

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

RYLDENE MARQUES DUARTE DA CRUZ

**DERIVADO SEMI-SINTÉTICO CUMARÍNICO 2H-1-BENZOPIRAN-2-ONA, 7-
PRENILOXI COM POTENCIAL ANTITUMORAL**

JOÃO PESSOA - PB

2016

RYLDENE MARQUES DUARTE DA CRUZ

**DERIVADO SEMI-SINTÉTICO CUMARÍNICO 2H-1-BENZOPIRAN-2-ONA, 7-
PRENILOXI COM POTENCIAL ANTITUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

João Pessoa - PB

2016

Catálogo na publicação
Setor de Catalogação e Classificação

C955d Cruz, Ryldene Marques Duarte da.
Derivado semi-sintético cumarínico 2h-1-benzopiran-2-ona, 7- preniloxi com
potencial antitumoral / Ryldene Marques Duarte da Cruz. – João Pessoa, 2016.
113 f. : il.

Orientador: Marianna Vieira Sobral.
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Farmacologia. 2. Cumarina. 3. Atividade antitumoral. 4. Tumor de Ehrlich.
5. Atividade antiangiogênica. 6. Toxicidade. I. Título.

UFPB/BC

CDU - 615(043)

RYLDENE MARQUES DUARTE DA CRUZ

DERIVADO SEMI-SINTÉTICO CUMARÍNICO 2H-1-BENZOPIRAN-2-ONA, 7-PRENILOXI COM POTENCIAL ANTITUMORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

APROVADA EM 27/10/2016

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral
Orientadora – UFPB



Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães
Examinador – UFPB



Prof. Dr. José Pinto Siqueira Júnior
Examinador – UFPB

Á minha família, Renato da Cruz, Elenilda Marques Duarte da Cruz e minha querida irmã Rayssa Marques Duarte da Cruz, a quem eu devo tudo que sou e sempre fizeram de tudo pra me proporcionar o melhor da vida.

AGRADECIMENTOS

Neste momento só tenho gratidão. À Deus que sempre me deu forças para superar todos os obstáculos da minha vida e mesmo quando não achei que conseguiria Ele estava lá me mostrando que tudo é possível e que cada coisa tem o seu momento certo de acontecer.

Agradeço à minha querida orientadora Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral que me ajudou a realizar esse sonho e me auxiliou de todas as maneiras possíveis, sempre tão paciente e dedicada me ensinou tanto e cada dia me surpreende com seu jeito divertido e ao mesmo tempo sério com seu trabalho.

A todos que fazem parte do Laboratório de Oncofarmacologia pelo convívio maravilhoso seja nos dias de eutanásia ou nos dias de festas, foram momentos inesquecíveis. À Ana Paula, Flávia, Rafael, Daiana, Daiene pelo apoio e amizade. Em especial às minhas queridas amigas que levarei para a vida toda Tatianne Mota, Tatyanna Kélvia, Vivianne e Renata. À Jephesson que se tornou um amigo nessa reta final e me ajudou e escutou sempre que precisei. À Monalisa que sempre me aconselhou e se tornou uma grande amiga e conselheira.

Ao auxílio do colega do Laboratório de Laboratório de Imunofarmacologia (CBiotec/UFPB), Dr. Fagner Leite com os estudos imunológicos, assim como da Profa. Dra. Giciane Carvalho, com os estudos histopatológicos.

Ao Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), por oferecer seus recursos e oportunidades, e ao Biotério Prof. Dr. Thomas George (IPeFarM/CCS/UFPB) pelo fornecimento dos animais.

Em especial aos funcionários do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFarM), ao amigo sr. Josué; José Crispim Duarte e Luis Cordeiro, pela prestatividade e apoio técnico no que diz respeito aos animais de laboratório, e Caroline Mangueira por sua assistência na secretaria da pós.

Aos Professores da PgPNSB pela dedicação e ensinamentos. Especial ao Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras, pelo prestatividade e ensinamentos.

Aos professores Drs. José Pinto de Siqueira Júnior, Hemerson Iury Ferreira Magalhaes, Reinaldo Nóbrega De Almeida e Liana Klébia de Moraes Pordeus pela gentileza de fazerem parte desse processo e avaliarem esse trabalho.

À Universidade Estadual de Paraíba (UEPB), em especial ao prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior e Rodrigo Santos Aquino de Araújo por sempre acreditarem no meu trabalho e sempre me auxiliarem quando precisei.

Ao técnico Jean Aguiar, que se sempre disponibilizou com boa vontade para me ajudar nas análises hematológicas e bioquímicas.

Aos meus amigos pessoais Jaismary e Tiago que fizeram parte dessa trajetória, me escutando, aconselhando e mostrando que amigos são outros irmãos que Deus coloca nas nossas vidas.

À minhas queridas amigas Katherine e Ana Paula que desde a graduação de farmácia se fazem presentes me proporcionando momentos inesquecíveis.

Agradeço à minha grande amiga Gabrielle que com seu jeito amigo e calmo de ser sabe dar me dar os melhores conselhos, foi uma amiga que o curso de farmácia me deu e quero levar para vida.

Ao meu companheiro Leonardo tão paciente e gentil que me ajudou de todas as formas possíveis e fez de tudo para me proporcionar os melhores momentos ao seu lado.

Aos meus pais que se dedicaram à nossa criação com amor e ensinamentos e sempre se esforçaram para nos dar o melhor.

À Rayssa minha irmã e melhor amiga, minha inspiração para a vida.

E às agências de fomento: CAPES e CNPq pelo apoio financeiro que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

E a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

O 2h-1-benzopiran-2-ona, 7-preniloxi (UMB-07) é um derivado cumarínico proveniente de uma reação de prenilação na umbeliferona. Derivados cumarínicos apresentam uma gama de atividades farmacológicas, tais como, antibacteriana, anti-inflamatória e antitumoral. Especificamente para o UMB-07, a literatura relata atividades antifúngica, antibacteriana e antitumoral. Apesar de ser um composto citotóxico para células tumorais, não há estudos de mecanismos de ação associados a esse efeito. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar a toxicidade e a atividade antitumoral de UMB-07. O efeito hemolítico de UMB-07 foi avaliado no ensaio de citotoxicidade em eritrócitos de sangue periférico de camundongos. UMB-07 induziu pequeno percentual de hemólise (0,8%) na concentração testada (2000 µg/mL), o que sugere baixa toxicidade. *In vivo*, foi realizado o ensaio de toxicidade pré-clínica aguda para avaliação de efeitos comportamentais e estimativa da dose letal 50% (DL₅₀). UMB-07 (300 ou 2000 mg/kg, via intraperitoneal - i.p.) induziu efeitos depressores nos sistemas nervosos central e autônomo. A DL₅₀ foi estimada em torno de 1000 mg/kg. A genotoxicidade de UMB-07 foi avaliada por meio do ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos. UMB-07 (300 mg/kg - i.p.) não induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados, sugerindo baixa genotoxicidade. O modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich foi utilizado para avaliação da atividade antitumoral de UMB-07 (12,5; 25 ou 50 mg/kg, i.p.), após nove dias de tratamento. UMB-07 (50 mg/kg) apresentou atividade antitumoral por reduzir os parâmetros volume, massa e a quantidade total de células tumorais ($p < 0,05$). Na avaliação de possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse efeito, observou-se que UMB-07 não interfere com a progressão do ciclo celular. Todavia, foi possível observar efeito antiangiogênico para esta cumarina, considerando a redução da microdensidade vascular peritumoral ($p < 0,05$). Ainda, foi avaliado o possível efeito imunomodulador de UMB-07 pela determinação de citocinas e quimiocina no fluido peritoneal dos animais. UMB-07 (50 mg/kg) reduziu os níveis da quimiocina CCL2, que, por sua vez, esta associada a angiogênese, metástase e progressão tumoral. Após tratamento de nove dias com UMB-07 foi possível observar que não houve alteração de parâmetros bioquímicos renais e hepáticos, o que foi corroborado pela análise histológica. Os parâmetros hematológicos alterados (linfócitos e segmentados) permaneceram dentro dos limites normais para a espécie, sugerindo baixo significado clínico para esse efeito. Em modelo *in vitro*, foi observado redução da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos peritoneais estimulados por lipopolissacarídeo. No entanto, esse efeito foi associado a uma citotoxicidade do composto. Estes resultados em conjunto sugerem que UMB-07, *in vivo*, possui baixa toxicidade, além de atividade antitumoral com mecanismo que envolve efeito antiangiogênico, possivelmente associado à redução da quimiocina CCL2.

Palavras-chave: Cumarina. Atividade antitumoral. Tumor de Ehrlich, Atividade antiangiogênica, Toxicidade.

CRUZ, R. M. D. **SEMI-SYNTHETIC COUMARIN DERIVATIVE 2H-1-BENZOPYRAN-2-ONA,7-PRENYLOXI AS ANTITUMOR POTENTIAL.** 2016. 113f. **Dissertation** (Master's degree in Natural Products and Bioactive Synthetics) - UFPB / CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

The 2H-1-benzopyran-2-one, 7-preniloxi (UMB-07) is a coumarin derivative from a prenylation reaction in commercial umbelliferone. Published data reported that coumarin derivatives have a range of pharmacological activities such as antibacterial, antiinflammatory and antitumor activity. Specifically for the UMB-07, the literature reports antifungal, antibacterial and antitumor activities. However, despite being a cytotoxic compound for tumor cells, there is no studies of mechanisms of action associated with this effect. This study aimed to evaluate the toxicity and antitumor activity of UMB-07. The hemolytic effect UMB-07 was evaluated by cytotoxicity assay in peripheral blood erythrocytes of mice. UMB-07 induced a small percentage of hemolysis (0.8%) at the concentration tested (2000 mg/mL), indicating a low toxicity. *In vivo*, the assay was performed Preclinical acute toxicity UMB-07 to evaluate behavioral effects and estimated 50% lethal dose (LD50). UMB-07 (300 or 2000 mg/kg, intraperitoneal injection - i.p.) induced depressive effects in the central and autonomic nervous systems. The LD50 was estimated at about 1000 mg / kg. Genotoxicity UMB-07 was assessed by the micronucleus test in the peripheral blood of mice. UMB-07 (300 mg/kg - i.p.) did not induce an increase in the number of micronucleated erythrocytes, suggesting low genotoxicity. The ascitic Ehrlich carcinoma model was used to evaluate the antitumor activity UMB-07 (12.5, 25 or 50 mg/kg, i.p.) after nine days of treatment. UMB-07 (50 mg/kg) showed antitumor activity by reducing the volume parameters, mass, and the total amount of tumor cells ($p < 0.05$). In evaluating possible mechanisms involved in this effect, it was observed that UMB-07 does not interfere with the cell cycle progression. However, antiangiogenic effect was observed for this coumarin, considering the reduction of Microvessel peritumoral ($p < 0.05$). Still, it evaluated the possible immunomodulatory effect of UMB-07 for determination of cytokines and chemokine peritoneal fluid of animals. UMB-07 (50 mg/kg) reduced levels of CCL2 chemokine, which, in turn, is associated with angiogenesis, metastasis and tumor progression. After treatment nine days with UMB-07 was observed that there was no change in kidney and liver biochemical parameters, which was confirmed by histological analysis. The altered hematological parameters (lymphocytes and segmented) remained within normal limits for the species, suggesting low clinical significance for this finding. *In vitro* model, we observed reduction of nitric oxide (NO) production in peritoneal macrophages stimulated by lipopolysaccharide. However, this effect was associated with a cytotoxicity of the compound on those cells. These results together suggest that UMB-07 *in vivo* has low toxicity and antitumor activity with a mechanism involving anti-angiogenic effects possibly associated with the reduction of CCL2 chemokine.

Keywords: Coumarin. antitumor activity. Ehrlich tumor, anti-angiogenic activity, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da 2H-1- Benzopiran-2-ona, 7-preniloxi.....	28
Figura 2. Figuras representativas da membrana peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos	49
Figura 3. Fotomicrografias dos rins dos animais dos grupos experimentais	56
Figura 4. Fotomicrografias dos fígados dos animais dos grupos experimentais	58
Figura 5. Fotomicrografias dos fígados dos animais dos grupos experimentais.	60

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1. Representação esquemática dos métodos utilizados para a avaliação da toxicidade e atividade antitumoral <i>in vivo</i> de UMB-07.....	35
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Efeito do tratamento (i.p.) com UMB-07 e 5-FU em camundongos transplantados com tumor de ehrlich. 47
- Gráfico 2.** Percentagem de células de tumor de ehrlich nas fases do ciclo celular após os tratamentos com UMB-07. 48
- Gráfico 3.** Gráfico representativo do efeito do tratamento com UMB-07 e 5-FU na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich. 49
- Gráfico 4.** Concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com tumor de ehrlich submetidos aos diferentes tratamentos..... 51
- Gráfico 5.** Inibição da produção do óxido nítrico em macrófagos peritoneais submetidos aos diferentes tratamentos com o UMB-07 61
- Gráfico 6.** Efeito do UMB-07 sobre a viabilidade celular em macrófagos peritoneais. 61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Características físico-químicas do UMB-07	34
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos da administração intraperitoneal aguda de 2H-1-Benzopiran-2-ona, 7-preniloxi em camundongos.	45
Tabela 2. Número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com UMB-07 e ciclofosfamida.	46
Tabela 3. Consumo de água e ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com tumor de ehrlich submetidos aos diferentes tratamentos com UMB-07	52
Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com tumor de ehrlich submetidos aos diferentes tratamentos com UMB-07	53
Tabela 5. Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com tumor de ehrlich submetidos aos diferentes tratamentos com UMB-07	54
Tabela 6. Índices dos órgãos de camundongos transplantados com tumor de ehrlich submetidos aos diferentes tratamentoscom UMB-07	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5- fluroacil
AIDS	Síndrome Da Imunodeficiência Adquirida
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
CAE	Carcinoma Ascítico de Ehrlich
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCL2	Quimiocina (motivo CC) de ligante 2
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDK	Cinase Dependente de Ciclina
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CH₅₀	Concentração que produz 50% de hemólise
CHCM	Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média
DL₅₀	Dose que causa 50% da letalidade dos animais
DMSO	Dimetilsulfóxido de sódio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico
FGFb	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
FUDR	5-Fluorodesoxiuridina
H.E.	Hematoxilina e eosina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HELA	Célula imortal derivada de câncer cervical
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HFS	Solução Fluorocrômica Hipotônica
HL-60	<i>Human promyelocytic leukemia cells</i>
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IMiDs	Drogas Imunomoduladoras com Propriedades Antiangiogênicas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IFN	Interferon
IGFR	Inibidores De Receptor De Fator De Crescimento Da Insulina

LMA	Leucemia Mielóide Aguda
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-1,2,4-oxadiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
MXT	Metotrexato
NaCl	Cloreto de sódio
Na₂SO₄	Sulfato de Sódio
NFκB	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
NK	<i>Natural Killer</i>
NMP	Neoplasias Mieloproliferativas
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
ONCOFAR	Laboratório de Oncofarmacologia
OMS	Organização Mundial de Saúde
v/v	Volume/volume
PBS	Solução Tampão Fosfato
PD-ECGF	Fator de Crescimento da Célula Endotelial Derivado de Plaqueta
PI	Iodeto de Propídeo
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
pRb	Proteína Retinoblastoma
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
TAM	Macrófagos Associados ao Tumor
TMB	Tetrametilbenzidina
TGF-β	Fator de Necrose Tumoral
TH1	Linfócito T auxiliar tipo I
TH2	Linfócito T auxiliar tipo II
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UMB-07	2h-1-benzopiran-2-ona, 7- preniloxi
UNICAMP	Universidade de Campinas
UV	Ultravioleta
VCM	Volume Corpuscular Médio
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
2.1 Aspectos gerais do câncer	4
2.2 Terapia antineoplásica: classes de fármacos e toxicidade	7
2.3 Controle do ciclo celular, angiogênese e microambiente tumoral	11
2.4 Estudo da toxicologia/farmacologia de fármacos com potencial antitumoral	21
2.5 Produtos naturais e o câncer	24
2.6 Cumarinas e seu potencial antitumoral	26
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Local da pesquisa	32
4.2 Material	32
4.2.1 Linhagens de células tumorais	32
4.2.2 Animais	32
4.2.3 Reagentes	33
4.2.4 Equipamentos	33
4.2.5 Derivado cumarínico	33
4.3 Métodos	34
4.3.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos	35
4.3.2 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda	36
4.3.3 Avaliação da genotoxicidade	37
4.3.4 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	37
4.3.4.1 Volume do tumor, massa tumoral e total celular	38
4.3.4.2 Análise do ciclo celular	38
4.3.4.3 Avaliação do efeito antiangiogênico	39
4.3.4.4 Quantificação das citocinas IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, CCL2, TNF- α e IFN- γ no lavado peritoneal	39
4.3.5 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com tumor de ehrlich	40
4.3.6 Quantificação indireta de NO em macrófagos	41

4.4	Análise estatística	42
5	RESULTADOS	44
5.1	Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos	44
5.2	Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda.....	44
5.3	Avaliação da genotoxicidade.....	45
5.4	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	46
5.4.1	Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade e total celular	46
5.4.2	Análise do ciclo celular	47
5.4.3	Investigação do efeito antiangiogênico	48
5.4.4	Quantificação das citocinas IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, CCL2, TNF- α e IFN- γ no lavado peritoneal	49
5.5	Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de tumor de ehrlich.....	52
5.5.1	Análises histológicas	55
5.6	Ensaio de inibição da produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais.....	60
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES.....	78
	REFERÊNCIAS	80
	ANEXOS.....	

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Câncer é um termo genérico utilizado para descrever um conjunto de doenças com etiologia multifatorial que atinge milhares de indivíduos a cada ano. Caracteriza-se por proliferação celular sustentada, resistência à morte celular, indução de angiogênese e ativação de invasão e metástase (HANAHAH; WEINBERG, 2011; SINGH, 2013).

O câncer é um grupo de doenças com grandes repercussões sociais, econômicas e psicológicas. Sendo assim, são incansáveis os esforços para se obter avanços no entendimento da complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos que são a base da transformação progressiva de células sadias em derivados altamente malignos (XIU et al., 2015).

Entre os métodos utilizados para o tratamento do câncer, a quimioterapia, apesar de ser considerada eficaz, apresenta efeitos secundários indesejáveis que ocorrem devido à baixa especificidade dos fármacos antineoplásicos. Outro fator limitante é a dificuldade do fármaco atingir o alvo em concentrações adequadas (SAFARZADEH et al., 2014).

Baseado nisso, busca-se alcançar estratégias para garantir uma citotoxicidade direcionada e reduzir o desenvolvimento de resistência aos antineoplásicos (WU; ZHOU, 2015). Nesta conjuntura, várias substâncias sintéticas podem ser obtidas por meio da síntese de novos compostos ou por modificações na estrutura de moléculas já conhecidas, direcionada pela relação estrutura química e ação biológica, na perspectiva de obter novas drogas com potencial terapêutico em diversos alvos e com menor toxicidade (ELLESTAD, 2006; ATHAYDE-FILHO, 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

Compostos heterocíclicos têm sido fontes de fármacos sintéticos, e seus estudos têm crescido exponencialmente, apresentando diferentes aplicações na indústria farmacêutica. A importância destes compostos está relacionada à possibilidade da introdução de heteroátomos no anel e novos grupos substituintes, o que lhes confere diferentes propriedades químicas e biológicas (MELO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008).

Dentre os compostos heterocíclicos, a classe dos derivados cumarínicos têm se mostrado uma classe de compostos com atividades farmacológicas diversas, tais como anti-inflamatória (FYLAKTAKIDOU et al., 2004), antioxidante (KOSTOVA et al., 2011), antinociceptiva (ALIPOUR et al., 2010), hepatoprotetora (ATMACA, 2011), antitrombótica (PENG et al., 2013), antimicrobiana (ARAÚJO et al., 2016), anti-tuberculose (MANVAR et al., 2011), antidepressiva (SASHIDHARA et al., 2011) e antitumoral (KIM et al., 2005; LIU et al., 2014).

Apesar dessa gama de efeitos já elucidados dos derivados cumarínicos, estes ainda permanecem como uma das classes mais versáteis de compostos para a descoberta de drogas com potencial antitumoral. Devido às aplicações potenciais de cumarinas na quimioterapia do câncer, grandes esforços têm sido feitos sobre a concepção e síntese desses derivados com atividade antitumoral (EMAMI; DADASHPOUR, 2015).

O derivado cumarínico 2h-1-benzopirran-2-ona, 7- preniloxi (UMB-07) foi sintetizado a partir de uma reação de alquilação (brometo de prenila) na umbeliferona comercial. Dados da literatura mostram que esse derivado apresenta atividades antifúngica (GUERRA et al., 2015) e antibacteriana (DE ARAÚJO et al., 2016), além de atividade antitumoral *in vitro* (BABA et al., 2002; HAGHIGHI et al., 2014) e *in vivo* (BABA et al., 2002). Porém, não há relatos de mecanismos de ação antitumoral para esta cumarina.

Nesse sentido, reconhecendo o potencial farmacológico dos derivados cumarínicos, o presente trabalho objetiva contribuir para a pesquisa científica no que se refere à investigação da atividade toxicológica e farmacológica de produtos sintéticos como o UMB-07, avaliando, por meio de ensaios *in vivo*, sua toxicidade, atividades antitumoral e possíveis mecanismos de ação envolvidos em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

Neoplasia é o termo designado para caracterizar o aumento anormal da replicação celular de um tecido onde há perda do controle do organismo gerando efeitos negativos ao portador. Quando há um crescimento exacerbado essa neoplasia torna-se um tumor (JÚNIOR et al., 2014), sendo estes classificados em benignos ou malignos (GOSHIMA et al., 2008).

Os tumores benignos caracterizam-se por um crescimento lento, formação de cápsula fibrosa, não são invasivos e apresentam semelhança com o tecido de origem. Já os tumores malignos, ou câncer, têm a capacidade de se proliferar mais rapidamente que os tecidos normais, além de induzir formação de novos vasos, e serem invasivos e bem diferenciados dos outros tecidos (COENEGRACHTS et al., 2009).

O câncer pode ser denominado de formas diferentes de acordo com o tecido em que se desenvolve. Como exemplo, pode-se citar o câncer de pele ou mucosa que são denominados de carcinoma, porém se o câncer tiver início em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Pode ser chamado de linfoma, quando acomete o sistema linfático, e leucemia quando atinge células jovens do sangue que se acumulam na medula óssea (BRANDÃO et al., 2010).

Segundo relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012, foram registrados 14,1 milhões de novos casos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo. Nos últimos anos, o câncer esteve entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (STEWART; WILD, 2014; WHO, 2014).

O câncer é um problema de saúde pública, principalmente entre os países em desenvolvimento, onde estima-se que, para as próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponderá a cerca de 20 milhões de casos novos estimados para 2025. A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de

próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes (INCA, 2016).

O câncer está diretamente ligado à exposição a fatores de risco. Em estudo feito por Martin-Moreno (2008) foi descrito que aproximadamente 30% dos casos são considerados evitáveis por modificação desses fatores. Estes incluem: o tabagismo, considerado importante fator de risco para câncer de pulmão e cânceres da cavidade oral e esôfago (DANAELI et al., 2005; LIM et al., 2012; WCRF; AICR, 2007); o excesso de consumo de álcool que está relacionado a cânceres da cavidade oral, da faringe, da laringe, e do esôfago, bem como da mama e do fígado (IARC 2010); infecções persistentes com bactérias, vírus ou parasitas (MARTEL et al., 2012); fatores hormonais, principalmente em mulheres, em particular no que se refere ao câncer de mama (BERAL et al., 2011; REEVES et al., 2012; MCCORMACK; BOFFETTA, 2011); e, ainda, fatores ambientais, como a poluição do ar doméstico e poluentes do ar exterior, que podem aumentar o risco de câncer do pulmão (RAASCHOU-NIELSEN et al., 2013, EVANS et al., 2013; LIM et al., 2012).

Aliados aos fatores descritos, as dietas pouco saudáveis incluindo alto consumo de carne vermelha, carne processada e sódio, assim como a baixa ingestão de frutas e vegetais também são consideradas fatores de risco para o câncer (LIM et al., 2012; WCRF; AICR, 2007). Por outro lado, a prática regular de exercício físico pode reduzir o risco de desenvolver alguns tipos de câncer, como de cólon (HARRIS et al., 2009), de mama (MONNINKHOF et al., 2007), de endométrio e de próstata (WCRF; AICR, 2007).

