



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

SIMONE LARA DE OMENA SILVA

EFEITO ANTICÂNCER DE DERIVADOS SINTÉTICOS DA CUMARINA

**MACEIÓ-AL,
2020.**

SIMONE LARA DE OMENA SILVA

EFEITO ANTICÂNCER DE DERIVADOS SINTÉTICOS DA CUMARINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Emiliano de Oliveira Barreto.
Co-orientador: Dr. Renato Santos Rodarte.

**MACEIÓ-AL,
2020.**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

S586e Silva, Simone Lara de Omena.
Efeito anticâncer de derivados sintéticos da cumarina / Simone Lara de Omena Silva.
– 2020.
66 f. : il. ; figs. color.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.
Coorientador: Renato Santos Rodarte.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 53-66.

1. Câncer. 2. Transição epitélio-mesenquimal. 3. Fármacos antitumorais. 4. Cumarina.
5. Metástase. I. Título.

CDU: 616-006.0: 615.4

Universidade Federal de Alagoas Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde	ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões Av. Lourival Melo Mota, 578 Cidade Universitária - Maceió-AL CEP: 57072-900 E-mail: ppgcs9@gmail.com Fone: 82 3214 1850
--	--

Folha de Aprovação

Simone Lara de Omena Silva

Efeito anticâncer de derivados sintéticos da cumarina

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 30 de junho de 2020.

Banca Examinadora



Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto (Orientador)



Prof. Dr. Janylle Nunes de Souza Ferro (UFAL)



Prof. Dr. Marvin Paulo Lins (UNINASSAU)

AGRADECIMENTOS

A Deus que mais uma vez me provou que a sua misericórdia e o seu amor não têm limites e que me mostrou, mesmo desacreditada de mim, que Nele tudo posso.

À minha mãe Leticia, a pessoa que mais pediu a Deus para que eu chegasse até aqui. Eu estou certa de que a sua fé e o seu amor me sustentaram. Obrigada por cada oração, por cada dia e noite que cuidou do meu filho para que eu conseguisse... Eu consegui! E ao meu pai Jorge, que mesmo achando que já estudei demais na vida, sempre acreditou na minha capacidade e soube me consolar nos momentos que precisei. Obrigada.

Ao meu filho Luiz Felipe, que chegou na minha vida de repente, bagunçando tudo o que eu havia programado para mim. Mas me mostrando que eu não fazia ideia de que a felicidade estava bem ali, na simplicidade de um gesto, de um sorriso ou de um abraço que, muitas vezes, me fez levantar e ter forças para continuar lutando. Obrigada, meu amor, por me fazer alguém melhor do que eu era antes de você!

Ao meu esposo Felipe, por todo apoio que foi essencial durante esses anos. Ele acreditou em mim quando nem eu mesma acreditava e aguentou todas as adversidades ao meu lado, sem largar a minha mão. Obrigada por cada palavra de consolo e de incentivo, por não desistir de mim, por me enxergar melhor do que eu sou e, principalmente, por ter o dom de me fazer sentir paz.

À Tay, que foi de colega de laboratório à madrinha de casamento e hoje é uma amiga que levarei por toda a vida. Eu poderia preencher todas as páginas dessa dissertação com motivos para agradecê-la, mas prefiro mandar um áudio de 5 min (brincadeira). Para resumir, a Tay foi o alicerce, onde eu me apoiei tantas vezes para não cair, e mesmo não estando tão firme, ela me segurou... E essas coisas a gente não esquece.

À Clarice, uma amiga que a graduação me apresentou, mas que foi presente de Deus em minha vida. Minha mãe costuma falar “se não fosse a Clarice, você estava perdida!” Talvez ela não saiba, mas os discursos curtos e grossos dela me serviram como um “acorda para a vida”... E à Regi, minha irmã de coração, que ouviu cada desabafo com paciência, sempre tentando encontrar uma solução para os meus problemas. Nessa vida a gente sente quem torce por nós e sabe quem corre ao nosso lado. Eu sei que posso contar com vocês, obrigada.

Ao professor Renato que foi meu orientador durante a graduação e co-orientador durante o mestrado. Obrigada por toda credibilidade, por toda a paciência e por toda a disponibilidade de sempre... E ao meu orientador, professor Emiliano, que conduziu o rumo dessa pesquisa e foi tão presente cada vez que precisei. Obrigada.

Aos meus colegas de laboratório Marcus, Camila e Julianderson por toda ajuda e companheirismo. Sou grata a Camila por dar continuidade aos meus experimentos durante a licença maternidade e ao Julianderson por, pacientemente, me acompanhar nos experimentos e me ensinar sobre os protocolos quando meu projeto precisou mudar. Obrigada!

Tudo posso naquele que me fortalece!

FILIPENSES 4; 13.

RESUMO

O câncer é um conjunto de doenças que se caracterizam pela proliferação descontrolada de células malignas com a capacidade de invadir tecidos e órgãos adjacentes. Este problema de saúde pública é mundial e está entre as seis maiores causas de morte. Dentre os mais de cem tipos, o câncer de pulmão é o mais incidente e mais mortal entre homens e mulheres no mundo. Apesar do avanço da química medicinal, os altos índices de mortalidade relacionados ao câncer de pulmão, se devem à falta de tratamentos específicos e às respostas pouco eficazes dos quimioterápicos usados para tratar esta doença. Sabendo que a transição epitélio-mesenquimal (TEM) confere às células propriedades migratórias e invasivas e que a migração celular depende deste processo para acontecer, a descoberta de uma substância que atue inibindo a TEM em células tumorais se torna um alvo interessante para a investigação e desenvolvimento de um novo fármaco com propriedades antitumorais mais eficazes. Nesse sentido, o objetivo geral desse trabalho foi avaliar a atividade anticâncer de derivados sintéticos da cumarina em linhagens tumorais e identificar sua potencial ação na modulação da TEM *in vitro*. Para a análise da viabilidade celular, foram realizados ensaios do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) em duas linhagens de células tumorais: A549 (adenocarcinoma pulmonar humano) e H2170 (carcinoma pulmonar humano), tratadas com os derivados sintéticos da cumarina por 24h, na concentração de 12 μM e o controle quimioterápico cisplatina (132,84 μM). Para avaliação da interferência dos derivados na TEM e na migração celular, foram realizados o ensaio de indução da TEM e por fim, o ensaio de migração horizontal, ambos em células A549 tratadas com os derivados 106, 123A e 123B na concentração de 12 μM , estimuladas ou não com IL-1 β por 24h. O tratamento com os derivados 106 e 123B reduziram, significativamente, a taxa de viabilidade em células A549 e H2170. Já o derivado 123A reduziu a taxa de viabilidade, apenas, em células A549. Apenas o tratamento com o derivado 106 foi capaz de atenuar as alterações morfológicas, relacionadas a TEM (transição epitélio-mesenquimal), em células A549 estimuladas por IL-1 β . Mas todos os três derivados foram capazes de reduzir a taxa de migração celular, induzida por IL-1 β em células A549. Os resultados obtidos sugerem que os derivados 106, 123A e 123B apresentam efeito antitumoral por mecanismos distintos e que independem das alterações morfológicas para um fenótipo mesenquimal. Sabendo que a proliferação, a migração e a TEM são cruciais para o desenvolvimento do câncer e da metástase tumoral e que o derivado 106 interferiu de forma significativa esses três processos em células A549, o derivado 106 mostrou ser um interessante alvo para o aprofundamento desse estudo na busca por uma substância antitumoral mais eficaz para o câncer de pulmão.

Palavras-chave: Cumarina. A549. IL-1 β . Transição epitélio-mesenquimal. Metástase.

ABSTRACT

Cancer is a set of diseases that are characterized by uncontrolled proliferation of malignant cells with the ability to invade adjacent tissues and organs. This public health problem is worldwide and is among the top six causes of death. Among the more than one hundred types, lung cancer is the most incident and deadliest among men and women in the world. Despite the advancement of medicinal chemistry, the high mortality rates related to lung cancer are due to the lack of specific treatments and the ineffective responses of chemotherapeutic drugs used to treat this disease. Knowing that the epithelial-mesenchymal transition (EMT) gives cells migratory and invasive properties and that cell migration depends on this process to happen, the discovery of a substance that acts by inhibiting EMT in tumor cells becomes an interesting target for research and development of a new drug with more effective antitumor properties. In this sense, the general objective of this work was to evaluate the anticancer activity of coumarin syntactic derivatives in tumor lines and to identify their potential action in the modulation of EMT *in vitro*. For the analysis of cell viability, MTT assays (3- [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) were performed on two tumor cell lines: A549 (human pulmonary adenocarcinoma) and H2170 (human lung carcinoma), treated with synthetic coumarin derivatives for 24h, at a concentration of 12 μ M and chemotherapy control cisplatin (132,84 μ M). To assess the interference of derivatives in EMT and cell migration, the EMT induction assay and, finally, the horizontal migration assay, both in A549 cells treated with derivatives 106, 123A and 123B at 12 μ M, stimulated or not with IL-1 β for 24 hours. Treatment with derivatives 106 and 123B significantly reduced the viability rate in A549 and H2170 cells. Derivative 123A reduced the viability rate, only, in A549 cells. Only treatment with derivative 106 was able to attenuate the morphological changes, related to EMT (epithelium-mesenchymal transition), in A549 cells stimulated by IL-1 β . But all three derivatives were able to reduce the rate of cell migration, induced by IL-1 β in A549 cells. The results obtained suggest that derivatives 106, 123A and 123B have an anti-tumor effect through different mechanisms and are independent of morphological changes for a mesenchymal phenotype. Knowing that proliferation, migration and EMT are crucial for the development of cancer and tumor metastasis and that derivative 106 significantly interfered with these three processes in A549 cells, derivative 106 proved to be an interesting target for further study in the search for a more effective antitumor substance for lung cancer.

Keywords: Coumarin. A549. IL-1 β . Epithelial-mesenchymal transition. Metastasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estágios da carcinogênese -----	14
Figura 2 – Estimativa para os tipos de câncer mais incidentes no Brasil em 2020 -----	15
Figura 3 – Aspectos celulares da Transição epitélio-mesenquimal -----	19
Figura 4 – Transição epitélio-mesenquimal em células tumorais -----	20
Figura 5 – Cumarina -----	25
Figura 6 – Estruturas químicas das cumarinas -----	26
Figura 7 – Estrutura química dos derivados sintéticos da cumarina -----	33
Figura 8 – Efeito dos derivados cumarínicos sobre a viabilidade de células A549 -----	35
Figura 9 – Efeito dos derivados 106, 123 A e 123B sobre a viabilidade de células A549 -	36
Figura 10 – Efeito dos derivados 106, 123A e 123B sobre a viabilidade de células H2170 -----	37
Figura 11 – Efeito do derivado 106 na variação morfológica induzida pela transição epitelial-mesenquimal em células A549 -----	38
Figura 12 – Efeito do derivado 123A na variação morfológica induzida pela transição epitelial-mesenquimal em células A549 -----	39
Figura 13 – Efeito do derivado 123B na variação morfológica induzida pela transição epitelial-mesenquimal em células A549 -----	40
Figura 14 – Efeito do derivado 106 na migração horizontal de células A549 -----	41
Figura 15 – Efeito do derivado 123A na migração horizontal de células A549 -----	42
Figura 16 – Efeito do derivado 123B na migração horizontal de células A549 -----	43

LISTA DE ABREVIATURAS

%: por cento;

°C: graus célsius;

<: menor que;

±: mais ou menos;

μL: Microlitros;

μM: Micromolar;

μg: Micrograma;

106: Composto derivado da cumarina sintético;

123 A: Composto derivado da cumarina sintético;

123 B: Composto derivado da cumarina sintético;

A-431: linhas celulares de câncer de pele;

A549: adenocarcinoma pulmonar humano;

ACS: american cancer society;

ATP: adenosina trifosfato;

Beas-2B: epitélio brônquico humano;

Cl: cloro;

CO₂: carbono;

CPNPC: carcinomas de pulmão de não pequenas células;

CPPC: carcinomas de pulmão de pequenas células;

CSC: células-tronco cancerígenas;

DCB: diclorobenzeno;

DMSO: dimetilsulfóxido;

EPM: erro padrão da média;

EROs: espécies reativas de oxigênio;

F₃C: trifluorometil;

FF2441: linhagem de células normais de fibroblastos;

g: grama;

h: hora;

H157: carcinoma de células escamosas do pulmão;

H2170: carcinoma pulmonar humano;

H322: carcinoma de pulmão;

H₃CO: metoxilo;

HDAC: histona desacetilase;

HDACis: inibidores de histona desacetilase;

Hela: adenocarcinoma de colo do útero;

HepG2: carcinoma hepatocelular;

HO: hidroxila;

HSP90: proteína de choque térmico;

IARC: agência internacional de pesquisa sobre o câncer;

IC₅₀%: concentração inibitória de 50%;

IL: interleucina;

IL-1 β : interleucina 1- β ;

INCA: instituto nacional do câncer;

IUPAC: união internacional de química pura e aplicada;

L-02: fígado humano;

MAT: microambiente tumoral;

MCF-7: adenocarcinoma de mama metastático;

MDA-MB-231: adenocarcinoma de mama metastático;

mg: miligrama;

mL: mililitro;

mM: Milimolar;

MS: ministério da saúde;

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio;

N: nitrogênio;

nm: nanômetro;

nM: Nanomolar;

ng: nanograma;

O: oxigênio;

OMS: organização mundial da saúde;

OPAS: organização pan-americana da saúde;

p.: página;

PBS: solução de tampão fosfato salino;

PC-3: carcinoma de próstata;

SAHA: ácido hidroxâmico suberoilânilda;

SAR: relação estrutura-atividade;

SES/SP: secretaria da saúde de são paulo;

TEM: transição epitélio-mesenquimal;

TNF- α : fator de necrose tumoral α ;

U.A.: unidade arbitrária;

UACC 903: câncer de melanoma;

VEGFR-2: receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular;

WHO: world health organization.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA	13
2.1 O câncer.....	13
2.1.1 Estimativa, incidência e mortalidade	14
2.1.2 Câncer de pulmão	15
2.1.3 Inflamação e o câncer	16
2.1.3.1 Transição epitélio-mesenquimal	19
2.1.4 Metástase	20
2.1.5 Quimioterapia	21
2.2 Química medicinal	22
2.3 Cumarinas	24
2.3.1 Metabólitos secundários	24
2.3.2 Classificação	25
2.3.3 Atividades biológicas	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 METODOLOGIA	30
4.1 Derivados sintéticos da cumarina	30
4.2 Síntese química	32
4.3 Cultura de linhagens celulares de câncer humano.....	30
4.4 Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	30
4.5 Indução da transição epitélio-mesenquimal.....	31
4.6 Ensaio de migração horizontal.....	32
4.7 Análises estatísticas	32
5 RESULTADOS	33
5.1 Síntese dos compostos cumarínicos	33
5.2 Efeito dos derivados sintéticos da cumarina sobre a viabilidade de células tumorais ...	35
5.2.1 Efeito dos derivados de cumarina sobre a linhagem de células A549	35
5.2.2 Efeito dos derivados de cumarina sobre a linhagem de células H2170	37

5.3 Efeito dos derivados da cumarina sobre a variação morfológica induzida pela transição epitelial-mesenquimal	38
5.4 Efeito dos derivados de cumarina sobre a motilidade de células A549	41
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	49
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS): “câncer é um grande grupo de doenças que tem como característica a rápida criação de células anormais que crescem além de seus limites habituais e podem invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos” (OPAS/OMS, 2018). A mais recente estimativa mundial, em 2018, da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) aponta que ocorreram 18,1 milhões de novos casos de câncer, e desses, 9,6 milhões foram levados a óbito (BRAY *et al*, 2018). Dentre todos os tipos de câncer (excluindo as neoplasias de pele não melanomas), o câncer de pulmão ocupa a primeira posição em incidência e mortalidade no mundo, se tornando um dos principais problemas de saúde pública e ocupando a 6ª maior causa de morte (WHO, 2018). No Brasil, o câncer de pulmão tornou-se o terceiro mais comum e foi responsável por 27.929 mortes em 2017 (INCA, 2020).

O tratamento mais usado para o câncer de pulmão ainda é a quimioterapia, visto que a realização da cirurgia para retirada do tumor não se torna possível na maioria dos casos, pois o paciente quando diagnosticado já se encontra em um estágio avançado da doença (INCA, 2020). A busca por um fármaco antitumoral mais efetivo e seletivo ou o estudo de novas estratégias que impeçam o avanço de tumores malignos tem ganhado muita importância (BRANDÃO, 2010), considerando que a maioria desses medicamentos, disponíveis no mercado atual, possui pouca especificidade, afetando também as células saudáveis, causando muitos efeitos colaterais (VIEIRA; GAMARRA, 2016), o que pode agravar ainda mais a recuperação do paciente (ZANDI *et al*, 2010).

Do ponto de vista clínico, a metástase é a fase mais crítica da tumorigênese, pois 90% da mortalidade de pacientes com câncer estão relacionadas às consequências da lesão metastática e não ao tumor primário, diretamente (TAO *et al*, 2016). Por este motivo, pesquisadores têm tentado elucidar os aspectos subjacentes às metástases (SLEEMANA *et al*, 2012). Sabendo que a transição epitélio-mesenquimal (TEM) é um processo importante que antecede à metástase, pois confere às células maior mobilidade e capacidade invasiva, (TAYLOR *et al* 2010), a descoberta de uma substância que atue na inibição da TEM em células tumorais se torna um alvo interessante para a investigação e desenvolvimento de um novo fármaco com propriedades antitumorais e antimetastáticas.

Como alternativas para o desenvolvimento de novos fármacos estão os compostos de origem natural, muito usados nos tratamentos de diferentes doenças, devido a sua ampla diversidade estrutural e funcional que possibilita a realização de modificações químicas na intenção de potencializar sua atividade farmacológica, além de apresentarem efeitos menos tóxicos (MOLLICA *et al*, 2012; KOPARDE *et al*, 2019). Porém, o isolamento de compostos naturais é, geralmente, complexo e de baixo rendimento. Somado a isto, a busca por respostas mais rápidas por interesse das indústrias farmacêuticas fizeram com que o desenvolvimento dos métodos de síntese orgânica ganhasse espaço (LI; VEDERAS, 2009), destacando a sua importância para uma maior exploração da estrutura química e identificação de alvos macromoleculares não explorados, possibilitando a descoberta de novos protótipos de fármacos com diferentes ações (SANGI, 2016).

Neste contexto, encontram-se as cumarinas, metabólitos secundários presentes em muitos vegetais, alguns fungos e algumas bactérias (VENUGOPALA *et al*, 2013). Estes compostos possuem uma estrutura química formada por anéis benzeno e α -pirona fusionados (MAGGI *et al*, 2011), um arranjo privilegiado para a síntese de compostos que podem interagir com diferentes alvos terapêuticos (DESIMONE *et al*, 2004), à medida que o padrão de substituição dessa estrutura determina o seu perfil de atividade (RIVEIRO *et al*, 2010). O presente estudo investigou o efeito anticâncer de novos derivados sintéticos da cumarina em diferentes linhagens tumorais e identificou sua ação na modulação da transição epitélio-mesenquimal *in vitro* em linhagem tumoral de adenocarcinoma pulmonar humano (A549).

2 REVISÃO DE LITERATURA

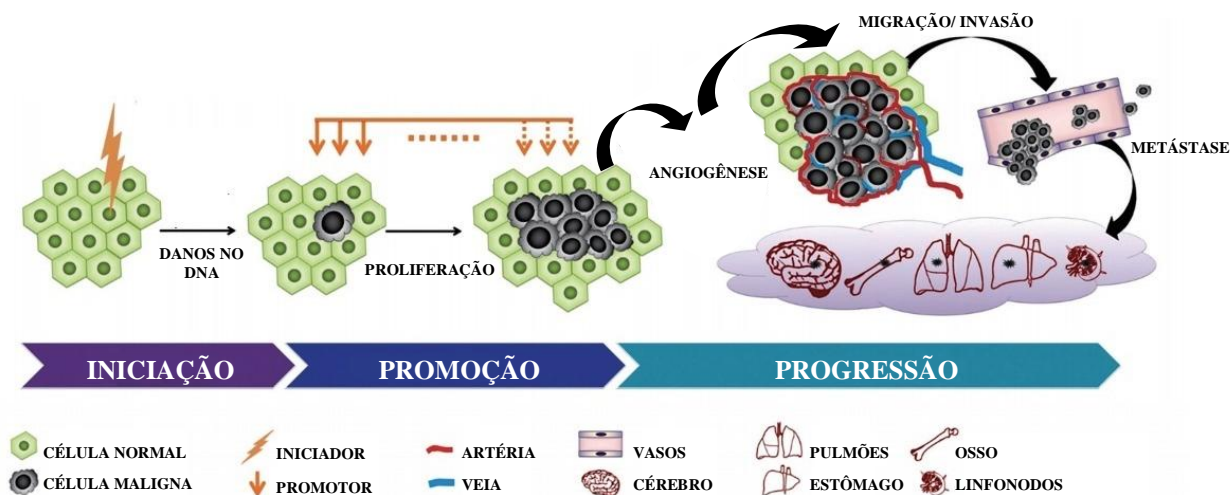
2.1 O câncer

Câncer, neoplasia ou tumor maligno são nomes dados a um conjunto de doenças que pode afetar quase todos os tecidos ou órgãos do corpo. Ocorre quando células anormais crescem incontrolavelmente, ultrapassam seus limites usuais e invadem tecidos e órgãos adjacentes, podendo se espalhar para outros órgãos distantes (WHO, 2020). Os tumores (crescimentos anormais de células) ocorrem devido a falhas nos mecanismos reguladores que supervisionam o crescimento e desenvolvimento das células. Se o tumor permanecer localizado na área que se originou, apresenta pouco risco à saúde e é designado benigno. Já a capacidade de invadir e destruir tecidos saudáveis do corpo é característica de tumores malignos (COSTA, 2020).