No câncer, as células são capazes de se manter por possuir diversas características específicas, tais como, a autossuficiência em sinais de crescimento e a resistência aos mecanismos antiproliferativos e apoptóticos; a reprogramação do metabolismo energético, para suprir as células provenientes desse crescimento exacerbado; a aquisição de imortalidade replicativa; a instabilidade do genoma e a inflamação promotora de tumor. As células tumorais podem também conseguir o suporte de células do tecido adjacente e atrair novos vasos sanguíneos (angiogênese) para levar nutrientes e oxigênio, assim como podem escapar da atuação do sistema imunológico, para, por fim, produzir metástase em órgãos distantes (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em relação à capacidade de manter a autossuficiência em sinais de crescimento, sabe-se que esse processo pode ser estimulado de diferentes formas, incluindo o estímulo a secreção de fatores de crescimento, a ativação do receptor mutante anormal, bem como a liberação excessiva de componentes de sinalização celular (CALDWELL et al., 2010; ITKONEN et al., 2013). Além de induzir e manter o estímulo para o crescimento e a proliferação, as células do câncer têm a capacidade de contornar mecanismos que regulam negativamente esse processo, os chamados supressores de tumor, dentre estes, as proteínas p53 e retinoblastoma (HANAHA; WEINBERG, 2011; WELLS et al., 2011; YANG et al., 2006; FARDINI et al., 2013).

Paralelamente a alta capacidade de proliferação, as células transformadas passam a escapar dos mecanismos apoptóticos. A morte celular por apoptose serve como um mecanismo natural de barreira para a patogênese do câncer (HANAHA; WEINBERG, 2000; ELMORE, 2007), quando, por exemplo, há uma sinalização excessiva de oncogenes e danos ao DNA associados à hiperproliferação. No entanto, estudos afirmam que a apoptose é atenuada nos tumores que conseguem progredir para estados de alta malignidade (STRASSER et al., 2011).

Devido ao crescimento rápido e descontrolado as células tumorais precisam de ajustes correspondentes às suas necessidades energéticas com a finalidade de impulsionar esse processo. No câncer, as células são capazes de realizar um processo conhecido como "efeito Warburg", onde mesmo em condições aeróbicas a glicose é direcionada apenas para o processo de glicólise levando a um estado que tem sido denominado "glicólise aeróbica" que gera altas concentrações de piruvato e seu metabólito, o lactato, que auxilia as células tumorais em diversos processos como invasão tumoral e supressão de efeitos anticancerígenos (MUNKLEY; ELLIOTT, 2016).

Outra característica essencial para as células cancerígenas é a capacidade de ultrapassar o processo de senescência celular normal resultante do encurtamento dos telômeros, o que lhe confere imortalidade replicativa. Sabe-se que a ativação da telomerase é um passo crítico na carcinogênese e ocorre em mais de 90% dos cânceres (LIU et al., 2012).

Durante a embriogênese, o desenvolvimento da vasculatura envolve o

surgimento de novas células endoteliais e sua montagem em tubos (vasculogênese), além do surgimento de novos vasos a partir dos pré-existentes (angiogênese). Em seguida, a vasculatura normal torna-se, em grande parte quiescente, ou seja, no adulto a angiogênese ocorre como parte dos processos fisiológicos, tais como cicatrização de feridas e ciclo reprodutivo feminino. Em contraste, durante a progressão do tumor, um "switch angiogênico" é quase sempre ativado e permanece estimulando a formação de novos vasos para auxiliar no processo de sustentação e expansão do tumor (TULI et al., 2015).

O câncer também tem sido associado a respostas inflamatórias, produzindo um microambiente tumoral que contribui para a sustentação do processo neoplásico. A inflamação promove vários efeitos envolvidos na progressão do câncer, como proliferação, angiogênese e metástase por meio da regulação positiva de várias vias, incluindo NF- κ B, TNF- α e TGF- β (MANTOVANI; ALLAVENA; SICA, 2008; ELINAV et al., 2013; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A capacidade de células tumorais para metastizar é relacionada com a flexibilidade das células em alterar a sua forma e função, atravessar a membrana basal, extravasar em vasos linfáticos e sanguíneos, e trafegar para locais distantes onde eles ocupam um microambiente distinto (VALASTYAN; WEINBERG, 2011; LEBER; EFFERTH, 2009; TALMADGE; FIDLER, 2010).

Todas as características descritas para as células cancerígenas as distinguem das células que compõem tecidos saudáveis do organismo, o que tem estimulado o estudo e a compreensão dos processos biológicos envolvidos, na tentativa de melhor caracterizar os possíveis alvos farmacológicos, o que pode contribuir na incessante busca de terapias efetivas e seguras para o tratamento da doença (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

2.2 Terapia antineoplásica: classes de fármacos e toxicidade

Existem mais de 200 tipos de câncer descritos, com diferentes causas, sintomas e tratamentos (CRU, 2014), sendo a cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e terapia alvo, as terapias mais utilizadas (WHO, 2015).

Os agentes que atuam sobre o câncer podem ser classificados em agentes

que inibem a iniciação do processo carcinogênico ou agentes que inibem a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão da doença. Dentre os que inibem a fase de iniciação pode-se citar o consumo regular de chá verde, *Camellia sinensis*, no Oriente. Observa-se que nessa região a incidência de câncer de cólon e mama é muito mais baixa comparada com dados do Ocidente, podendo ser justificado pelos flavonoides e outros compostos fenólicos presentes no chá verde, especialmente a 3-galato-epigallocatequina, que possuem atividade comprovada em diversos sistemas fisiológicos (XIANG et al., 2016; HUANG et al., 2016).

Os agentes que inibem a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão do câncer são os mais estudados para o desenvolvimento de novos fármacos, pois atuam após a instalação da doença (BRANDÃO et al., 2010).

Grande parte dos fármacos usados na quimioterapia antineoplásica interfere de alguma forma na progressão do ciclo celular. Assim, esses fármacos podem ser classificados conforme a sua atuação sobre o ciclo celular em fármacos ciclo-específicos, os quais atuam somente nas células que se encontram no ciclo celular, e fármacos ciclo-inespecíficos, quando exercem sua ação nas células independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G0 (ALMEIDA et al., 2004).

Os fármacos ciclo-específicos incluem, por exemplo, os agentes antimetabólitos que exercem seus efeitos principalmente por bloquearem bioquimicamente a síntese do DNA e, sendo assim, ficam restritos à atuarem na fase S do ciclo celular. Como exemplo podem ser citados os análogos do ácido fólico: Metotrexato (MXT); análogos das pirimidinas: Fluorouracil (5-Fluorouracil; 5-FU); Floxuridina (5-Fluorodesoxiuridina; FUDR); Citarabina (citosina arabinosídeo, ara-C); e análogos das purinas: Mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP). Outros fármacos ciclo-específicos incluem os alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina) e taxanos (paclitaxel, docetaxel) que são considerados agentes antimitóticos por atuarem especificamente na fase M do ciclo celular (ALMEIDA et al., 2004; GARRO; PUNGITORE, 2015; VISCONTI et al., 2016).

Já os fármacos ciclo-inespecíficos podem ser subclassificados de acordo com o mecanismo de ação no DNA, já estes eles podem agir de diferentes maneiras, em: fármacos que interagem diretamente com o DNA, como os agentes

alquilantes, dentre eles, mostardas nitrogenadas, nitrossuréis e complexos de coordenação de platina; fármacos que formam radicais livres e destroem o DNA através da fragmentação de suas hélices, como a bleomicina; fármacos que interagem com a fenda menor do DNA, como berenil, pentamidina e análogos; fármacos que alteram as propriedades de pareamento das bases, como os agentes intercalantes proflavina, acridina, amsacrina; e fármacos que inibem a topoisomerase, como a doxorrubicina (ALMEIDA et al., 2004; CHAVEZ-GONZALEZ et al., 2016).

Baseados nos diversos mecanismos de resistência das células tumorais, foi dado início a uma era de terapia-alvo que se baseia na constante identificação de alterações no microambiente tumoral para que possam ser elucidados novos alvos terapêuticos (FIGUERAS et al., 2007).

Entre esses diversos alvos pode-se citar os anticorpos monoclonais trastuzumab, com alvo no receptor HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), utilizado para tratamento de câncer de mama, cetuximab com ação no receptor de crescimento EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*); inibidores de proteínas cinase como imatinib, utilizados no tratamento de leucemia mieloide crônica; inibidores da histona desacetilase constituem um outro grupo no tratamento do câncer e como exemplo pode-se citar o ácido hidroxâmico suberoilanolida. Um outro mecanismo utilizado para combater o crescimento de células tumorais se dá por meio da utilização de agentes que atuam nos vasos sanguíneos, que fornecem suprimento de oxigênio e nutrientes, como por exemplo, o bevacizumab que tem ação antiangiogênica (URRUTICOECHEA et al., 2010).

Em paralelo com o desenvolvimento das novas terapias-alvo, o uso de produtos biológicos fez avanços significativos. Um exemplo disso é a utilização de vetores virais para melhorar a eficácia da quimioterapia, por meio da obtenção de uma concentração suficientemente elevada do fármaco anticancerígeno perto das células malignas. Um outro mecanismo de atividade antitumoral envolve a utilização de vírus o qual, ao chegar no tumor, ativa uma resposta imune contra o mesmo (AHANI et al., 2016).

A maioria dos agentes atualmente disponíveis agem em nível celular, principalmente em células que estão em processo de divisão ativo, interferindo no processo de crescimento e divisão das células (LEITE et al., 2012). Sendo assim,

os quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer podem afetar tanto as células sadias quanto as neoplásicas, ocasionando maiores danos a células malignas devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos destes dois tipos celulares. Porém, devido ao fato desses compostos atingirem células saudáveis também, eles ocasionam uma toxicidade que já vem sendo estudada desde o início do seu uso na década de 40 (NIOSH, 2010).

Dentre os efeitos indesejados mais comuns causados pelo tratamento com esses fármacos pode-se destacar a toxicidade hematológica, que inclui mielossupressão, associada à trombocitopenia e anemia, além de efeitos mais comuns como náusea, diarreia, anorexia, mal-estar, alopecia, dor e fraqueza (MOTZER et al., 2009; ESCUDIER et al., 2007; STERNBERG et al., 2010; MOTZER et al., 2013; HUDES et al., 2007; AVILA et al., 2010).

Ainda, os antineoplásicos podem se classificar em irritantes ou vesicantes, de acordo com o potencial agressivo aos vasos sanguíneos e tecidos adjacentes. Fármacos considerados irritantes causam danos nos tecidos que não evoluem para necrose, como 5-fluorouracil, carmustina e docetaxel, porém eles podem causar eritema, dor, inflamação no local da punção e uma sensação de queimação. Já os vesicantes, tais como, doxorrubicina, vincristina e vinblastina, causam eritema, edema, e necrose cutânea (CRIADO et al., 2010).

Antineoplásicos também podem produzir outros efeitos como toxicidade renal e cardiotoxicidade, ocasionados por fármacos como docetaxel e doxorrubicina, bem como toxicidade reprodutiva (amenorreia, azoospermia irreversível e aborto). Além disso, pode-se observar neurotoxicidade (alteração do estado mental, coma, neuropatia periférica, convulsões generalizadas, ataxia cerebelar), que é um efeito comum da cisplatina e hepatotoxicidade podendo culminar em hepatite fulminante induzida pela flutamida, utilizada no tratamento do câncer de próstata (KEVSER et al., 2016; NAKANO et al., 2015; PRADOS et al., 2012; GERMANAS; PANDYA, 2002).

Apesar de serem utilizados contra os tumores, alguns fármacos podem induzir surgimento de novas neoplasias durante o tratamento, detectáveis, muitas vezes, anos após o fim da terapia. Por exemplo, em pacientes que fazem uso da hidroxiureia, isolada ou em associação, para tratamento de neoplasias mieloproliferativas (NMP) existe o risco do surgimento da síndrome mielodisplásica

(SMD) e leucemia mieloide aguda (LMA) (BJÖRKHOLM et al., 2011).

A terapia alvo, incluindo os inibidores de receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), inibidores de receptor de fator de crescimento da insulina (IGFR) e inibidores do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), surgiram como uma possibilidade de minimização desses limitantes efeitos indesejáveis dos antineoplásicos citotóxicos. Apesar disso, estes também induzem efeitos indesejáveis tais como sangramentos na região esofágica, diarreia, perda de apetite, entre outros (KOTHARI; ALMHANNA, 2015; CHEN, 2009).

Sendo assim, devido a essa baixa seletividade, e consequentemente alta toxicidade para tecidos saudáveis, estudos buscam o aprimoramento da terapia do câncer, para aumento da eficácia, e o alcance do sucesso terapêutico na prática oncológica bem como para a redução da toxicidade associada ao tratamento (CORDEIRO et al., 2014).

2.3 Controle do ciclo celular, angiogênese e microambiente tumoral

O ciclo celular é caracterizado como uma série de eventos que ocorrem em uma célula com a finalidade de duplicação do genoma e reprodução em duas células filhas. Apresenta-se dividido em quatro fases consecutivas, a saber: G1 que é a fase na qual há o crescimento celular, a fase S na qual há duplicação do DNA, a fase G2 onde ocorre síntese de proteínas necessárias para a divisão celular, e a fase M que é conhecida como fase de mitose, na qual há divisão do DNA e, consequentemente, divisão celular (CURTIS; BRUN, 2010).

A regulação adequada do ciclo celular é vital para o funcionamento da célula, assim como é importante detectar danos no DNA e interromper o ciclo para que haja a reparação ou eliminação das células com danos irreparáveis (MOLLER et al., 2003). Nesse contexto, o desenvolvimento de muitas neoplasias está associado a problemas na regulação do ciclo celular (YE et al., 2003; GUICHARD et al., 2014).

A progressão através das fases do ciclo celular é controlada pela atividade de Cinases Dependentes de Ciclinas (CDKs), que constituem uma família de 20 membros (MALUMBRES et al., 2009; GOPINATHAN, RATNACARAM, KALDIS,

2011). A atividade das CDKs é regulada durante as diferentes fases por diversos mecanismos. Estas são proteínas cinases serina-treonina caracterizadas por terem uma região de ligação a uma outra proteína chamada de ciclina que possui domínios essenciais para a ativação da atividade enzimática das CDKs, para que haja progressão do ciclo celular (KARIMIANA et al., 2016).

Outras proteínas fazem parte da regulação do ciclo celular. A proteína Proteína Retinoblastoma (pRb), uma vez fosforilada por um complexo ciclina/CDK, libera o fator de transcrição E2F que ativa a expressão de genes envolvidos na replicação de DNA e na progressão do ciclo celular (HENLEY; DICK, 2012; DICK, 2007; EZHEVSKY et al., 1997; YAO et al., 2008). Já no processo de regulação negativa do ciclo celular, a proteína p53, conhecida como supressora de tumor, inibe a progressão do ciclo para reparo de danos ou indução de morte celular (ROOS et al., 2007; ROOS; KAINA, 2013; HUI et al., 1997; KAO et al., 2007). No câncer, essas proteínas citadas como reguladores do ciclo celular são alvos de anomalias oncogênicas, que desregulam sua expressão e, portanto, induzem proliferação descontrolada (QIN; NG, 2001).

Nesse contexto, é possível apontar as características biológicas do câncer nas quais a desregulação do ciclo celular está envolvida. Estas incluem, A) *Sinalização proliferativa sustentada*: as células tumorais fazem liberação autócrina de fatores crescimento, os quais sustentam a proliferação celular mesmo em meio com baixa concentração de fatores de crescimento externos; B) *Insensibilidade a supressores de crescimento*: em condições normais, os fatores antiproliferativos são produzidos para manter a quiescência celular e a homeostase do tecido. Genes supressores de tumor, tais como o gene associado ao retinoblastoma (RB) e as proteínas p53, desempenham papéis fundamentais nos mecanismos que ajudam as células a decidir entre a proliferação, senescência e via apoptótica. A inativação de genes supressores de tumor em células cancerosas lhes permitem contornar os programas que exercem uma regulação negativa sobre o crescimento descontrolado da célula; C) *Evasão de mecanismos de morte celular*: a apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada que ocorre ao longo da vida durante o desenvolvimento e desempenha um papel crítico na manutenção da homeostase celular. As células tumorais impedem a sua auto-destruição por contornar mecanismos apoptóticos normais por vários meios,

principalmente por meio da perda da função supressora de tumor p53 (GARCÍA-CABALLERO et al., 2016).

Considerando que a desregulação do ciclo celular é uma característica fundamental das células tumorais, a interrupção do ciclo celular direcionada para células malignas é uma abordagem importante para a terapia do câncer (URREGO et al., 2014).

Vários agentes citotóxicos são capazes de ocasionar a parada ou retardo do ciclo celular na fase G0/G1, S ou fase G2/M, produzindo morte celular por apoptose (FU et al., 2015; JOE et al., 2002; CAMARGO et al., 2015). Como exemplo, podem ser citados os fármacos antimetabólitos, como o 5-fluorouracil, e os antimitóticos, como os alcaloides da vinca, dentre estes, a vinblastina e a vincristina (VALLO et al., 2015).

Angiogênese é um processo caracterizado pela formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Normalmente ocorre durante processos como o desenvolvimento embrionário, homeostase, como por exemplo, na formação de corpo lúteo, e em condições patológicas, tal como na inflamação crônica, e na progressão do tumor, nesse caso chamado de angiogênese tumoral que é um processo essencial no crescimento progressivo de neoplasias e na produção de metástases (BENEDITO; HELLSTRÖMB, 2013; SERBAN et al., 2015).

Em condições fisiológicas, a angiogênese depende do balanço de moduladores positivos e negativos dentro do microambiente vascular (HANAHAH; FOLKMAN, 1996) e exige a atuação de uma série de moléculas, incluindo fatores pró-angiogênicos, proteínas da matriz extracelular, receptores de adesão, e enzimas proteolíticas. Sendo assim, as células endoteliais angiogênicas têm um padrão de expressão que é caracterizado por um interruptor que medeia o equilíbrio proteolítico nas células para um fenótipo invasivo, bem como pela expressão de moléculas de adesão específicas. Em tecidos normais, a quiescência vascular é mantida pela influência dominante de inibidores endógenos de angiogênese (fatores antiangiogênicos) sobre os estímulos pró-angiogênicos (BERTRAND et al., 2014).

Quando ocorre a liberação de fatores pró-angiogênicos e, conseqüentemente ativação de células endoteliais, há o surgimento de dois tipos

celulares com fenótipos diferentes que são chamados de células de ponta e células de sustentação (BUSSMANN et al., 2011). A célula de ponta é caracterizada por ser uma célula migratória, que estende longos filopódios fazendo a varredura do ambiente para sinais atrativos ou repelentes, e, portanto, serve para orientar o novo vaso sanguíneo em uma determinada direção. Próximo a essas células de ponta estão as células de sustentação que proliferam durante a extensão do broto celular e formam o novo lúmen vascular (ARECK et al., 2010).

Sendo assim, esses dois tipos de células endoteliais trabalham em processos regulados, e uma vez que as conexões e o fluxo de sangue forem estabelecidos, a atividade migratória e a proliferação cessa e, eventualmente, elas adotam um "fenótipo de repouso" (TREPAT et al., 2012; CALEY et al., 2016).

O desequilíbrio entre os reguladores positivos e negativos desencadeia uma angiogênese patológica, e esta depende, principalmente, da liberação de fatores de crescimento específicos para células endoteliais, e/ou da regulação negativa de fatores inibidores da angiogênese por células inflamatórias ou neoplásicas, que estimulam o crescimento de vasos sanguíneos do hospedeiro (MAEDA, 2012).

Diversos fatores de crescimento estão envolvidos nesse processo, como o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fator de Crescimento da Célula Endotelial Derivado de Plaqueta (PD-ECGF), os Fatores de Crescimento Derivados de Plaquetas (PDGFs), Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) (BRAT; VAN MEIR, 2001) e Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (bFGF), que se ligam a receptores da superfície celular, ativando uma cascata de sinalização intracelular e induzindo a angiogênese (COMPAGNO et al., 2014).

Os vasos sanguíneos gerados por células tumorais apresentam uma série de anormalidades estruturais e funcionais, tais como: tamanho, forma, padrão de ramificação, falta de hierarquia do vaso normal, não exibem as características reconhecíveis de arteríolas, capilares e vênulas, e as células endoteliais desses vasos podem proliferar 50 a 200 vezes mais rápido do que as células endoteliais normais, formando um endotélio estruturalmente defeituoso, que mostra descontinuidades ou aberturas (LIZEE et al., 2013). Assim, a vasculatura tumoral é tipicamente anormal, desordenada e permeável, o que permite a nutrição e oxigenação do tumor, e a remoção de resíduos do metabolismo celular (VASUDEV;

REYNOLDS, 2014), além de favorecer hemorragias, bem como o tráfego de células tumorais para a corrente sanguínea, com consequente formação de metástases (RIBATTI; CRIVELLATO, 2010).

Muitas drogas têm sido desenvolvidas para impedir a angiogênese por meio da inibição da via do VEGF, entre elas, o bevacizumab (Avastin®) que é um anticorpo monoclonal IgG1 que liga-se ao VEGF-A, um importante fator pró-angiogênico expresso em quase todos os tipos de tumores neutralizando-o e impedindo-o de ativar o seu receptor (FOLKMAN, 1971; FERRARA; GERBER, 2003).

Além do bevacizumab, há um número crescente de drogas antiangiogênicas disponíveis em vários estágios de desenvolvimento clínico ou já sendo usadas na prática clínica. As principais classes de medicamentos utilizados são: moléculas anti-VEGF (anticorpos anti-VEGF) (FOLKMAN, 1995); inibidores do receptor tirosina quinase que têm como alvo o receptor de VEGF e os receptores de outros fatores pró-angiogênicos (PEREZ-ATAYDE; SALLANM, 1997); e as drogas imunomoduladoras com propriedades antiangiogênicas (IMiDs) (FOLKMAN, 1971; BRANDYN et al., 2014)

Apesar da existência desses medicamentos com diferentes mecanismos de ação, os tumores podem apresentar diferentes respostas. Sendo assim, estes podem responder bem à terapia antiangiogênica o que pode sugerir que a vasculatura tumoral é sensível a uma droga em particular, ou essa atividade pode está associada à dependência de oxigênio e nutrientes por parte das células tumorais. Por outro lado, em alguns tipos de câncer a terapia antiangiogênica pode controlar a doença por um período de tempo, porém, em seguida ocorre a progressão do tumor. Neste caso, o tumor encontrou uma maneira diferente para promover a angiogênese, ou as células do tumor se adaptaram a um ambiente menos vascularizado, o que indica o desenvolvimento de resistência ao tratamento (VASUDEV; REYNOLDS, 2014). Por conta disso, o uso de terapia de combinação incluindo agentes antiangiogênicos e fármacos citotóxicos tem predominado como escolha no tratamento de alguns tipos de câncer (LI et al., 2011; JAIN, 2014; KIEUHOA et al., 2016).

Durante o desenvolvimento do câncer diferentes tipos celulares interagem entre si formando um microambiente tumoral composto de células cancerígenas e

células auxiliares, como por exemplo, células vasculares, fibroblastos e células do sistema imunológico, as quais, atuando em conjunto, são essenciais para o crescimento do tumor. (QUAIL; JOYCE, 2013).

Baseado nisso, existem medicamentos eficazes no combate não somente às células do câncer mas também a estas células auxiliares (MCMILLIN; NEGRI; MITSIADES, 2013), destacando a importância de drogas com mecanismos regulatórios envolvendo principalmente o sistema imunológico (HAYAKAWA et al., 2016). Nesse contexto, os efeitos de diferentes citocinas no microambiente tumoral e seu potencial como alvo de drogas imunomoduladoras têm sido extensamente estudados (ITA; HANDA, 2016).

A Interleucina 1 (IL-1) é uma citocina pró-inflamatória que exerce efeitos sobre uma variedade de células e desempenha um papel importante em doenças auto-imunes e inflamatórias, agudas e crônicas (DINARELLO, 2004). É secretada principalmente por monócitos, macrófagos, células epiteliais, células sinoviais e condrócitos. Existem dois subtipos de IL-1, IL-1 α e IL-1 β , ambas presentes na maioria das células, porém IL-1 α está presente principalmente nas células epiteliais com a função de diferenciação celular e ativação de resposta imune. Em contraste, a expressão de IL-1 β é limitada a condições fisiológicas normais, entretanto, sob condições de estímulo inflamatório, IL-1 β é secretada e liberada na corrente sanguínea onde ela exerce efeitos sobre outras células. No câncer, a desregulação de IL-1 β está ligada à transformação neoplásica, angiogênese, invasão tumoral e metástase (KIM et al., 2013; DINARELLO, 1989 *apud* TAN et al., 2016).

Recentes relatos mostram que altos níveis de IL-1 β estão diretamente relacionados a uma forma mais agressiva do tumor (BAIRD et al., 2016; ZHE et al., 2011). Sendo assim, existe um embasamento em terapias anticâncer focados na neutralização da IL-1 β ou do seu receptor (VORONOV et al., 2003; SCHMID et al., 2011; BAR et al., 2004; LEWIS et al., 2006; CARMI et al., 2013).