Apenas de 5% a 10% dos cânceres resultam da herança genética, a maior parte é resultado dos danos ao material genético que as células sofrem ao longo da vida (INUMARU *et al*, 2011). Esses danos podem ocorrer em genes denominados proto-oncogenes (inativos em células normais), se ativados passam a se chamar de oncogenes, sua função é transformar a célula normal em maligna. O processo de transformação de uma célula maligna em um câncer pode durar até anos e é chamado de carcinogênese ou oncogênese (INCA, 2019). A carcinogênese pode iniciar-se espontaneamente ou através da exposição a agentes carcinógenos (fatores químicos, físicos ou biológicos) em uma determinada frequência e tempo e pela interação entre eles. Em qualquer dos casos há a inferência de alterações mutagênicas e não-mutagênicas ou epigenéticas nas células (WHO, 2020).

Há três estágios que dividem a carcinogênese (figura 1). O estágio de iniciação, onde os genes são expostos aos agentes cancerígenos; o estágio de promoção, onde a célula que já teve o material genético alterado sofre ação dos agentes oncopromotores e o estágio de progressão, onde a célula cancerosa se multiplica de maneira descontrolada e irreversível (MS, 2019).

Figura 1 – Estágios da carcinogênese



Uma célula normal, cujo material genético sofreu alteração, passa a receber instruções erradas para suas atividades, podendo se tornar maligna (cancerosa) e proliferar, dando origem a novas células iguais a ela. Na fase de iniciação, as células se encontram geneticamente alteradas, mas nenhum tumor é detectado. Na fase de promoção, as células alteradas são transformadas em malignas, lenta e gradualmente, para isso deve haver um longo e contínuo contato com o agente cancerígeno promotor. Na fase de progressão, o câncer está formado e em constante evolução, surge as primeiras manifestações clínicas da doença. As células cancerosas multiplicam-se de maneira descontrolada, comprometendo os órgãos afetados. Em alguns casos, as células malignas se desprendem do tumor e migram para outros tecidos, através dos vasos sanguíneos e linfáticos, em um processo denominado metástase (adaptado de Liu *et al*, 2015).

2.1.1 Estimativa, incidência e mortalidade

O câncer é um dos mais graves problemas de saúde pública e independe de riqueza ou classe social. Na última década, quase todos os países tiveram aumento de casos da doença e essas taxas tendem a aumentar em pelo menos 60% nos próximos 20 anos. Em 2020, a cada cinco pessoas, uma enfrentará um histórico de câncer durante a vida e em 2040 esses números dobrarão (WHO, 2020). A mais recente estimativa mundial da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) aponta que, no ano de 2018, ocorreram cerca de 18,1 milhões de novos casos de câncer no mundo. Dentre esses, foram registrados 9,6 milhões de óbitos (BRAY *et al*, 2018).



As taxas de mortalidade variam de acordo com os países e os tipos de cânceres. Tais variações se dão pelos diferentes modos de vida, exposições a fatores de riscos já conhecidos ou putativos, os padrões de prática médica e da infraestrutura na saúde (WILD *et al*, 2020). Cerca de 70% das mortes por câncer no mundo ocorrem nos países de baixa e média renda (PLUMMER *et al*, 2016), isso pode ser explicado pelo diagnóstico tardio e a indisponibilidade de tratamentos nesses países. No ano de 2017, apenas 26% dos países de

baixa e média renda relataram a disponibilidade dos serviços de patologia no setor público, enquanto nos países de alta renda 90% relataram disponibilidade (STEWART; WILD, 2014).

Os fatores de riscos relacionados ao modo de vida, como: obesidade, má alimentação, inatividade física e o consumo de álcool e tabaco contribuem para um terço das mortes por câncer no mundo, sendo o tabagismo responsável por 22% delas (OPAS/OMS, 2018). Observou-se uma mudança no número de casos por tipos de câncer em países em desenvolvimento, onde os tipos associados a agentes infecciosos foram reduzidos, já os tipos associados aos modos de vida tiveram um aumento (BRAY *et al*, 2018).

No Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022, de acordo com os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), é de 625.000 novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes serão o de pele não melanoma, seguido pelos cânceres de mama e próstata, cólon e reto e pulmão. Com exceção do câncer de pele não-melanoma, para os homens os tipos mais comuns serão: próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), traqueia, brônquio e pulmão (7,9%) e para as mulheres: mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), traqueia, brônquio e pulmão (5,6%), figura 2 (INCA, 2020). O câncer é a segunda principal causa de morte prematura no Brasil, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (OPAS/OMS, 2018).

Figura 2 – Estimativa para os tipos de câncer mais incidentes no Brasil em 2020.

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.520	9,1%	Homens	Mulheres	Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.180	5,0%			Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema Nervoso Central	5.220	2,3%

* Números arredondados para múltiplos de 10

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer (exceto pele não-melanoma) mais incidentes, estimados para 2020 no Brasil (INCA, 2020).

2.1.2 Câncer de pulmão

O câncer de pulmão ocupa a primeira posição em incidência e mortalidade no mundo. Em 2018, surgiram 2,1 milhões de novos casos, onde 1,37 milhão foram em homens e 725 mil em mulheres (BRAY *et al*, 2018; FERLAY *et al*, 2018), no mesmo ano esta doença

causou 1,8 milhões de óbitos (WHO,2020). Apesar do câncer de pulmão ser o quinto mais comum no Brasil, ainda é o mais mortal. Em 2017, ocasionou 16.137 óbitos em homens e 11.792 em mulheres, representando 84,74% de mortalidade, a maior dentre todos os tipos de câncer. Para cada ano do triênio 2020-2022, estima-se 17.760 novos casos em homens e 12.440 em mulheres, com média de sobrevida de 15% e 21% em cinco anos, respectivamente, o que gera cerca de 15 mil e 10 mil óbitos por ano entre homens e mulheres acometidos por essa patologia (INCA, 2020).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão ainda são o tabagismo e a exposição passiva ao tabaco. Cerca de 85% dos casos de câncer de pulmão estão relacionados ao consumo de derivados de tabaco no Brasil, o INCA aponta que mais de 156 mil mortes, por ano, poderiam ser evitadas se o tabaco não fosse usado (INCA, 2019). No mundo, 63% das pessoas que morrem por câncer de pulmão eram fumantes ou ex-fumantes (WHO, 2018). Existem ainda outros fatores de risco para o câncer de pulmão, como a exposição a agentes químicos ou físicos (asbesto, sílica, urânio, cromo e radônio) e altas doses de suplementos de betacaroteno em fumantes e ex-fumantes (ACS, 2019; INCA, 2019).

De acordo com a American Cancer Society (2019), o câncer de pulmão pode ser dividido em dois grandes grupos. O primeiro é composto pelos Carcinomas de Pulmão de Não Pequenas Células (CPNPC), são mais frequentes (80% a 85% dos casos) e formados pelos subtipos: adenocarcinoma, carcinoma epidermoide, carcinoma de células grandes, carcinoma adenoescamoso e carcinoma sarcomatoide. O segundo é composto pelos Carcinomas de Pulmão de Pequenas Células (CPPC) que são menos frequentes (10% a 15% dos casos). Há ainda os tumores carcinoides do pulmão, carcinoma adenoides císticos, linfomas e sarcomas.

Tanto em países desenvolvidos como no Brasil, os CPNPC, geralmente, são diagnosticados em seus estágios avançados, apresentando assim, baixas taxas de sobrevida. Em geral, 70% dos pacientes diagnosticados apresentam doença localmente avançada - estágio III ou metastática - estágio IV (SES/SP, 2015). Enquadram-se nesse grupo, as linhagens A549 (adenocarcinoma pulmonar) e H2170 (carcinoma pulmonar de células escamosas) testadas no presente estudo.

2.1.3 Inflamação e câncer

A relação entre inflamação e câncer data de 1863, quando o patologista alemão Rudolf Carl Virchow (1821-1902) levantou a hipótese de que um câncer poderia surgir em locais de

inflamação crônica (COUSSENS; WERB, 2002; ATSUMI *et al*, 2013). De fato, as células inflamatórias e seus mediadores estão presentes no microambiente tumoral, independente do seu estágio de desenvolvimento, e são encontradas usualmente em biópsias tumorais (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010). A inflamação aguda e transitória tem como função o controle e reparo de tecidos danificados, já a inflamação associada ao câncer é crônica e tem como função promover a progressão tumoral (SUAREZ-CARMONA *et al*, 2017).

As condições inflamatórias crônicas, como doença pulmonar obstrutiva crônica ou colite ulcerosa, estão fortemente associadas à elevada incidência de câncer (COLLINS *et al*, 1987; WILSON *et al*, 2008; HOUGHTON *et al*, 2013). O uso crônico de aspirina ou outros anti-inflamatórios não esteróides reduz a mortalidade de cânceres de esôfago, colo-retal e pulmão (CUZICK *et al*, 2009; ROTHWELL *et al*, 2011). A inflamação desregulada é reconhecida como uma das características do câncer e está envolvida na iniciação, progressão e metástase do tumor (COUSSENS *et al*, 2002; GRIVENNIKOV *et al*, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O microambiente tumoral (MAT) é um tecido complexo que apresenta distorções da homeostasia do tecido original, onde as células normais são reprogramadas para agir em função das células neoplásicas (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010). O MAT é formado pelas células neoplásicas e o estroma ao seu redor, contendo fibroblastos, células endoteliais, pericitos e proteínas da matriz extracelular, além de células imunes adaptativas (linfócitos T e B) e células imunes inatas, como: macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células supressoras derivadas da linhagem mieloide, células dendríticas e células natural killer (FIGUEIRDO, 2019).

Essas diferentes células comunicam-se diretamente ou através da produção de citocinas e quimiocinas para controlar o desenvolvimento tumoral. Os fatores que determinarão se a inflamação promoverá o crescimento tumoral ou a imunidade antitumoral são as expressões dos vários mediadores e moduladores imunes, a abundância e ativação dos diversos tipos de células no MAT (SMYTH *et al*, 2006; LIN; KARIN, 2007). A expressão de citocinas e quimiocinas no MAT pode ser mais relevante do que seu conteúdo de células imunes. Independente da célula que as produziram, as citocinas podem promover ou inibir o desenvolvimento tumoral (LIN; KARIN, 2007).

A inflamação constante no MAT promove a proliferação celular, angiogênese e sobrevivência das células tumorais, influenciando na migração e contribuindo, assim para a disseminação e metástase (PEREIRA, 2009). O câncer tem além de um controle interno sobre o MAT, um controle externo ao tumor, no qual influencia o recrutamento de células

circundantes para sustentar seu crescimento e disseminação, induzindo, através de sinalizações supressoras, a quase destruição dos mecanismos de resistência do hospedeiro (FIGUEIREDO, 2019).

Os macrófagos associados a tumores são umas das células imunes mais importantes na área de inflamação e câncer e uma importante fonte de citocinas (MANTOVANI *et al*, 2008). Essas células são responsáveis, principalmente, pelo crescimento tumoral e são essenciais para a angiogênese, invasão e metástase (CONDEELIS; POLLARD, 2006), a abundância de macrófagos no microambiente tumoral, geralmente, se correlaciona com mau prognóstico (MURDOCH *et al*, 2008). Os macrófagos expressam altos níveis de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-14, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13 e IL-23 (SICA *et al*, 2008).

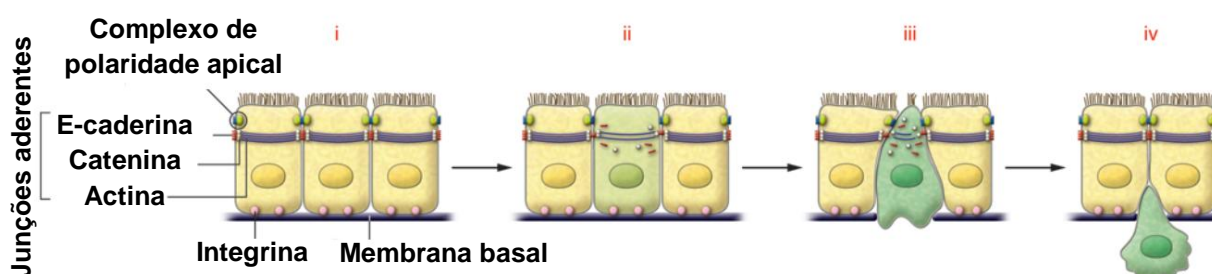
A interleucina-1 beta (IL-1 β) é uma citocina pró-inflamatória que está relacionada com a progressão de tumor em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC). Um estudo de Wu e colaboradores (2016), relatou um alto nível de IL-1 β sérica em pacientes com CPNPC, quando comparados com pessoas saudáveis. O aumento de IL-1 β está relacionado com a baixa sobrevida. Um estudo semelhante concluiu que os níveis elevados de IL-1 β sérica se correlacionavam com a baixa sobrevida livre de progressão em pacientes com CPNPC (MC LOED *et al*, 2016). Outro estudo investigou sobre respostas inflamatórias relacionadas ao câncer de pulmão em estágio inicial e revelou que os altos níveis de IL-1 β estavam associados a mortalidade de três anos no adenocarcinoma (MILLARES *et al*, 2018). Somado a esses estudos, um estudo de caso-controle percebeu que o aumento do antagonista do receptor de IL-1 está associado a uma redução do risco de câncer de pulmão (SHIELS *et al*, 2013).

Estudo de resultados de trombose anti-inflamatória de canacimumabe (CANTOS - Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study) mostrou a inibição de IL-1 β com diminuição da incidência e da mortalidade de pacientes com câncer de pulmão (RIDKER *et al*, 2017). Diversos estudos demonstraram que a exposição aguda a IL-1 β induz a expressão de genes associados à transformação, invasão e metástase em várias doenças malignas, incluindo câncer de pulmão (POLD *et al*, 2004; KRYSAN *et al*, 2005; DOHADWALA *et al*, 2006; LEE *et al*, 2008; St JOHN *et al*, 2009; WU *et al*, 2016; MASOLA *et al*, 2019). O impacto da exposição crônica a IL-1 β , que pode ser mais fisiologicamente relevante, foi mostrado por Li e colaboradores (2020) com percepções mecanicistas que implicam a inflamação crônica regulada por IL-1 β como componente central na carcinogênese e metástase. Assim, a inibição dessa via pode contribuir para a prevenção e tratamento do CPNPC.

2.1.3.1 Transição epitélio-mesenquimal

As células tumorais desprendem-se do tumor primário e adquirem a capacidade de migração e invasão a partir da redução de interações célula-célula (SILVA, 2016). Para isso, as células epiteliais malignas passam por um processo denominado transição epitélio-mesenquimal (TEM), caracterizado pela mudança do fenótipo epitelial para o mesenquimal da célula, levando a perda ou redução na expressão de marcadores específicos de células epiteliais e o aumento na expressão de marcadores típicos de células mesenquimais (FORONI *et al*, 2011; SIGURDSSON *et al*, 2011). A mudança do estado epitelial para mesenquimal altera as moléculas de adesão expressas pela célula, as quais passam a apresentar comportamento migratório e invasivo (BEERLING *et al*, 2018), figura 3.

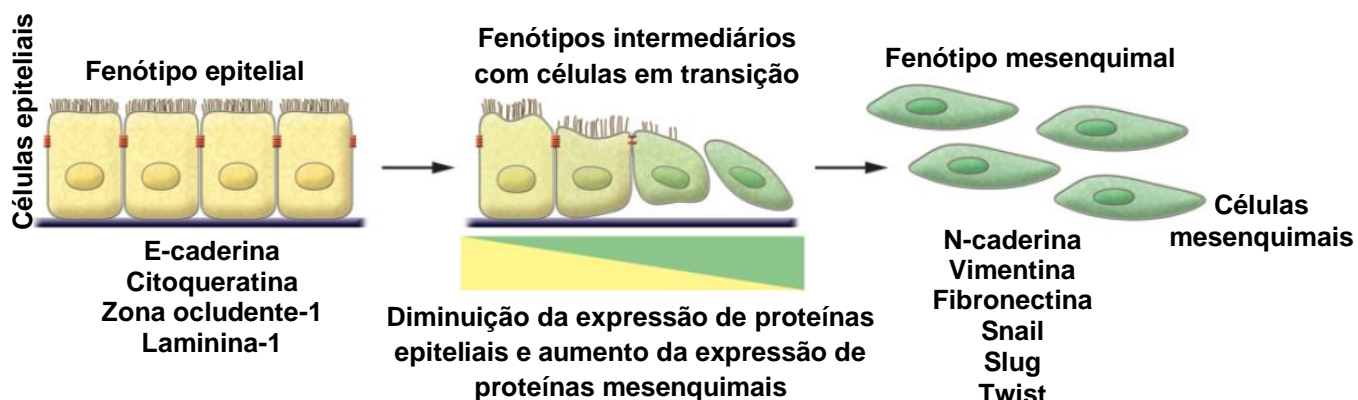
Figura 3 – Aspectos celulares da Transição epitélio-mesenquimal



(i) células epiteliais normais e suas junções aderentes: E-caderina em conjunto com anéis de catenina e actina. As junções de oclusão estão associadas com os complexos de polaridade apical e as integrinas interagem com componentes da membrana basal. (ii) perda de adesão célula-célula. Indutores da TEM reprimem a transcrição dos genes que codificam os componentes de aderência e das junções de oclusão, induzindo a perda da polaridade celular. E-caderina é degradada. (iii) Decomposição da membrana basal e constrição apical. A remodelação do citoesqueleto favorece a delaminação das células, através da indução da constrição apical e reorganização da membrana basal. (iv) delaminação celular e invasão. A expressão de receptores de integrina e ativação contínua de metaloproteases favorecem a migração através da matriz extracelular e a invasão dos tecidos adjacentes (Adaptado de Acloque *et al*, 2009).

A transição epitélio-mesenquimal é, geralmente, ativada por citocinas inflamatórias do microambiente tumoral em respostas patológicas. Durante a TEM, o citoesqueleto da célula é reorganizado, onde fibras de tensão ocupam o lugar da actina periférica e vimentinas ocupam o lugar dos filamentos de citoqueratina. Conseqüentemente, as células passam de um formato cuboide para um formato fusiforme, além de adquirirem capacidade invasiva e maior mobilidade na matriz extracelular, já que perdem o contato célula-célula (HAY, 1995; HOLLIER *et al*, 2009; TAYLOR *et al* 2010), figura 4.

Figura 4 – Transição epitélio-mesenquimal em células tumorais



A transição epitélio-mesenquimal envolve uma mudança funcional de células epiteliais polarizadas para células mesenquimais móveis, diminuindo a expressão de proteínas epiteliais e aumentando a expressão de proteínas mesenquimais, responsáveis pela motilidade da célula (Adaptado de Kalluri e Weinberg, 2009).

A presença da E-caderina está associada a perda da vimentina, características das células epiteliais. Já a perda de E-caderina e o aumento de vimentina é observado em células mesenquimais. Interessantemente, este padrão mesenquimal existe em células neoplásicas epiteliais quando expressam fenótipo agressivo e migratório (GILLES *et al*, 2003; KOKKINOS *et al*, 2007; ONDER *et al*, 2008). A transição epitélio-mesenquimal é de suma importância para que a metástase ocorra, pois além de características migratórias e invasivas, as células vão adquirir resistência a apoptose e evasão imunológica (THIERY, 2002). Uma migração bem-sucedida para órgãos distantes necessita de TEM (YE; WEINBERG, 2015).

2.1.4 Metástase

Denomina-se metástase o processo de disseminação, acompanhado pela propagação de células tumorais em áreas distantes (COSTA, 2020). Para isso, as células utilizam, geralmente, as vias hematogênica e linfática (FILHO, 2013). Ao mesmo tempo em que o tumor progride, uma população de células heterogêneas surgem apresentando as mais diversas características: crescimento excessivo, desregulação proliferativa, angiogênese e aumento da mobilidade e da capacidade invasiva (WEBER, 2008; SLEEMANA *et al*, 2012).

O processo da metástase é complexo e engloba as seguintes etapas: ativação da TEM, no qual as células tumorais adquirem características migratórias e invasivas; invasão local, onde ocorre a degradação da lâmina basal e a organização da matriz extracelular que separa os

tecidos epiteliais do estroma; intravasamento, no qual as células tumorais entram na corrente sanguínea; capacidade de sobrevivência na corrente sanguínea; extravasamento, no qual as células tumorais chegam a um órgão específico; e por fim, o estabelecimento das células tumorais no órgão onde se formará a metástase (ARVELO *et al*, 2016).