IL-4 desempenha um papel importante em respostas imunológicas por atuar de diversas maneiras, tais como, induzindo a liberação de anticorpos IgE pelas células B e o desenvolvimento subsequente de células T CD4+ *naïve* em células Th2 (PAUL; ZHU, 2010), induzindo ativação de células mielóides como macrófagos, células dendríticas e eosinófilos (GORDON; MARTINEZ, 2010;

COOK, 2012), além de aumentar a expressão de mediadores da inflamação (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013; HELLER, 2012).

Apesar da sua função de proteção na resposta imunológica, a produção em excesso dessa intercelucina está ligada a doenças como asma e dermatite atópica alérgica dominado por Th2 (LIANG, 2012), bem como a imunossupressão das células T no linfoma cutâneo e na leucemia (GUENOVA, 2013).

Em modelos experimentais de câncer, foi demonstrado que a IL-4 é um potente indutor da ativação de macrófagos (BISWAS; MANTOVANI, 2010; PUCCI et al., 2009; STEIN, 1992 *apud* GUENOVA et al., 2015) e de células T com a finalidade de aumentar a invasão de células tumorais e metástases pela polarização de Macrófagos Associados ao Tumor (TAM) para formar um fenótipo do tipo M2 considerado mais invasivo (DENARDO, 2009). Outro fator interessante é que células tumorais expressam quantidade elevada de receptor de IL-4 que está associada ao efeito proliferativo da citocina. Ainda, foi observado que IL-4 além de produzir um efeito antiapoptótico em células tumorais, também é capaz de induzir a angiogênese, o que auxilia no crescimento e invasão do tumor (LI et al., 2009; ROCA et al., 2012). Esses dados sugerem a possibilidade de uma terapia antitumoral que envolva diminuição na secreção de IL-4 ou da função do seu receptor (GUENOVA et al., 2015).

IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória que apresenta diversas funções, tanto em relação a imunidade inata como adaptativa (DAI; KOHLER; BROMBACHER, 1997 *apud* WANG et al., 2016). Apesar de inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ , IL-2, IL-3 e TNF- α produzidas por células como macrófagos e células T reguladoras (DONNELLY; FREEMAN; HAYES, 1995; MURAI, 2009), estudos em camundongos *knockout* em IL-10, demonstraram que essa citocina retardou o crescimento de um tumor e melhorou as respostas de células T contra o mesmo (HALAK; MAGUIRE; LATTIME, 1999 *apud* WANG et al., 2016).

Outra importante ação de destaque dessa citocina foi em estudos em modelos de câncer humano, nos quais foi observado que o aumento da expressão de IL-10 levou à rejeição do tumor e a uma imunidade tumoral de longa duração. Além disso, em ensaios realizados em camundongos *knockout* para IL-10 com câncer de pele houve um aumento da progressão do tumor assim como uma

metástase prematura (MUMM et al., 2011; OFT, 2014).

O Interferon (IFN) pode promover uma série de funções biológicas como defesa contra infecções virais, estendendo-se para defesa contra células tumorais e efeitos imunomoduladores (BILLIAU, 2006). O IFN- γ está envolvido na modulação de respostas imunitárias e inflamatórias e é produzido predominantemente por células *Natural Killer* (NK), *Natural Killer T* (NKT), e Células T ativadas (ZHU; YAMENE; PAUL, 2010).

As células T *helper* também são responsáveis pela produção de IFN- γ , e o mesmo impulsiona uma regulação positiva que obriga a diferenciação de células CD4+ para o perfil de resposta Th1, que atua, por sua vez, na resposta antitumoral (ZHU; YAMENE; PAUL, 2010; HWANG, 2010). Além disso, o IFN- γ melhora a apresentação de antígeno, por meio da promoção do seu processamento, e induz a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), destacando sua importância em respostas imunes específicas antitumorais (YOUNG; BREM, 2007; SCHRODER, 2004).

Independentemente da sua fonte, todos os IFNs têm o potencial de atuar sobre as células de tumor para exercer efeitos antitumorais diretos e indiretos, por meio de células do sistema imunológico. Ele também é responsável por regular a expressão de muitos genes envolvidos no crescimento de células de tumor, proliferação, diferenciação, sobrevivência e migração (FUNG, 2013).

Apesar de classicamente ser apresentada como uma citocina com potencial antitumoral, outros estudos constataram que IFN pode contribuir para o aumento de algumas proteínas que estão associados com a proliferação, migração, invasão e crescimento gerando um fenótipo mais agressivo do câncer. Isso mostra a dualidade dos seus efeitos frente às células tumorais e a importância da investigação dessa citocina em neoplasias (FATHERS et al., 2012).

IL-12 é uma citocina que tem a capacidade de potencializar a atividade citotóxica de células T CD8+ e células NK (KOBAYASHI et al., 1989 *apud* PARHAR et al., 2016; STERN et al., 1990 *apud* PARHAR et al., 2016). Ela tem um papel crucial na modulação da resposta imune envolvida na indução de respostas do tipo Th1, que envolve outro tipo de células T que são as CD4+, que, por sua vez, desempenham um papel central na resposta contra tumores. Paralelamente, IL-12 pode suprimir respostas do tipo Th2, cuja ativação cria um fenótipo celular que

mantem o microambiente favorável ao crescimento do tumor (COLOMBO; TRINCHIERI, 2002; FRIDMAN et al., 2012).

Estudos comprovaram que IL-12 possui atividade antitumoral, pois por meio da imunoterapia, esta citocina foi capaz de inibir o crescimento de tumores e prolongar a sobrevivência por reativação tanto de células T CD8⁺ quanto de células NK (LODE et al., 1998; CHEN et al., 1997; SHI, 2003, PARHAR et al., 2016).

Embora essa citocina tenha demonstrado uma atividade antitumoral significativa em diversos modelos animais (LASEK; ZAGOZDZON; JAKOBISIAK, 2014) ensaios clínicos com a mesma, utilizada de maneira isolada em pacientes com tumores sólidos avançados e doenças malignas hematológicas, mostraram uma taxa de resposta mista que varia de 0 a 11%, com exceção do linfoma cutâneo das células T, relacionado com a AIDS, sarcoma de Kaposi e linfoma não Hodgkin, onde há uma maior resposta (DEL VECCHIO et al., 2007). A baixa efetividade na maioria dos tumores pode ser associada às pequenas doses administradas de IL-12 devido à sua toxicidade sistêmica grave, e a carga de tumor mais elevada (pacientes em estágio avançado) (PARHAR et al., 2016).

Estudos realizados na década de 90 pelo grupo liderado pelo Dr. Judah Folkman destacaram a importância dessa citocina como antiangiogênico tumoral. Baseado nos dados da atuação da IL-12 contra tumores, comprovado por meio de ensaios pré-clínicos e clínicos, pode-se destacar o potencial dessa citocina como um potente adjuvante na imunoterapia do câncer (ZHU et al., 2013; LASEK et al., 2014).

A quimiocina (motivo CC) de ligante 2 (CCL2) é uma quimiocina constitutiva que está envolvida primariamente na organização do tecido linfóide e no tráfego basal de monócitos e basófilos. Tem sido associada na patogênese de doenças caracterizadas por infiltrados monocíticos, tais como a psoríase, a artrite reumatóide ou a aterosclerose, e é bem expressa em populações de células tumorais e células estromais de muitos cânceres (SALLUSTO et al., 2000).

Esta quimiocina é responsável pelo recrutamento de monócitos inflamatórios que expressam CCR2 (o receptor de CCL2), assim como o posterior recrutamento de macrófagos associados a tumores, além de promover angiogênese e metástase (QIAN et al., 2009; CRUSZ; BALKWILL, 2015; QIAN; POLLARD, 2010).

Esse processo é dependente da CCL2 sintetizada tanto pelo tumor quanto pelo estroma e ocorre, por exemplo, para monócitos inflamatórios humanos em metástases pulmonares de células de câncer de mama humano. Estudos mostram que a inibição da sinalização de CCR2-CCL2 é capaz bloquear o recrutamento de monócitos inflamatórios, inibir a metástase *in vivo* e prolongar a sobrevivência de camundongos portadores de tumor (UENO et al., 2000; VALKOVIC et al., 1998; SAJI et al., 2001; RHODES et al., 2004; TSUI et al., 2007). A partir desses dados, observa-se que a inibição dessa quimiocina pode ser uma potencial ferramenta no combate ao câncer.

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) possui importante papel fisiológico e patológico, principalmente na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e virais (IM, 2010). A denominação “fator de necrose tumoral” foi dada devido aos estudos que demonstraram a capacidade dessa citocina de induzir necrose hemorrágica em sarcomas transplantados subcutaneamente em camundongos (CARSWELL et al., 1995).

TNF- α é expresso em uma grande variedade de células, sendo considerado um importante mediador em reações inflamatórias agudas e crônicas, além de estimular a produção de outras citocinas inflamatórias. Ele desempenha um papel central em doenças autoimunes como artrite reumatóide, em doenças inflamatórias do intestino incluindo doença de Crohn e na colite ulcerativa, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico e esclerose sistêmica (TRACEY et al., 2008; GALDIERO et al., 2013; CORDERO, 2010).

A liberação de TNF- α está diretamente ligada a progressão da fase inicial do câncer graças à ação dessa citocina no estímulo da liberação de fatores pró-angiogênicos como o VEGF (NORRBY, 2002; FEOKTISTOV et al., 2003).

Paradoxalmente, ela é também considerada uma potente citocina antiangiogênica em doses mais elevadas, podendo provocar necrose e a subsequente destruição de vasos sanguíneos do tumor e aumento da eficácia da quimioterapia. Apesar desses dados o TNF nunca foi considerado como uma droga anticâncer devido a sua dualidade de efeitos a depender do tipo de câncer. Porém essa citocina tem tido sucesso como adjuvante para o tratamento do melanoma metastático regionais e sarcoma dos tecidos moles avançado (TOOMER; CHEN, 2014).

2.4 Estudo da toxicologia/farmacologia de fármacos com potencial antitumoral

O desenvolvimento de agentes terapêuticos para o tratamento do câncer tem sido um processo desafiador. Os fármacos utilizados na clínica estão na dose máxima tolerada ou em níveis bastante próximos dela e, frequentemente, causam toxicidade significativa, devido a sua facilidade de penetrar em vários tecidos (HIROSE et al., 2011).

Portanto, estudos de toxicidade pré-clínica são extremamente importantes para estabelecer a segurança da dose inicial clínica e identificar o espectro de toxicidade induzida por drogas em modelos experimentais apropriados (CEKANOVA; RATHORE, 2014).

Os ensaios que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação vigente. Pode-se investigar também parâmetros como o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação-dose resposta. Outras informações podem ainda ser obtidas numa avaliação de toxicidade aguda como: indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica, diagnóstico e tratamento das reações tóxicas, estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade, informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe e informações sobre quais seriam as consequências de exposições acidentais no trabalho ou no ambiente doméstico (PURCHASE et al., 1998; BLAAUBOER, 2003; PRIETO et al., 2006; COECKE et al., 2006).

O protocolo para avaliação da toxicidade aguda é feito a partir da administração em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias. Segundo o *Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos* publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em 2013, estudos para a determinação de DL50 (dose que induz morte de 50% dos animais experimentais) não são necessários (ANVISA, 2013). Podem ser utilizados métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um

menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) “Guidelines for Testing of Chemicals”, como por exemplo o Guia de nº 423 (OECD, 2001).

Baseado neste guia da OECD, para o ensaio de toxicidade aguda administra-se uma dose da substância teste a um grupo de três animais, e dependendo da relação sobrevivência/morte, o estudo é repetido com outros animais recebendo doses maiores ou menores da mesma substância. A dose inicial utilizada é selecionada a partir de uma das quatro opções preconizadas pelo guia, tais quais: 5, 50, 300 ou 2000 mg/kg. Quando não existe qualquer informação sobre a substância que será testada, por razões de proteção dos animais, deve-se a utilizar uma dose inicial de 300 mg/kg.

Ainda de acordo com o guia n. 423 da OECD, bem como com as instruções da *Food Drug Administration* (FDA) para estudos de toxicidade aguda, apenas um gênero é estudado em um ensaio de toxicidade aguda; Geralmente, assume-se a fêmea como o gênero mais sensível aos efeitos tóxicos agudos de produtos químicos (OKOMODA; ATAGUBA, 2011; OKOMODA et al., 2013).

No contexto da avaliação da toxicidade de novos candidatos a fármacos antitumorais, o estudo dos efeitos genotóxicos assume papel relevante considerando o potencial tóxico de muitos antineoplásicos sobre o material genético das células não tumorais. O conhecimento do potencial genotóxico de um fármaco ou de compostos presentes no meio ambiente é uma informação essencial para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de riscos para o homem e para o ambiente (LEE et al., 2016).

A genotoxicidade é causada por agentes que interagem com o DNA e outros alvos celulares que controlam a integridade do material genético, incluindo a indução de adutos de DNA, quebras na cadeia e mutações pontuais (BAUMSTARK-KHAN, 2010), além de causar mutações cromossômicas estruturais e numéricas que podem não só iniciar o desenvolvimento do câncer mas também pode ter um impacto sobre a fertilidade e a saúde das gerações posteriores, contribuindo para as potenciais mudanças hereditárias em eco-sistemas após um acúmulo a longo prazo (AHN et al., 2009). Vários estudos relataram que existe uma relação direta entre o contato com agentes genotóxicos e a redução da qualidade de vida (MAZUMDAR et al., 2011; ABDA et al., 2015).

Entre os ensaios biológicos para avaliação de danos causados por agentes genotóxicos pode-se destacar o teste do micronúcleo (RODRIGUES et al., 2013) que é uma metodologia que pode ser realizada *in vivo*, que utiliza a medula óssea ou o sangue periférico para fornecer informações primárias, em nível cromossômico, sobre os danos no DNA causados por agentes químicos e físicos (FACTORI et al., 2014).

Os micronúcleos originam-se de fragmentos cromossômicos acêntricos (efeito clastogênico) ou de cromossomos inteiros que não completam a migração anafásica da divisão celular (efeito aneugênico) (ALBAS et al., 2014). O teste baseia-se na observação de células que sofrem alterações na distribuição de suas cromátides ou quebra de cromátides. Durante a anáfase, momento em que há a segregação dos cromossomos, os fragmentos provenientes das quebras e de cromossomos inteiros, e que não estão ligados pelo fuso, não acompanham a migração para os pólos da célula. Após a telófase, tais fragmentos cromatídicos não são incluídos nos núcleos das células filhas, formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células (FENECH, 2000; FERIGOLO; SAGRILLO, 2013).

O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário murino (CALIXTO-CAMPOS et al., 2013). Para os ensaios, podem ser utilizados camundongos de qualquer linhagem devido à falta de expressão dos principais antígenos de histocompatibilidade. Para a sua manutenção, as células são transplantadas através de passagens na cavidade peritoneal dos animais (KAMETANI et al., 2007).

É um tipo de tumor que apresenta um conjunto de células pleomórficas, com alto grau de atipias, com presença de nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo/citoplasma maior que a das células normais (NASCIMENTO et al., 2006; SILVA; SANTOS; CASSALI, 2006).

Após a inoculação intraperitoneal de células de tumor de Ehrlich, o volume ascítico aumenta progressivamente devido à capacidade de crescimento rápido dessas células. Esse processo ocorre em duas fases, sendo uma fase de proliferação, na qual o número de células aumenta de forma exponencial, seguido por uma fase de repouso, na qual o número de células permanece quase constante

(SONG et al., 1993; SIEMS et al., 1993; GRUNE et al., 1992; SKOG et al., 1990; TANNOCK, 1969; OZASLAN et al., 2011).

A forma ascítica do tumor tem sido utilizada como modelo experimental para avaliar a influência de drogas de diferentes origens sobre as respostas de proliferação dessas células e do portador das mesmas (SOLIMAN et al., 2015).

A ascite é formada provavelmente em consequência da inflamação induzida pelo tumor, devido ao aumento da permeabilidade vascular peritoneal. Outros fatores que contribuem para a ascite e letalidade do tumor de Ehrlich incluem: a drenagem linfática peritoneal prejudicada pelas células tumorais, a pressão mecânica exercida pelo aumento progressivo de fluido ascítico e a indução de hemorragia peritoneal (VIEIRA et al., 2010). Paralelamente, as células de tumor de Ehrlich também são usadas como um modelo de tumor sólido, por inculação das células em tecido subcutâneo (VENDRAMINI-COSTA et al., 2010; FRAJACOMO et al., 2016).

É um tumor agressivo que pode induzir mielossupressão e afetar a resposta inflamatória por meio do aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL1 β e MCP1, além de prostaglandina E2 (PGE2) e óxido nítrico (SANTOS et al., 2016; FERNANDES et al., 2015).

2.5 Produtos naturais e o câncer

Produto natural é um composto químico que pode ser produzido por seres vivos, encontrado na natureza e que geralmente tem atividade biológica ou farmacológica que pode ser usado na descoberta ou concepção de produtos farmacêuticos. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (NEWMAN; CRAGG, 2016).

A pesquisa em produtos naturais é uma das áreas mais tradicionais da Química no Brasil, devido a fatores históricos amplamente discutidos e à grande biodiversidade do país. A maioria dos trabalhos está voltada para o isolamento e a

identificação de substâncias, muitas vezes associados a ensaios biológicos ou estudos quimiotaxonômicos (VALLI et al., 2013).

Os produtos naturais têm sido considerados a fonte mais rica de drogas devido ao fato de possuírem uma imensurável variedade de estruturas em relação a química combinatória, apesar disso, ainda existe uma série de compostos inexplorados (MISHRA; TIWARI, 2011; DIAS et al., 2012). Desde os anos 60, com as primeiras pesquisas sobre a epipodofilotoxina e seus derivados como agentes citotóxicos, até os dias de hoje, a natureza é fonte promissora de drogas com atividade contra o câncer (CABRERA; YOO; BRIZEL, 2013).

Uma análise das estratégias utilizadas na descoberta de novos medicamentos mostrou que 36% das drogas aprovadas pelo FDA, entre 1999 e 2008 foram produtos naturais ou seus derivados (SWINNEY; ANTHONY, 2011; NEWMAN; CRAGG, 2010). Estudo feito por Newman e Cragg em 2012 constatou que aproximadamente 50% das novas drogas introduzidas no período de 1981-2010 foram derivados da natureza, a maioria sendo agentes antibióticos e antiproliferativos (NEWMAN; CRAGG, 2012). Dentre estes se destacam a vimblastina (Velban®) e a vincristina (Oncovin®) e os análogos vindesina (Eldisine®) e vinorelbina (Navelbine®); o paclitaxel (Taxol®) e o análogo docetaxel (Taxotere®); a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (Etopophos®) e teniposídeo (Vumon®); e a camptotecina e os análogos, topotecano (Hycamtin®) e irinotecano (Camptosar®). Estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Dados recentes mostram que existem 70 fármacos antitumorais derivados de produtos naturais que foram lançados ou estão em desenvolvimento, entre esses, 28 drogas já foram lançadas e outras 42 estão em desenvolvimento, dos quais 9, 19 e 14 drogas estão sendo avaliadas na Fase 3, Fase 2 e Fase 1 de ensaios clínicos, respectivamente (DU; XIAOLI, 2014).

Portanto, no contexto do câncer, a pesquisa e o desenvolvimento de drogas com alta eficiência e baixa toxicidade, particularmente os medicamentos extraídos de recursos naturais, tornou-se uma estratégia altamente promissora para a identificação de novos agentes antitumorais (VASKO et al., 2014).

No Brasil encontra-se a maior biodiversidade do planeta (de 15 a 20% do total), porém, considera-se que ainda pouco se sabe sobre a farmacologia ou

fitoquímica das espécies. Existem aproximadamente 250.000 espécies e apenas cerca de 20% das plantas foram farmacologicamente avaliadas. Esses dados demonstram que existe uma gama de produtos com potencial farmacológico agregado que ainda serão descobertos e explorados (CAETANO et al., 2015).

2.6 Cumarinas e seu potencial antitumoral

As cumarinas (2H-1-benzopiran-2-ona) representam uma classe de substâncias fenólicas encontradas em plantas constituídas de anéis de benzeno e α -pirona fundidos (AOYAMA et al., 1992 *apud* VENUGOPALA, RASHMI; ODHAV, 2013). Mais de 1300 cumarinas foram identificadas como metabólitos secundários de plantas, bactérias e fungos. O composto prototípico é conhecido como 1,2-benzopirona ou, menos comumente, conhecido como ácido *o*-hidroxicinâmico e lactona (IRANSHAHI et al., 2009).

As cumarinas foram encontradas pela primeira vez em sementes de cumaru (*Dipteryx odorata* pertencente à família Fabaceae) e foram relatadas em cerca de 150 espécies diferentes, distribuídas em aproximadamente 30 famílias diferentes, dentre as quais pode-se citar as famílias Rutaceae, Umbelliferae, Clusiaceae, Guttiferae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Nyctaginaceae e Apiaceae (CLAY; CLEMENT, 1993; EVANS, 2009; PÉREZA; SOUTOB, 2011).

As cumarinas podem ser encontradas em todas as partes das plantas, desde os níveis mais elevados nos frutos (*Aegle marmelos*) (EVANS, 2009), mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) e amora silvestre (*Rubus fruticosus*), sementes (feijão tonka) (*Calophyllum cerasiferum* Vesque) (SPINO; DODIER; SOTHEESWARAN, 1995 *apud* VENUGOPALA, RASHMI; ODHAV, 2013), em raízes (*Ferulago campestris*), nas folhas (*Murraya paniculata*) e látex da árvore tropical encontradas em florestas tropicais (*Calophyllum teysmannii*), chá verde e outros alimentos, como chicória (ROSSELLI et al., 2009). Pode-se encontra-lás também em alguns óleos essenciais tais como óleo de cássia (CHOI et al., 2001), óleo de casca de canela (BOURGAUD et al., 2006) e óleo de lavanda. As condições ambientais e mudanças sazonais podem influenciar a incidência de cumarinas em partes variadas da planta (ROSSELLI et al., 2009).

A função das cumarinas não está clara, embora a literatura sugira que estas atuam como reguladores de crescimento de plantas, bacteriostáticos e fungistáticos (BOGDAL, 1998 *apud* VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013)

A biossíntese das cumarinas ocorre por meio do metabolismo da fenilalanina, sendo o ácido p-hidróxi-cinâmico (ácido p-cumarínico) um de seus primeiros precursores, o qual é hidroxilado na posição C-2' (orto-hidroxilação) e, em seguida, sofre isomerização fotocatalizada da ligação dupla (E-Z). O isômero Z sofre uma lactonização espontânea que produz a umbeliferona. Apesar da maioria das cumarinas serem formadas a partir da via do ácido chiquímico, boa parte delas podem ser derivadas de uma via mista (ácido chiquímico e acetato) (SIMÕES et al., 2004).

Além de serem produzidas por organismos vegetais, existem evidências que as cumarinas podem ser provenientes do metabolismo microbiano, as quais podem ser utilizadas como iniciadoras de semi-síntese de outros derivados ou como padrões analíticos para estudos metabólicos em mamíferos (MARUMOTO et al., 2011).

Os derivados cumarínicos se destacam por apresentar diferentes atividades biológicas, tais como, atividade antifúngica (DE ARAÚJO et al., 2013), antibacteriana (HAMDI; AL-AYED; SAID, 2012), como moduladores da resistência aos antibióticos (BAZZAZ et al., 2010), atividade anti-inflamatória (BAROT et al., 2015; CÉSPEDES et al., 2006), anti-HIV (OLMEDO et al., 2012), hepatoprotetora (SAHEBKAR, 2011), antimitótica (IBRAHIM, 2006), antioxidante (CARPINELLA et al., 2005) e antitumoral (BENCI et al., 2012; SERRA et al., 2012; KASUMBWE et al., 2016; KRALJEVIĆ et al., 2014; YAGHMAEI et al., 2016; GURRAPU et al., 2016; CAO et al., 2016; YE et al., 2016; LIU et al., 2015, YU et al., 2015).

Dados da literatura mostram que derivados cumarínicos apresentam atividade antitumoral *in vitro* tanto em células de Ehrlich quanto em linhagem de câncer de mama como MCF-7. O estudo do mecanismo de ação mostrou que estes podem atuar via ativação de caspases, e portanto ativam a apoptose, e via PI3K-cinase, que possui papel importante na sinalização oncogênica e no tráfego de proteínas intracelulares (AVIN et al., 2014).

Outros mecanismos envolvidos na ação antitumoral desses compostos envolvem a apoptose (KRALJEVIĆ et al., 2014) via rompimento da membrana

mitocondrial (KASUMBWE et al.; 2016; YE et al., 2016), parada do ciclo celular na fase G2/M, interação com tubulina impedindo o processo de divisão celular (CAO et al., 2016) e parada no ciclo celular na fase S (YU et al., 2015).

Segundo Jumat et al. (2010), sistemas heterocíclicos que contêm átomos de nitrogênio, enxofre ou oxigênio constituem uma importante classe de compostos em química medicinal, devido a alta diversidade de aplicações clínicas. Por toda essa variedade de propriedades biológicas, essa tem sido uma classe que tem despertado bastante interesse de pesquisadores por todo mundo (IBRAHIM, 2006; GARAZD et al., 2000; NAGORICHNA et al., 2003).

Desta forma foram sintetizados vários derivados das cumarinas, dentre eles o 2H-1-benzopiran-2-ona,7-preniloxi (UMB-07) (**Figura 1**), o qual foi relatado como detentor de atividades farmacológicas, tais como antifúngica (GUERRA et al., 2015), antibacteriana (DE ARAÚJO et al., 2016) e antitumoral *in vitro* (BABA et al., 2002; HAGHIGHI et al., 2014) e *in vivo* (BABA et al., 2002). Porém, não existem relatos dos mecanismos envolvidos nas atividades farmacológicas ou toxicológicas *in vivo*, o que justifica um interessante estudo para investigação do seu potencial antitumoral assim como do seu perfil toxicológico.

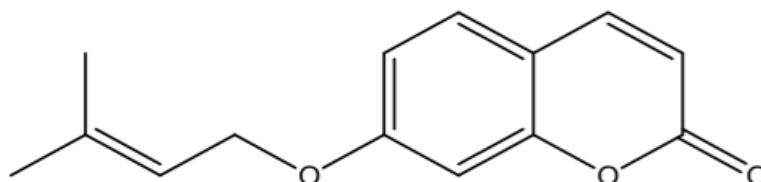


Figura 1. Estrutura química da 2H-1- Benzopiran-2-ona, 7- preniloxi

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade e atividade antitumoral do derivado semi-sintético cumarínico 2h-1-benzopiran-2-ona, 7- preniloxi (UMB-07).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade de UMB-07 em eritrócitos de camundongos;
- Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda de UMB-07 em camundongos;
- Avaliar a genotoxicidade de UMB-07 em camundongos;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* de UMB-07 em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich;
- Investigar o possível mecanismo de ação de UMB-07 por meio de estudos do ciclo celular;
- Analisar o efeito antiangiogênico de UMB-07;
- Investigar a participação de citocinas no mecanismo de ação antitumoral de UMB-07;
- Estudar o perfil de toxicidade de UMB-07 após tratamento antitumoral em camundongos transplantados com tumor de Ehrlich;
- Investigar a atuação de UMB-07 na produção do óxido nítrico em macrófagos peritoneais;

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar) e no Biotério Prof. Thomas George, ambos do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), todos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Material

4.2.1 Linhagens de células tumorais

Para avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foi usada uma linhagem de adenocarcinoma murino (Carcinoma Ascítico de Ehrlich), gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA/UNICAMP) e mantida na cavidade peritoneal de camundongos Swiss no Biotério Prof. Thomas George, por meio de repique semanal.

4.2.2 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) pesando entre 30 e 35 g, com faixa etária próxima de 60 dias, obtidos do Biotério Prof. Thomas George (IPeFarM/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C), com livre acesso à comida e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno, colocadas nas grades metálicas das gaiolas em sua parte superior. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de doze horas. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFPB, sob número

de protocolo 141/2015.

4.2.3 Reagentes

Foram utilizadas as seguintes substâncias: Cetamina – (Ketamin®); cloridrato de xilazina –(Anasedan®); heparina – (HEPAMAX-S®); Solução fosfato tamponada (PBS); Tween 80 (Sigma-Aldrich®); Dimetilsulfóxido (Mallinckrodt CHEMICALS); Triton X-100 (Sigma- Aldrich®); Soro bovino fetal (SBF) (Nutricell®); Iodeto de Propídeo (Sigma –Aldrich); Tween 20 (Sigma-Aldrich®); 5-Fluorouracil (Sigma-Aldrich®); Kit ELISA (eBioscience®).

4.2.4 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: Centrífuga (HETTICH-Zentrifugen- Rotina 380 R); Microscópio invertido (Olympus); Balança analítica (GEHAKA® AG 200); Citômetro de fluxo (FacsCanto II, BD, EUA); Câmera fotografica (Canon OverShot A2500); Leitor de placa (Synergy HT, BioTek). Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System) e o analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet* (Horiba ABX Diagnostics), respectivamente.

4.2.5 Derivado cumarínico

2H-1-benzopiran-2-ona, 7- preniloxi (UMB-07) foi obtido por técnicas específicas, e gentilmente fornecido pelo colaborador Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) localizado na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Uma Cumarina hidroxilada comercial (umbeliferona ou 7-hidroxycumarina) (3 mmol) foi submetida a alquilação na presença de carbonato de potássio (3.9 mmol) como base e haleto de alquila (brometo de prenila) (3.9 mmol) em 20 mL de acetonitrila. Essa reação foi realizada sob agitação em refluxo por tempos reacionais que variaram de 22-46 horas. A mesma foi monitorada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Ao final do procedimento, o produto foi

filtrado e lavado por duas vezes com acetato de etila (10 mL). Essa fase orgânica, então, foi lavada com água destilada (cerca de 50 mL) e seca com sulfato de sódio (Na₂SO₄), e evaporado à vácuo. Os resíduos obtidos foram recristalizados pelo uso do sistema metanol/THF fornecendo o composto final (CHUNG et al., 2012).

O composto sintetizado teve sua estrutura elucidada por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN C13) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H1), realizados no Núcleo de Caracterização e Análise da Universidade Federal da Paraíba (NUCAL). O quadro 1 expressa as características físico-químicas, bem como o rendimento do composto estudado.

Quadro 1. Características físico-químicas do UMB-07

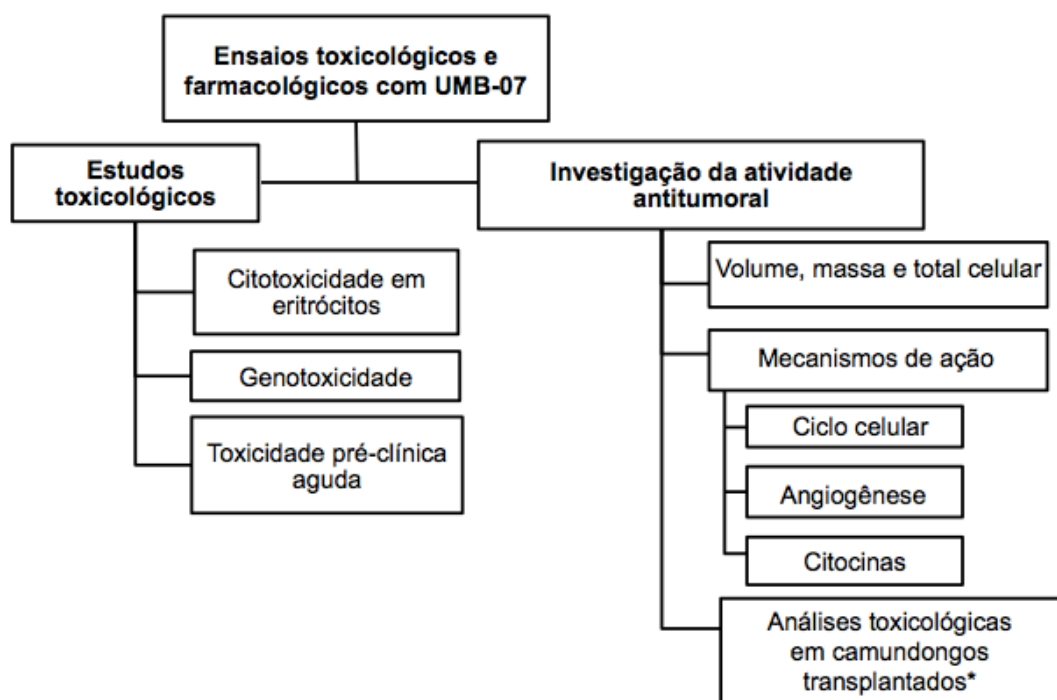
Código	Ponto de fusão	Fator de retenção	Rendimento (%)	Massa molar	Estrutura molecular	Aparência
UMB-07	>280	0,82*	90	230	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	Cristais marrons

*a = sistema de eluição 10:0,1 (CH₂Cl₂/MeOH);

4.3 Métodos

Os estudos farmacológicos e toxicológicos de UMB-07 foram realizados de acordo com o fluxograma a seguir.

Fluxograma 1. Representação esquemática dos métodos utilizados para a avaliação da toxicidade e atividade antitumoral *in vivo* de UMB-07.



*Parâmetros avaliados: avaliação ponderal e do consumo de água e ração; parâmetros bioquímicos e hematológicos; índice de órgãos e análises histológicas.

4.3.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos

Os ensaios para avaliação da citotoxicidade em eritrócitos foram realizados segundo Kang et al. (2009), com algumas modificações. Os eritrócitos foram obtidos de sangue fresco de camundongos Swiss, sob anestesia com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.), coletado do plexo orbital. A agulha foi heparinizada (heparina sódica) para prevenir coagulação. Para obter a suspensão de eritrócitos, 1 mL de sangue total foi solubilizado em 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e então centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos. O plasma sobrenadante foi descartado e esse processo repetido mais duas vezes. Os eritrócitos foram finalmente ressuspensos em PBS, obtendo-se então a suspensão de eritrócitos a 0,5% (v/v) que foi utilizada para o ensaio de hemólise.

UMB-07 foi solubilizado em DMSO (5%) e preparado em PBS, no dobro da concentração desejada (2000 µg/mL). A cada 100 µL dessas soluções foi

adicionado 100 μ L da suspensão de eritrócitos, em triplicata. Os controles positivo e negativo foram também utilizados, pela incubação de eritrócitos em uma solução de 0,1% de Triton X-100 em PBS (2 mL) e DMSO (5%) em PBS (2 mL), respectivamente. A placa de 96 poços foi mantida sob agitação suave por 60 minutos. Após esse período, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente removido. Então, foi adicionado 200 μ L/poço de solução de Triton X-100 (0,1%) e a placa foi cuidadosamente agitada. A quantidade de hemólise causada pela solução do Triton X-100 (0,1%) foi determinada espectrofotometricamente a 415 nm e serviu como prova inversa para determinação da CH50 (concentração que produz 50% de hemólise) de UMB-07.

4.3.2 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

Os ensaios de toxicidade aguda em camundongos foram realizados de acordo com “Guidelines for testing of chemicals” n. 423/2001 da OECD (**ANEXO B**).

Camundongos Swiss, três fêmeas por grupo, incluindo o controle, foram submetidos a doses únicas de 300 ou 2000 mg/kg de UMB-07 por via intraperitoneal e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (solução a 12% de Tween 80 em salina). O nível de dose para ser usado como a dose de partida é selecionado a partir de um dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 ou 2000 mg/kg. Quando não existe qualquer informação sobre a amostra a ser testada, por razões de proteção dos animais, recomenda-se a utilização de uma dose inicial de 300 mg/kg. De acordo com o guia n. 423/2001 da OECD após a realização do primeiro ensaio com a dose de 300 mg/kg, e houver morte de apenas um ou nenhum animal, repete-se o mesmo e, mantendo-se o resultado inicial, realiza-se outro ensaio agora numa dose maior de 2000 mg/kg. Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL50 (apesar de fornecer uma estimativa do seu valor), entretanto permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” – GHS.

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA) após administração da substância, foi realizada observação

cuidadosa para detecção de possíveis sinais tóxicos como hiperatividade, irritabilidade, agressividade, tremores, convulsões, catatonia, analgesia, anestesia, ptose, resposta ao toque diminuído, ambulação, capacidade de limpeza e ato de levantar, nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos e após 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental (**ANEXO C**) descrito por Almeida et al. (1999) do Laboratório de Psicofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB.

4.3.3 Avaliação da genotoxicidade

Para o ensaio do micronúcleo em sangue periférico, grupos de seis camundongos Swiss fêmeas foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com a dose de 300 mg/kg. Um grupo padrão (ciclofosfamida - 50 mg/kg – v.o.) e um grupo controle (solução salina e tween 80 à 12%) foram incluídos. Após um período de 48 horas da administração de UMB-07, os animais foram submetidos a um pequeno corte na cauda para obtenção de uma amostra de sangue (10 µL) e confecção das extensões sanguíneas. Após secagem, as lâminas foram coradas com coloração panótica para posterior análise em microscópio óptico. Para cada animal, três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000 eritrócitos contados para determinação do número de eritrócitos micronucleados (OECD, 1997).

4.3.4 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo*

Células de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE) com cinco dias de crescimento foram aspiradas da cavidade peritoneal de camundongos e implantadas por via intraperitoneal (0,5 mL - 4×10^6 células/mL) nos animais experimentais (DOLAI et al., 2012). Vinte e quatro horas após o implante, UMB-07 foi solubilizado em Tween 80 (12%) e administrado diariamente por via intraperitoneal (i.p.) a grupos de seis animais, nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg, por nove dias. O grupo controle foi tratado com uma solução de 12% de Tween 80 e um quinto grupo de animais foi tratado com 5-Fluorouracil (5-FU), 25 mg/kg, como droga padrão.

4.3.4.1 Volume do tumor, massa tumoral e total celular

Para a avaliação do efeito antitumoral de UMB-07, um dia após a última administração do tratamento descrito no item 4.3.4, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical, o líquido ascítico foi coletado da cavidade peritoneal e o volume foi medido e expresso em mL. Uma alíquota foi retirada para a determinação da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão do azul de tripan. Para tanto, foram incubados volumes semelhantes de líquido ascítico e de uma solução de 0,4% do corante, seguido de análise das células em câmara de Neubauer. Este ensaio avalia a habilidade de células viáveis, com membrana plasmática intacta, excluírem o corante azul de tripan, permitindo assim, a quantificação dessas células (RENZI; VALTOLINA; FORSTER, 1993).

A massa do tumor foi determinada pela diferença dos pesos dos camundongos antes e depois da retirada do líquido ascítico e expresso em gramas (g).

A quantidade total de células no peritônio dos animais foi expressa como total celular ($\times 10^7$ células), que foi obtido como o produto do volume do tumor, expresso em mL, pela viabilidade celular, expressa como a quantidade de células $\times 10^6$ /mL.

4.3.4.2 Análise do ciclo celular

Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por nove dias com UMB-07 conforme descrito no item 4.3.4. Um dia após a última administração, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical, e as células coletadas da cavidade peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos foram ressuspensas em solução de NaCl 0,9% (p/v) a fim de se obter uma concentração final de 1×10^6 células/mL. Para a análise do ciclo celular, as suspensões celulares foram centrifugadas a 3000 rpm, por cinco minutos, o sobrenadante foi desprezado e a suspensão foi homogeneizada. Foram adicionados 300 μ L da solução fluorocrômica hipotônica (HFS) [citrato de sódio 0,1% (p/v) e Triton X-100; 0,1% (p/v)], 50 μ g/mL de Iodeto

de Propídeo (PI) e completou-se com água ultrapura até chegar ao volume de 50 mL. Em seguida, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FacsCanto II, BD, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram obtidos com o programa *Flowing Software 2.5.1* e tratados no programa *GraphPad Prism 5.0* (POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004).

4.3.4.3 Avaliação do efeito antiangiogênico

Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por nove dias com UMB-07 conforme descrito no item 4.3.4. No dia seguinte após a administração da última dose, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. O peritônio foi cortado e o revestimento interior da cavidade peritoneal dos animais de todos os grupos foi examinado e fotografado para investigação da microdensidade vascular peritumoral, com o auxílio de um programa computacional (AVSOFT®). A microdensidade dos vasos foi determinada pela área ocupada por vasos sanguíneos dividido pela área total selecionada (AGRAWAL et al., 2011).

4.3.4.4 Quantificação das citocinas IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, CCL2, TNF- α e IFN- γ no lavado peritoneal

Para a quantificação de citocinas, os animais foram divididos em grupos para implante das células de CAE e tratados conforme descrito no item 4.3.4. Após nove dias de tratamento, o líquido ascítico coletado da cavidade peritoneal dos animais foi centrifugado a 1200 rpm, por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e armazenado a – 20 °C para posterior dosagem das citocinas, por meio de ELISA, de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

Brevemente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-IL-1, anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IL-12, anti-CCL2, anti-TNF- α e anti-IFN- γ , solubilizados em tampão fosfato, e incubadas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO-USA) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a

solução de bloqueio (PBS contendo 10% de soro fetal bovino), por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e foram adicionadas tanto as amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas recombinantes IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, CCL2, TNF- α e IFN- γ para a obtenção da curva. As placas foram novamente incubadas *overnight* a 4 °C. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotinilado foi adicionado às placas que foram incubadas por uma hora. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e então foi adicionado o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP). As placas foram incubadas por mais meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1N e a leitura realizada em leitor de placa a 450 nm. A quantidade de citocinas foi calculada a partir das curvas-padrão.

4.3.5 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com tumor de ehrlich

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos pelo tratamento com UMB-07, os animais foram pesados no início e no final do tratamento de nove dias, e diariamente, foram avaliados os consumos de água e de ração.

No dia seguinte após a administração da última dose, após jejum de 6 horas, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.), e amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada.

Para a análise dos parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina, aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT) o sangue foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm para obtenção do plasma. Já para as análises hematológicas foi utilizado sangue total heparinizado e realizada avaliação das séries vermelha e branca (eritograma e leucograma). As extensões sanguíneas foram coradas com coloração panótica e analisadas em microscópio óptico, para realização da contagem diferencial de leucócitos.

Após a coleta do sangue para análises bioquímicas e hematológicas, todos os animais foram eutanasiados, por deslocamento cervical, e os órgãos (timo, baço, fígado, rins e coração) foram extirpados e pesados. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

Após a pesagem, os órgãos (fígado e rins) dos animais tratados com a dose de 50 mg/kg de UMB-07 foram seccionados, fixados em formalina (solução de formol a 10%) tamponada e após 24 horas foram resseccionados para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Em micrótomo rotativo semi-automático, os fragmentos tissulares emblocados em parafina, foram seccionados em espessura de 3,0 µm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson, este último destinado ao estudo do tecido hepático. Em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As análises histológicas foram realizadas com a colaboração da Profa. Dra. Giciane Carvalho Vieira do Departamento de Morfologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.3.6 Quantificação indireta de NO em macrófagos

Macrófagos peritoneais foram obtidos quatro dias após a administração de 3 mL de solução tioglicolato de sódio 3%, via i.p., ou de camundongos naive (sem administração prévia de tioglicolato), como descrito em Silva et al. (2013). Para a coleta, camundongos foram sedados na câmara de anestesia por inalação de isoflurano, e eutanasiados por deslocamento cervical. Em sequência, foi realizada a assepsia do abdômen e um corte levando a exposição do peritônio, no qual foi injetado 3 mL de meio RPMI-1640. O lavado peritoneal foi extraído e centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e as células decantadas foram ressuspensas em meio RPMI-1640 suplementado. A concentração de células foi obtida por contagem em câmara de Neubauer.

A concentração de macrófagos peritoneais foi ajustada para 10^6 células/mL. A cada poço foi adicionado 2×10^5 células, em placa de 96 poços, incubada em estufa a 37 °C, tensão constante de 5% de CO₂ *overnight*. Antes da realização dos

experimentos, os sobrenadantes foram substituídos, com remoção das células não aderentes.

A quantificação de óxido nítrico foi realizada indiretamente pela dosagem de nitrito [NO₂] pelo método de Griess, adaptado de Vazquez-Torres et al. (2000). Brevemente, macrófagos peritoneais, extraídos conforme descrito acima, foram pré-tratados com veículo (0,05% DMSO), UMB-07 (0,1, 1, 10 ou 100 µM) 30 minutos antes da adição do estímulo LPS (1 µg/mL). Cerca de 24 h após a adição do estímulo, os sobrenadantes foram retirados e logo tiveram a concentração de nitrito [NO₂] mensurada. Para a quantificação, foram utilizados 100 µL de cada amostra junto a 100 µL do reagente de Griess, composto de uma solução com 0,1% de NEED (naftiletilenodiamino dihidroclorídrico 0,1%), sulfanilamida 1% em ácido fosfórico (H₃PO₄), adquirindo coloração instantaneamente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda 540 nm. Os resultados foram comparados a uma curva padrão, com concentrações conhecidas de nitrito de sódio.

4.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados empregando-se o método de Análise de Variância (ANOVA) “one-way” seguido do teste de Dunnett para comparação entre as médias, com pós teste posterior de Tukey, para comparação dos demais grupos entre si. Os dados obtidos foram expressos como média ± e.p.m (erro padrão da média), sendo os valores considerados significativos, quando apresentassem um nível de significância (p) menor que 0,05.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos

No ensaio de citotoxicidade em eritrócitos de sangue periférico de camundongos observou-se que UMB-07, na concentração testada (2000 µg/mL) induziu apenas 0,8% de hemólise, portanto, sua CH_{50} não foi calculada.

5.2 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

No ensaio de toxicidade pré-clínica aguda foi observado que UMB-07 não provocou mortes na dose de 300 mg/kg. Seguindo o guia da OECD 423, repetiu-se o ensaio com a mesma dose e o mesmo número de animais para confirmação do resultado e novamente observou-se que não houve morte dos animais. Em seguida, realizou-se um novo ensaio numa dose maior (2000 mg/kg) que induziu a morte de dois animais (**Tabela 1**). O valor de DL50 foi estimado, segundo o guia OECD 423, em torno de 1000 mg/kg.

Foram evidenciados efeitos como ptose e sedação nos tempos de 30 e 60 minutos tanto para a dose de 300 mg/kg como para a dose de 2000 mg/kg. Enquanto que alterações como tônus muscular e força para agarrar diminuídos foram observados no tempo de 30 minutos para o tratamento com a dose de 2000 mg/kg. Esses efeitos desapareceram após o período de 4 horas em ambas as doses.

Tabela 1. Efeitos da administração intraperitoneal aguda de 2H-1-Benzopiran-2-ona, 7-preniloxi em camundongos.

Grupo	Experimento	M/T	Efeitos
Controle	-	0/3	Nenhum
300 mg/kg	1	0/3	Ptose, sedação
	2	0/3	Ptose, sedação
2000 mg/kg	1	2/3	Ptose, sedação, tônus muscular e força para agarrar diminuídos

M/T – animais mortos/animais tratados

5.3 Avaliação da genotoxicidade

Para avaliar o possível efeito genotóxico *in vivo* de UMB-07 foi realizado o ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos, cujo resultado está apresentado na **Tabela 2**.

Como esperado, o tratamento com ciclofosfamida induziu um aumento o número de eritrócitos micronucleados ($18,20 \pm 1,56$; $p < 0,05$) em comparação com o controle ($8,33 \pm 0,99$).

O tratamento dos animais com a dose de 300 mg/kg de UMB-07 não induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados ($5,18 \pm 0,50$) em sangue periférico quando comparado ao grupo controle ($8,33 \pm 0,99$).

Tabela 2. Número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com UMB-07 e ciclofosfamida.

Grupos	Dose (mg/kg)	Número de eritrócitos micronucleadas
Controle	-	8,33 ± 0,99
Ciclofosfamida	50 mg/kg	18,20 ± 1,56 ^a
UMB-07	300 mg/kg	5,18 ± 0,50

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais. ^a p<0,05 comparado ao grupo controle (12% Tween 80) analisado aos pares por Teste Mann-Whitney U.

5.4 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo*

5.4.1 Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade e total celular

O tratamento com a dose de 50 mg/kg de UMB-07 induziu significante redução no volume tumoral ($5,19 \pm 0,95$ mL; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($11,0 \pm 0,5$ mL) (**Gráfico 1.A**). Houve também significante redução na massa tumoral apenas para o grupo tratado com a dose de 50 mg/kg ($5,43 \pm 0,91$ g; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($9,81 \pm 1,1$ g) (**Gráfico 1.B**). As doses de 12,5 ou 25 mg/kg não induziram alteração significante nos parâmetros volume e massa tumoral (**Gráfico 1.A e 1.B**).

Já para o parâmetro total celular, observou-se redução significativa nos animais tratados com as doses de 25 e 50 mg/kg ($99,41 \pm 11,3 \times 10^7$ células e $81,79 \pm 12,39 \times 10^7$ células, respectivamente; $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle ($196,4 \pm 24,34 \times 10^7$ células) (**Gráfico 1.C**).

Os animais tratados com 5-FU apresentaram significante redução em todos os parâmetros avaliados (massa tumoral: $1,16 \pm 0,24$ g; volume tumoral: $0,01 \pm 0,01$ mL; total celular: $0,01 \pm 0,01 \times 10^7$ células; $p < 0,05$) (**Gráfico 1.A, 1.B e 1.C**).