O nicho metastático é um microambiente que apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento de tumores secundários. Acredita-se que haja um padrão entre os tumores e os órgãos específicos em que migram. É o caso de carcinomas de cólon que tendem a desenvolver metástase no fígado e no pulmão e quase nunca em ossos, pele ou cérebro. A formação do nicho metastático está associada à deposição de novos componentes da matriz extracelular, bem como à remodelação de seus constituintes, como por exemplo, a deposição de fibronectina, tenascina-C, periostina e versican (PONTES, 2011; SLEEMAN *et al*, 2012).

As metástases apresentam diferentes manifestações clínicas. Podendo aparecer logo que diagnosticado o câncer, sendo a primeira manifestação da doença ou surgir anos depois da retirada cirúrgica do tumor ou ainda ser reduzida após o tratamento (FILHO, 2013). A ocorrência de metástases pode ser comum a alguns tipos de tumores e está relacionada a uma das principais causas de morte em pacientes com câncer (WEBER, 2008; FILHO, 2013; WHO, 2020).

Por este motivo, pesquisadores têm voltado a atenção para tentar elucidar os aspectos subjacentes este processo (SLEEMANA *et al*, 2012). Os mecanismos bioquímicos e controles genéticos relacionados à aquisição do fenótipo invasivo e à disseminação metastática têm sido áreas de intensa pesquisa. Em muitos estudos, a ativação da TEM tem sido proposta como processo crítico na aquisição de fenótipos malignos para as células neoplásicas epiteliais (KALLURI; WEINBERG, 2009).

2.1.5 Quimioterapia

A escolha do tratamento adequado para o câncer vai depender do tipo, localidade e estágio do tumor. A cirurgia, quimioterapia e radioterapia são alguns dos tratamentos mais tradicionais e utilizados. Outras modalidades mais modernas incluem a terapia hormonal, terapia com células-tronco e imunoterapia (ABBAS; REHMAN, 2018). Elas podem ser usadas isoladas ou em conjunto, poucas neoplasias são tratadas com apenas uma modalidade terapêutica (INCA, 2019).

Para o câncer de pulmão, o tratamento de melhor resultado é cirúrgico, por possibilitar a retirada do tumor com uma margem de segurança. Porém, dependendo do estágio avançado

da doença e do quadro clínico debilitado do paciente, de 80-90% dos casos, a cirurgia não é possível (INCA, 2020), resultando na importância do desenvolvimento de novos fármacos antitumorais para este tipo de tumor. Sendo assim, o tratamento mais utilizado ainda vem sendo a quimioterapia (ZANDI *et al*, 2010), que se dá por meio do uso de medicamentos (quimioterápicos) que combatem as células malignas do tumor. Cada organismo reage de uma maneira diferente a um quimioterápico, por isso o paciente, geralmente, recebe uma combinação de vários desses terapêuticos de forma simultânea. Estes medicamentos se misturaram na corrente sanguínea e são levados a todas as partes do corpo (MS, 2020).

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto as normais (SALMONM, 1998; MURAD; KATZ *et al*, 2018). Isso ocorre pelo fato dos quimioterápicos, geralmente, atravessarem o endotélio em quase todas as regiões do organismo, após sua administração, alcançando tanto às células-alvo quanto às outras células que não estão relacionadas à doença, o que explica os efeitos adversos causados por esses medicamentos (VIEIRA; GAMARRA, 2016).

A quimioterapia vem alcançando êxitos notáveis na cura de alguns tipos de câncer, como a leucemia aguda infantil, linfomas e tumores sólidos derivados de células germinais. Por outro lado, não houve grandes avanços para o tratamento de tumores sólidos frequentes como o de mama, o de cólon, o de pâncreas e o de pulmão. O que explica os altos índices de mortalidade relacionados a estes tipos (NEWMAN *et al*, 2007). A falta de tratamentos específicos para muitos tumores, como por exemplo, o carcinoma de pulmão de células não-pequenas que responde, modestamente, aos quimioterápicos disponíveis, são grandes obstáculos no tratamento de doenças neoplásicas avançadas (KUMMAR *et al*, 2004). Diante deste contexto, há uma necessidade urgente pela identificação, pela avaliação e pelo desenvolvimento de novos fármacos antitumorais com melhor eficácia, de fácil administração e poucos ou insignificantes efeitos colaterais e reações adversas.

2.2 Química medicinal

A busca pelo alívio de dores e curas de doenças, através da ingestão de ervas e folhas, foram umas das primeiras formas do uso de produtos naturais como tratamento. O conhecimento da natureza pelos povos indígenas e primitivos foi fundamental para a descoberta de muitas substâncias que foram introduzidas na terapêutica e permanecem até hoje como medicamentos, como por exemplo, os alcaloides de Cinchona e Papaver (VIEGAS

JR.; BOLZANI, 2006). A maioria das substâncias orgânicas conhecidas são produzidas pela natureza, sendo o reino vegetal o responsável pela maior diversidade química conhecida e estudada na literatura (MONTANARI; BOLZANI, 2001). No início, os químicos limitavam os estudos das plantas ao isolamento e determinação estrutural de suas substâncias ativas, mas com a importância dada a esses organismos para a medicina, química e medicina passaram a ter uma estreita relação e um rápido avanço (YUNES; FILHO, 2001).

O avanço da química medicinal nos últimos anos permitiu a descoberta de fármacos inovadores, usados nos tratamentos de doenças que até então apresentavam altas taxas de mortalidade ou desabilitavam populações. As áreas de química orgânica, biologia molecular e estrutural, bioinformática e biotecnologia também favoreceram uma melhor compreensão dos processos fisiopatológicos e, conseqüentemente, a descoberta de fármacos mais seguros e eficazes (AMARALA *et al*, 2017). Fica evidente que os avanços científicos e tecnológicos na área de pesquisa, desenvolvimento e inovação de fármacos trouxeram resultados significativos na qualidade de vida das populações ao redor do mundo (HUGHES *et al*, 2011; SWINNEY; ANTHONY *et al*, 2011).

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada – IUPAC (1998), química medicinal é a disciplina que estuda a descoberta, invenção e preparação de compostos bioativos de interesse terapêutico, incluindo o seu mecanismo de ação à nível molecular e sua relação estrutura-atividade (SAR, do inglês, Structure-Activity Relationships). Ou seja, a química medicinal envolve desde a invenção até a interpretação do mecanismo de ação molecular de substâncias candidatas a novos fármacos. Além de aspectos relacionados com a absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade. É fundamental o estabelecimento da relação entre química, biologia, farmacologia, medicina, física e computação (WERMUTH *et al*, 2008; GUIDO *et al*, 2010).

O processo de desenvolvimento de novos fármacos é complexo e tem um custo elevado (HUGHES *et al*, 2011). Os métodos do estado-da-arte em biologia e química permitiram o esclarecimento dos mecanismos fisiopatológicos e farmacológicos e auxiliaram na compreensão dos reconhecimentos moleculares e das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas de substâncias candidatas a novos fármacos (SWINNEY; ANTHONY *et al*, 2011). A biotecnologia relacionada ao estudo da química medicinal possibilita o trabalho de identificação, seleção e otimização de moléculas capazes de interagir, seletivamente, com o alvo molecular selecionado que represente o espaço biológico, como por exemplo, enzima-receptor (GUIDO *et al*, 2010).

Um dos maiores desafios para a química medicinal é aumentar a eficiência de compostos naturais no tratamento de doenças, através de modificações químicas adicionais. Além dessa possibilidade, a síntese de derivados naturais, muitas vezes, é mais rápida e de menor custo para a estruturação de novos compostos farmacológicos promissores (PAULULAT *et al*, 1999; WESSJOHANN, 2000).

2.3 Cumarinas

2.3.1 Metabólitos secundários

A potencial ação dos medicamentos de origem natural, usados nos tratamentos das mais diferentes doenças, é justificada pela presença de compostos bioativos presentes nos organismos naturais que lhes conferem maior eficácia e a absorção, causando menos efeitos tóxicos, além de suas estruturas serem passíveis de modificação química (KOPARDE *et al*, 2019). Nas plantas, esses compostos são chamados de metabólitos secundários e são produzidos como resultado da adaptação do organismo ao ambiente ou para atuar como mecanismos de defesa contra predadores e diversas atividades biológicas dos vegetais. Sua biossíntese é derivada dos processos fundamentais da fotossíntese, glicólise e ciclo de Krebs (DEWICK, 2002; FUMAGALI *et al*, 2008; COLEGATE; MOLYNEUX, 2008).

Devido a essa flexibilidade metabólica, os metabólitos secundários dotam de uma enorme variabilidade química estrutural e funcional. Uma vez que os organismos vivos são induzidos a ativar mecanismos bioquímicos e genéticos para sobreviverem, geram um acúmulo de metabólitos. As moléculas naturais também podem ser usadas como modelos para a síntese de novos compostos bioativos ou sintetizados parcialmente, objetivando potencializar as suas propriedades farmacológicas (SIMÕES *et al*, 2017).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas dividem-se em três classes principais: terpenoides, alcalóides e compostos fenólicos (SAVITHRAMMA *et al*, 2011; PAL *et al*, 2014). Dentre eles, os fenólicos destacam-se por sua ampla distribuição, funções ecológicas e inúmeras atividades farmacológicas. Possuem um ou mais grupos hidroxilas ligados a um anel aromático e são representados por taninos, flavonoides e cumarinas (AMORIM *et al*, 2008)

As cumarinas são metabólitos secundários produzidos por várias espécies de plantas e alguns fungos e bactérias. Sua função nesses organismos ainda não foi totalmente esclarecida, mas acredita-se que desempenhem papéis como reguladores do crescimento e como bactericidas e fungicidas para as plantas (VENUGOPALA *et al*, 2013). Esses compostos

possuem sabor adocicado e odor fácil de ser reconhecido, semelhante ao cheiro do feno recém-cortado. Por esse motivo, a cumarina é usada na produção de perfumes desde 1882 (MATOS *et al*, 2015). Mas a relevância do seu uso vai além das indústrias cosmética e alimentícia, seu papel mais importante é descrito em produtos naturais, química orgânica e química medicinal (RENSHENG, 2012; MONGA *et al*, 2012).

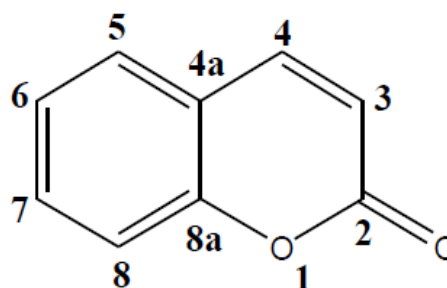
O primeiro composto cumarínico foi isolado em 1820 por Vogel, a partir do feijão Tonka ou Cumarú, sementes da planta *Dipteryx odorata* (*Coumarouna odorata*) de onde surgiu a palavra “cumarina”, figura 5A (BORGES *et al*, 2005; BOISDE; MEULY, 2007). As cumarinas pertencem à classe das lactonas com estrutura química formada, basicamente, por um anel de benzeno fundido a um anel de α -pirona (compostos benzopiranóicos), figura 5B (MAGGI *et al*, 2011).

Figura 5 – Cumarina

A)



B)



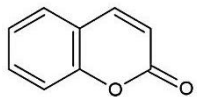
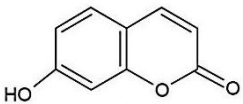
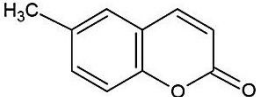
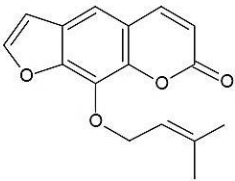
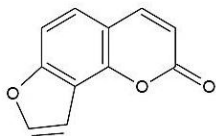
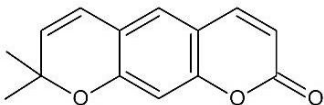
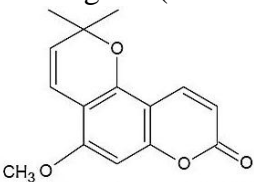
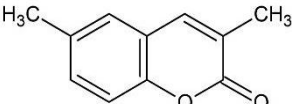
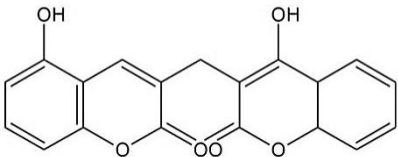
1,2-Benzopirona ou Cumarina

(A) *Coumarouna odorata*, planta popularmente conhecida como Cumarú, que deu origem a palavra “cumarina”
 Fonte: <<https://www.alivingproof.com/products/tonka-beans>>. (B) estrutura química da cumarina (Adaptado de Araújo, 2016).

2.3.2 Classificação

O esqueleto básico de todos os derivados da cumarina é formado pela fusão dos anéis benzeno e 1,2-pirona (primeiro átomo numerado do ciclo é o oxigênio sem dupla ligação) e é denominado de cumarina *per se* (COSTA, 1994). São classificadas em cinco grupos: cumarinas simples; furanocumarinas; piranocumarinas; cumarinas substituintes no anel pirona e cumarinas miscelâneas, figura 6 (ROJAHN, 1956; MURRAY, 1989; BRUNETON, 1995).

Figura 6 – Estruturas químicas das cumarinas

(A) Cumarinas simples		
Cumarina <i>per se</i>	7-hidroxicumarina	6-metilcumarina
		
(B) Furanocumarinas		
Furanocumarina linear (Imperatorina)	Furanocumarina angular (Angelicina)	
		
(C) Piranocumarinas		
Piranocumarina linear (Xantiletina)	Piranocumarina angular (Aloxantoxiletina)	
		
(D) Cumarinas com substituintes no anel pirona		
3,6 dimetilcumarina		
		
(E) Cumarinas miscelâneas		
Cumarina dimérica (Dicumarol)		
		

(A) cumarinas simples: formadas pelos derivados da cumarina *per se* com radicais hidroxi, alcóxi, alquil e as formas glicosídicas. (B) furanocumarinas: constituídas por um anel furano condensado ao núcleo, subdividindo-se em linear e angular com substituintes ligados aos anéis benzenóides (C5, C6, C7 e C8). (C) piranocumarinas: são os análogos às furanocumarinas, contendo anel pirano. (D) cumarinas com substituintes no anel pirona: são aquelas que possuem substituintes na posição C3 e C4. (E) cumarinas miscelâneas: formadas pelas biscumarinas (cumarinasdiméricas) e isocumarinas que têm o átomo de oxigênio e carbono ligado a ele por dupla ligação, com posição invertida (Adaptado de Montagner, 2007).

2.3.3 Atividades biológicas

Já existem cerca de 1.300 moléculas pertencentes à família das cumarinas, isoladas de 150 espécies de plantas, fungos e bactérias (CUNHA, 2010; MAISTRO *et al*, 2014). Além das centenas de espécies que produzem as cumarinas, existem os seus derivados de origem sintética elevando, significativamente, sua disponibilidade (DIAS, 2015). A extração, síntese e avaliação de compostos cumarínicos têm se desenvolvido rapidamente (BAIRAGI *et al*, 2012; BATRA *et al*, 2012), essa relevância se deu pela descoberta de suas potenciais ações farmacológicas, baixa toxicidade e efeitos colaterais, melhores efeitos curativos, menor resistência a medicamentos e amplo espectro no tratamento de uma variedade de doenças (WANG *et al*, 2009).

Estes estudos não se limitam apenas às cumarinas biológicas retiradas dos organismos naturais, mas também aos compostos artificiais de cumarinas com estruturas e propriedades sintetizadas. Alguns já são comercializados e usados clinicamente, é o exemplo do anticoagulante Varfarina (PENG *et al*, 2013) e o expectorante Guaco (GUASPARETO *et al*, 2015). Somado a isso, o seu processo de purificação é bastante complexo e sua abundância em plantas é muito baixa (YAMAGUCHI *et al*, 2013). Por isso, as alterações estruturais químicas têm se mostrado uma excelente opção na obtenção de derivados de produtos naturais, como por exemplo, a 1,2-benzopirona, que fornece uma variedade estrutural, através das substituições de seus carbonos sp^2 do seu núcleo base, possibilitando uma variedade de atividades biológicas (ZAVRŠNIK *et al*, 2011; GOMHA; KHALIL, 2012).

Dentre as várias atividades biológicas já encontradas em cumarinas e seus derivados, algumas principais são: antifúngica (ELIAS *et al*, 2019), antibacteriana (HU *et al*, 2020), antidepressiva (WANG *et al*, 2019), antioxidante (SING *et al*, 2020), anti-inflamatória (TANIMOTO *et al*, 2020), anti-HIV (SAFAKISH *et al*, 2019), neuroprotetora (MATOS *et al*, 2020) anticoagulante, diurética, vasodilatadora, antialérgica (WU *et al*, 2009) e antitumoral (MAKOWSKA *et al*, 2019; KAWAI *et al*, 2019; ZHAO *et al*, 2020).

As cumarinas já mostraram ter influência em várias vias envolvidas no câncer, como: inibição da angiogênese, da quinase, da anidrase carbônica, da aromatase, da telomerase, da sulfatase e da proteína Hsp90, parada do ciclo celular e atividade antimetabólica (THAKUR *et al*, 2015; DANDRIYAL *et al*, 2016). Muitos estudos confirmam a eficácia do uso de cumarinas e seus derivados no tratamento contra o câncer. Sabendo que as histonas desacetilases (HDAC's) são enzimas superexpressas em uma variedade de cânceres e estão associadas à tumorigênese (BOLDEN *et al*, 2006; SINGH *et al*, 2017) e que os inibidores de

HDACs (HDACis) foram identificados como terapêuticos promissores contra o câncer (SANGWAN *et al*, 2018), Yang e colaboradores (2019) sintetizaram uma série de novos derivados de hidroxamato à base de cumarina, a fim de avaliar seu potencial como inibidores de histona desacetilase (HDACis) e comprovaram que o composto “10e” inibiu a HDAC quase 90 vezes mais do que o controle usado, vorinostat (SAHA). Os compostos “10e” e “11d” aumentaram os níveis de histona acetilada H3 e H4, corroborando com a forte inibição da HDAC. Além disso, “10e” e “11d” mostraram um potencial maior contra as linhagens de células tumorais humanas A549 (adenocarcinoma de pulmão) e Hela (adenocarcinoma de colo do útero), em comparação com SAHA, causaram a parada do ciclo celular de A549 na fase G2/M e o aumento, significativo, da apoptose.

Com base no estudo anterior, Zhao e colaboradores (2020), desenvolveram mais 26 análogos, a partir de modificações químicas estruturais feitas nos mesmos derivados, com o intuito de obter atividade melhorada contra linhagens de células tumorais e constataram que vários derivados, além de mostrar efeitos inibitórios da HDACs, apresentaram atividade antiproliferativa contra quatro linhagens tumorais humanas (MDA-MB-231: adenocarcinoma de mama metastático, MCF-7: adenocarcinoma de mama metastático, H157: Carcinoma de células escamosas do pulmão e A549). Dentre eles, os compostos “13a” e “13c”, foram potentes inibidores *in vitro* de tumores sólidos (IC₅₀ entre 0,36-2,91 μM), ao mesmo tempo em que mostraram baixa citotoxicidade contra células normais (Beas-2B: epitélio brônquico humano e L-02: fígado humano). Os mesmos compostos aumentaram a acetilação das histonas H3 e H4, induziram a parada do ciclo celular na fase G2/M e induziram apoptose celular em carcinoma mamário MDA-MB-231, além de mostrarem efeito antimetastático ainda melhor que o controle positivo SAHA, usado contra a mesma linhagem.

Outro estudo de Ahmed e colaboradores (2020), sintetizou vinte e cinco derivados à base de cumarina e revelou que a maioria dos derivados foi citotóxico contra uma linhagem de células de carcinoma mamário humano (MCF-7). Os compostos chamados “4a” (IC₅₀ = 1,24 μM) e “3d” (IC₅₀ = 1,65 μM) foram mais citotóxicos que a estaurosporina (IC₅₀ = 8,81 μM), usada como controle positivo. O composto “4a” também foi capaz de induzir a parada do ciclo celular na fase G2/M, induzir apoptose, através da ativação da caspase-9 e inibir (0,36 μM) VEGFR-2, receptor 2 de ligação ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), responsável por iniciar uma cascata de fosforilação que resulta no aumento da proliferação e migração endotelial (MIETTINEN *et al*, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade anticâncer de novos derivados sintéticos da cumarina e identificar sua potencial ação na modulação da transição epitelial-mesenquimal *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar o efeito dos novos derivados sintéticos da cumarina sobre a viabilidade celular em linhagens tumorais A549 e H2170;
- 2) Avaliar o efeito de derivados sintéticos da cumarina sobre a transição epitelial-mesenquimal em células da linhagem tumoral A549;
- 3) Avaliar o efeito de derivados sintéticos da cumarina sobre a motilidade de células da linhagem tumoral A549.

4 METODOLOGIA

4.1 Derivados sintéticos da cumarina

Os derivados cumarínicos foram cedidos e sintetizados pelo professor Dr. Thiago Mendonça de Aquino do Laboratório de Química Medicinal (LQM) da UFAL, através de estudos em parceria com o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (UFPB), Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (UEPB) e Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (Université de Strasbourg). Onde se obtiveram a síntese de trinta e cinco compostos, dos quais mais de 50% são inéditos (vinte e seis novos produtos). Os nomes das moléculas foram gerados pelo programa Chem Draw Ultra13 de Cambridge Soft, levando em consideração as regras IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

4.2 Cultura de linhagens celulares de câncer humano

As linhagens celulares de adenocarcinoma pulmonar humano (A549) e carcinoma pulmonar humano (H2170) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem H2170 foi cultivada em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco® Life Technologies) e a linhagem A549 foi cultivada em meio de cultura DMEM (Gibco™ Invitrogen Corporation). Todas suplementadas com 10% de soro fetal bovino (LGC Biotechnology Ltda. São Paulo, Brazil), L-glutamina, piruvato de sódio e aminoácidos não essenciais (Gibco® Life Technologies), em uma concentração de 1 mL/ 100 mL de meio, incubadas em uma estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

4.3 Ensaio de viabilidade celular por MTT

Inicialmente foi feita uma avaliação com 35 derivados sintéticos da cumarina na linhagem tumoral A549, com o intuito de selecionar os derivados com maior interferência sobre a viabilidade celular. Seguindo as diretrizes do NCI (National Cancer Institute) para a avaliação de substâncias isoladas em ensaios biológicos, foi utilizada neste *screening* inicial a concentração de 12 µM para todos os derivados sintéticos. O ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi realizado para determinar a viabilidade celular de acordo com atividade metabólica enzimática, onde a formação de cristais de

formazan no interior das células viáveis foi medida através de espectrofotometria. Os ensaios seguiram o protocolo recomendado por Denizot e Lang, 1986. Todas as linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 células/poço. Após 24h, as células foram tratadas com os derivados cumarínicos na concentração de 12 μM e com os controles, sempre em quadruplicata. Em seguida, as placas foram encubadas a 37° em estufa de CO_2 por 24h de tratamento. Por fim, foi adicionado o MTT (5 mg/mL) e feita a leitura após 4h em um leitor de microplaca a 540 nm. Após o *screening* inicial, os ensaios foram repetidos com os derivados selecionados (106, 123A e 123B) em diluição seriada (1,5 μM - 12 μM) e os controles. Os controles utilizados foram: a) branco (meio de cultura sem células e sem tratamento); b) célula (células em meio de cultura sem tratamento); c) cisplatina (células em meio com quimioterápico cisplatina - 132,84 μM); d) DMSO (células com dimetilsulfóxido 1%, veículo no qual as substâncias estão dissolvidas).

4.4 Indução da transição epitelial-mesenquimal

As células A549 foram selecionadas para dar continuidade aos ensaios deste estudo por serem muito usadas na literatura como modelo para indução da transição epitélio-mesenquimal. As células foram semeadas (4×10^4 células/poço) em placas de 24 poços com lamínulas de vidro até atingirem a confluência de 70% em meio DMEM suplementado. Após incubação *overnight*, foram tratadas com os derivados cumarínicos (12 μM) na presença ou ausência de IL-1 β (1 ng/mL) por 24 horas. Depois do tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos, permeabilizadas com Triton X-100 por 10 minutos e lavadas com PBS. Em seguida, as células foram incubadas com faloidina-FITC (concentração 1:100) por 1 hora, a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente com PBS, incubadas com DAPI (1:1000) em PBS $1 \times$ por 10 min e montadas com PBS/Glicerol. As variações morfológicas associadas a transição epitelial-mesenquimal foram avaliadas através de microscopia de fluorescência. Para avaliar a morfologia das células foram obtidas fotos de campos aleatórios para avaliação dos seguintes aspectos: formato da célula e presença de projeções citoplasmáticas. As fotomicrografias foram obtidas através da câmara Nikon modelo DS-Ri1 (Microscópio Nikon Eclipse 50i). A intensidade de fluorescência foi determinada em pixels e quantificada pelo programa Image J 1.44p. Este ensaio seguiu o protocolo de Guan *et al*, 2016.

4.5 Ensaio de migração horizontal

O ensaio de migração horizontal seguiu o protocolo de Liang e colaboradores (2007). O efeito dos derivados da cumarina na migração de células A549 foi avaliado pelo ensaio de migração horizontal (*scratch-wound healing assay*). As células A549 ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas em uma estufa de CO₂ *overnight* para adesão e formação de uma monocamada celular confluenta. Após esse período, as células foram incubadas com 5 µg/mL de mitomicina C por 2 h para inibir a proliferação celular. Posteriormente, um risco linear foi realizado na monocamada, usando uma pipeta estéril de 200 µL e, em seguida, o meio foi descartado. Os poços foram lavados duas vezes com PBS para remover os resíduos celulares e as células foram tratadas com derivados de cumarina (12 µM) na presença ou ausência de IL-1β (1 ng/mL). A migração celular foi visualizada sob microscópio invertido (Olympus IX70) e as imagens foram adquiridas nos tempos de 0 e 24 horas após o risco. As fotomicrografias foram analisadas utilizando o software Adobe Photoshop CS5.1 para determinar a área ocupada por células durante os tempos determinados. O fechamento da área livre de células caracterizou o índice de migração celular que foi obtido mediante o seguinte cálculo:

Índice de migração (%) = $[(A_0 - A_t)/A_0] \times 100$, em que A₀ refere-se a área original e A_t a área no tempo (0 e 24 h) após o risco.

4.6 Análises estatísticas

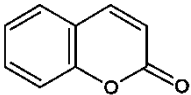
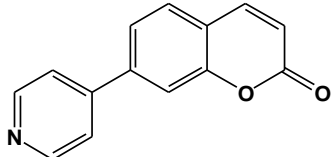
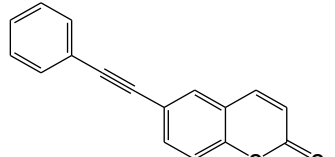
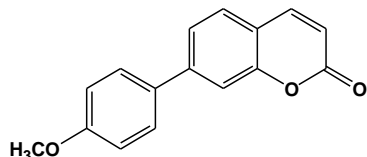
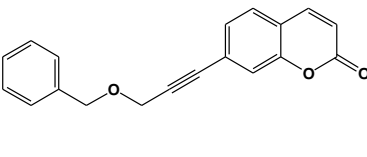
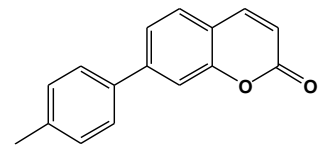
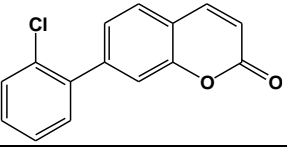
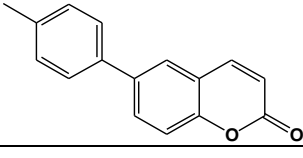
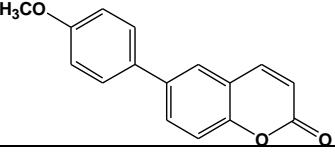
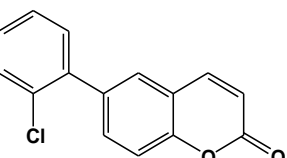
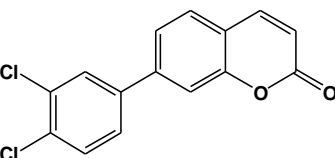
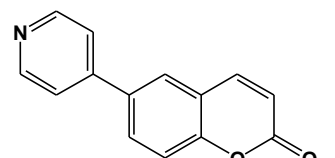
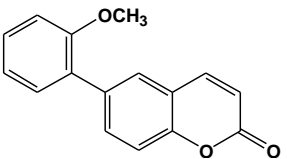
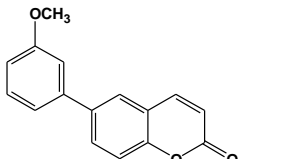
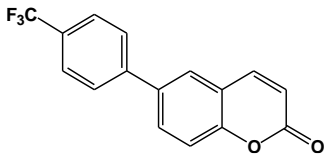
Os resultados foram representados como média e erro padrão da média (EPM) e avaliados, estatisticamente, através da análise de variância One-Way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Kewls. Para tal, foi utilizado o programa GraphPadPrism 5.0[®]. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

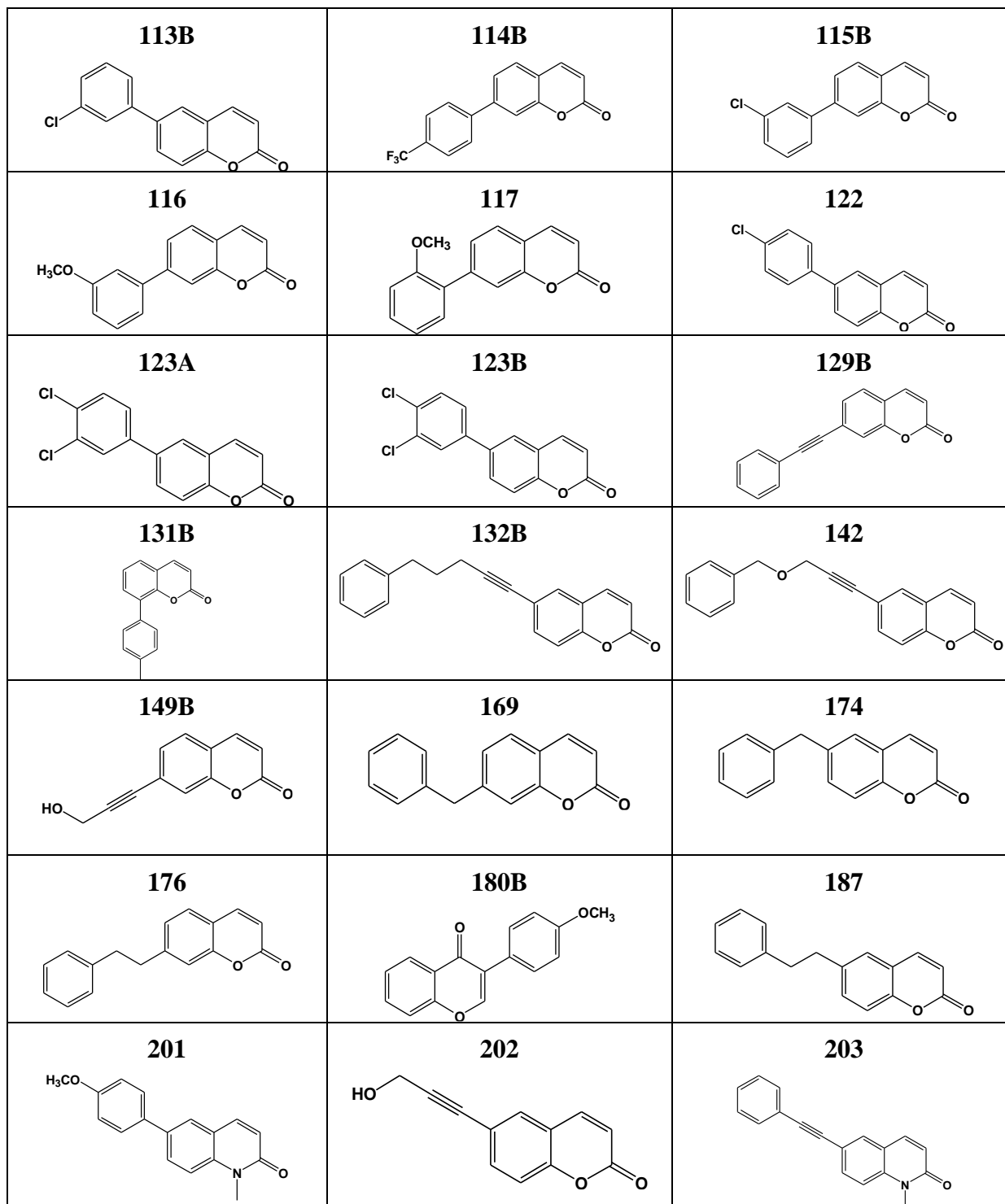
5 RESULTADOS

5.1 Síntese dos compostos cumarínicos

Os derivados cumarínicos usados no presente estudo foram sintetizados a partir de diferentes reações de acoplamento cruzado, catalisadas por organometálicos (ARAÚJO, 2016). Diferentes radicais foram inseridos em diferentes posições na estrutura base da cumarina, gerando trinta e cinco derivados, os quais têm suas estruturas químicas apresentadas na figura 7.

Figura 7 – Estrutura química dos derivados sintéticos da cumarina

Cumarina <i>per se</i> 	27B 	56B 
62B 	63B 	64B 
92 	95 	96 
98 	106 	107B 
108B 	109B 	111B 



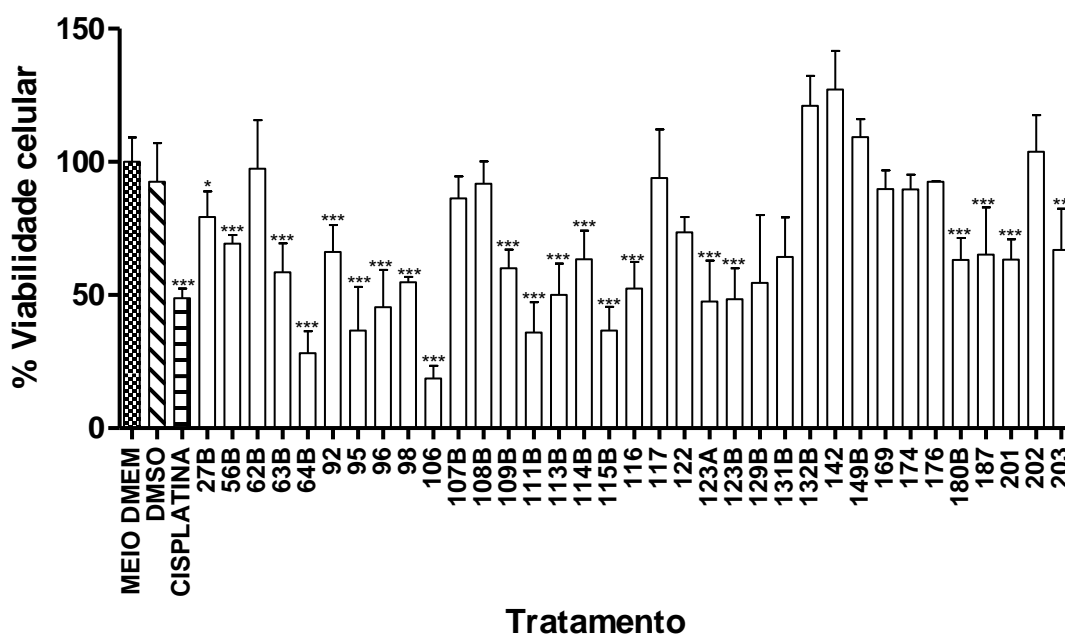
Estruturas químicas dos derivados sintéticos da cumarina. O: oxigênio; N: nitrogênio; H₃CO: metoxilo; Cl: cloro; F₃C: trifluorometil; HO: hidroxila.

5.2 Efeito dos derivados sintéticos da cumarina sobre a viabilidade de células tumorais

5.2.1 Efeito dos derivados de cumarina sobre a linhagem de células A549

De acordo com o ensaio realizado em células A549, dos trinta e cinco derivados cumarínicos testados, vinte e um reduziram de forma significativa a viabilidade das células quando comparado ao grupo controle compostos por células tratadas apenas com meio de cultivo (DMEM). A cisplatina, utilizado como fármaco referência, reduziu a viabilidade das células em $48,79\% \pm 1,39$ (figura 8). Nove derivados mostraram um efeito redutor maior ou igual a 50%, são eles: 64B ($28,14\% \pm 3,11$), 95 ($36,67\% \pm 6,67$), 96 ($45,44\% \pm 5,71$), 106 ($18,66\% \pm 2,13$), 111B ($35,96\% \pm 4,60$), 113B ($50,06\% \pm 5,23$), 115B ($36,74\% \pm 3,96$), 123A ($47,61\% \pm 7,68$) e 123B ($48,44\% \pm 6,68$).

Figura 8 – Efeito dos derivados cumarínicos sobre a viabilidade de células A549.



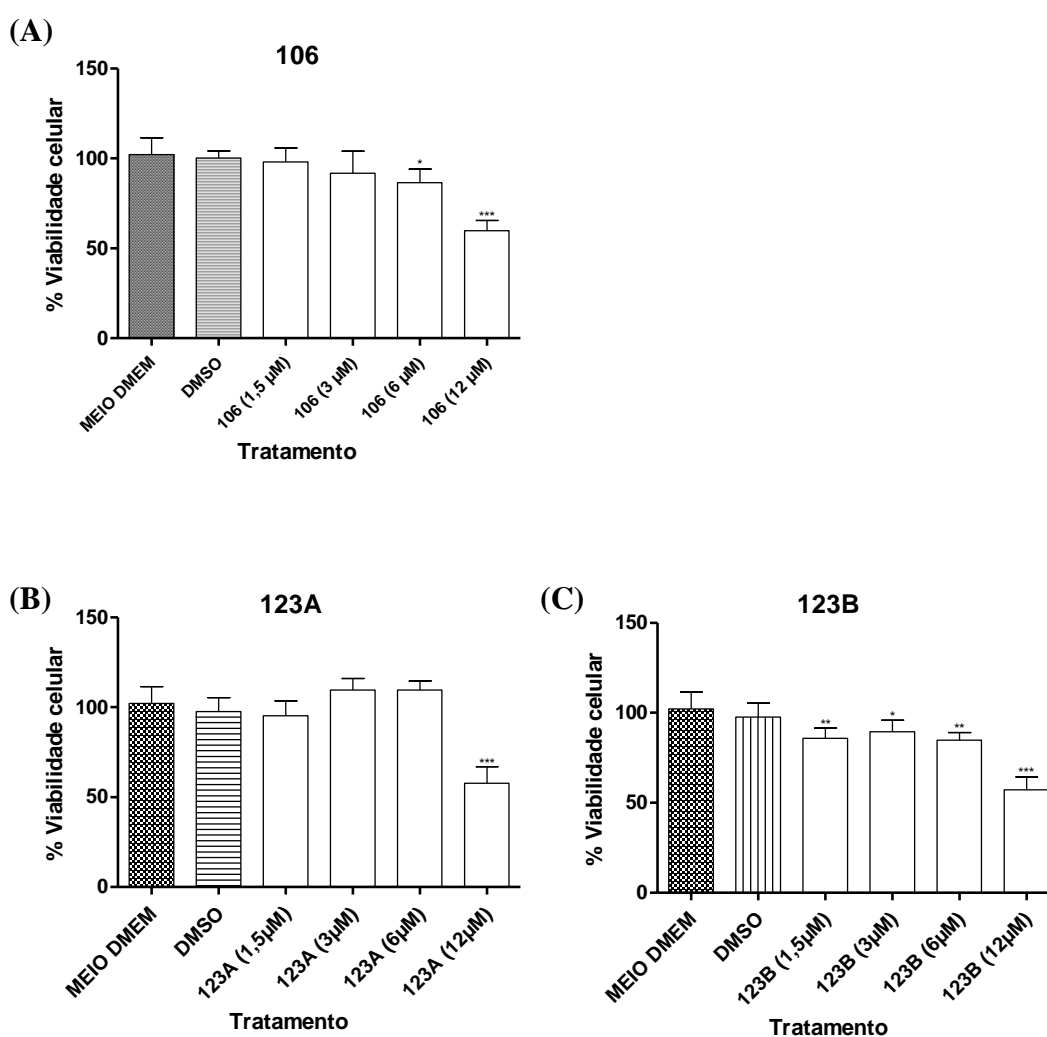
A viabilidade das células A549 foi avaliada pelo método do MTT após tratamento por 24 horas com os derivados da cumarina (12 μ M). A549: Adenocarcinoma pulmonar humano; DMEM: controle sem tratamento; DMSO: controle interno das substâncias (dimetilsulfóxido 1%); CISPLATINA: quimioterápico (40 μ g/mL); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, em relação ao grupo de células mantidas apenas com meio DMEM.

Com propósito de garantir o avanço das análises para identificar qual destes possui potencial anticâncer, foram selecionadas, para dar continuidade a este estudo, três amostras nominadas 106, 123A e 123B. A amostra 106 foi escolhida por ter apresentado o maior efeito redutor em A549, já as amostras 123A e 123B foram escolhidas por apresentarem em suas estruturas químicas, o mesmo radical inserido na amostra 106, o radical 1,2-diclorobenzeno

(C₆H₄Cl₂). Essas três amostras tiveram seus efeitos citotóxicos novamente avaliados pelo ensaio do MTT, utilizando diferentes concentrações para os tratamentos.

De acordo com a figura 9A, o derivado 106 mostrou um efeito redutor dose-dependente. No entanto, este efeito só se mostrou significativo a partir da concentração de 6 μ M e na concentração de 12 μ M (59,82% \pm 2,30), teve seu maior efeito redutor. O tratamento com o derivado 123A foi significativo, em relação ao controle sem tratamento, apenas na concentração de 12 μ M (57,63% \pm 3,30), figura 9B. Já 123B, mostrou efeito redutor significativo em todas as concentrações testadas e em 12 μ M (57,16% \pm 2,70), seu maior efeito redutor (figura 9C).