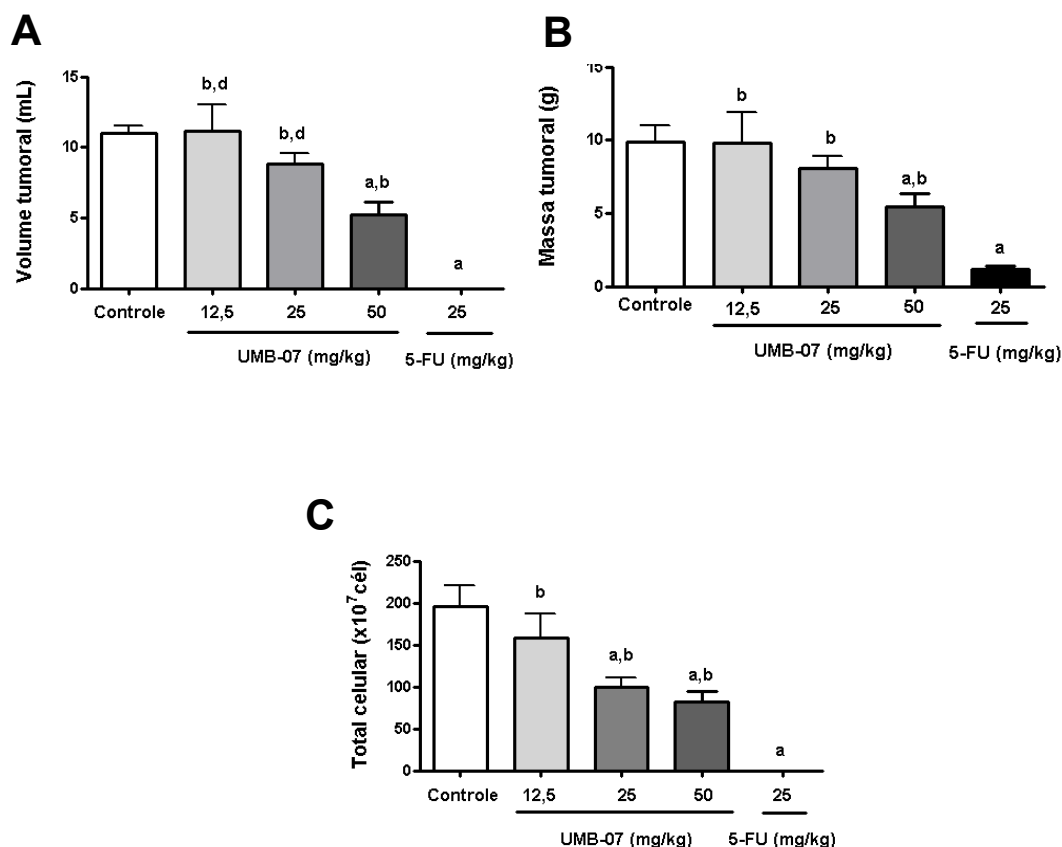


Gráfico 1. Efeito do tratamento (i.p.) com UMB-07 e 5-FU em camundongos transplantados com tumor de ehrlich. A: volume tumoral. B: massa tumoral. C: total celular. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais analisados por ANOVA seguido de Dunnet e Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU; ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo UMB-07 (25 mg/kg); ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo UMB-07 (50 mg/kg).

5.4.2 Análise do ciclo celular

O tratamento de nove dias com UMB-07 com as doses de 25 ou 50 mg/kg não induziu alterações significativas na distribuição das células tumorais nas diferentes fases do ciclo celular (**Gráfico 2**).

O tratamento com a droga padrão 5-FU induziu aumento significativo do pico sub-G1 ($83,4\% \pm 0,92$; $p < 0,05$), e reduziu a porcentagem de células nas fases G0/G1 ($9,2\% \pm 0,51$ $p < 0,05$), S ($2,27\% \pm 0,09$ $p < 0,05$) e G2/M ($0,74\% \pm 0,04$ $p < 0,05$), em comparação com os controles ($16,38\% \pm 1,63$; $46,79\% \pm 2,25$; $17,66\% \pm 0,35$; $12,38\% \pm 0,53$, respectivamente).

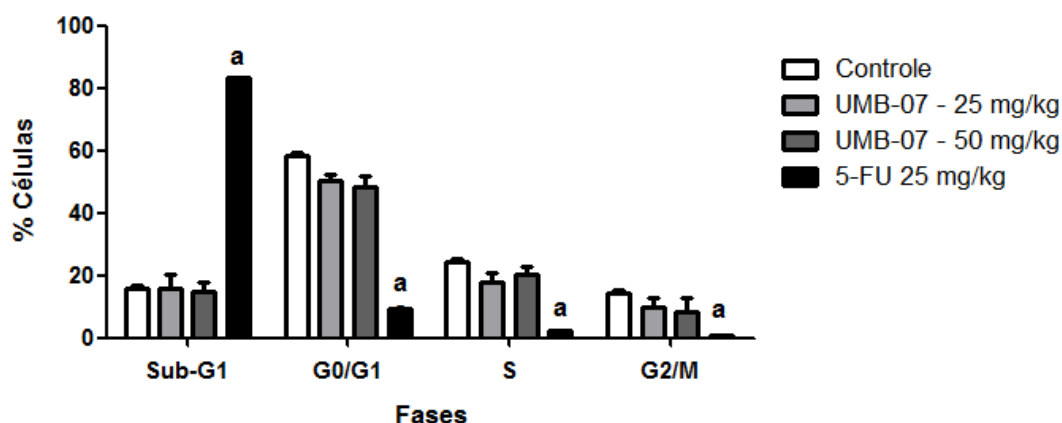


Gráfico 2. Percentagem de células de tumor de ehrlich nas fases do ciclo celular após os tratamentos com UMB-07. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Dunnet e Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.4.3 Investigação do efeito antiangiogênico

Observou-se uma redução na microdensidade dos vasos nos grupos tratados com UMB-07 ($0,21 \pm 0,01\%$, $p < 0,05$; $0,22 \pm 0,01\%$, $p < 0,05$; $0,12 \pm 0,007\%$, $p < 0,05$ para as doses de 12,5 mg/kg, 25 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente) quando comparados ao grupo controle ($0,29 \pm 0,02\%$). Quando comparados o grupo tratado com droga padrão 5-FU ($0,11 \pm 0,01\%$ $p < 0,05$) e o grupo controle ($0,29 \pm 0,02\%$), também observou-se uma redução significativa na microdensidade dos vasos (**Figura 2 e Gráfico 3**).

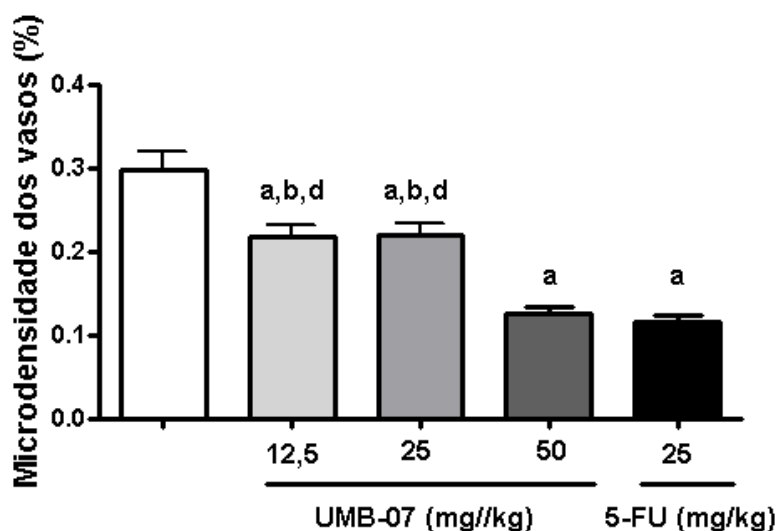


Gráfico 3. Gráfico representativo do efeito do tratamento com UMB-07 e 5-FU na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich. Determinado pela área ocupada por vasos sanguíneos dividido pela área total selecionada. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão padrão da média de seis animais analisado por seguido de Dunnet e Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo do 5-FU. ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo UMB-07 (50 mg/kg).

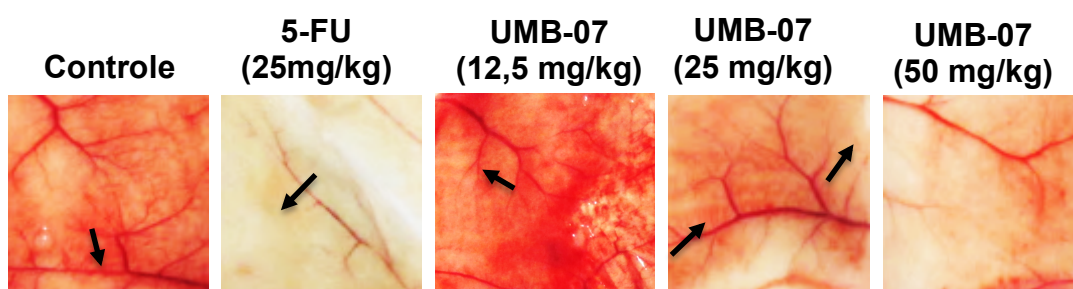


Figura 2. Figuras representativas da membrana peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão padrão da média de seis animais analisado por seguido de Dunnet e Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo do 5-FU. ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo UMB-07 (50 mg/kg).

5.4.4 Quantificação das citocinas IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, CCL2, TNF- α e IFN- γ no lavado peritoneal

UMB-07 não induziu alteração nos níveis das citocinas IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ no lavado peritoneal de animais tratados com as doses de 25 ou 50 mg/kg. Pode-se observar apenas uma redução da quimiocina CCL2 ($1007 \pm 144,4$ pg/mL; $p < 0,05$) para a dose de 50 mg/kg de UMB-07, quando comparado ao controle ($1875 \pm 175,9$ pg/mL) (**Gráfico 4.G**).

Nos animais tratados com o 5-FU foi detectado aumento de IL-1 ($11,31 \pm 0,8$ pg/mL; $p < 0,05$) e IFN- γ ($2470 \pm 145,9$ pg/mL; $p < 0,05$) e diminuição de TNF- α ($12,39 \pm 0,56$ pg/mL; $p < 0,05$) e da quimiocina CCL2 ($25,16 \pm 5,15$ pg/mL, $p < 0,05$), em comparação com os respectivos controles (**Gráfico 4.A, 4.F e 4.G**).

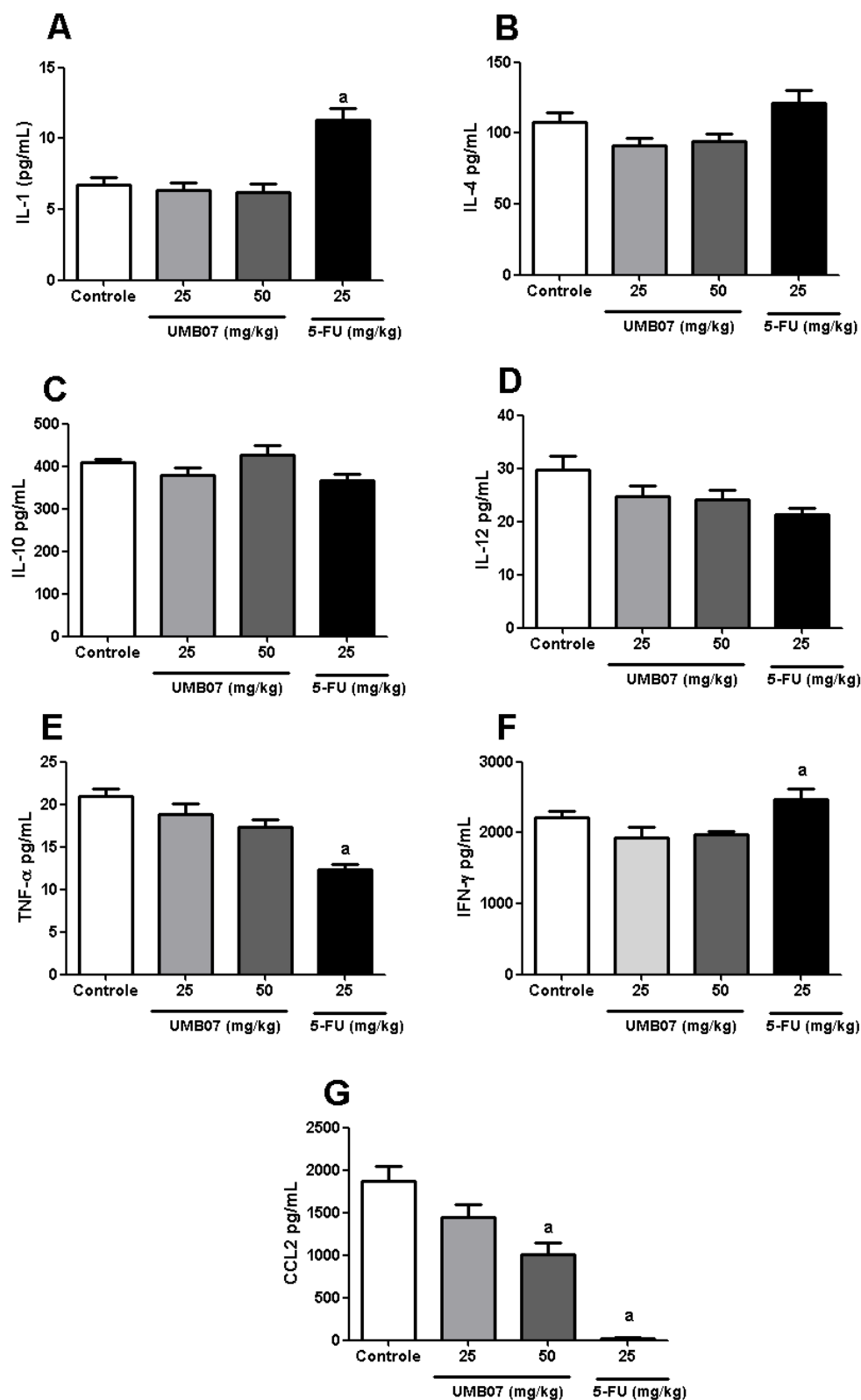


Gráfico 4. Concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com tumor de Ehrlich submetidos aos diferentes tratamentos. A: IL-1. B: IL-4. C: IL-10. D: IL-12. E: TNF-α. F: IFN-γ. G: CCL2. Dados apresentados como média ± erro padrão da média analisados por ANOVA seguido por Dunnett e Tukey $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.5 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de tumor de ehrlich

Na **Tabela 3** estão expressos valores referentes ao consumo de água e ração, assim como a evolução ponderal dos animais após o tratamento com UMB-07.

Baseado nos resultados da **Tabela 3** pode-se constatar que UMB-07 (12,5; 25 ou 50 mg/kg) aumentou significativamente o consumo de ração dos animais em comparação com o grupo controle.

Em relação ao peso final dos animais, houve uma redução significativa para os animais tratados com o 5-FU ($30,40 \pm 2,36$ g) e UMB-07, 50 mg/kg ($42,20 \pm 3,52$ g) quando comparados ao grupo controle ($47,05 \pm 2,88$ g).

Tabela 3. Consumo de água e ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com tumor de ehrlich submetidos aos diferentes tratamentos com UMB-07*.

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de ração (g)	Consumo de água (mL)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	-	$55,00 \pm 4,94$	$48,75 \pm 7,44$	$33,65 \pm 1,59$	$47,05 \pm 2,88$
5-FU**	25	$45,04 \pm 5,17^a$	$41,88 \pm 6,51$	$32,40 \pm 2,56$	$30,40 \pm 2,36^a$
UMB-07	12,5	$65,63 \pm 4,41^{a,b}$	$45,00 \pm 5,34$	$31,07 \pm 2,09$	$44,28 \pm 6,85^d$
UMB-07	25	$68,84 \pm 7,14^{a,b}$	$44,38 \pm 5,39$	$31,00 \pm 1,96$	$44,48 \pm 2,79^d$
UMB-07	50	$68,30 \pm 6,24^{a,b}$	$41,88 \pm 6,51$	$31,50 \pm 1,65$	$42,20 \pm 3,52^{a,d}$

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais, analisados por ANOVA seguido por Dunnet e Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU (25 mg/kg).

*UMB-07: 2H-1-benzopiran-2-ona, 7- preniloxi

**5-FU: 5-fluorouracil

Na análise toxicológica dos parâmetros bioquímicos não observou-se diferença significativa entre as doses avaliadas e o controle (**Tabela 4**).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com tumor de ehrlich submetidos aos diferentes tratamentos com UMB-07*.

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Controle	-	282,8 ± 83,62	130,6 ± 31,28	85,55 ± 9,3	1,04 ± 0,3
5- FU***	25	175,3 ± 34,72 ^a	30,89 ± 10,80 ^a	38,38 ± 7,7 ^a	0,34 ± 0,05 ^a
UMB-07*	25	325,2 ± 76,23 ^d	145,6 ± 30,40 ^d	98,10 ± 1,2 ^d	1,07 ± 0,13 ^d
UMB-07*	50	265,7 ± 48,12 ^d	118,5 ± 13,24 ^d	95,70±15,08 ^d	0,98 ± 0,18 ^d

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido por Dunnet e Tukey. ^ap< 0,05 comparado ao grupo controle. ^dp< 0,05 comparado ao grupo 5-FU.

*UMB-07: 2H-1-benzopiran-2-ona, 7- preniloxi

***5-FU: 5-fluorouracil

No que diz respeito à avaliação dos parâmetros hematológicos e hematemétricos foi observado um aumento significativo dos leucócitos totais no grupo tratado com a dose de 50 mg/kg ($34,1 \pm 10,0$; $p<0,05$) em comparação ao controle ($19,8 \pm 2,5$). Nos animais tratados com a mesma dose observou-se uma redução significativa dos linfócitos ($58,5 \pm 5,3$; $p<0,05$) em comparação ao controle ($78,3 \pm 2,8$). Também observou-se um aumento significativo dos segmentados ($35,3 \pm 10,0$; $p<0,05$) em relação ao controle ($19,6 \pm 2,5$) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com tumor de ehrlich submetidos aos diferentes tratamentos com UMB-07*.

Parâmetro	Controle	5-FU**	UMB-07*	
			25 mg/kg	50 mg/kg
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	7,6 $\pm$ 0,4	8,3 $\pm$ 0,2	8,5 $\pm$ 1,5	8,2 $\pm$ 0,2
Hemoglobina (g/dL)	12,5 $\pm$ 1,1	13,2 $\pm$ 1,4	13,1 $\pm$ 0,6	12,33 $\pm$ 0,4
Hematócrito (%)	37,5 $\pm$ 3,5	44,0 $\pm$ 3,1 ^a	40,9 $\pm$ 4,5	38,8 $\pm$ 3,5
VCM (fm^3)	48,9 $\pm$ 2,1	50,5 $\pm$ 2,1	48,0 $\pm$ 4,0	47,27 $\pm$ 1,5
HCM (pg)	15,9 $\pm$ 0,5	15,0 $\pm$ 1,2	14,8 $\pm$ 1,4	14,5 $\pm$ 0,7
CHCM (g/dL)	33,2 $\pm$ 2,8	29,8 $\pm$ 1,4	31,0 $\pm$ 2,3	30,9 $\pm$ 1,9
Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	19,8 $\pm$ 2,5	20,2 $\pm$ 1,0	18,5 $\pm$ 3,5	34,1 $\pm$ 10,0 ^{a,b,d}
Linfócitos	78,3 $\pm$ 2,8	77,5 $\pm$ 3,4	79,3 $\pm$ 1,7	58,5 $\pm$ 5,2 ^{a,b,d}
Segmentados	19,6 $\pm$ 2,5	20,2 $\pm$ 1,0	18,3 $\pm$ 3,5	35,3 $\pm$ 8,0 ^{a,b,d}
Monócitos	1,83 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,5
Eosinófilos	0,1 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido por Dunnet e Tukey. ^ap< 0,05 comparado ao grupo controle. ^bp< 0,05 comparado ao grupo UMB-07 (25 mg/kg). ^dp< 0,05 comparado ao grupo 5-FU.

*UMB-07: 2H-1-benzopiran-2-ona, 7- preniloxi

**5-FU: 5-fluorouracil

O tratamento com UMB-07 não induziu alterações significativas nos índices dos órgãos avaliados (coração, timo, baço, fígado e rins) (**Tabela 6**). Já o tratamento com o 5-FU aumentou significativamente os índices do coração ($4,06 \pm 0,24$; p< 0,05), timo ($2,46 \pm 0,45$; p< 0,05) e rins ($10,55 \pm 0,89$; p< 0,05) em relação ao controle ($2,70 \pm 0,65$; $1,67 \pm 0,29$; $7,50 \pm 1,47$, respectivamente). Em relação ao índice de baço, o tratamento com o 5-FU ($2,55 \pm 0,46$; p< 0,05) ocasionou uma redução significativa em relação ao controle ($2,89 \pm 0,99$).

Tabela 6. Índices dos órgãos de camundongos transplantados com tumor de ehrlich submetidos aos diferentes tratamentos com UMB-07*.

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de coração (mg/g)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)
Controle	-	2,70 ± 0,61	1,67 ± 0,26	2,89 ± 0,97	52,41 ± 6,1	7,50 ± 1,44
5-FU**	25	4,06 ± 0,22 ^a	2,46 ± 0,41 ^a	2,55 ± 0,44 ^a	54,91 ± 2,51	10,55 ± 0,86 ^a
UMB-07	12,5	2,68 ± 0,80 ^b	1,60 ± 0,54 ^b	2,55 ± 0,43 ^b	46,37 ± 9,43	7,68 ± 1,28 ^d
UMB-07	25	2,78 ± 0,58	2,28 ± 0,22	3,04 ± 0,70	56,25 ± 5,94	6,81 ± 2,0 ^d
UMB-07	50	2,39 ± 0,26 ^b	1,73 ± 0,33	2,59 ± 0,65	51,31 ± 7,15	7,63 ± 1,8 ^d

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisados por ANOVA seguido por Dunnet e Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU (25 mg/kg).

*UMB-07: 2H-1-benzopiran-2-ona, 7- preniloxi

**5-FU: 5-fluorouracil

5.5.1 Análises histológicas

Para uma avaliação mais detalhada dos possíveis efeitos tóxicos do UMB-07 sobre os órgãos dos animais tratados, uma avaliação histopatológica, especificamente de fígado e rins, foi realizada.

As lâminas com os cortes de rins dos animais do grupo controle transplantado e tratados com 5-FU (25 mg/kg) e UMB-07 (50 mg/kg) apresentaram-se dentro dos limites de normalidade histológica. Ao exame microscópico, os lobos renais do grupo controle apresentavam-se bem definidos com raios medulares na pirâmide medular e labirinto cortical recobrimdo a sua base e lados (**Figura 3.A**). Na região medular as alças de Henle, os ductos, túbulos coletores e vasos retos estavam conservados (**Figura 3.B**). As artérias e veias interlobares apresentavam-se regularmente distribuídas com infiltrado celular na região periférica de forma isolada (**Figura 3.C**). O grupo 5-FU também apresentou as características da região cortical (**Figura 3.D**) e medular preservadas. Nos animais tratados com UMB-07 (50 mg/kg) os lóbulos estavam conservados com corpúsculos renais

(corpúsculo de Malpighi) preservados, envolvidos por fina cápsula de Bowmann (folheto visceral e folheto parietal) e glomérulos (**Figura 3.E**) sustentados por delicado mesângio (**Figura 3.G**). Os túbulos contorcidos proximais e distais, alça de Henle, ductos e túbulos coletores (**Figura 3.F**) estavam revestidos por epitélio com altura variável, de colunar a pavimentoso, típico do tecido renal (**Figura 3.F e 3.H**). As artérias e veias intralobulares apresentavam-se regularmente distribuídas.

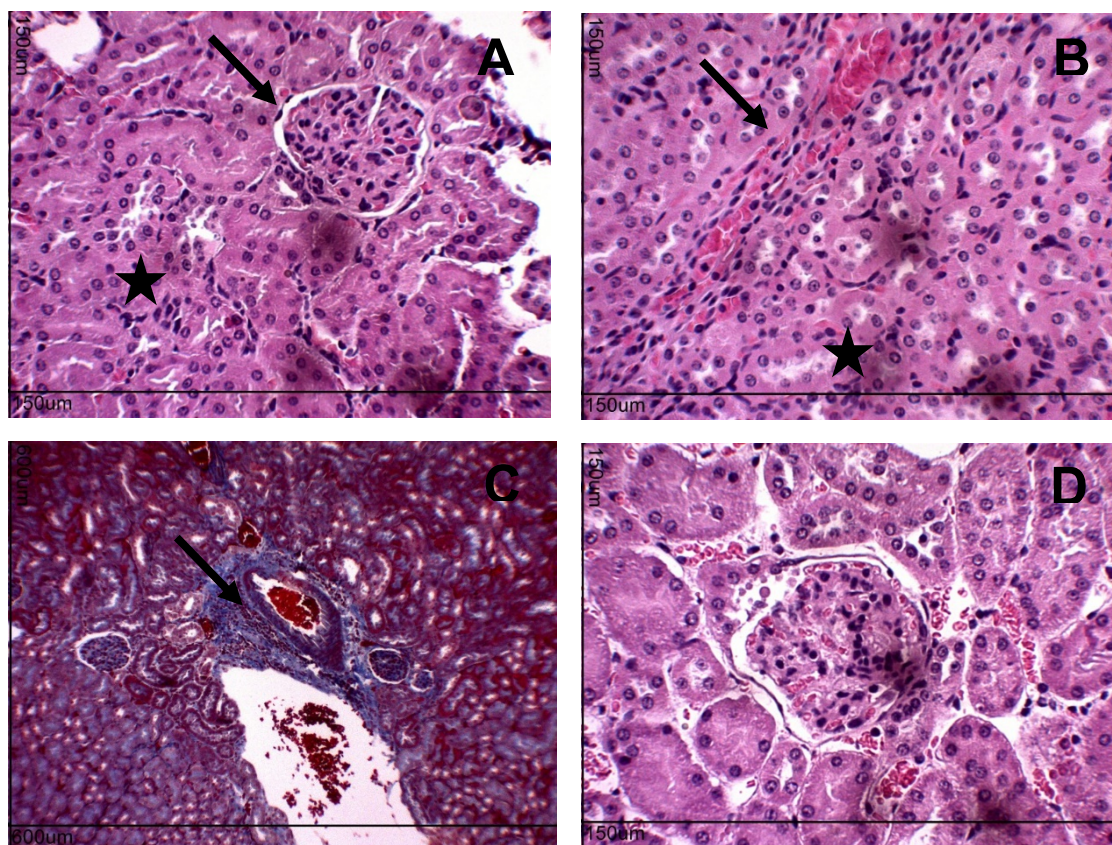


Figura 3. Fotomicrografias dos rins dos animais dos grupos experimentais: Controle, 5-FU (25 mg/kg) e UMB-07 (50 mg/kg). **(A)** Controle transplantado, região cortical, glomérulo renal (seta) e labirinto cortical (estrela). **(B)** Controle transplantado, região medular, ductos coletores (estrela), alça de Henle e vasos retos (seta). **(C)** Controle transplantado, infiltrado celular na região periférica da artéria e veia interlobares (seta). **(D)** Grupo 5-FU Controle transplantado, região cortical

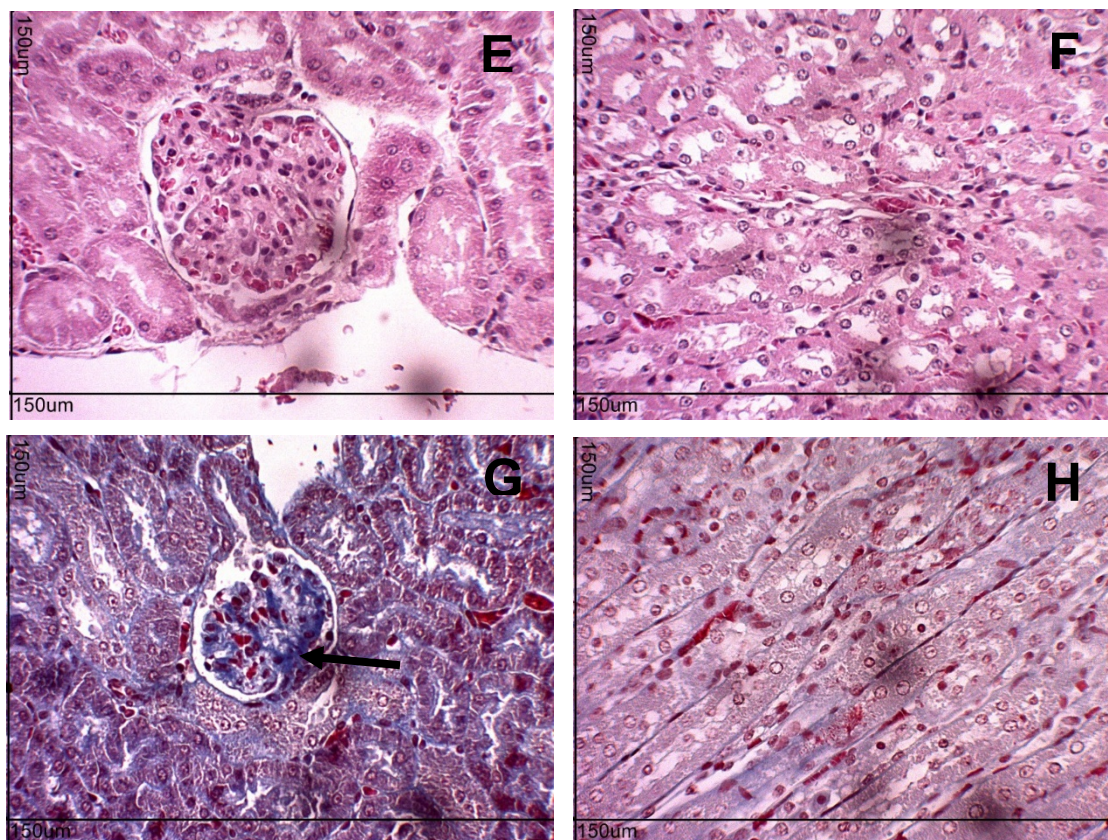


Figura 3. Fotomicrografias dos rins dos animais dos grupos experimentais (**Continuação**): **(E)** Grupo UMB-07 região cortical, **(F)** região medular, **(G)** região cortical, mesângio (seta) e **(H)** região medular. **A, B, D, E e F** – HE, A.T. x400. **C** – Tricrômio de Masson, A.T. x100, **G e H** – Tricrômio de Masson, A.T. x400.

Ao exame microscópico, os fígados dos animais do grupo controle apresentaram arquitetura do tipo lobular preservada, porém, observa-se congestão venosa portal e lobular (**Figura 4.A**) com veias hepáticas terminais de paredes finas, equidistantes, espaços portais, regularmente distribuídos e pequenos, comportando tríades hepáticas (ducto biliar, ramo da veia porta e ramo da artéria hepática) (**Figura 4.B**) sem particularidades histológicas com os hepatócitos organizados em placas (**Figura 4.C**) direcionadas para as veias centrolobulares de paredes finas. No lóbulo hepático foi identificado infiltrado inflamatório. Os espaços portais que incorporam a tríade hepática apresentaram infiltrado celular (**Figura 4.B**). O infiltrado diminuiu nos grupos tratados com 5-FU (25 mg/kg) (**Figura 4.D e 4.E**) e UMB-07 (50 mg/kg) (**Figura 4.F, 4.G e 4.H**). Entre os hepatócitos foi possível observar diferença no tamanho dos núcleos (**Figura 4.C e 4.H**). O infiltrado celular era constituído por células mononucleares e corpos apoptóticos (**Figura 4.B, 4.E e 4.G**).

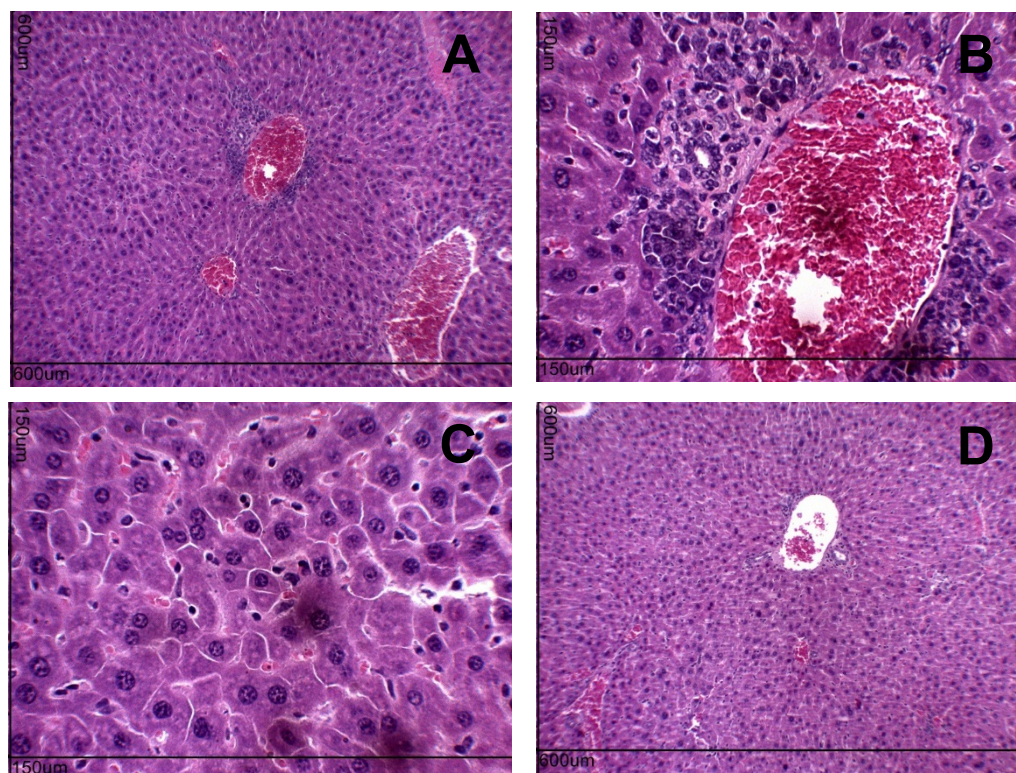


Figura 4. Fotomicrografias dos fígados dos animais dos grupos experimentais: Controle, 5-FU (25 mg/kg) e UMB-07 (50 mg/kg). Grupo controle: (A) lóbulo hepático, (B) tríade hepática e (C) placas de hepatócitos. FU-5: (D). A e D – HE, A.T. x100. B e C – HE, A.T. x400.

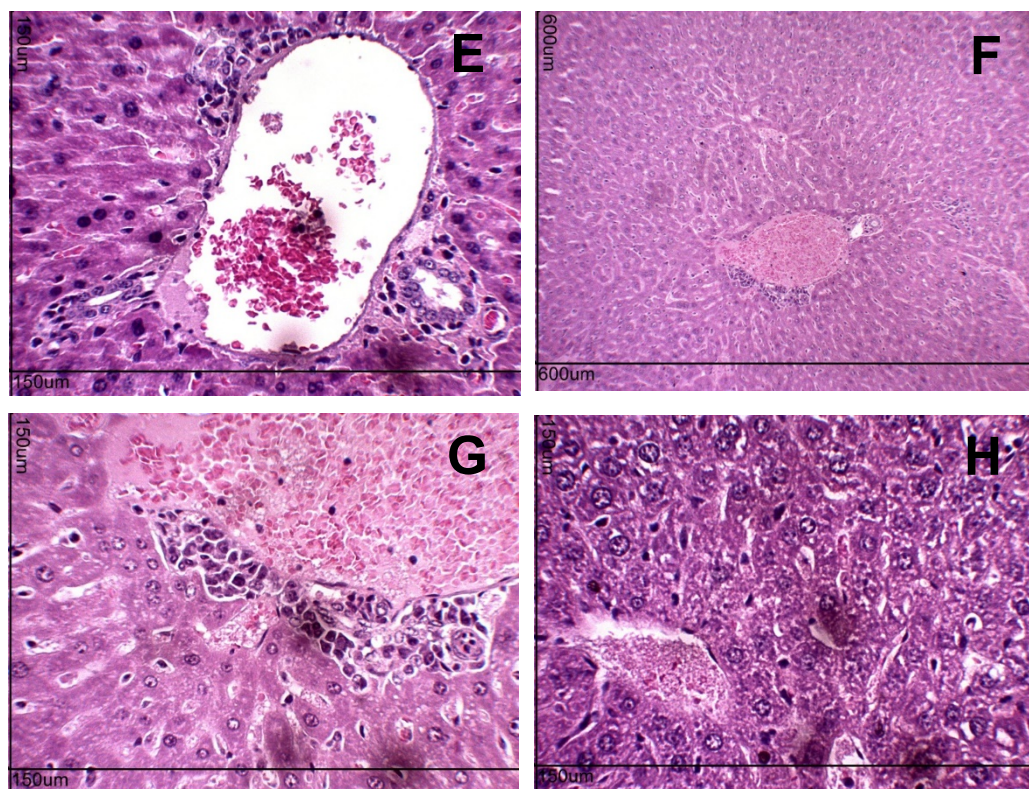


Figura 4. Fotomicrografias dos fígados dos animais dos grupos experimentais: **(Continuação)** (E) espaço porta. UMB-07: (F) lóbulo hepático e (G) espaço porta com infiltrado celular e (H) hepatócitos. F – HE, A.T. x100. E, G e H – HE, A.T. x400.

O grupo controle apresentou esteatose hepática (**Figura 5.A**) e o grupo 5-FU infiltrado inflamatório observado em torno da tríade hepática do tipo linfocitário (**Figura 5.B**) com hepatócitos apresentando alteração na afinidade a coloração a nível citoplasmático e nuclear. No grupo UMB-07 foi observado células em mitose aleatoriamente (**Figura 5.C**), efeito característico de proliferação hepatocelular e alteração na afinidade ao corante promovendo alteração na coloração do citoplasma e do núcleo dos hepatócitos (**Figura 5.D**).

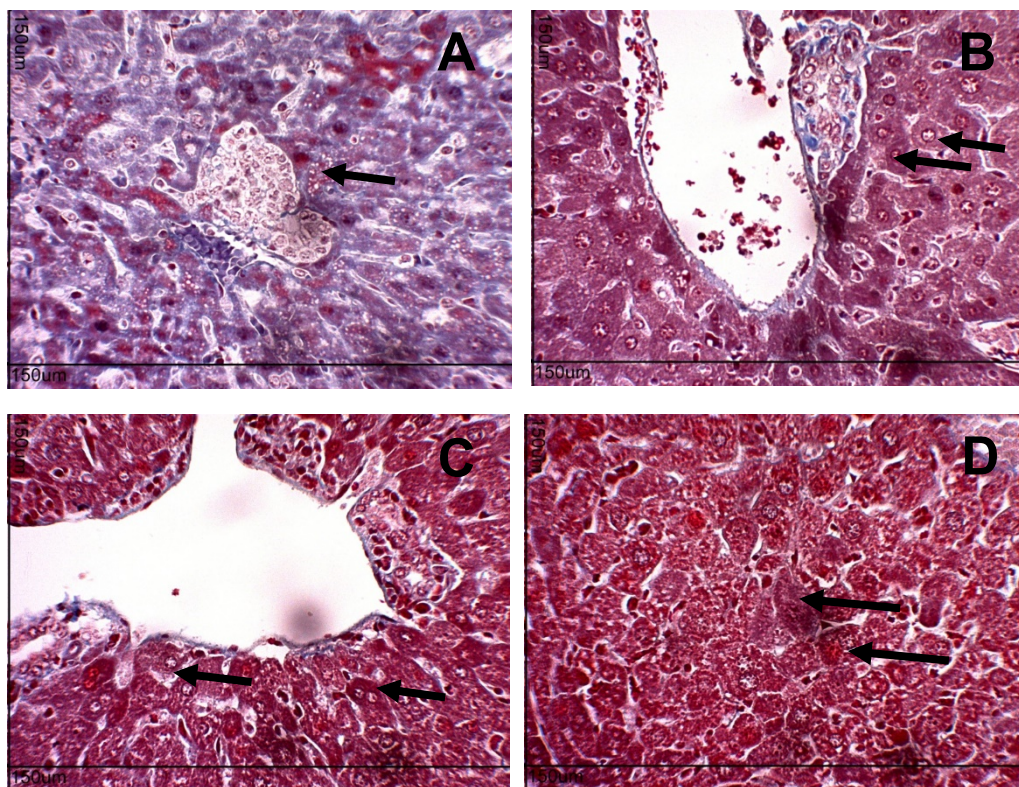


Figura 5. Fotomicrografias dos fígados dos animais dos grupos experimentais: Controle, 5-FU (25 mg/kg) e UMB-07 (50 mg/kg). Grupo controle: (A) Esteatose hepática (seta). 5-FU: (B) infiltrado celular, células com afinidade citoplasmática e nuclear diferente a coloração, UMB-07 (C) e (D) Divisão celular e afinidade celular diferente ao corante. A, B, C e D – Tricrômio de Masson, A.T. x400.

5.6 Ensaio de inibição da produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais

No presente estudo, os efeitos do UMB-07 (50 mg/kg) na produção de NO induzida por LPS, em macrófagos peritoneais foram investigados. Após o tratamento com LPS (1 µg/mL) durante 24 h, a concentração de nitrito aumentou significativamente. Após incubação com diferentes concentrações do UMB-07 (0,1; 1; 10 ou 100 µM, $p < 0,05$), juntamente com LPS, uma inibição significativa da produção de nitrito foi detectada na presença do derivado cumarínico na concentração de 100 µM ($p < 0,05$) em comparação ao grupo tratado somente com o LPS (**Gráfico 5**). Não foi observada alteração nos níveis de nitrito após tratamento apenas com o UMB-07.

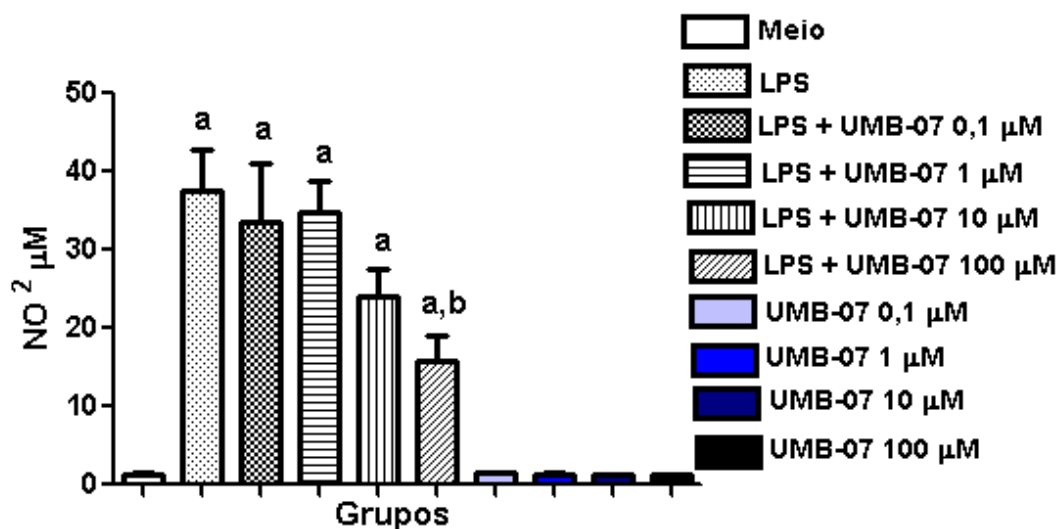


Gráfico 5. Inibição da produção do óxido nítrico em macrófagos peritoneais submetidos aos diferentes tratamentos com o UMB-07. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados por ANOVA seguido por Dunnet e Tukey. $a_p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com veículo (meio). $b_p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com LPS.

Ainda, é possível observar que a despeito da inibição da produção de nitrito, o UMB-07 induziu citotoxicidade na concentração de 100 μ M, reduzindo a viabilidade dos macrófagos para 61,8% (**Gráfico 6**).

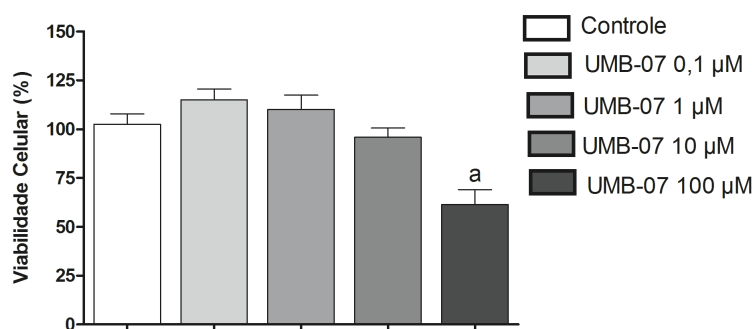


Gráfico 6. Efeito do UMB-07 sobre a viabilidade celular em macrófagos peritoneais. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados por ANOVA seguido Dunnet e Tukey $a_p < 0,0001$ comparado ao grupo controle.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O câncer é a principal causa de mortalidade por doenças não transmissíveis em todo o mundo, além de ser responsável por uma alta morbidade e gerar altos custos para os sistemas de saúde (WHO, 2016; SIEGEL et al., 2014). Sendo assim, é incessante a busca pelo conhecimento da biologia da doença, e por tratamentos eficazes e mais seletivos, consequentemente, com menor toxicidade (PLUCHINO; HALL, 2012; PARHI; MOHANTY; SAHOO, 2012; LOPEZ; BANERII, 2016).

Nesse contexto, os produtos naturais se destacam devido à sua diversidade química, biológica e geográfica, o que tem se refletido no seu uso potencial no tratamento de diversas doenças, dentre estas, o câncer (DEMAIN; VAISHNAV, 2011).

Dentre as classes de produtos naturais bem relatadas na literatura pode ser citada a classe das cumarinas, constituída por compostos amplamente distribuídos no reino vegetal, e reponsáveis por uma gama de atividades biológicas, que incluem, atividade antibacteriana, anticonvulsivante, antifúngica, anti-inflamatória e antitumoral (IRANSHAHI et al., 2009; THAKUR et al., 2015; EVANS et al., 2009; SHIN et al., 2010; LUO et al., 2011; DANDRIYAL et al., 2016). Em relação a dados de toxicidade, a literatura mostra baixa nefrotoxicidade e cardiotoxicidade para cumarinas, apesar de apresentar dados de hepatotoxicidade. Sendo assim, constantemente novos derivados cumarínicos vão sendo sintetizados com o intuito de melhorar sua estrutura química para potencializar seus efeitos e minimizar a sua toxicidade (BRONIKOWSKA et al., 2012; VASSALLOA et al., 2010).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo estudar a toxicidade e a atividade antitumoral do 2h-1-benzopiran-2-ona, 7- preniloxi (UMB-07), um derivado cumarínico que apesar da literatura mostrar dados de atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, não há relatos de mecanismos de ação antitumoral para esta cumarina.

O estudo iniciou com a avaliação da toxicidade de UMB-07 em modelos *in vitro* e *in vivo*. Na busca de drogas com potencial antitumoral, a avaliação da toxicidade em tecidos normais merece destaque considerando a falta de seletividade e alta toxicidade que grande parte desses compostos apresentam.

Sendo assim, modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* que avaliam a toxicidade de candidatos a fármacos antitumorais são essenciais (BECHAN et al., 2010)

Uma das formas de avaliar esse efeito é por meio de estudos de toxicidade em eritrócitos, que representa o modelo primário para estudo de membrana plasmática celular, pelo fato de ser uma célula desprovida de núcleo e organelas, além de ser considerado de fácil acesso para estudar as possíveis alterações na membrana celular induzidas por uma droga. Outro importante ponto a ser destacado é o fato de que muitos antineoplásicos utilizados na clínica, como cisplatina e a bleomicina podem acentuar a anemia que geralmente ocorre em pacientes com câncer (CANAPÈ et al., 2015; WU et al., 1997). De acordo com relatos da literatura, esse efeito pode ser provocado tanto pela inibição da síntese de novas células pela medula óssea quanto pela hemólise intravascular (ZBIDAH et al., 2013).

UMB-07 induziu pequeno percentual de hemólise mesmo após tratamento dos eritrócitos de sangue periférico de camundongos com alta concentração (2000 µg/mL), o que indica baixa citotoxicidade desse derivado cumarínico em eritrócitos de camundongos. Esse dado corrobora dados da literatura que mostram baixo potencial hemolítico para outros derivados cumarínicos (WANG et al., 2014a; XU et al., 2015).

Na sequência, com objetivo de determinar possíveis efeitos tóxicos decorrentes da exposição única a doses elevadas de UMB-07, bem como determinar doses seguras a serem utilizadas nos ensaios farmacológicos *in vivo* de atividade antitumoral, foi realizado o ensaio de toxicidade pré-clínica aguda em camundongos.

Um dos parâmetros de toxicidade mais conhecidos é a dose letal média (DL50), caracterizada como a dose única de uma substância capaz de provocar a morte de 50% dos animais experimentais. Com base nesse dado, é possível selecionar doses seguras a serem utilizadas para os experimentos de atividade farmacológica *in vivo* subsequentes, pois, se uma substância tem DL50 três vezes maior que a dose mínima efetiva, ela pode ser considerada uma boa candidata para estudos posteriores (ODEGHE; UWAKWE; MONAGO, 2012; AMELO; NAGPAL; MAKONNEN, 2014).

No entanto, o atual guia da ANVISA que dispõe sobre os ensaios de

toxicidade pré-clínica necessários para novos candidatos a fármacos, descreve que não são necessários estudos para o cálculo preciso da DL50. Todavia, devem ser utilizados métodos alternativos que empregam um menor número de animais, mas que fornecem estimativa do valor da DL50 de uma determinada amostra, tais como os guias da OECD (ANVISA, 2013).

O ensaio toxicológico pré-clínico agudo foi realizado com UMB-07 em camundongos submetidos à doses únicas de 300 ou 2000 mg/kg, pela via intraperitoneal. Após o tratamento agudo, foi evidenciado que o número de mortes aumentou com a elevação da dose. O valor aproximado de DL50 foi estimado em 1000 mg/kg, o que permitiu a escolha de doses seguras a serem usadas nos testes farmacológicos.