Figura 9 – Efeito dos derivados 106, 123 A e 123B sobre a viabilidade de células A549

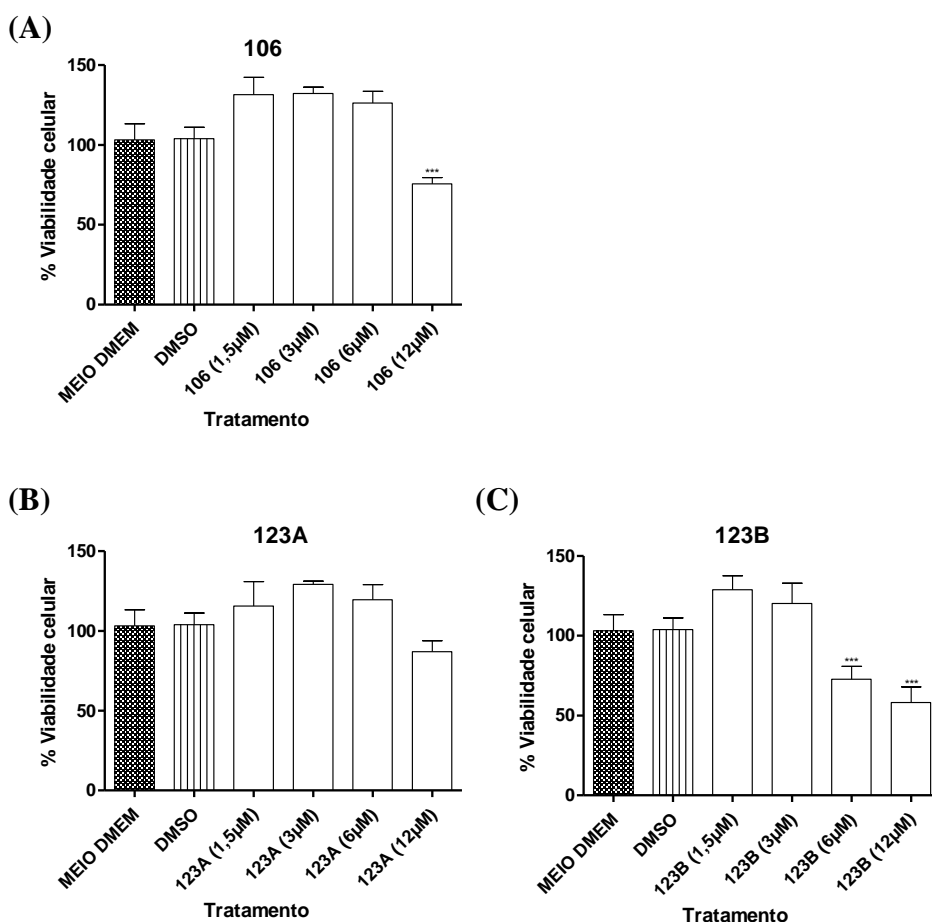


A viabilidade das células A549 foi avaliada pelo método do MTT, após tratamento por 24 horas com os derivados em diferentes concentrações. (A) Tratamento com o derivado sintético 106. (B) Tratamento com o derivado sintético 123A. (C) Tratamento com o derivado sintético 123B. DMEM: controle sem tratamento; DMSO: controle interno das substâncias (dimetilsufóxido 1%); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo de células mantidas apenas com meio DMEM.

5.2.2 Efeito dos derivados de cumarina sobre a linhagem de células H2170

Com propósito de verificar se estes efeitos citotóxicos se estendem para outras linhagens de câncer pulmonar, as análises foram estendidas. Os efeitos dos derivados da cumarina 106, 123A e 123B sobre a viabilidade de células tumorais humanas da linhagem H2170 foram avaliados. Como apresentado na Figura 10A, O derivado da cumarina 106 exibiu efeitos citotóxicos sobre as células tumorais H2170 apenas na maior concentração avaliada (12 μ M), reduzindo a viabilidade para 75,67% \pm 1,57 em relação as células do controle, mantidas apenas com meio de cultivo. O derivado 123A não mostrou efeito significativo em nenhuma das concentrações testadas para H2170 (figura 10B). Já o 123B foi significativo, nas duas maiores concentrações testadas, onde em 12 μ M reduziu a viabilidade celular para 58,14% \pm 4,00 (figura 10C).

Figura 10 – Efeito dos derivados 106, 123A e 123B sobre a viabilidade de células H2170



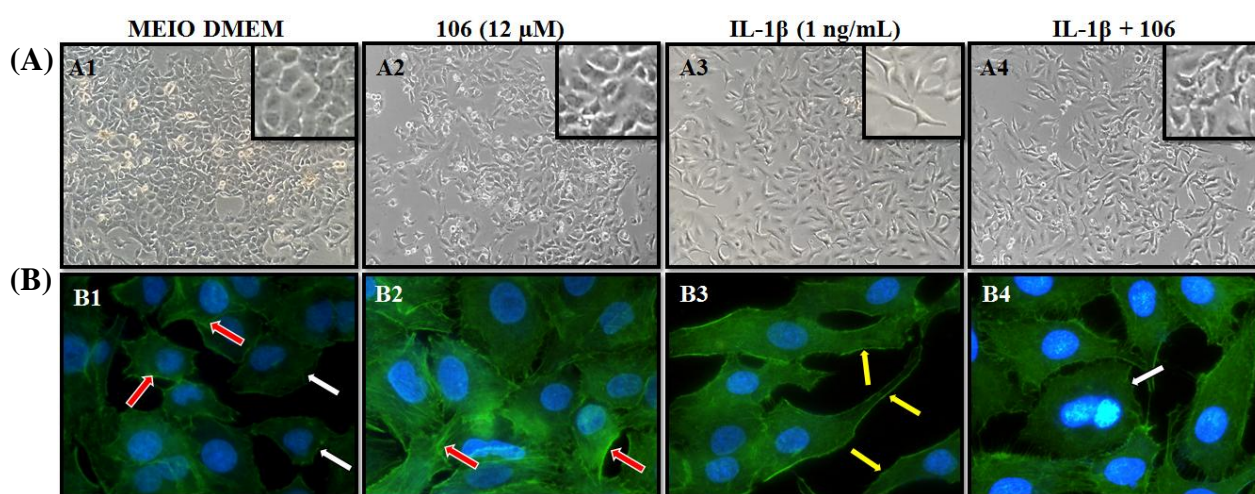
A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT em células H2170 expostas aos derivados cumarínicos por 24 h. H2170: carcinoma pulmonar humano. (A): Tratamento com o derivado 106. (B): Tratamento com o derivado 123A. (C): Tratamento com o derivado 123B. DMEM: controle sem tratamento; DMSO: controle interno das substâncias (dimetilsufóxido 1%); *** p <0,001 em relação ao grupo de células mantidas apenas com meio DMEM.

5.3 Efeito dos derivados da cumarina sobre a variação morfológica induzida pela transição epitelial-mesenquimal

Sendo a transição epitelial-mesenquimal (TEM) um processo biológico crítico para eventos de invasão/disseminação por células neoplásicas capazes de realizar metástase, verificou-se se os derivados sintéticos da cumarina 106, 123A e 123B seriam capazes de interferir na transdiferenciação de células epiteliais para mesenquimais. Para este conjunto de análises, as características relacionadas às células epiteliais e mesenquimais foram avaliadas a partir de fotomicrografias em microscopia de contraste de fase.

Como apresentado na Figura 11A (A1), 12A (A1) e 13A (A1), as células mantidas apenas em meio de cultivo DMEM apresentaram uma morfologia poliédrica, aparência de paralelepípedos e junção intercelular, formando uma monocamada confluenta com contato célula-célula, um perfil característico de células epiteliais. Já nas células estimuladas por IL-1 β , houve uma evidente mudança morfológica que podem ser observadas, nas figuras 11A (A3), 12A (A3) e 13A (A3), pelo formato das células com maiores prolongamentos nas extremidades, semelhante a fibroblastos e a perda de contato célula-célula, sugerindo que houve uma transdiferenciação do perfil epitelial para o mesenquimal.

Figura 11 – Efeito do derivado 106 na variação morfológica induzida pela transição epitelial-mesenquimal em células A549



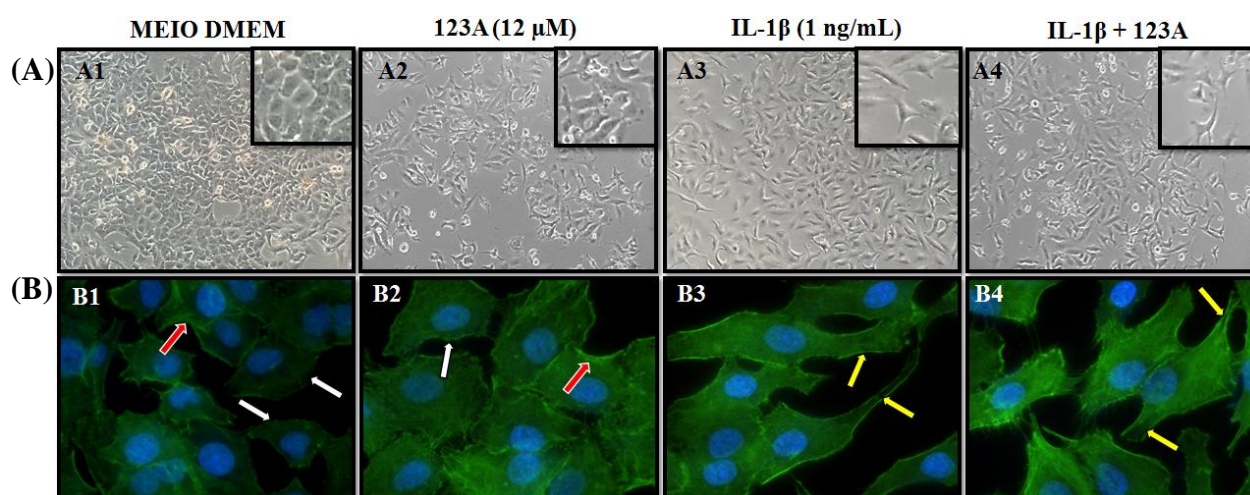
Efeito do derivado sintético da cumarina 106 na diferenciação epitelial-mesenquimal induzida por IL-1 β em células A549. As células foram mantidas com o derivado 106 sob estímulo ou não com IL-1 β por 24 h. (A) Fotomicrografias em microscópio invertido de luz ($\times 40$ de aumento). (B) Marcação para faloidina ($\times 100$ aumento). Em azul, o núcleo das células marcados com corante fluorescente DAPI. A549: adenocarcinoma pulmonar humano; MEIO DMEM: células sem tratamento; 106: derivado cumarínico (12 μ M); IL1 β : interleucina-1 β (1 ng/mL); Seta branca: células com morfologia epitelial; seta vermelha: filamentos de actina na região cortical das células; seta amarela: células com morfologia mesenquimal.

O tratamento com o derivado 106 não apresentou diferença visível no perfil morfológicos das células, em relação ao controle com meio DMEM, figura 11A (A2). Interessantemente, o tratamento com o derivado 106 nas células estimuladas com IL-1 β foi capaz de atenuar as mudanças morfológicas, relacionadas a TEM nas células A549, figura 11A (A4).

De modo diferente ao observado com o derivado 106 da cumarina, os derivados 123A e 123B não foram capazes de interferir de maneira evidente com as mudanças morfológicas relacionadas a TEM em células estimuladas com IL-1 β , figuras 12A (A4) e 13A (A4) que mantiveram a mesma morfologia das células tratadas apenas com IL-1 β , figura 12A (A3) e 13A (A3).

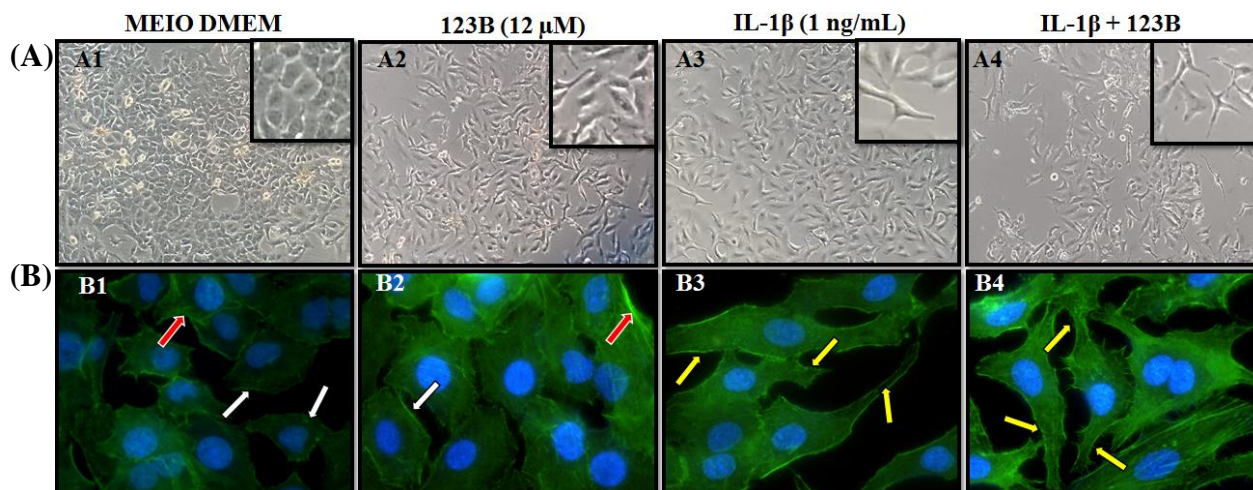
As áreas com menores confluências de células na placa, registradas nas figuras 11A (A2), 12A (A2) e 13A (A2), sugerem que os tratamentos com os derivados 106, 123A e 123B sejam citotóxicos para células A549, corroborando com os dados anteriores do ensaio do MTT.

Figura 12 – Efeito do derivado 123A na variação morfológica induzida pela transição epitelial-mesenquimal em células A549



Efeito do derivado sintético da cumarina 123A na diferenciação epitelial-mesenquimal induzida por IL-1 β em células A549. As células foram mantidas com o derivado 123A sob estímulo ou não com IL-1 β por 24 h. (A) Fotomicrografias em microscópio invertido de luz ($\times 40$ de aumento). (B) Marcação para faloidina ($\times 100$ aumento). Em azul, o núcleo das células marcados com corante fluorescente DAPI. A549: adenocarcinoma pulmonar humano; Meio DMEM: células sem tratamento; 123A: derivado cumarínico (12 μ M); IL1 β : interleucina-1 β (1 ng/mL); Seta branca: células com morfologia epitelial; seta vermelha: filamentos de actina na região cortical das células; seta amarela: células com morfologia mesenquimal.

Figura 13 – Efeito do derivado 123B na variação morfológica induzida pela transição epitelial-mesenquimal em células A549



Efeito do derivado sintético da cumarina 123B na diferenciação epitelial-mesenquimal induzida por IL-1 β em células A549. As células foram mantidas com o derivado 123B sob estímulo ou não com IL-1 β por 24 h. (A) Fotomicrografias em microscópio invertido de luz ($\times 40$ de aumento). (B) Marcação para faloidina ($\times 100$ aumento). Em azul, o núcleo das células marcados com corante fluorescente DAPI. A549: adenocarcinoma pulmonar humano; Meio DMEM: células sem tratamento; 123B: derivado cumarínico (12 μ M); IL1 β : interleucina-1 β (1 ng/mL); Seta branca: células com morfologia epitelial; seta vermelha: filamentos de actina na região cortical das células; seta amarela: células com morfologia mesenquimal.

Visando uma maior caracterização morfológica, a organização dos microfilamentos de actina foi avaliada pela marcação com faloidina marcada com FITC. As células do grupo controle (mantidas em meio DMEM) apresentaram uma deposição de filamentos de actina abundante na região cortical (seta vermelha), tornando-as poliédricas e polares (seta branca), características típicas de células epiteliais que podem ser observadas nas figuras 11B (B1), 12B (B1) e 13B (B1). Nas células que foram estimuladas por IL-1 β , houve perda de polarização e formação de fibras de estresse (seta amarela), indicando uma transdiferenciação do perfil epitelial para mesenquimal (figuras 11B, 12B e 13B).

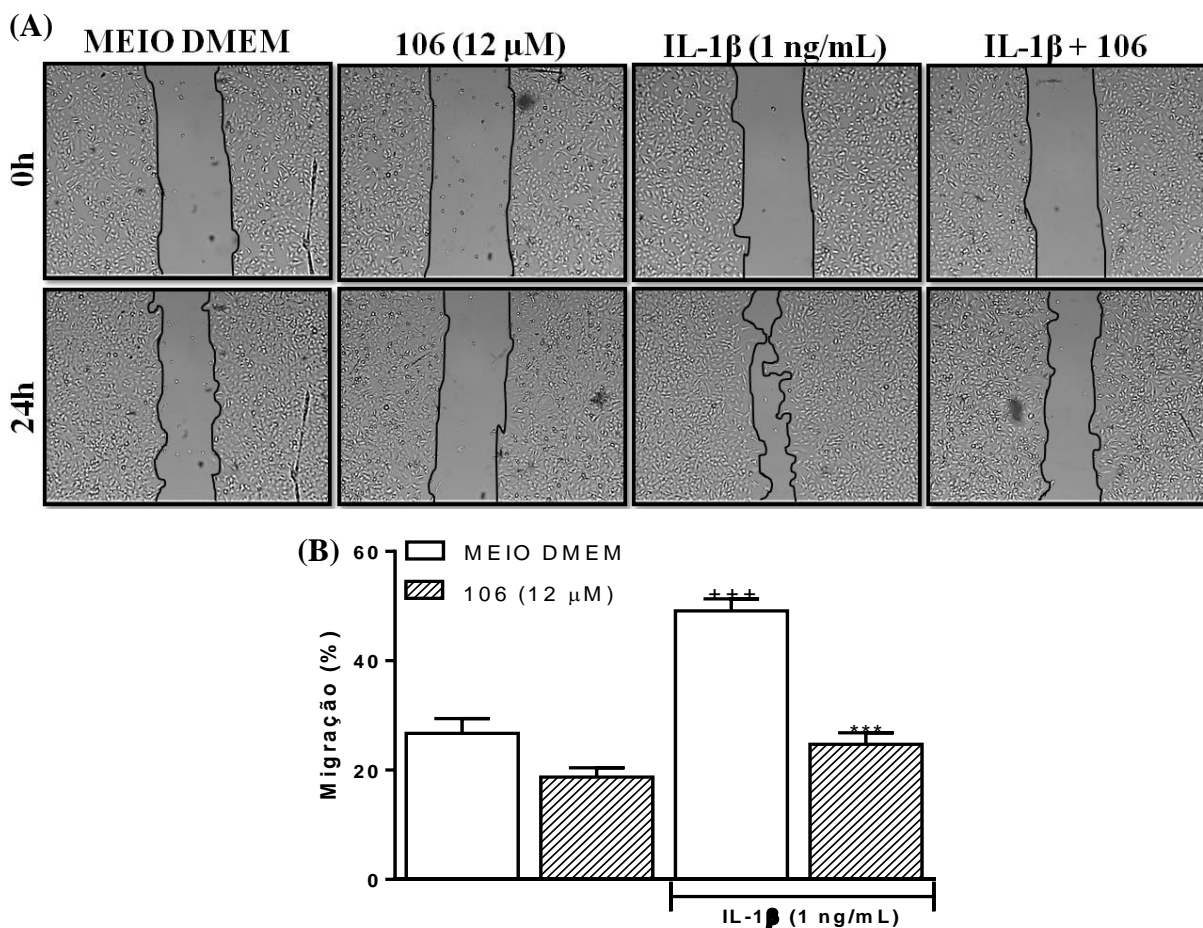
Os tratamentos com os derivados 106, 123A e 123B não surtiram efeitos na organização dos filamentos de actina e núcleos das células A549, quando comparadas com o controle do meio DMEM, figuras 11B (B2), 12B (B2) e 13B (B2). Entretanto, o tratamento com o derivado 106 (figura 11B – B4) foi capaz de interferir nas alterações na organização dos filamentos de actina em células estimuladas com IL-1 β , o que não foi possível com os tratamentos com os derivados 123A e 123B, figuras 12B (B4) e 13B (B4), reforçando as observações morfológicas anteriores.

5.4 Efeito dos derivados de cumarina sobre a motilidade de células A549

Sabendo que a migração celular é um fator determinante para o processo de metástase de células neoplásicas, e que o derivado sintético da cumarina 106 foi capaz de interferir na TEM, foi realizada uma prova funcional deste potencial anticâncer com os derivados, ao avaliar um evento de motilidade celular, utilizando o ensaio de migração horizontal *in vitro* com células A549.