Na maior dose de UMB-07 avaliada no teste de toxicidade (2000 mg/kg), foram observados efeitos sobre o Sistema Nervoso Autônomo (SNA), que sugere inibição parassimpática, uma vez que foram registrados em destaque diminuição do tônus muscular e da força para agarrar, assim como observaram-se efeitos depressores do Sistema Nervoso Central (SNC), como sedação e ptose, nas duas doses avaliadas (ALMEIDA et al., 2006). Semelhantemente, Pereira et al. (2009) observaram o potencial inibitório no SNC de vários derivados cumarínicos por meio da redução dos níveis do neurotransmissor excitatório glutamato.

Kumar et al. (2013) fizeram um estudo para determinação do perfil toxicológico em ratos de um derivado cumarínico proveniente de um extrato de *Aegle marmelos* e após a realização dos ensaios na doses de 50, 100, 500 e 1000 mg/kg constatou-se que o mesmo mostrou baixa toxicidade. Em um outro estudo, Zhang et al. (2012) avaliaram o óleo essencial de *Ligusticum chuanxiong*, que apresenta em sua composição cumarina com anel benzopirano. Nesse estudo, constatou-se uma baixa toxicidade tanto via oral como via intraperitoneal para o referido óleo. Em ensaios de toxicidade aguda realizados por Ramu et al. (2016) observou-se que a administração oral de 2000 mg/kg de umbeliferona em ratos não ocasionou nenhum sinal de toxicidade. Portanto, os dados de baixa toxicidade obtidos para UMB-07 corroboram dados da literatura que mostram baixa toxicidade para plantas medicinais ricas em cumarinas, bem como para compostos isolados.

Danos ao DNA podem resultar em mutações de genes, o que pode levar a uma disfunção biológica com consequente desenvolvimento de doenças que levam

bastante tempo para se desenvolverem. Esse dano pode ser causado por agentes físicos ou químicos, e pode ser denominado genotoxicidade (NEWMAN, 2009; HAGENAARS et al., 2008; VILLELA et al., 2006).

A maior parte dos compostos químicos podem ser genotóxicos, ou seja, possuem capacidade de interferir no DNA e na expressão gênica, e podem ser potencialmente mutagênicos ou até mesmo carcinogênicos. Uma maneira de se avaliar o potencial genotóxico de um composto é por meio do ensaio do micronúcleo que tem a capacidade de detectar danos permanentes ao DNA. Micronúcleos são corpos citoplasmáticos compostos por um fragmento do cromossomo remanescente da divisão celular na etapa da anáfase (SIU et al., 2004; LIU et al., 2014). Nesse ensaio, antineoplásicos reconhecidamente genotóxicos, dentre estes a ciclofosfamida, são usados como padrão de indução de micronúcleos (DOLLERY, 1999; INCE et al., 2014).

O potencial genotóxico *in vivo* de UMB-07 foi avaliado utilizando o ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos. Considerando que UMB-07 não aumentou o número de eritrócitos micronucleados, pode-se sugerir que UMB-07 apresenta baixa genotoxicidade. Mazzorana et al. (2013) realizaram ensaios para avaliar o potencial genotóxico de um extrato de *Mikania laevigata*, cuja composição majoritária era de cumarinas, e observou-se que o mesmo não se apresentou genotóxico. Todavia, testes adicionais que avaliam outros aspectos relacionados a genotoxicidade devem ser realizados com UMB-07, a exemplo do teste de Ames (SUZUKIA et al., 2016).

Os estudos de toxicidade com UMB-07 em conjunto permitem sugerir que este derivado cumarínico apresenta baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo*, o que permitiu a seleção de doses seguras a serem utilizadas no ensaio de avaliação da atividade antitumoral. Para tal, utilizou-se a linhagem de carcinoma de Ehrlich que foi descrito como um adenocarcinoma mamário murino. Seu crescimento é rápido, com um comportamento muito agressivo e é capaz de crescer em quase todas as linhagens de camundongos. Na sua forma ascítica tem sido utilizado como um modelo de tumor transplantável para investigar o efeito antitumoral de várias substâncias (SEGURA et al., 2000; SOLIMAN, 2015).

Os animais transplantados com o tumor de Ehrlich foram tratados durante nove dias com diferentes doses de UMB-07 (12,5; 25 ou 50 mg/Kg). Considerando

todos os parâmetros avaliados (volume e massa do tumor, e total celular) pode-se observar que a dose de 50 mg/Kg induziu significativa atividade antitumoral. O tratamento com a dose de 25 mg/kg de UMB-07 reduziu significativamente a quantidade total de células no peritônio dos animais, porém, não foi capaz de reduzir os parâmetros volume e massa tumorais indicando que esta dose não foi capaz de reverter a ascite peritoneal induzida pelo tumor.

A droga padrão utilizada nesse ensaio foi o 5-fluorouracil (5-FU), que é um análogo da pirimidina usado para tratar uma gama de tumores sólidos, e possui como mecanismo de ação a inibição da timidilato sintase (TS) pelo 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), incorporação de 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP) ao RNA e incorporação do 5-fluoro-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (FdUTP) ao DNA. A inibição da TS, uma enzima importante na síntese de pirimidina, resulta na depleção do trifosfato de deoxitimidina (dTTP) e um aumento no trifosfato de deoxiuridina (dUTP) seguida da diminuição na síntese e reparo de DNA. Portanto, trata-se de um antineoplásico, da classe dos antimetabólitos, que interfere com o processo de replicação celular (NOORDHUIS et al., 2004; LV et al., 2012; CAMACHO et al., 2010; HONG et al., 2014).

Baseado em um estudo realizado por Chang et al. (2016) em células ZR-75-1 (linhagem de câncer de mama humano), foi relatado que a cumarina esculetina foi capaz de promover citotoxicidade evidenciada pelo aumento do pico subG1, o que é indicativo de apoptose Yu et al. (2015) avaliaram o potencial antitumoral da umbeliferona frente a células de hepatocarcinoma (HepG2), e observaram que a mesma ocasiona uma parada no ciclo celular na fase S.

Visto que dados da literatura demonstraram que outros derivados cumarínicos apresentaram atividade antitumoral *in vitro* com parada no ciclo celular, o presente estudo prosseguiu com a avaliação dos efeitos de UMB-07 no ciclo celular. Porém, não foi possível observar alterações no perfil do ciclo celular induzidos por UMB-07 em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich *in vivo*. Todavia, estudos *in vitro* utilizando diferentes tempos de tratamento devem ser realizados para avaliar possíveis efeitos de UMB-07 no ciclo celular.

Em outro estudo com derivados cumarínicos, realizado por Avin et al. (2014), observou-se que um dos compostos era capaz de inibir o crescimento do carcinoma ascítico de Ehrlich e do linfoma ascítico de Dalton tanto *in vitro*, como *in*

vivo. Foi observado que esse efeito envolve ativação de apoptose e mecanismos antiangiogênicos.

Devido à importância da angiogênese para o desenvolvimento de tumores, a inibição da sinalização de fatores de crescimento para esse processo é uma estratégia importante na terapia do câncer (YANG et al., 2016). Segundo Folkman (1971), o crescimento tumoral depende da formação de novos vasos. Sendo assim, esse processo está diretamente relacionado com a agressividade do tumor e com a diminuição da sobrevida do paciente. Portanto, a inibição de fatores que promovem o crescimento desses novos vasos é alvo de pesquisas que levam a descoberta de novas moléculas com potencial antitumoral (FANG, 2011; FOLKMAN, 1971; BENAZZI et al., 2014; YANG et al., 2016).

Considerando que UMB-07 reduziu a microdensidade vascular peritumoral no modelo de carcinoma de Ehrlich, pode-se inferir que o mecanismo de ação antitumoral deste derivado cumarínico envolve, pelo menos parcialmente, um efeito antiangiogênico. Portanto, UMB-07 caracteriza-se como um inibidor de um processo essencial para a expansão tumoral. Todavia, sabendo que a mudança para padrão angiogênico depende do equilíbrio dinâmico entre fatores pró-angiogênicos (MMP-9, VEGF, TNF- α e CCL-2) e antiangiogênicos, tais como a endostatina, no ambiente imediato das células endoteliais (YANG et al., 2016; ABRAMS et al., 2003), novos estudos devem ser realizados na perspectiva de elucidar em qual(is) alvo(s) molecular(es) UMB-07 está agindo para produzir seu efeito antiangiogênico.

Em ensaios *in vitro* realizados com uma furanocumarina chamada marmesina foi constatado que a mesma inibiu significativamente a angiogênese por meio da inibição do receptor VEGFR (KIM et al., 2015). Em um outro estudo feito por Neelgundmath et al. (2015) observou-se que, diferentes derivados cumarínicos induziram efeitos antitumorais por modular o NF-KB (fator nuclear-KB), que é uma citocina envolvida com processos como proliferação, sobrevivência, resistência a drogas, angiogênese e metástase.

Wang et al. (2014b) propuseram que a associação de um peptídeo, capaz de inibir o receptor VEGFR, com diversos radicais alifáticos e aromáticos poderia potencializar a atividade desse peptídeo. Foi constatado que o melhor grupo adicionado foi uma cumarina com um grupo metóxi na posição 7, indicando a

importância desse radical conjugado com o peptídeo para o aumento da sua interação com os domínios hidrofóbicos desse receptor.

A inflamação possui um papel relevante na carcinogênese, pois contribui para o estresse oxidativo que causa danos celulares levando a alterações no genoma, o que culmina com a expressão de genes modificados e o acúmulo de mutações. No processo carcinogênico a inflamação causada pelo microambiente tumoral também pode promover o crescimento tumoral e a progressão de metástases, demonstrando a importância do processo inflamatório tanto no surgimento quanto no crescimento do tumor (MIMICA et al., 2016; OKADA, 2014; ELINAV et al., 2013).

Baseado na importância do microambiente para a progressão tumoral, avaliou-se a capacidade de UMB-07 modular mediadores inflamatórios (citocinas/quimiocina) no peritônio dos animais tratados (25 ou 50 mg/kg de UMB-07) durante nove dias, em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

Entre os mediadores avaliados, foi detectado que UMB-07 reduziu os níveis de CCL2. Esta quimiocina está envolvida no processo inflamatório, e é um fator crucial para o desenvolvimento de células T *helper* na imunidade adaptativa, promovendo respostas do tipo Th2 e recrutando macrófagos associados a tumores (TAMs) e macrófagos que expressam Gr-1, o que culmina na sobrevivência do câncer e metástases (GU et al., 2010; MARTIROSYAN et al., 2016).

Além disso, sabe-se que CCL-2 possui um papel fundamental na promoção da angiogênese (CHOI, 2016). Foi detectado que o aumento na concentração de CCL2 ocasiona o aumento da produção de VEGF por macrófagos no microambiente tumoral mostrando a sua importância no processo da neovascularização tumoral (TANAKA et al., 2006; SZCZEPANIK et al., 2015).

Em estudos clínicos observou-se que o aumento da expressão de CCL2 está relacionada com a progressão do câncer de mama e de ovário (LECHNER et al., 2011). Fang et al. (2015) constataram que o aumento dessa quimiocina inibe o processo de necrose de células tumorais de câncer de mama.

Em um outro estudo realizado por Szekanecz et al. (2010) foi observada uma correlação entre o aumento da expressão de CCL2 e o aumento de macrófagos e a densidade de vasos na região peritumoral. Além disso, altos níveis de CCL2 foram observados em paciente com carcinoma nasofaríngeo avançado e

metastático, demonstrando mais uma vez a relação dessa quimiocina e diminuição da sobrevida dos pacientes (LU et al., 2011).

Portanto, a expressão de CCL2, CCL17, CCL22, CXCL1-3 e CXCL5, CXCL6, CXCL8 CXCL12 pode ser associada com um pior prognóstico da doença em pacientes com câncer (BIRAGYN et al., 2012).

Shen et al. (2016) realizaram estudos em células de câncer de pulmão e observaram que CCL2 pode aumentar a migração e formação de colônias, além de desempenhar um papel crucial no recrutamento de macrófagos inflamatórios que podem aumentar a malignidade do tumor.

Sendo assim, pode-se inferir que UMB-07 induz redução da angiogênese, associada a atividade antitumoral, por, pelo menos parcialmente, reduzir os níveis de CCL2.

Ribeiro et al. (2016) realizaram um estudo e observaram que o aumento de IL-1 está diretamente relacionado com o processo inflamatório causado pelo 5-FU. Nossos dados corroboram esses relatos já que foi observado aumento dessa citocina após o tratamento com essa droga.

Em um estudo realizado por Yu et al. (2015) foi observado que o tratamento com o 5-FU contra linhagens de células de câncer de estômago (MGC) também reduziu os níveis TNF- α , o que condiz com dados observados nesse trabalho e a relação do aumento dessa citocina com a malignidade do tumor. Uma outra maneira de atuação do 5-FU contra o câncer pode se dar através do aumento da citocina IFN- γ , uma vez foi mostrado que a mesma está envolvida em efeitos antiproliferativos, antiangiogênicos e pró-apoptóticos em células tumorais (GORGULHO, 2012).

Diante de inúmeros relatos na literatura de efeitos adversos produzidos a partir da utilização de drogas antineoplásicas, a utilização de ensaios de toxicidade que avaliem possíveis alterações da homeostasia do organismo exposto à quimioterapia é imprescindível. O tratamento dos animais experimentais com doses repetidas das amostras por nove dias difere do ensaio de toxicidade aguda, pois permite avaliar os efeitos produzidos pelo acúmulo da substância em doses terapêuticas no organismo.

Diante disto, para a avaliação do perfil de toxicidade de UMB-07 nos animais experimentais, alguns parâmetros como consumo de água e de ração, bem como a

evolução ponderal foram analisados. Uma vez que a maioria das drogas antineoplásicas causam alterações no trato gastrointestinal (TGI) (OLIVEIRA, 2010), pode-se dizer que UMB-07 apresentou uma toxicidade no TGI, uma vez que houve um aumento do consumo de ração e uma redução do peso dos animais.

Um estudo realizado por AKAH et al. (2010) avaliou a toxicidade de derivados cumarínicos administrados intraperitonealmente. Foram observados sinais de toxicidade como anorexia e fadiga. Um outro ponto interessante desse estudo está relacionado a atividade anticoagulante da cumarina que se dá principalmente no trato gastrointestinal o que conduz a lesões hemorrágicas. Esses dados remetem ao fato de que a lesão no TGI pode ocasionar uma redução da absorção de nutrientes e assim ocasiona a anorexia dos animais mesmo com o aumento do consumo de ração como uma tentativa para suprir as necessidades nutricionais (AKAH et al., 2010).

O fígado está localizado em uma posição estratégica no corpo humano e regula a homeostase metabólica por meio da produção de energia e moléculas utilizadas por outras células em tecidos próximos ou muito distantes. Além disso, exerce uma das funções mais importantes do organismo na defesa, a detoxificação, convertendo as toxinas lipofílicas aos metabólitos mais hidrofílicos que podem ser eliminados do corpo por meio da urina, uma vez que os rins constituem o principal órgão excretor (GRANT, 1991; STANCA et al., 2008; MALKANTHI; PATERSON; BARNES, 2014). O fígado possui a capacidade única de se regenerar após ferimento (WASHABAU et al., 2013; XAVIER; CALDEZ; KALDIS, 2014).

Um possível dano hepatocelular se traduz pelo aumento plasmático das enzimas transaminases aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT), o que faz dessas enzimas os principais indicadores desse tipo de dano (RUSSO; JACOBSON, 2002; BERTOLAMI, 2005). Com a lesão hepática, estas enzimas podem extravasar para o plasma e podem ser úteis para o diagnóstico e monitoramento desse tipo de lesão. Apesar de poderem também estar aumentadas em outros órgãos, elas são os principais marcadores de lesão celular, especialmente hepatopatias (HENRY, 2008; BRANCO, 2009).

AST é uma enzima encontrada no fígado, mas também no músculo esquelético e cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos. No fígado, é encontrada no

citoplasma (40%) e nas mitocôndrias (60%) dos hepatócitos. Quando qualquer um desses tecidos é danificado, a AST é liberada no sangue. Como não há um método laboratorial para saber qual a origem da AST encontrada no sangue, o diagnóstico da causa do seu aumento deve levar em consideração a possibilidade de lesão em qualquer um dos órgãos onde é encontrada. Já a ALT é encontrada em altas concentrações apenas no citoplasma dos hepatócitos, o que a torna útil para o diagnóstico de agressão hepática, com relativa especificidade (JORGE, 2006; BRANCO, 2009).

A alanina aminotransferase é uma enzima mais específica para a avaliação de dano hepático, pois o conteúdo desta enzima no fígado excede, em muito, a concentração em outros tecidos. A sua elevação acompanha o dano hepatocelular agudo. Desta forma, tomando-se por base que a ALT é uma enzima mais específica para avaliação da lesão hepática e observando-se que esta enzima não apresentou uma elevação pode-se afirmar que não houve alteração funcional do fígado (CHIDA et al., 2003).

O tratamento com UMB-07 nas doses avaliadas não ocasionou alteração nos níveis plasmáticos das transaminases ALT e AST quando comparado ao grupo controle, o que sugere baixa hepatotoxicidade.

Há muito tempo se fala sobre a hepatotoxicidade das cumarinas. Em um estudo realizado por Hazleton et al. (1956) constatou-se o potencial hepatotóxico desses compostos. Além disso, um estudo clínico realizado em pacientes com linfedema feito por Loprinzi et al. (1999) também destacou o papel de um derivado cumarínico na hepatotoxicidade. Baseado nesses fatos, Verstraelen et al. (2016) realizou um estudo com a cumarina 1,2-benzopirona e marcadores hepáticos e constatou mais uma vez o potencial hepatotóxico desses compostos.

Porém, as cumarinas também são conhecidos por sua baixa citotoxicidade (MARTIN-ARAGON et al., 1998). Baseado nisso Atmaca et al. (2011) realizaram estudos com as cumarinas esculetina e escoparona, para determinar o potencial hepatotóxico desses compostos, e constatou que os mesmos não se apresentaram hepatotóxicos. Esses dados mostram a dualidade desses compostos quando se trata de toxicidade hepática. E como foi mostrado anteriormente, o derivado UMB-07 não demonstrou esse tipo de toxicidade.

Os rins regulam funções vitais do organismo como equilíbrio hídrico, ácido-básico e eletrolítico, participando de funções hormonais e regulação da pressão arterial (CURY; BRUNETTO; AYDOS, 2010). A avaliação da função renal pode ser realizada por meio da determinação das concentrações sanguíneas de ureia e creatinina.

A ureia é um produto da degradação do metabolismo dos aminoácidos, produzida a partir da amônia no ciclo da ureia hepática (GROSS; WEHRLE; BUSSEMAKER, 1996). Tem sido recomendado que a aplicabilidade das determinações da ureia no soro é significativamente potencializada quando os resultados da ureia são considerados juntamente com os resultados das determinações da creatinina (HENRY, 2008).

No músculo, a creatina é convertida em fosfocreatina, que serve como uma fonte rica em energia. Sob condições fisiológicas, a creatina perde água espontaneamente, formando sua amida cíclica, a creatinina. Uma vez formada, a creatinina não é reutilizada no metabolismo corporal e assim funciona exclusivamente como um produto de degradação (HENRY, 2008). A creatinina é excretada na circulação em uma taxa relativamente constante. Uma fração substancial da sua excreção nos rins é resultado da secreção tubular proximal. A creatinina também é filtrada livremente pelos glomérulos, mas não é reabsorvida. Seus níveis séricos elevados estão associados com uma redução da taxa de filtração glomerular e, portanto, distúrbios renais (HENRY, 2008).

Os tratamentos com UMB-07 não induziram alterações nos níveis plasmáticos de ureia e creatinina, sugerindo que não apresenta toxicidade renal, nas doses avaliadas. Esses dados corroboram com Singh et al. (2014) os quais realizaram ensaios com um derivado cumarínico (N, N, N-Trietil-11-(4-metil-2-oxo-2H-benzopiran-7-iloxi)-11-oxoundecan-1-aminium bromide) e observaram que o mesmo não foi nefrotóxico.

Os eritrócitos, células do tecido sanguíneo, têm como principal função o transporte de oxigênio. Em relação aos leucócitos sua principal função é a proteção do corpo contra infecções, trabalhando em conjunto com as proteínas imunoglobulinas e do sistema complemento, formando os mecanismos de defesa do hospedeiro. Os leucócitos também produzem citocinas que aumentam a função ou estimulam a proliferação de outras células (EVANS, 2009).

Alterações hematológicas constituem uma das consequências mais frequentes do uso de quimioterápicos no tratamento do câncer; as alterações mais frequentes nos pacientes são neutropenia, anemia, leucopenia e plaquetopenia (ROQUE; FORONES, 2006; STEGER; HAUTMANN; KOLBL, 2012).

No presente estudo houve redução do número de linfócitos e um aumento do número de segmentados no grupo tratado com a dose de 50 mg/kg de UMB-07. Apesar disso, esses valores estão dentro da normalidade para a espécie, entre 60 – 90 $10^3/\text{mm}^3$ para linfócitos e entre 10 – 40 $10^3/\text{mm}^3$ para segmentados, sendo assim não há significado clínico para esse achado (GAD, 2007).

Observou-se também um aumento do número de leucócitos totais o que caracteriza uma resposta inflamatória que pode ser ocasionada por alguns derivados cumarínicos, como por exemplo a cumarina esculina em estudo realizado por Wang et al. (2015).

A análise histológica não evidenciou alterações nos rins dos animais tratados com a maior dose de UMB-07, demonstrando uma baixa toxicidade do composto sobre esse órgão. Corrobora com dados da literatura que afirmam que derivados cumarínicos pode promover uma ação renoprotetora (CAO et al., 2015).

O fígado contém dois tipos principais de células epiteliais diferenciadas: os hepatócitos, células que exercem a principal atividade metabólica do órgão, que estão localizados no parênquima hepático e representam cerca de 60% da sua massa, e as células epiteliais biliares, localizadas nos ductos biliares (XAVIER; CALDEZ; KALDIS, 2014). As células de Kupffer são macrófagos fixos nas membranas dos sinusoides e podem ser encontradas em todo o fígado (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

A análise histológica do fígado dos animais do grupo controle mostrou a presença de infiltrado inflamatório nesse grupo que pode ser consequência local de um efeito sistêmico (tumor), entretanto foi observada uma redução desse infiltrado no grupo de animais tratados com UMB-07 o que condiz com dados prévios sobre derivados cumarínicos promovendo ação hepatoprotetora (SHI et al. 2014).

O óxido nítrico (NO) é um componente essencial para o sistema biológico, uma vez que o mesmo está envolvido em processos fisiológicos e patológicos. O NO pode regular diversos de processos biológicos, como por exemplo é liberado em resposta a estímulos nocivos tais como, endotoxina e citocinas pró-

inflamatórias. Em um processo inflamatório o NO é produzido principalmente pela enzima iNOS, que é induzida por vários mecanismos relacionados com as citocinas inflamatórias (IFN- γ , IL-1 e TNF- α), e está relacionado com a vasodilatação que ocorre nas fases iniciais do processo (MACEACHERN et al., 2015).

O óxido nítrico pode ser genotóxico em determinadas circunstâncias indicando que pode ser envolvido na etiologia de muitos tipos de câncer. Ao mesmo tempo, diversos estudos sugerem que o NO suprime vários fenótipos de câncer. O NO parece estimular ou inibir a carcinogênese a depender de vários fatores como concentração, tempo de exposição e tipo de câncer (HICKOK; THOMAS, 2010).

Em baixas concentrações, menores que 100 nM, NO atua impedindo a apoptose de alguns tipos de câncer. Em contrapartida, em elevadas concentrações, mais do que 500 nM, NO pode ser pró-apoptótico e citotóxico frente a células tumorais. Nessas circunstâncias, o NO é derivado de macrófagos, neutrófilos e células endoteliais (VANINI et al., 2015).

De maneira geral, estudos afirmam que a síntese excessiva e desregulada de NO tem contribuindo para o crescimento e proliferação tumoral. Além disso, ele pode modular diferentes eventos como angiogênese, apoptose, ciclo celular, invasão e metástase (SCICINSKI et al., 2015).

Entre os mecanismos envolvidos na tumorigênese pelo NO estão: lesões no DNA através da formação de espécies tóxicas e mutagênicas, por modificação direta do DNA, ou pela inibição de mecanismos de reparação do mesmo, indução de mutações na p53 para que a mesma perca sua atividade supressora de tumor, inibição de caspases, bloqueando o processo de apoptose, além de promover o aumento do fluxo sanguíneo do tumor através de dilatação dos vasos arteriolares e reduzir interações adesivas de leucócitos endoteliais (CHOUDHARI et al., 2013).