De acordo com a Figura 14, o estímulo com IL-1 β acelerou a migração de células A549 de forma significativa após 24 h de tratamento em comparação com as células mantidas apenas com meio de cultivo DMEM. No entanto, observou-se que o derivado 106 foi capaz de inibir, significativamente, para 24,72% a taxa de migração, induzida pelo IL-1 β em A549, figura 14B.

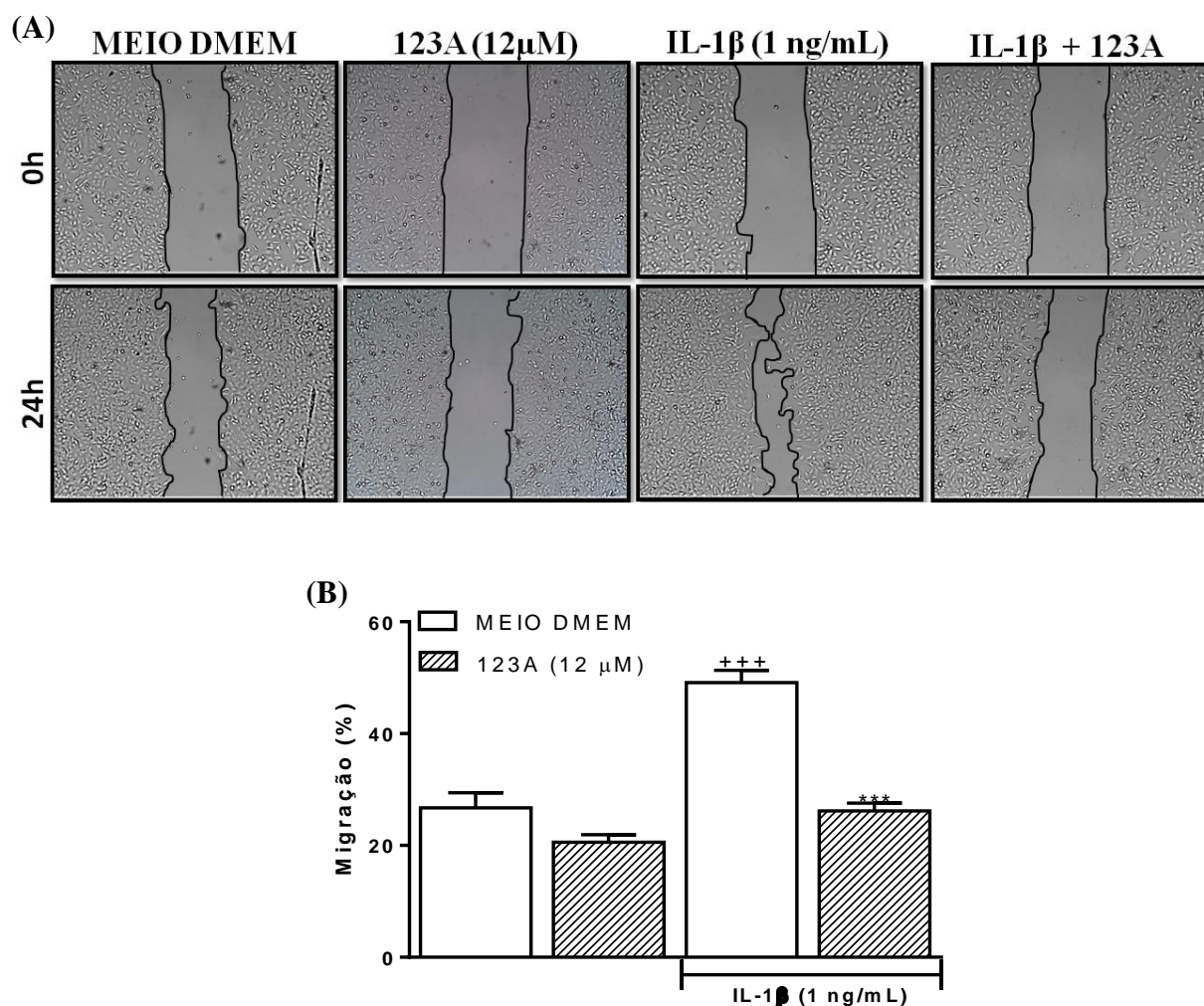
Figura 14 – Efeito do derivado 106 na migração horizontal de células A549



Efeito do derivado sintético 106 da cumarina sobre a migração de células A549 estimuladas por IL-1 β . (A) Fotomicrografia representativa do ensaio de migração horizontal. (B) Número percentual médio do fechamento da área livre de células. A549: Adenocarcinoma pulmonar humano; 106: derivado da cumarina; DMEM: controle sem tratamento; IL-1 β : Interleucina-1 β ; +++ p <0,001 em relação as células mantidas com meio DMEM; *** p <0,001 em relação as células estimuladas com IL-1 β .

O derivado 123A também foi capaz de inibir, significativamente, a migração induzida por IL-1 β nessas células, onde inibiu para 26,16% a taxa de migração (figura 15).

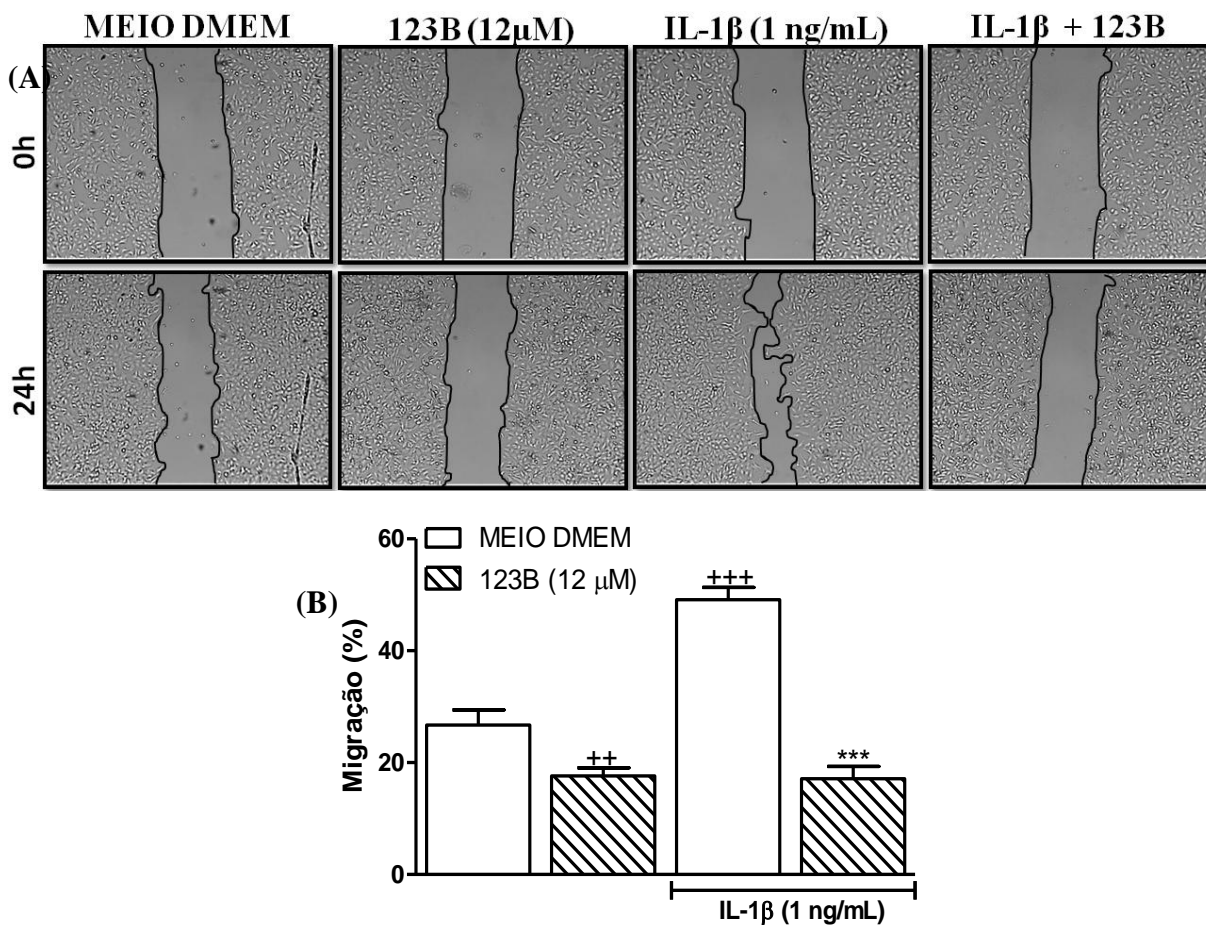
Figura 15 – Efeito do derivado 123A na migração horizontal de células A549



Efeito do derivado sintético 123A da cumarina sobre a migração de células A549 estimuladas por IL-1 β . (A) Fotomicrografia representativa do ensaio de migração horizontal. (B) Número percentual médio do fechamento da área livre de células. A549: Adenocarcinoma pulmonar humano; 123A: derivado da cumarina; DMEM: controle sem tratamento; IL-1 β : Interleucina-1 β ; +++p<0,001 em relação as células mantidas com meio DMEM; ***p<0,001 em relação as células estimuladas com IL-1 β .

Já o derivado 123B inibiu para 17,61% a migração de células A549, significativamente em relação ao controle de células com meio DMEM, e inibiu para 17,11% a migração dessas células, induzidas pelo IL-1 β (figura 16).

Figura 16 – Efeito do derivado 123B na migração horizontal de células A549



Efeito do derivado sintético 123B da cumarina sobre a migração de células A549 estimuladas por IL-1 β . (A) Fotomicrografia representativa do ensaio de migração horizontal. (B) Número percentual médio do fechamento da área livre de células. A549: Adenocarcinoma pulmonar humano; 123B: derivado da cumarina; DMEM: controle sem tratamento; IL-1 β : Interleucina-1 β ; ++ p <0,01 e +++ p <0,001 em relação as células mantidas com meio DMEM; *** p <0,001 em relação as células estimuladas com IL-1 β .

6 DISCUSSÃO

Sabendo que as cumarinas e seus derivados sintéticos possuem variadas atividades biológicas, de interesse farmacológico, como: antibacteriana (Al-MAJEDY *et al*, 2018), antiviral (HASSAN *et al*, 2016), anti-inflamatória (GROVER; JACHAK, 2015), anticoagulante (GOMEZ *et al*, 2012), antineurodegenerativa (ANANDI *et al*, 2012) e anticâncer (RIVEIRO *et al*, 2010) e que, a estrutura química desses compostos permite a realização de modificações sintéticas, abrindo caminho para a descoberta de inúmeros derivados à base da cumarina com diversas propriedades antitumorais (SABT *et al*, 2018). O presente estudo avaliou, então, o efeito de novos compostos sintéticos derivados da cumarina, contra dois tipos de linhagens tumorais pulmonares humanas: A549 e H2170.

Estudos presentes na literatura evidenciam que alterações realizadas nas estruturas químicas de algumas substâncias, podem ser capazes de afetar nos seus efeitos biológicos e até potencializá-los. Um deles é o estudo de Shi e colaboradores (2017), no qual uma série de derivados da escopoletina, um tipo de cumarina, foi sintetizada, introduzindo α -aminoacetamida, acrilamida e β -aminopropamida respectivamente na posição 3 da escopoletina e, através do ensaio do MTT, avaliaram seus efeitos citotóxicos contra quatro linhagens de células tumorais humanas (MDA-MB-231, MCF-7, HepG2 e A549). Os dados mostraram que os derivados denominados “7a”, “7b”, “7e”, “7f”, “8a” e “8e” foram mais citotóxicos para as linhagens testadas do que apenas a escopoletina. Neste estudo, a introdução da acrilamida e seus análogos β -aminopropamida, melhorou significativamente a atividade citotóxica.

Farooq e Hussain (2018) avaliaram o efeito anticâncer de derivados de triazóis ligados à 7-hidroxicumarina em sete diferentes linhagens tumorais. Através do ensaio do MTT, o composto “5” exibiu melhor atividade citotóxica em comparação com apenas a 7-hidroxicumarina, com valores de $IC_{50\%} = 5,1; 22,7; 14,3$ e $10,2 \mu M$ contra mama (MCF-7), pulmão (NCI-H322), próstata (PC-3) e linhas celulares de câncer de pele (A-431), respectivamente. O mesmo composto induziu apoptose e parada do ciclo na fase G1 em células de câncer de mama (MCF-7).

Lingaraju e colaboradores (2018) testaram derivados de isoxazolininas com cumarinas e avaliaram sua atividade citotóxica *in vitro* contra UACC 903 (câncer de melanoma) e linhagem de células normais de fibroblastos (FF2441) pelo ensaio do MTS. Os resultados revelaram que os derivados denominados “7b”, “7c”, “7f” e “7j” induziram maior citotoxicidade contra UACC 903. Dentre eles, o composto “7b” ($IC_{50\%} = 8,8 \mu M$) teve uma

substituição metóxi no anel fenil da isoxazolina. O composto “7c” ($IC_{50\%} = 10,5 \mu\text{M}$) foi considerado o mais interessante por inibir seletivamente as células de melanoma sem afetar as células normais FF2441 que pode ser explicado devido a presença do radical 3,4-dimetoxi no anel fenil da isoxazolina. O composto “7f” ($IC_{50\%} = 9,2 \mu\text{M}$) teve a presença de cloro na posição orto do anel fenil da isoxazolina e o composto “7j” ($IC_{50\%} = 4,5 \mu\text{M}$) apresentou a maior citotoxicidade, que pode ser atribuída a substituição de cloro e flúor nas posições orto do anel fenil da isoxazolina. Neste estudo, foram observados em estudos de relações estrutura-atividade que a substituição no anel fenil da isoxazolina desempenhou um papel vital na inibição de UACC 903.

Neste estudo, foi feito, primeiramente, um *screening* visando selecionar o derivado que surtiria maior efeito redutor na viabilidade celular de A549, através do ensaio do MTT. Foi testado um total de 35 derivados, na concentração de $12 \mu\text{M}$, obedecendo aos parâmetros do NCI (National Cancer Institute) de concentração máxima para substâncias isoladas. Como observado na figura 8 (p. 35), o derivado 106 apresentou maior efeito redutor ($18,66\% \pm 2,13$), mais do que o controle quimioterápico usado, a cisplatina ($48,79\% \pm 1,39$). Entretanto, ao observar as estruturas químicas dos compostos testados na figura 7 (p. 33), nota-se que o radical inserido no composto 106, um diclorobenzeno, é o mesmo dos compostos 123A e 123B, apenas em posições diferentes. Por este motivo, os três compostos foram selecionados para dar continuidade ao estudo, possibilitando assim, responder também se as diferentes posições do diclorobenzeno na estrutura da cumarina implicariam em diferenças significativas de seus efeitos contra A549 e H2170.

Muitos estudos presentes na literatura também usaram o ensaio do MTT para avaliar a viabilidade celular, o que assegura que este ensaio é confiável e efetivo. É o caso do estudo de Ma e Liu (2017), que através do ensaio do MTT, avaliou uma variedade de derivados cumarínicos a fim de aumentar sua potência seletiva e seu efeito inibidor de crescimento em linhagens tumorais, constatando que para A549 (adenocarcinoma pulmonar humano), seis dos derivados exibiram um potencial inibidor maior do que o controle quimioterápico usado, BENC-511. Soni e Soman (2018) sintetizaram derivados de aminocumarina e relataram atividade anticâncer, através do ensaio do MTT, onde um composto denominado “17l” mostrou uma atividade inibidora maior em A549 com valor de $IC_{50\%} = 24 \pm 0,1 \text{ nM}$, do que o fármaco padrão usado, fluorouracil ($IC_{50\%} = 11,13 \pm 0,083 \mu\text{M}$). Wang e colaboradores (2018), também através do ensaio do MTT, testaram um derivado de cumarina e fenilsulfonilfuroxano, o composto “8b”, através do ensaio, “8b” mostrou que diminuiu a viabilidade celular de duas linhagens de tumor pulmonar humano (A549 e H1299) de forma

dependente da dose e do tempo, enquanto o controle quimioterápico cetaxel apresentou menor atividade de inibição.

A cisplatina é um quimioterápico capaz de tratar câncer testicular, cânceres ginecológicos, principalmente o de ovário, cânceres gastrointestinais, geniturinários, de pulmão e o câncer de cabeça e pescoço (DE VITA, 2001). A partir do momento que esse fármaco entra na célula, seu íon cloreto (Cl^-) dissocia-se, formando um complexo reativo com a água que interage com o DNA. Ocorre então: a formação de ligações covalentes com o DNA; a reação com dois sítios diferentes do DNA que produzem ligações intracadeias ou intercadeias; a formação dos complexos DNA-platina, resultando na inibição da síntese de DNA e, portanto, na sua transcrição; a indução de apoptose na célula e, por fim, a ligação com proteínas nucleares e citoplasmáticas, resultando em um efeito citotóxico (AHMAD, 2010; CHU *et al*, 2013). Ao mesmo tempo, a cisplatina é capaz de se ligar ao DNA mitocondrial, reduzindo a produção de ATP (adenosina trifosfato) e as atividades das ATPases, alterando o conteúdo de cálcio no interior da célula, reduzindo a respiração celular, resultando na produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) e na peroxidação lipídica (DALEY-YATES, MCBRIEN, 1982; UOZOMI, LITTEREST, 1985).

Apesar da cisplatina se mostrar um fármaco com alto potencial antineoplásico e farmacocinética favorável, igualmente aos outros quimioterápicos, pode causar consideráveis reações adversas, algumas delas são: mielossupressão, náuseas e vômitos, nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade e reação adversa ocular (VISACRI, 2013). Mesmo o tratamento com a cisplatina ($48,79\% \pm 1,39$) ter surtido um efeito redutor significativo para A549 (figura 8, p. 35) nesse estudo, a importância da descoberta de novas substâncias com efeitos contra tumores pulmonares se dá a partir da necessidade do desenvolvimento de um quimioterápico mais efetivo e com menores ou insignificantes efeitos colaterais.

Após o ensaio de *screening*, os compostos 106, 123A e 123B foram analisados em diluição seriada ($1,5 \mu\text{M} - 12 \mu\text{M}$), também através do MTT, a fim de se obter uma $\text{IC}_{50\%}$. Como observado nas figuras 9 (p. 36) e 10 (p. 37), não foi possível a obtenção da $\text{IC}_{50\%}$ de nenhum dos derivados, em nenhuma das duas linhagens tumorais testadas. Ainda assim, seus efeitos inibitórios foram significativos, comparados ao controle sem tratamento. Os derivados 106 e 123B surtiram efeitos inibitórios nas duas linhagens tumorais e o derivado 123A, apenas na linhagem tumoral A549.

Os compostos orgânicos clorados são conhecidos por provocarem impactos ambientais e à saúde (YANG *et al*, 2012). O diclorobenzeno (DCB), por exemplo, é bastante usado na

fabricação de solventes, pesticidas, corantes e produtos químicos orgânicos (GUERIN 2008; TONG *et al*, 2010). 1,2-diclorobenzeno é um isômero primário do DCB e tem como sinônimos: orto-diclorobenzeno e o-diclorobenzeno (TIAN, 2006). A exposição ao 1,2-diclorobenzeno pode causar irritação aos olhos e trato respiratório, dores abdominais, náuseas, vômitos e diarreia. Porém, esta substância não apresenta genotoxicidade e não há evidências de carcinogenicidade em roedores (CETESB, 2018). No entanto, a síntese de 1,2-diclorobenzeno com cumarina nunca foi relatada até agora e não há nenhum estudo que mostre alguma atividade biológica do diclorobenzeno ou seus derivados. Mas, considerando a importância biológica dos derivados cumarínicos e sabendo que o padrão de substituição em sua estrutura química determina o seu perfil de atividade (RIVIEIRO *et al*, 2010), foi contemplado, nesse estudo, avaliar, ineditamente, o efeito anticâncer de 1,2-diclorobenzeno acoplado em diferentes posições na estrutura da cumarina.

Os derivados cumarínicos podem apresentar a capacidade de regular diferentes vias celulares. Investigações biológicas feitas em cumarinas já revelaram o envolvimento desses compostos com inúmeras vias envolvidas na carcinogênese, como inibição da quinase, parada do ciclo celular, inibição da angiogênese, inibição da proteína de choque térmico (HSP90), inibição da telomerase, atividade antimetabólica, inibição da anidrase carbônica, inibição de transportadores monocarboxilados, inibição da aromatase e inibição da sulfatase (THAKUR *et al*, 2015).

Somado a isso, a transição epitélio-mesenquimal (TEM) é um processo biológico no qual as células epiteliais adquirem o fenótipo mesenquimal no desenvolvimento embrionário, fibrose tecidual e progressão tumoral (KALLURI; WEINBERG, 2009). Nos tecidos tumorais, a TEM induz o fenótipo mesenquimal com propriedades malignas associadas à migração, invasão e metástase (DE CRAENE; BERX, 2013). Além do mais, o TEM facilita o aumento na subpopulação de CSC (células-tronco cancerígenas) e já foi associado a um fenótipo quimiorresistente no câncer de mama (CREIGHTON *et al*, 2010). Sendo a TEM uma etapa crítica na obtenção do estado metastático, optou-se por investigar se os derivados 106, 123 A e 123 B causariam mudanças morfológicas, relacionadas a TEM em A549, através do ensaio da indução da transição epitélio-mesenquimal, e em seguida, levando em conta que o processo de migração celular é primordial para que ocorra a metástase, uma das principais etapas da carcinogênese, optou-se, finalmente, por investigar a ação dos mesmos derivados na migração celular de A549, com o ensaio de migração horizontal.

Outros estudos usaram a linhagem tumoral A549 como modelo para indução da TEM e/ou indução da migração celular e demonstraram uma boa funcionalidade dos ensaios, o que

foi crucial na escolha dessa linhagem, ao invés de H2170, para dá continuidade a esse estudo. É o caso de Guangcai e colaboradores (2016) que mostraram o efeito anti-metastático de uma furanocumarina, na linhagem A549, realizando dentre outros, o ensaio de migração horizontal. Ko e colaboradores (2018) mostraram o efeito inibitório de metástase da bergamota, outra furanocumarina, especificamente induzindo o processo de TEM em A549. Um terceiro estudo parecido, de Feng e colaboradores (2017), mostrou efeito antitumoral de uma cumarina chamada osthole contra A549, realizando dentre outros, o ensaio de migração e a indução da TEM para avaliar a morfologia celular.

De acordo com o observado pelo ensaio de morfologia nas figuras 11A (p. 38), 12A (p. 39) e 13A (p.40), as células estimuladas por IL-1 β deixaram de ter o perfil epitelial (como as do controle sem tratamento) e passaram a ter um perfil mesenquimal, observadas a partir de mudanças no formato e perda de contato célula-célula, como era de se esperar. O TEM é um processo que leva à perda de aderências célula-célula e junções estreitas, causando a reorganização do citoesqueleto e perda de polaridade apical. O que explica como uma célula tumoral de origem epitelial atinja uma morfologia espinelóide (CREIGHTON *et al*, 2010; DAVE *et al*, 2012). Para complementar esses dados, foi analisado, em seguida, a organização do citoesqueleto de actina por coloração com faloídina. Sustentando os dados anteriores, as células estimuladas por IL-1 β transitaram do perfil epitelial para o perfil mesenquimal, podendo ser observado perda de polarização e formação de fibras de estresse, observados nas figuras 11B (p.38), 12B (p.39) e 13B (p.40). Quando as células, estimuladas por IL-1 β , receberam o tratamento com os derivados cumarínicos, apenas o derivado 106 foi capaz de reduzir essas alterações morfológicas. Este último achado, leva a acreditar que o derivado 106 é um interessante alvo para intervenções terapêuticas direcionadas contra a metástase tumoral em A549.

De acordo com os resultados do ensaio de migração horizontal, os três derivados cumarínicos inibiram a migração de A549, que foi induzida por IL-1 β , de forma significativa em relação ao controle sem tratamento. Estes dados levam a acreditar que o tratamento com IL-1 β , tenha causado a perda do contato célula-célula, provocando um padrão de migração unicelular, como observado nas figuras 14 (p. 41), 15 (p. 42) e 16 (p. 43). O fato do tratamento com os derivados cumarínicos ter inibido esta migração, induzida por IL-1 β , leva a acreditar no potencial desses compostos em relação à sua atividade anticâncer.

A interleucina-1 β (IL-1 β) tem um papel bastante relevante como mediadora da inflamação relacionada ao câncer, podendo ser secretada por células imunes, estromais e tumorais (GERMANO *et al*, 2008). Altos níveis de IL-1 β no tumor estão associados a mau

prognóstico em uma variedade de cânceres, incluindo mama, próstata, cólon e pulmão (LEWIS *et al*, 2006). Inclusive, já foram relatados casos de pacientes com aterosclerose que tiveram uma redução, significativa, na incidência de câncer de pulmão, quando recebiam o anticorpo anti-interleucina1 β (RIDKER *et al*, 2017). Ainda assim, os mecanismos pelos quais a IL-1 β atua no desenvolvimento do câncer e da metástase não foram estabelecidos (TULOTTA *et al*, 2019).

Apesar de muitos compostos com atividade anticâncer já terem sido encontrados, a busca por um quimioterápico eficaz, que atue especificamente nas células tumorais malignas, sem causar danos ao organismo, ainda é de grande interesse farmacológico. Pensando nisso, Lake e Grasso em 1996, relataram que as cumarinas apresentam diferentes níveis de toxicidade, a depender da espécie testada. Altas doses de cumarina podem ser tóxicas e carcinogênicas quando testadas em ratos, mas há pouca evidência de toxicidade induzida na espécie humana (LAKE, 1999). Porém, ao que parece, camundongos, hamsters e babuínos são os melhores modelos comparativos com os seres humanos (LAKE *et al*, 2002). Esta diferença pode ser explicada devido às vias que diferentes espécies metabolizam a cumarina. Como por exemplo, na maioria dos seres humanos, a cumarina é metabolizada em 7-hidroxycumarina, um metabólito não tóxico. Já em ratas, a maioria é metabolizada em 3,4-epoxidação, formando um metabólito tóxico, o 3,4-epóxido (LEWIS *et al* 2006; UEHARA *et al*, 2008).

Os dados apresentados neste estudo revelaram que os derivados cumarínicos com radicais 1,2-diclorobenzeno: 106, 123A e 123B atuam inibindo a viabilidade celular das linhagens tumorais de pulmão (H2170 e A549), inibindo a migração celular de A549 e especificamente, o derivado 106 foi capaz de inibir a TEM induzida por IL-1 β em A549. Esses achados levam a acreditar que os três derivados estudados aqui são interessantes alvos para dar continuidade a uma pesquisa na busca por novos quimioterápicos mais efetivos e menos tóxicos para A549. Esclarecendo também que outros ensaios são necessários para melhor elucidar os mecanismos de ação envolvidos nessas atividades e a segurança do uso desses compostos para saúde humana, deixando como perspectivas para esse estudo: ensaios da viabilidade celular por MTT em células normais e ensaios de genotoxicidade (micronúcleo, apoptose e cometa alcalino) em células normais para avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos dos derivados nas células normais; ensaio do ciclo celular e ensaio da anexina V em A549 para avaliar outras vias metabólicas, assim como se há morte celular ou inibição da proliferação em A549; ensaio de imunohistoquímica para avaliar a expressão de e-caderina e vimentina e um ensaio de invasão celular para melhor caracterizar um efeito anti-metastático.

7 CONCLUSÃO

- Os derivados 106, 123A e 123B reduziram, significativamente, a viabilidade nas linhagens de câncer de pulmão (células A549 e H2170).
- Apenas o derivado sintético da cumarina 106 foi capaz de atenuar as alterações morfológicas, relacionadas a TEM em células A549, estimuladas por IL-1 β .
- Todos os três derivados foram capazes de inibir, significativamente, a migração celular, induzida por IL-1 β em células A549.
- Os resultados indicam que os derivados 106, 123A e 123B devam apresentar efeitos anticâncer por mecanismos distintos e que independam das alterações morfológicas para um fenótipo mesenquimal e que as vias de síntese química, a partir da cumarina, mostram-se potencialmente úteis para obter novas entidades químicas com potencial anticâncer.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Z.; REHMAN, S. An overview of cancer treatment modalities. **Neoplasms**. 2018.

ACLOQUE, H.; ADAMS, M. S.; FISHWICK, K.; BRONNER-FRASER, M.; NIETO, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. **The journal of clinical investigation**. v. 119, p. 1438-1449, 2009.

ACS, American Cancer Society. 2019. Risk factors and causes of childhood cancer. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/cancerin-children/risk-factors-and-causes.html>>. Acesso em 24 de março de 2020.

ACS, American Cancer Society. 2019. What is lung câncer? Disponível em:<<https://www.cancer.org/content/cancer/en/cancer/lung-cancer/about/what-is.html>>. Acesso em 17 de abril de 2020.

AHMED, E. Y.; NEHAD, A.; LATIF, A.; EL-MANSY, M. F.; ELSERWY, W. S.; ABDELHAFEZ, O. M. VEGFR-2 inhibiting effect and molecular modeling of newly synthesized coumarin derivatives as anti-breast cancer agents. **Bioorganic e medicinal chemistry**. v. 28, n. 5, 2020.

AHMAD, S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. **Chemistry e biodiversity**. v. 7, n. 3, p. 543-566, 2010.

AL-MAJEDY, Y.; KADHUM, A. A.; IBRAHEEM, H.; *et al.* A systematic review on pharmacological activities of 4-methylumbelliferon. **Systematic reviews in pharmacy**. v. 8, p. 24-30, 2018.

AMARALA, A. T.; ANDRADEB, C. H.; KÜMMERLEC, A. E.; GUIDOD, R. V. C. A evolução da química medicinal no brasil: avanços nos 40 anos da sociedade brasileira de química. **Química Nova**. v. 40, n. 6, p. 694-700, 2017.

AMORIM, E.L.C.; *et al.*, simple and accurate procedure for determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethno pharmacology. **Functional ecology**. v. 2, p. 88-94, 2008.

ANAND, P.; SINGH, B.; SINGH, N. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for alzheimer's disease. **Bioorganic and medicinal chemistry**. v. 20, p. 1175-1180, 2012.

ARAÚJO, R. S. A. **Síntese, caracterização e reatividade química de heterociclos carbonilados funcionalizados através de reações de acoplamento cruzado**. 2016. Tese (doutorado em produtos naturais e sintéticos bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

ARVELO, F.; SOJO, F.; COTTE, C. Tumour progression and metastasis. **Cancer medical science**. v. 10, n. 617, 2016.

ATSUMI, T.; SINGH, R.; SABHARWA, L. *et al.* Inflammation amplifier: a new paradigm in cancer biology. **Cancer research**. v. 74, n. 1, p. 8-14, 2013.

BAIRAGI, S. H.; SALASKAR, P. P.; LOKE, S. D.; SURVE, N. N.; TANDEL, D. V.; DUSARA, M. D. Medicinal significance of coumarins. **International journal of pharmaceutical research**. v. 4, n. 2, p. 16-19, 2012.

BATRA, N.; BATRA, S.; PAREEK, A.; NAGORI, B. P. Diverse pharmacological activities of 3-substituted coumarins: a review. **International research journal of pharmacy**. v. 3, n. 7, p. 24-29, 2012.

BEERLING, E.; SEINSTRA, D.; DE WIT, E.; KESTER, L.; VAN DER VELDEN, D.; MAYNARD, C. *et al.* Plasticity between epithelial and mesenchymal states unlinks EMT from metastasis-enhancing stem cell capacity. **Cell reports**. v. 14, n. 10, p. 2281-2288, 2016.

BOISDE, P. M.; MEULY, W. C. Coumarin. **Encyclopedia of chemical technology**. ed. 5, 2007.

BOLDEN, J. E.; PEART, M. J.; JOHNSTONE, R.W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. **Nature reviews drug discovery**. v. 5, n. 769, 2006.

BORGES, F.; ROLEIRA, F.; MILHAZES, N.; SANTANA, L.; URIARTE, E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. **Current medicinal chemistry**. v. 12, 2005.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química nova**. v. 33, n. 6, 2010.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**. v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BRUNETON, J.C. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. Paris: Intercepted Ltd, 1999. p. 229-240.

CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2020. Ficha de informação toxicológica. Divisão de toxicologia humana e saúde ambiental. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2018/05/Clorobenzenos.pdf>> Acesso em 18 de junho de 2020.

CHU, E.; DE VITA, V. T. **Physician's cancer chemotherapy drug manual 2013**. 1. ed. Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers, 2013.

COLEGATE S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive natural products: detection, isolation and structure determination**. 2. ed. CRC Press, 2008, p. 421-437.

COLLINS, R. H. JR.; FELDMAN, M.; FORDTRAN, J. S. Colon cancer, dysplasia, and surveillance in patients with ulcerative colitis. **N Engl J Med**. v. 316, p. 1654-1658, 1987.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**. v. 124, n. 2, p. 263-266, 2006.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. p. 591.

COSTA, J. Cancer disease. Disponível em: < <https://www.britannica.com/science/cancer-disease>>. Acesso em 07 de fevereiro de 2020.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**. v. 420, p. 860-867, 2002.

CREIGHTON, C. J.; CHANG, J. C.; ROSEN, J. M.; Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**. v. 15, p. 253-260, 2010.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e fitoquímica**. 3. ed. 2010, p. 226-227.

CUZICK, J. *et al.* Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. **Lancet Oncol**. v. 10, p. 501–507, 2009.

DALEY-YATES, P. T.; MC BRIEN, D. C. H. The inhibition of renal ATPase by cisplatin and some biotransformation products. **Chemico-biological interactions**. v. 40, n. 3, p. 325-34, 1982.

DANDRIYAL, J.; SINGLA, R.; KUMAR, M.; JAITAK, V. Recent developments of C-4 substituted coumarin derivatives as anticancer agents. **European journal of medicinal chemistry**. v. 119, p. 141–168, 2016.

DAVE, B.; MITTAL, V.; TAN, N. M.; CHANG, J.C. Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. **Breast cancer research**. v. 14, p. 202, 2012.

DE CRAENE, B.; BERX, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. **Nature reviews cancer**. v. 13, p. 97–110, 2013.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**. v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DESIMONE, R. W.; CURRIE, K. S.; MITCHELL, S. A.; DARROW, J. W.; PIPPIN, D. A. Privileged structures: Applications in drug discovery. **Combinatorial chemistry e high throughput screening**. v. 7, p. 473-493, 2004.

DE VITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: principles e practice of oncology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. 2002, p. 520.

DIAS, A. R. S. V. G. Cumarinas: origem, distribuição e efeitos tóxicos. 2015. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2015.

DOHADWALA, M. *et al.* Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E (2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer. **Cancer research**. v. 66, p. 5338–5345, 2006.

ELIAS, R.; BENHAMOU, R. I.; JABER, Q. Z.; DOROT, O.; ZADA, S. L.; OVED, K.; PICHINUK, E.; FRIDMAN, M. Antifungal activity, mode of action variability, and subcellular distribution of coumarin-based antifungal azoles. **European journal medicinal chemistry**. v. 179, p. 779-790, 2019.

FAROOQ, S.; HUSSAIN, A.; QURISHI, M. A.; HAMID, A.; KOUL, S. Synthesis and biological evaluation of novel triazoles linked 7-hydroxycoumarin as potent cytotoxic agents. **Anticancer agents medicinal chemistry**. v. 18, n. 11, p. 1531-1539, 2018.

FENG, A. H.; LUA, L.; WANGA, Y.; PEIB, L.; CHEN, X. Osthole inhibited TGF- β induced epithelial–mesenchymal transition (EMT) by suppressing NF-kB mediated Snail activation in lung cancer A549 cells. **Cell adhesion e migration**. v. 11, n. 5, p. 464-475, 2017.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; DYBA, T.; RANDI, G.; BETTIO, M.; GAVIN, A.; VISSER, O.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality patterns in europe: estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. **European journal of cancer**, 2018.

FIGUEIREDO, C. R. L. V. O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**. v. 55, n. 3, p. 321-332, 2019.

FILHO, G.B. **Bogliolo: patologia geral**. 5 ed, 2013.

FORONI, C. *et al.* Epithelial–mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. **Cancer treatment reviews**. v. 38, n. 6, p. 689-97, 2011.

FUMAGALI, E. *et al.* Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18, p. 627-641, 2008

GASPARETTO, J. C.; PECCININI, R. G.; FRANCISCO, T. M. G.; CERQUEIRA, L. B.; CAMPOS, F. R.; PONTAROLO, R. A kinetic study of the main guaco metabolites using syrup formulation and the identification of an alternative route of coumarin metabolism in humans. **Plos one**, v. 10, n. 3, p. 1-22, 2015.

GERMANO, G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. **Cytokine**. v. 43, p. 374-379, 2008.

GILLES, C.; POLETTE, M.; METSDAGT, M.; NAWROCKI-RABY, B.; RUGGERI, P.; BIREMBAUT, P.; FOIDART, J. M. Transactivation of Vimentin by β -catenin in human breast cancer cells. **Cancer research**. v. 63, p. 2658-2664, 2003.

GOMEZ-OUTES, A.; SUAREZ-GEA, M. L.; CALVO-ROJAS, G.; *et al.* Discovery of anticoagulant drugs: a historical perspective. **Current drug discovery technologies**. v. 9, p. 83-104, 2012.

GOMHA, S. M.; KHALIL, K. D. A conveniente ultrasound-promoted synthesis of some new thiazole derivatives bearing a coumarin nucleus and their cytotoxic activity. **Molecules**. v. 17, p. 9335-9347, 2012.

GRIVENNIKOV, S. I., GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, infammation and cancer. **Cell**. v. 140, p. 883-899, 2010.

GROVER, J.; JACHAK, S.M. Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development. **Royal society of chemistry**. v. 49, p. 38810-39634, 2015.

GUANGCAI, L. I.; YUAN, H. E.; JUN, Y. A. O.; HUANG, C.; SONG, X.; DENG, Y.; XIE, S.; REN, J.; JIN, M.; HUIGUO, A. Angelicin inhibits human lung carcinoma A549 cell growth and migration through regulating JNK and ERK pathways. **Oncology reports**. v. 36, p. 3504-3512, 2016.

GUAN, R.; WANG, X.; ZHAO, X.; SONG, N.; ZHU, J.; WANG, J.; WANG, J.; XIA, C.; CHEN, Y.; ZHU, D.; SHEN, L. Emodin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats by suppressing epithelial-mesenchymal transition and fibroblast activation. **Scientific reports**. v. 6, n. 35696, 2016.

GUERIN, T. F. *Ex-situ* bioremediation of chlorobenzenes in soil. **Journal of hazardous materials**. v. 154, n. 1-3, p. 9-20, 2008.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Revista estudos avançados**. v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

HASSAN, M. Z.; OSMAN, H.; ALI, M. A.; AHSAN, M. J. Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents. **European journal of medicinal chemistry**. v. 123, p. 236-255, 2016.

HAY, E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. **Acta anatomica**. v. 154, p. 8-20, 1995.

HOLLIER, B.G., EVANS, K.; MANI, S. A. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**. v. 14, p. 29-43, 2009.

HU, C. F.; ZHANG, P. L.; SUI, Y. F.; LV, J. S.; ANSARI, M. F.; BATTINI, N.; LI, S.; ZHOU, C. H.; GENG, R. X. Ethylenic conjugated coumarin thiazolidinediones as new efficient antimicrobial modulators against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Bioorganic chemistry**. v. 94, 2020.

HUGHES, J.; REES, S.; KALINDJIAN, S.; PHILPOTT, K. Principles of Early Drug Discovery. **British journal of pharmacology**. v. 162, n. 6, p. 1239-1249, 2011.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. 2019. Como surge o câncer? Disponível em <<https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>>. Acesso em 28 de março de 2020.

INCA. Instituto Nacional de Câncer, 2020. Câncer de pulmão. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pulmao>>. Acesso em 05 de fevereiro de 2020.

INCA. Instituto Nacional do Câncer, 2020. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em 4 de fevereiro de 2020.

INUMARU, L. E.; SILVEIRA, E. A.; VELOSO, M. M. N. Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. **Cadernos de saúde pública**. v. 27, n.7, 2011.

IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry. 1998. Glossary of terms used in medicinal chemistry. **Pure and applied chemistry**. v. 70, n. 5, p. 1129-1143, 1998.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of clinical investigation**. v. 119, p. 1420-1428, 2009.

KAWAI, J.; TOKI, T.; OTA, M.; INOUE, H.; TAKATA, Y.; ASAHI, T.; SUZUKI, M.; SHIMADA, T.; ONO, K.; SUZUKI, K.; TAKAISHI, S.; OHKI, H.; MATSUI, S.; TSUTSUMI, S.; HIROTA, Y.; NAKAYAMA, K. Discovery of a potent, selective, and orally available MTHFD2 inhibitor (DS18561882) with *in vivo* antitumor activity. **Journal medicinal chemistry**. v. 62, n. 22, p. 10204-10220, 2019.

KO, J.; NAM, D.; UM, J.; JUNG, S. H.; SETHI, G.; AHN, K. S. Bergamottin Suppresses metastasis of lung cancer cells through abrogation of diverse oncogenic signaling cascades and epithelial-mesenchymal transition. **Molecules**. v. 23, p. 1601, 2018.

KOKKINOS, M. I.; WAFAI, R.; WONG, M. K.; NEWGREEN, D. F.; THOMPSON, E. W.; WALTHAM, M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer – observations *in vitro* and *in vivo*. **Cells tissues organs**. v. 185, p. 191-203, 2007.

KOPARDE, A. A.; DOJAD, R. C.; MAGDUM, C. S. Natural products in drug discovery. **Pharmacognosy medicinal plants**, 2019.

KRYSAN, K. *et al.* Prostaglandin E2 activates mitogen-activated protein kinase/Erk pathway signaling and cell proliferation in non-small cell lung cancer cells in an epidermal growth factor receptor-independent manner. **Cancer research**. v. 65, p. 6275-6281, 2005.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS; COTRAN. **Pathology basis of disease**. 7. ed, 2004.

LAKE, B. G.; GRASSO, P. Comparison of the hepatotoxicity of coumarin in the rat, mouse, and syrian hamster: a dose and time response study. **Fundamental and applied toxicology**. v. 34, p. 105-117, 1996.

LAKE, B. G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. **Food and chemical toxicology**. v. 37, n. 4, p. 423-453, 1999.

- LAKE, B. G. *et al.* Studies on the disposition, metabolism and hepatotoxicity of coumarin in the rat and Syrian hamster. **Food and chemical toxicology**. v. 40, p. 809-823, 2002.
- LEE, J. M. *et al.* Inflammation in lung carcinogenesis: new targets for lung cancer chemoprevention and treatment. **Crit Rev Oncol Hematol**. v. 66, p. 208-217, 2008.
- LEWIS, A. M.; VARGHESE, S.; XU, H.; ALEXANDER, H. R. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. **Journal of translational medicine**. v. 4, n. 48, p.1479-5876, 2006.
- LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**. v. 10, p. 161-165, 2009.
- LI, R.; ONG, S. L.; TRAN, L. M.; JING, Z.; LIU, B.; PARK, S. J.; HUANG, Z. L.; WALSER, T. C.; HEINRICH, E. L.; LEE, G.; SALEHI-RAD, R.; CROSSON, W. P.; PAGANO, P. C.; PAUL, M. K.; XU, S.; HERSCHMAN, H.; KRYSAN, K.; DUBINETT, S. Chronic IL-1 β -induced inflammation regulates epithelial-to-mesenchymal transition memory phenotypes via epigenetic modifications in non-small cell lung cancer. **Scientific reports**. v. 10, n. 377, 2020.
- LIANG, C.; PARK, A.; GUAN, J. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature protocols**. v. 2, n. 2, 2007.
- LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J Clin invest**. v. 117, n. 5, p. 1175-83, 2007.
- LINGARAJU, G. S.; BALAJI, K. S.; JAYARAMA, S.; ANIL, M. S.; KIRAN, K. R.; SADASHIVA, M. P. Synthesis of new coumarin tethered isoxazolines as potential anticancer agents. **Bioorganic and medicinal chemistry letters**. v. 28, n. 23-24, p. 3606-3612, 2018.
- LIU *et al.* Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic. **Quantitative imaging in medicine and surgery**. v. 5, n. 5, p. 708-29, 2015.
- MA, C.; LIU, Z. Design and synthesis of coumarin derivatives as novel PI3K inhibitors. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**. v. 17, p. 395-403, 2017.
- MAGGI, F.; BARBONI, L.; CAPRIOLI, G.; PAPA, F.; RICCIUTELLI, M.; SAGRATINI, G.; VITTORI, S. HPLC quantification of coumarin in bastard balm (*Melittis lissophyllum* L., Lamiaceae). **Fitoterapia**. v. 82, n. 8, p. 1215-1221, 2011.
- MAISTRO, E. L.; MARQUES, E. S.; FEDATO, R. P.; TOLENTINO, F.; SILVA, C. D. A. C.; TSUBOY, M. S. F.; VARANDA, E. A. *In vitro* assessment of mutagenic and genotoxic effects of coumarin derivatives 6,7-Dihydroxycoumarin and 4-Methylesculetin. **Journal of toxicology and environmental health**. v.78, n. 2, p. 109-118, 2014.

- MAKOWSKA, A.; WOLFF, L.; SĄCZEWSKI, F.; BEDNARSKI, P. J.; KORNICKA, A. Synthesis and cytotoxic evaluation of benzoxazole/benzothiazole-2-imino-coumarin hybrids and their coumarin analogues as potential anticancer agents. **Pharmazie**. v. 74, n. 11, p. 648-657, 2019.
- MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**. v. 454, p. 436-444, 2008.
- MASOLA, V. *et al.* In vitro effects of interleukin (IL)-1 beta inhibition on the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular and hepatic stellate cells. **J Transl Med**. v. 17, n. 12, 2019.
- MATOS, M. J.; SANTANA, L.; URIARTE, E.; ABREU, O. A.; MOLINA, E.; YORDI, E. G. Coumarins: An important class of phytochemicals. **Research gate**, 2015.
- MATOS, M. J.; IBATÁ, D. M. H.; URIARTE, E.; VIÑA, D. Coumarin-rasagiline hybrids as potent and selective hMAO-B inhibitors, antioxidants and neuroprotective agents. **Chem Med Chem**. 2020.
- MCLOED, A. G. *et al.* Neutrophil-Derived IL-1beta Impairs the Efficacy of NF-kappaB Inhibitors against Lung Cancer. **Cell reports**. v. 16, p. 120-132, 2016.
- MIETTINEN, M.; RIKALA, M.; RYSZ, J.; LASOTA, J.; WANG, Z. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) as a marker for malignant vascular tumors and mesothelioma – immunohistochemical study of 262 vascular endothelial and 1640 nonvascular tumors. **American journal of surgical pathology**. v. 36, n. 4, p. 629-639, 2012.
- MILLARES, L. *et al.* Tumor-associated metabolic and inflammatory responses in early stage non-small cell lung cancer: Local patterns and prognostic significance. **Lung cancer**. v. 122, p. 124–130, 2018.
- MOLLICA, A.; LOCATELLI, M.; STEFANUCCI, A.; PINNEN, F. Synthesis and biological of secondary metabolites from marine sponges containing dibrominated indolic systems. **Molecules**. v.17, p. 6083-6099, 2012.
- MONGA, P. K.; SHARMA, D.; DUBEY, A. Comparative study of microwave and conventional synthesis and pharmacological activity of coumarins. **Journal of chemical and pharmaceutical research**. v. 4, n. 1, p. 822-50, 2012.
- MONTAGNER, C. **Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas**. 2007. Dissertação (mestrado em biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2007.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química nova**. v. 24, p. 105-111, 2001.
- MS/ INCA, Ministério da Saúde/ Instituto Nacional do Câncer. 2019. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//livro-abc-5-edicao.pdf>>. Acesso em 19 de junho de 2020.

- MS. Ministério da saúde, 2020. **Câncer: sintomas, causas, tipos e tratamentos**. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer>>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2020.
- MURAD, A.M.; KATZ, A. Oncologia Bases Clínicas do Tratamento. p. 41, 2018.
- MURDOCH, C.; MUTHANA, M.; COFFELT, S. B.; LEWIS, C. E. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nat. Rev. Cancer**. v. 8, p. 618-631, 2008.
- MURRAY, R. D. H. Coumarins. **Natural products reports**. p. 591-618, 1989.
- NEWMAN D. J.; CRAGG, G. M. J. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**. v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- ONDER T. T.; GUPTA, P. B.; MANI, S. A.; YANG, J.; LANDER, E. S.; WEINBERG, R. A. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. **Cancer research**. v. 68, p. 3645-3654, 2008.
- ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de medicina**. v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.
- OPAS/OMS. 2018. Folha informativa – Câncer. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094>. Acesso em 24 de março de 2020.
- PAL, A.; KAMTHANIA, M. C.; KUMAR, A. Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds - A Review. **Scientific research**. v. 1, n. 4, p. 752-769, 2014.
- PAULULAT, T.; TANG, Y.Q.; GRABLEY, S.; THIERICKE, R. Combinatorial chemistry: the impact of natural products. **Chimica Oggi**. v. 17, p. 52-56, 1999.
- PENG, X-M.; DAMU, G.; ZHOU, C. Current developments of coumarin compounds in medicinal chemistry. **Current pharmaceutical design**. v. 19, p. 3884-3930, 2013.
- PEREIRA JR., J. L. Avaliação da resposta inflamatória como marcador de atividade tumoral em pacientes com câncer colorretal. **Revista interdisciplinar de estudos experimentais**. v. 1, n. 4, 2009.
- PLUMMER, M.; DE MARTEL, C.; VIGNAT, J.; FERLAY, J.; BRAY, F.; FRANCESCHI, S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **Lancet global health**. v. 4, n. 9, p. 609-616, 2016.
- POLD, M. *et al.* Cyclooxygenase-2-dependent expression of angiogenic CXC chemokines ENA-78/CXC Ligand (CXCL) 5 and interleukin-8/CXCL8 in human non-small cell lung cancer. **Cancer Res**. v. 64, p. 1853-1860, 2004.
- PONTES, C. L. S. **Produção recombinante e caracterização de uma desintegrina da peçonha de uma *Rinocerophis alternatus* (antiga *Bothrops alternatus*) com atividade antimetastática visando o desenvolvimento de um novo fármaco**. 2011. Tese (doutorado em genética e evolução). Universidade Federal de São Carlos: São Carlos, 2011.

RENSHENG, X.; YANG, Y.; WEIMIN, Z. **Introduction to natural products chemistry**. 1. ed. Science press, 2011.

RIDKER, P. M.; MACFADYEN, J. G.; THUREN, T.; EVERETT, B. M.; LIBBY, P.; GLYNN, R. J.; et al. Effect of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet**. v. 17, p.1833-1842, 2017.

RIVEIRO, M. E.; DE KIMPE, N.; MOGLIONI, A.; VÁSQUEZ, R.; MONCZOR, F.; SHAYO, C.; DAVIO, C. Coumarins: Old compounds with novel promising therapeutic perspectives. **Current medicinal chemistry**. v. 17, p. 1325-1338, 2010.

ROJAHN, C. A. **Produtos químicos e farmacêuticos**. v. 3. México: Atlante, 1956.

ROTHWELL, P. M. *et al.* Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. **Lancet**. v. 377, p. 31-41, 2011.

SABAT, A.; OMAIMA, M.; ABDELHAFEZA; *et al.* Novel coumarin-6-sulfonamides as apoptotic anti-proliferative agents: synthesis, *in vitro* biological evaluation, and QSAR studies. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**. v. 33, n. 1, p. 1095-1107, 2018.

SAFAKISH, M.; HAJIMAHDI, Z.; AGHASADEGHI, M. R.; VAHABPOUR, R.; ZARGHI, A. Design, synthesis, molecular modeling and anti-HIV assay of novel quinazolinone incorporated coumarin derivatives. **Current HIV research**. 2019

SALMONM, S.E. **Farmacología básica e clínica**. p. 629-655, 1998.

SANGI, D. P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química nova**. v. 39, n. 8, p. 995-1006, 2016.

SANGWAN, R.; RAJAN, R.; MANDAL, P.K. HDAC as onco target: Reviewing the synthetic approaches with SAR study of their inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**. v. 158, p. 620-706, 2018.

SINGH, A.; PATEL, P.; PATEL, V. K.; JAIN, D. K.; VEERASAMY, R.; SHARMA, P. C.; RAJAK, H. Histone deacetylase inhibitors for the treatment of colorectal cancer: recent progress and future prospects. **Current cancer drug targets**. v. 17, p. 456-466, 2017.

SAVITHRAMMA, N.; ANKANNA, S. Screening of medicinal plants for secondary metabolites. **Middle east journal of scientific research**. v. 8, p. 579-584, 2011.

SESSP, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. 2015. Fundação Oncocentro de São Paulo. Disponível em: <<http://fosp.saude.sp.gov.br/publicacoes/tabnet>>. Acesso em 24 de março de 2020.

SHI, W.; HU, J. L.; BAO, N.; LI, D. A.; CHEN, L.; SUN, J. B. Design, synthesis and cytotoxic activities of scopoletin-isoxazole and scopoletin-pyrazole hybrids. **Bioorganic e medicinal chemistry letters**. v.27, p. 147-151, 2017.

SHIELS, M. S. *et al.* Circulating inflammation markers and prospective risk for lung cancer. **Journal of national cancer institute**. v. 105, p. 1871-1880, 2013.

SICA, A.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. **Cancer lett**. v. 267, n. 2, p. 204-215, 2008.

SIGURDSSON, V. *et al.* Endothelial Induced EMT in Breast Epithelial Cells with Stem Cell Properties. **Plos one**. v. 6, n. 9, 2011.

SILVA, C. L. **Inibição da metástase via transição epitélio-mesenquimal por shrna, metformina e y27632 em neoplasia mamária**. 2016. Tese (doutorado em genética) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2016.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed., p. 13-15; 2017.

SINGH, A. K.; PATEL, P. K.; CHOUDHARY, K.; JOSHI, J.; YADAV, D.; JIN, J. O. quercetin and coumarin inhibit dipeptidyl peptidase-IV and exhibits antioxidant properties: *In Silico, In Vitro, Ex Vivo*. **Biomolecules**. v. 10, n. 2, 2020.

SLEEMANA, J.P.; *et al.* Concepts of metastasis in flux: the stromal progression model. **Seminars in cancer biology**. v. 22, n. 1, p. 174-186, 2012.

SLEEMAN, J. P. The metastatic niche and stromal progression. **Cancer metastasis review**. v. 31, n. 1, p. 429-440, 2012.

SMYTH, M. J.; DUNN, G. P.; SCHREIBER, R. D. Cancer immune surveillance and immune editing: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. **Adv Immunol**. v. 90, p. 1-50, 2006.

SONI, R.; SOMAN, S. Design and synthesis of aminocoumarin derivatives as DPP-IV inhibitors and anticancer agents. **Bioorganic chemistry**. v. 79, p. 277-284, 2018.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. World cancer report 2014. International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <<https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>>. Acesso em 16 de março de 2020.

ST JOHN, M. A. *et al.* Proinflammatory mediators upregulate snail in head and neck squamous cell carcinoma. **Clinical cancer research**. v. 15, p. 6018-6027, 2009.

SUAREZ-CARMONA, M.; LESAGE, J.; CATALDO, D.; GILLES, C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. **Molecular oncology**. v. 11, p. 805-23, 2017.

SWINNEY, D. C.; ANTHONY, J. How Were New Medicines Discovered? **Nature reviews drug discovery**. v. 10, n. 7, p. 507-519, 2011.

TANIMOTO, A.; WITAICENIS, A.; CARUSO, Í. P.; PIVA, H. M. R.; ARAUJO, G. C.; MORAES, F. R.; FOSSEY, M. C.; CORNÉLIO, M. L.; SOUZA, F. P. D. I.; STASI, L. C. 4-Methylesculetin, a natural coumarin with intestinal anti-inflammatory activity, elicits a glutathione antioxidant response by different mechanisms. **Chemico-biological interactions**. v. 315, 2020.

TAO, S.; YUAN, Q.; WEI-LONG, Z. Epithelial-mesenchymal transition and its regulation in tumor metastasis. **IntechOpen**. v. 10, p. 217-239, 2016.

TAYLOR, M. A.; PARVANI, J. G.; SCHIEMANN, W. P. The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β in normal and malignant mammary epithelial cells. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**. v. 15, p.169-190, 2010.

THAKUR, A.; SINGLA, R.; JAITAK, V. Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. **European journal of medicinal chemistry**. v. 101, n. 28, p. 476-495, 2015.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nature reviews cancer**. p. 442-454, 2002.

TIAN, X. M. **Environmental behavior and ecotoxicological effects of p-dichlorobenzene**. Tese (doutorado), Dongbei University, 2006.

TONG, E. S. P.; MERWE, J. P.; CHIU, J. M. Y.; WU, R. S. S. Effects of 1, 2-dichlorobenzene on the growth, bioenergetics and reproduction of the amphipod, *Melita Longidactyla*. **Chemosphere**. v. 80, p. 20–27, 2010.

TULOTTA, C.; LEFLEY, D. V.; FREEMAN, K.; GREGORY, W. M.; HANBY, A. M.; *et al.* Endogenous production of IL-1B by breast cancer cells drives metastasis and colonisation of the bone microenvironment. **Clinical cancer research published**.v. 25, n. 9, p. 2769-2782, 2019.

UEHARA, T.; KIYOSAWA, N.; SHIMIZU, T.; OMURA, K.; HIRODE, M.; IMAZAWA, T.; URUSHIDANI, T. Species-specific differences in coumarin-induced hepatotoxicity as an example toxicogenomics-based approach to assessing risk of toxicity to humans. **Human e experimental toxicology**. v. 27, n. 1, p. 23–35, 2008.

UOZOMI, U.; LITTEREST, C. L. The effect of cisplatin on renal ATPase activity *in vivo* and *in vitro*. **Cancer chemotherapy and pharmacology**. v. 15, n. 2, p. 93-96, 1985.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed research international**. 2013.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**. v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer. **Revendo ciências básicas**. v. 14, n. 1, p. 99-103, 2016.

WANG, H.; LU, X.; YAO, H.; FENG, J.; LIU, R. Research progress on application of coumarin and its derivatives. **Chemical industry times**. v. 23, n. 8, p. 40-43, 2009.

VISACRI, M. B. **Estudo das reações adversas, qualidade de vida e excreção de cisplatina na urina de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em quimioterapia e radioterapia**. 2013. Dissertação (mestrado em ciências médicas) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2013.

WANG, Q.; GUO, Y.; JIANG, S.; DONG, M.; KUERBAN, K.; LI, J.; FENG, M.; CHEN, Y.; YE, L. A hybrid of coumarin and phenylsulfonylfuroxan induces caspase-dependent apoptosis and cytoprotective autophagy in lung adenocarcinoma cells. **Phytomedicine**. v. 39, p. 160-167, 2018.

WANG, S. B.; LIU, H.; LI, G. Y.; LI, J.; LI, X. J.; LEI, K.; WEI, L. C.; QUAN, Z. S.; WANG, X. K.; LIU, R. M. Coumarin and 3,4-dihydroquinolinone derivatives: Synthesis, antidepressant activity, and molecular docking studies. **Pharmacol reports**. v. 71, n. 6, p. 1244-1252, 2019.

WEBER, G. F. Molecular mechanisms of metastasis. **Cancer letters**. v. 270, n. 1, p. 181-190, 2008.

WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. 3. ed. Academic Press, 2008.

WESSJOHAN, L. A. Synthesis of natural-product-based compound libraries. **Current opinion in chemical biology**. v. 4, p. 303-309, 2000.

WHO, World Health Organization. 2018. Top 10 causes of death. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/causes-of-death/GHO/causes-of-death>>. Acesso em 16 de março de 2020.

WHO, World Health Organization. 2018. Global health estimates 2016: deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000–2016. Disponível em: <https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/>. Acesso em 24 de março de 2020.

WHO, World Health Organization. 2020. Report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/330745>>. Acesso em 28 de março de 2020.

WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Disponível em: <<http://publications.iarc.fr/586>>. Acesso em 19 de junho de 2020.

WILSON, D. O. *et al.* Association of radiographic emphysema and airflow obstruction with lung cancer. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 178, p. 738–744, 2008.

WU, C. *et al.* Correlation between serum IL-1beta and miR-144-3p as well as their prognostic values in LUAD and LUSC patients. **Oncotarget**. v. 7, p. 85876–85887, 2016.

WU, L., WANG, X.; XU, W.; FARZANEH, F.; XU, R. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. **Current medicinal chemistry**. v. 16, p. 4236-4260, 2009.

WU, T. *et al.* Modulation of IL-1beta reprogrammes the tumor microenvironment to interrupt oral carcinogenesis. **Sci Rep**. v. 6, 2016.

YAMAGUCHI, Y.; AKIMOTO, I.; MOTEGI, K.; YOSHIMURA, T.; WADA, K.; NISHIZONO, N.; ODA, K. Synthetic models related to methoxalen and menthofuran cytochrome P450 (CYP) 2A6 interactions. Benzofuran and coumarin derivatives as potent and selective inhibitors of CYP2A6. **Chemical e pharmaceutical bulletin**. v. 61, n. 10, p. 997-1001, 2013.

YANG, F. F.; ZHAO, N.; SONG, J. L.; ZHU, K. K.; JIANG, C. S.; SHAN, P. P.; ZHANG, H. Design, synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based hydroxamate derivatives as histone deacetylase (hdac) inhibitors with antitumor activities. **Molecules**. v. 24, p. 2569, 2019.

YANG, J.; GUO, Y. L.; DC, X.; CAO, L. M.; JIA, J. P. A controllable Fe⁰-C permeable reactive barrier for 1, 4-dichlorobenzene dechlorination. **Chemical engineering journal**. v. 203, p. 166-173, 2012.

YE, X.; WEINBERG, R. A. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. **Trends in cell biology**. v. 25, p. 675-686, 2015.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Em Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. **Química nova**. v. 24, n. 147, 2001.

ZANDI, K. *et al.* *In vitro* antitumor activity of *Gracilaria corticata* (a red alga) against jurkat and molt-4 human cancer cell lines. **African journal of biotechnology**. v. 9, n. 40, p. 6787-6790, 2010.

ZAVRŠNIK, D.; MURATOVIĆ, S.; MAKUC, D.; PLAVEC, J.; CETINA, M.; NAGL, A.; DE CLERCQ, E.; BALZARINI, J.; MINTAS, M. Benzylidene-bis-(4-hydroxycoumarin) and benzopyrano-coumarin derivatives: Synthesis, ¹H/¹³C-NMR conformational and X-ray crystal structure studies and *in vitro* antiviral activity evaluations. **Molecules**. v. 16, n. 7, p. 6023-6040, 2011.

ZHAO, N.; YANG, F.; HAN, L.; QU, Y.; GE, D.; ZHANG, H. Development of coumarin-based hydroxamates as histone deacetylase inhibitors with antitumor activities. **Molecules**. v. 25, n. 3, 2020.