UMB-07 reduziu significativamente a produção de NO em macrófagos peritoneais estimulados por lipolissacarídeo (LPS), todavia considerando os dados de citotoxicidade apresentado, pode-se inferir que esse efeito está relacionado a um efeito tóxico da substância sobre os macrófagos e não a uma inibição da produção de NO. esse resultado está relacionado a uma diminuição da sua produção por um efeito tóxico direto por esse composto a viabilidade dos macrófagos.

Considerando todos os aspectos abordados, esse trabalho apresenta, para 2h-1-benzopiran-2-ona, 7- preniloxi (UMB-07), um derivado cumarínico sintético, dados de atividade antitumoral, via mecanismos antiangiogênicos e imunomoduladores, além de indicar a baixa toxicidade de UMB-07.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados com o derivado cumarínico 2h-1-benzopiran-2-ona, 7- preniloxi (UMB-07), foi possível concluir que:

- UMB-07, nas concentrações estudadas, apresentou baixa citotoxicidade frente eritrócitos de camundongos;
- UMB-07 apresentou baixa toxicidade aguda em camundongos, nas doses utilizadas;
- UMB-07 não apresentou genotoxicidade *in vivo*, nas condições avaliadas;
- UMB-07 mostrou atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich, com mecanismo de ação envolvendo efeitos antiangiogênicos, relacionados, possivelmente, a redução da quimiocina CCL2;
- UMB-07 apresentou baixa toxicidade *in vivo*, em animais com CAE submetidos ao tratamento de doses repetidas (nove dias).

Referências

REFERÊNCIAS

ABDA, A.; BENOURETH, D.E.; Tabet, M.; LIMAN, R.; KONUK, M.; KHALLEF, M.; TAHER, A. Mutagenicity and genotoxicity of drinking water in Guelma region, Algeria. **Environ Monit Assess**, v. 187, n. 21, p. 1-15, 2015.

ABRAMS T.J.; MURRAY,L.T.; PESENTI, E.; WALKER, V.; HOLWAY, T; COLOMBO, L.B; LEE, J.M. CHERRINGTON, N.M. Mol. Preclinical evaluation of the tyrosine kinase inhibitor SU11248 as a single agent and in combination with "standard of care" therapeutic agents for the treatment of breast cancer. **Cancer Ther**. v.2, p. 1011–1021, 2003.

AHANI, R.; FARZIN R.; REZA A. C.; MOHAMMAD H. E.; NASIR M.; MAHDI B.; ZAHRA S.; NAVID M.; KAYHAN A. Sindbis Virus-Pseudotyped Lentiviral Vectors Carrying VEGFR2-Specific Nanobody for Potential Transductional Targeting of Tumor Vasculature. **Molecular Biotechnology**, v. 19, pp 1–10, 2016.

AHN J. M.; HWANG E. T.; YOUN C. H.; BANU D. L.; KIM B. C.; NIAZI J. H.; GU, M. B. Prediction and classification of the modes of genotoxic actions using bacterial biosensors specific for DNA damages. **Biosens. Bioelectron**. v. 254, pp.767–772, 2009.

AKAH, P.A.; OSIGWE, C.C.; NWORU, C.S. Reversal of Coumarin-Induced Toxicity by the Extracts and Fractions of *Ageratum conyzoides*. **Asian Journal of Medical Sciences**, v.2, n.3, pp. 121-126, 2010.

ALBAS, C.S.; SOUZA, J.P.; NAI, G.A.; PARIZI, J.L.S. Avaliação da genotoxicidade da *Ilex paraguariensis* (erva mate) pelo teste do micronúcleo. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.345-349, 2014.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS – JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALMEIDA, J.R.C. **Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p. 358.

ALIPOUR, M.; KHOobi, M.; SEMAMI, S.; FALLAH-BENAKOHAL, S.; GHASEMI-NIRI, S.F.; ABDOLLAHI, M.; FOROUMADI, A.; DARU A.; SHAFIEE, J. Antinociceptive properties of new coumarin derivatives bearing substituted 3,4-dihydro-2H-benzothiazines. **Pharm. Sci.**, v. p. 9-15, 2014.

ANVISA. **Guia para condução de estudos não-clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, 2013.

AGRAWAL, S. S.; SARASWATI, S.; MATHUR, R. et al. Cytotoxic and antitumor

effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. **Life Sciences**. v. 89, p. 147-158, 2011.

AMELO, W.; NAGPAL, P.; MAKONNEN, E. Antiplasmodial activity of solvent fractions of methanolic root extract of *Dodonaea angustifolia* in *Plasmodium berghei* infected mice. **BMC Complement Altern Med.**, v. 14, pp. 462, 2014.

AVIN, B. R. V.; THIRUSANGU, P.; RANGANATHA, V. L.; FIRDOUSE, A.; PRABHAKAR, B.T.; KHANUM, S.A. Synthesis and tumor inhibitory activity of novel coumarin analogs targeting angiogenesis and apoptosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 211-221, 2014.

ATHAYDE-FILHO, P. F.; PINHO, A. S.; BENEDITO, R. B.; LUIS, J. A.; MORAIS, L. C. S. L.; ALMEIDA, R. N. Estudo de atividade antinociceptiva de 3-fenil-5-(4-etilfenil)-imidazolidina-2,4-diona, **ENAP**, 2007.

ATMACA, M.; H.M. BILGIN, B.D. OBAY, H. DIKEN, M. KELLE, E. KALE. The hepatoprotective effect of coumarin and coumarin derivatives on carbon tetrachloride-induced hepatic injury by antioxidative activities in rats J. **Physiol. Biochem**. V.67, p.569-576, 2011.

AOYAMA, Y.; KATAYAMA, T.; YAMAMOTO, M.; TANAKA, H.; KON, K. "A new antitumor antibiotic product, demethylchartreusin. Isolation and biological activities," **e Journal of Antibiotics**, v. 45, n. 6, pp. 875–878, 1992.

ARAÚJO, R. S. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SCOTTI, M.T.; SCOTTI, L.; CRUZ, R.M.D.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; MENDONÇA-JUNIOR, F.J.B. Modulation of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus* with Coumarin Derivatives. **Scientifica**. v.2016, p.1-6, 2016.

ARECK A. U.; GASSMAN A.A.; EAST A.T.; GREISLER, H.P. Molecular Mediators of Angiogenesis. **J Burn Care Res**.v. 1, p.158-186, 2010.

AVILA C.; ONEL M. Reacciones adversas del imatinib como droga de segunda línea en pacientes con leucemia mieloide crónica. **Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter, Ciudad de la Habana** , v. 26, n. 3, p. 223-227, 2010.

BABA, M.; JIN, Y.; MIZUNO, A.; SUZUKI, H.; OKADA, Y.; TAKASUKA, N.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; OKUYAMA, T. Studies on Cancer Chemoprevention by Traditional Folk Medicines XXIV.1) Inhibitory Effect of a Coumarin Derivative, 7-Isopentenylcoumarin, against Tumor-Promotion. **Biol. Pharm. Bull.** v.25, n2, p. 244—246, 2002.

BAR, D., APTE, R.N.; VORONOV, E.; DINARELLO, C.A; COHEN, S. A. Continuous delivery system of IL-1 receptor antagonist reduces angiogenesis and inhibits tumor development. **FASEB J.**, v.18, pp.161–163, 2004.

BAIRD, A.M.; GRAY, S.G.; RICHARD, D.J.; O'BYRNE, K.J. Promotion of a cancer-like phenotype, through chronic exposure to inflammatory cytokines and hypoxia in a bronchial epithelial cell line model. **Sci. Rep**, v. 6, pp. 18907, 2016.

BAROT, K.P.; JAIN, S.V.; KREMER, L.; SINGH, S.; GHATE, M.D. Recent advances and therapeutic journey of coumarins: Current status and perspectives. **Med. Chem. Res.**, v. 24, pp.2771–2798, 2015.

BAUMSTARK-KHAN C.; HELLWEG C. E.; REITZ G. Cytotoxicity and genotoxicity reporter systems based on the use of mammalian cells. **Whole Cell Sens. Syst. II**, v.118, pp.113–151, 2010.

BAZZAZ B. S. F., IRANSHAHI M., NADERINASAB M., HAJIAN S., SABETI Z., MASUMI E. Evaluation of the effects of galbanic acid from *Ferula szowitsiana* and conferol from *F. badrakema*, as modulators of multi-drug resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v.5, n.1, pp.25–32. 2010.

BECHAN S, DEVENDRA KR, PRASHANT KR, RIZVI SI, GEETA W. Determination of erythrocyte fragility as a marker of pesticide-induced membrane oxidative damage. **Methods Mol Biol.**, v.594, pp,123–128, 2010.

BENAZZI, C.; A. AL-DISSI, C. H. CHAU, W. D. FIGG, G. SARLI,¹ J. T. DE OLIVEIRA, AND F. GÄRTNER. Angiogenesis in Spontaneous Tumors and Implications for Comparative Tumor Biology. **The Scientific World Journal**, v.2014, p.1-16, 2014.

BENCI, K.; MANDIĆ, L.; SUHINA, T.; et al. Novel coumarin derivatives containing 1,2,4-triazole, 4,5-dicyanoimidazole and purine moieties: Synthesis and evaluation of their cytostatic activity. **Molecules**. v. 17, p. 11010-11025, 2012.

BENEDITO R, HELLSTRÖM M. Notch as a hub for signaling in angiogenesis. **Exp Cell Res**, v.319, n.9, p.1281–1288, 2013.

BERAL V, REEVES G, BULL D, GREEN J. “Breast Cancer Risk in Relation to the Interval between Menopause and Starting Hormone Therapy.” **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n.4, p. 296–305, 2011.

BERTRAND, N.; WU, J.; XU, X.; KAMALY, N.; FAROKHZAD, O.C. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.66, pp. 2–25, 2014.

BILLIAU A. Anti-inflammatory properties of type I interferons. **Antivir Res**, v. 71, n.2–3, 108–116, 2006.

BIRAGYN, A.; LONGO, D. L. Neoplastic “Black Ops”: cancer's subversive tactics in overcoming host defenses. **Seminars in cancer biology**, v. 22, p. 50-59, 2012.

BISWAS, S.K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunol**, v. 11, pp. 889 – 896, 2010.

BJÖRKHOLM M, DEROLF ÅR, HULTCRANTZ M, et al. Treatment-related risk factors for transformation to acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in myeloproliferative neoplasms. **J Clin Oncol.**, v. 29, pp. 2410-2415, 2011.

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Alternatives to laboratory animals.** v.31 n. 3, p. 277-281, 2003.

BOGDAL, D. "Coumarins: fast synthesis by Knoevenagel condensation under microwave irradiation," **Journal of Chemical Research, Synopses**, v.8, pp. 468–469, 1998.

BOURGAUD, F.; HEHN, A.; LARBAT R.; et al., "Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes," **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n.2-3, pp. 293–308, 2006.

BRANCO, A. C. S. C. **Avaliação da toxicidade pré-clínica crônica de *Foeniculum vulgare* Mill.** 2009. 136p. Tese (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

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, p. 1359-1369, 2010.

BRANDYN A. CASTRO, B.A.; MANISH K. A. Bevacizumab for glioblastoma: current indications, surgical implications, and future directions. **Neurosurg Focus.** v.6, p.1-22, 2014.

BRONIKOWSKA, J.; SZLISZKA, E.; JAWORSKA, D.; CZUBA, D.P.; KROL, W. The coumarin psoralidin enhances anticancer effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), **Molecules.**, vol.17, pp. 6449-6464, 2012.

BUSSMANN, J., WOLFE, S. A.; SIEKMANN, A. F. Arterial-venous network formation during brain vascularization involves hemodynamic regulation of chemokine signaling. **Development**, v.138, pp.1717-1726, 2011.

CAETANO, N.L.B. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população do município de Lagarto- SE, Brasil – ênfase em pacientes oncológicos. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu , v. 17, n. 4, supl. 1, p. 748-756, 2015.

CALDWELL, SA, JACKSON SR, SHAHRIARI KS, LYNCH TP, SETHI G, WALKER S, VOSSELLER K AND REGINATO MJ. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. **Oncogene.**, v.29, pp.2831-2842, 2010.

CALEY, M. P.; KING, H.; SHAH, N.; WANG, N.; RODRIGUEZ-TEJA, M.; GRONAU, J.H.; WAXMAN, J.; [STURGE](#), J. Tumor-associated Endo180 requires stromal-derived LOX to promote metastatic prostate cancer cell migration on human

ECM surfaces. **Clin Exp Metastasis**, v.33, pp.151–165, 2016.

CANAPÈ, C.; CATANZARO, G.; TERRENO, E.; KARLSSON, M.; LERCHE, M. H.; JENSEN, P. R. Probing treatment response of glutaminolytic prostate cancer cells to natural drugs with hyperpolarized [5-13C] glutamine. **Magn Reson Med**, v.,73, 2296 -2305, 2015.

CALIXTO-CAMPOS, C.; ZARPELON, A.C; CORRÊA, M.; CARDOSO, R. D. R.; PINHO-RIBEIRO, F.A; CECCHINI, R.; MOREIRA, E.G; CATIA J.C. ; BERNARDY, C. F.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W.A. The Ehrlich Tumor Induces Pain-Like Behavior in Mice: A Novel Model of Cancer Pain for Pathophysiological Studies and Pharmacological Screening. **BioMed Research International**, v. 2013, pp. 1-12, 2013.

CAMACHO, L.H.; GARCIA, S.; PANCHAL, A.M.; LIM, J.; HONG, D.S.; NG, C.; MADOFF, D.C.; FU, S.; GAYED, I.; KURZROCK, R. Exploratory Study of Hepatic Arterial Infusion Oxaliplatin with Systemic 5-Fluorouracil/Bevacizumab in Patients with Refractory Solid Tumor and Extensive Liver Metastases. **Clinical Colorectal Cancer**, v.9, p.311-314, 2010.

CAMARGO, M.S.; OLIVEIRA, M.T.; SANTONI, M.M.; RESENDE, F.A.; OLIVEIRA-HOHNE, A.P.; ESPANHA, L.G.; NOGUEIRA, C.H.; CUESTA-RUBIO, O.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Effects of nemorosone, isolated from the plant *clusia rosea*, on the cell cycle and gene expression in mcf-7 bus breast cancer cell lines. **Phytomedicine**, v.22, pp.153–157, 2015.

CARMY Y., DOTAN S., RIDER P., KAPLANOV I., et al. The Role of IL-1 in the Early Tumor Cell – Induced Angiogenic Response **J Immunol.**, v.190, pp.3500-3509, 2013.

CAO, D., LIU Y., YAN W.; WANG C.; BAI P.; WANG T.; TANG M.; WANG X.; YANG Z.; MA B.; MA L.; LEI L.; WANG F.; XU B.; ZHOU Y.; YANG T.; CHEN L. Design, Synthesis, and Evaluation of in Vitro and in Vivo Anticancer Activity of 4-Substituted Coumarins: A Novel Class of Potent Tubulin Polymerization Inhibitors. **J Med Chem.**, v.59, n.12, pp.5721-39, 2016

CARPINELLA, M. C.; FERRAYOLI, C. G.; PALACIOS, S. M. Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits. **J Agric Food Chem.** v. 53, p. 2922-2927, 2005.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L. et al. Anendotoxin- induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, p. 3666–70, 1995.

CÉSPEDES, C.L.; AVILA, J.G.; MARTÍNEZ, A.; SERRATO, B.; CALDERÓN-MUGICA, J.C.; SALGADO-GARCIGLIA, R. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). **J. Agric. Food Chem.**, v.54, pp. 3521–3527, 2006.

CEKANOVA, M.; RATHORE, K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, pp. 1911- 1922, 2014.

CHANG, H.; CHIANG-TING C., YOU-SHENG L., POCHUEN S., DAIH-HUANG K., CHUNG-REN J., WEI-ZHE L. Esculetin, a natural coumarin compound, evokes Ca^{2+} movement and activation of Ca^{2+} -associated mitochondrial apoptotic pathways that involved cell cycle arrest in ZR-75-1 human breast cancer cells. **Cell**, v. 37, n.4, pp 4665–4678, 2016.

CHEN L, CHEN D, BLOCK E et al. Eradication of murine bladder carcinoma by intratumor injection of a bicistronic adenoviral vector carrying cDNAs for the IL-12 heterodimer and its inhibition by the IL-12 P40 subunit homodimer. **J Immunol.**, v.159, pp.351–359,1997.

CHENG, A.L.; KANG, Y.K., CHEN, Z, TSAO CJ, QIN S, KIM JS, LUO R, FENG J, YE S, YANG, TS, XU, J, SUN, Y, LIANG, H, LIU, J, WANG, J, TAK, WY, PAN, H, BUROCK, K, ZOU, J, VOLIOTIS, D, GUAN, Z. EFFICACY and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet Oncol.**, v.10, pp. 25-34, 2009.

CHIDA, V. V.; MOREIRA, M. B.; LEME, L. F. P.; FAGUNDES, D. J.; RAMALHO, C. E. B.; NOVO, N. F.; MONTERO, E. F. S. Estudo da função hepática de ratos espontaneamente hipertensos submetidos a diferentes pressões de pneumoperitônio com CO_2 . **Acta Cirúrgica Brasileira.**, v. 18, n. 1, 2003.

CHOI, J.; LEE, K. T.; KA, H.; JUNG, W. T.; JUNG, H. J.; PARK, H. J. “Constituents of the essential oil of the *Cinnamomum cassia* stem bark and the biological properties,” **Archives of Pharmacal Research**, v. 24, n. 5, pp. 418–423, 2001.

CHOI, Y.; SEO, H.; HAN, J.; YOO, I.; KIM J.; KA, H. Chemokine (C-C motif) Ligand 28 and Its Receptor CCR10: Expression and Function at the Maternal-Conceptus Interface in Pigs. **Biol Reprod.**, .v.31 pp. 1-16, 2016.

CHOUDHARI, S. K.; CHAUDHARY, M.; BAGDE, S.; GADBAIL, A.R.; JOSHI, V. Nitric oxide and cancer: a review. **World J Surg Oncol.** v.11, pp. 118-129, 2011.

CLAY, J. W.; C. R. CLEMENT. Selected Species and Strategies to Enhance Income Generation from Amazonian Forests. Forestry Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 1993.

COENEGRACHTS, K; MATOS, C.; BEEK, L.; METENS, T.; HASPESLAGH, M.; BIPAT, S. ; STOKER, J.; RIGAUTS, H. Focal liver lesion detection and characterization: comparison of non-contrast enhanced and SPIO-enhanced diffusion-weighted single-shot spin echo echo planar and turbo spin echo T2-weighted imaging, **Eur J Radiol.**, v.72, pp. 432–439, 2009.

COECKE, S.; BLAAUBOER, B. J.; ELAUT, G.; FREEMAN, S.; FREIDIG, A.; GENSMANTEL, N.; HOET, P.; KAPOULAS, V. M.; LADSTETTER, B.; LANGLEY, G.; LEAHY, D.; MANNENS, G.; MENEGUZ, A.; MONSHOUWER, M.; NEMERY, B.; PELKONEN, O.; PFALLER, W.; PRIETO, P.; PROCTOR, ROGIER, N.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; SABBIONI, E.; STEILING, W.; VAN DE SANDT, J. J. Toxicokinetics and metabolism. **Alternatives to laboratory animals. Suppl.**, v.1, p. 147-175, 2006.

COLOMBO M.P.; TRINCHIERI G.; Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.13, pp.155–168, 2002.

COMPAGNO D, JAWORSKI FM, GENTILINI L, et al. Galectins: Major Signaling Modulators Inside and Outside the Cell. **Curr Mol Med.**, v.14, pp. 630-51, 2014.

CORDERO, J.B.; MACAGNO J.P., STEFANATOS, R.K.; STRATHDEE, K.E.; CAGAN, R.L. VIDAL, M.; Oncogenic ras diverts a host TNF tumor suppressor activity into tumor promoter, **Dev. Cell.**, v.18, pp. 999–1011, 2010.

CORDEIRO, M. L.S.; SILVA N.L.F; FERREIRA, M.R.; NÓBREGA, V. F. F. F. Anticorpos monoclonais: implicações terapêuticas no câncer. **REVISTA SAÚDE E CIÊNCIA**, v.3, p 252-262, 2014

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRIADO P.R., BRANDT H.R., MOURE E.R., PEREIRA G.L., SANCHES J.A. Adverse mucocutaneous reactions related to chemotherapeutic agents: part II. **An Bras Dermatol.**, v.85, pp.591-608, 2010.

CRU - Cancer Research UK. Cancer cases and deaths across the world and in the UK: October 2011. Disponível em: <<http://publications.cancerresearchuk.org/cancerstats/statsworldwide/cancer-global-ppt.html>>. Acesso em: 29 jun. 2014.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 12, n. 10, p. 584-596, 2015.

CURTIS, P.D.; BRUN, Y.V.; Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.74, pp.13-41, 2010.

CURY, J. L.; BRUNETTO, A. F.; AYDOS, R. D. Negative effects of chronic kidney failure on lung function and functional capacity. **Rev Bras Fisioter**, São Carlos, v. 14, n. 2, p. 91-8, 2010.

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, pp.141-168, 2016.

DANAEI, G, HOORN, S, VANDER, LOPEZ, A D, MURRAY, C J, EZZATI, M. "Causes of Cancer in the World: Comparative Risk Assessment of Nine Behavioural and Environmental Risk Factors." **The Lancet.**, v. 366, n. 9499, pp.1784–93, 2005.

DAI, W.; KOHLER, G.; BROMBACHER, F. Both innate and acquired immunity to *Listeria monocytogenes* infection are increased in IL-10-deficient mice. **J. Immunol.**, v.158, pp. 2259–2267, 1997.

DE ARAÚJO R. S. A., GUERRA F. Q. S., LIMA E. D. O., et al. Synthesis, Structure-activity Relationships (SAR) and *in silico* studies of coumarin derivatives with antifungal activity. **International Journal of Molecular Sciences.**, v.14, n.1, pp.1293–1309, 2013.

DEL VECCHIO, M., BAJETTA, E., CANOVA, S., LOTZE, M.T., WESA, A., PARMIANI, G., ANICHINI, A. Interleukin-12: biological properties and clinical application. **Clin Cancer Res.**, v.3, pp.4677–4685, 2007.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial Biotechnology.**, v.4, pp.687–699, 2011.

DENARDO, D.G., BARRETO, J.B., ANDREU, P., VASQUEZ, L., TAWFIK, D., KOLHATKAR, N., COUSSENS, L.M. CD4+ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumour properties of macrophages. **Cancer Cell**; v.16, pp.91 – 102. 2009.

DICK, F.A. Structure-function analysis of the retinoblastoma tumor suppressor protein—Is the whole a sum of its parts? **Cell Div.**, v.2, pp.26, 2007

DOLLERY, C. Therapeutic Drugs. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp.349-354. 1999.

DONNELLY, R. P., FREEMAN, S. L., HAYES, M. P. Inhibition of IL-10 expression by IFN-gamma up-regulates transcription of TNF-alpha in human monocytes. **J. Immunol.**, v.155, pp.1420–1427, 1995.

ELINAV E, NOWARSKI R, THAISS CA, HU B, JIN C, FLAVELL RA. In ammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. **Nat Rev Cancer.** v.13, p.759-71, 2013.

ELLESTAD, G. A. From Natural Products to Bioorganic Chemistry. What's Next? **Journal of Medicinal Chemistry**, v.49, p.6627, 2006.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology.**, v.35, pp.495-516, 2007.

EMAMI, S.; DADASHPOUR, S. Current developments of coumarin-based anti-cancer agents in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.102, p.611-630 2015.

ESCUДИER B, PLUZANSKA A, KORALEWSKI P, RAVAUD A, BRACARDA S, SZCZYLIK C, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. **Lancet.**, v. 370, pp.-2103-2111, 2007.

EVANS, W.C. *Trease and Evans Pharmacognosy*, Elsevier Ltd., 16th edition, 2009.

EVANS, J., DONKELAAR, A. V., MARTIN, R. V., BURNETT, R., RAINHAD, D. G. "Estimates of Global Mortality Attributable to Particulate Air Pollution Using Satellite Imagery." **Environmental Research.**, v.120, pp.33-42, 2013.

EZHEVSKY, S. A.; NAGAHARA, H.; VOCERO-AKBANI, A. M.; GIUS, D. R.; WEI, M. C.; DOWDY, S. F. Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D: Cdk4/6 complexes results in active pRb. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 10699– 10704, 1997.

FACTORI, R.A., LELES, S. M.A, NOVAKOWSKI, G.C.B.C., ROCHA, C. L. S. C.A A. THOMAZ, S. M. Toxicity and genotoxicity of water and sediment from streams on dotted duckweed (*Landoltia punctata*). **Braz. J. Biol.**, v. 74, n. 4, pp. 769-778, 2014.

FANG, S, SALVEN, P. Stem cells in tumor angiogenesis. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**,, v. 50, n.2, pp.290–295, 2011.

FARDINI, Y, DEHENNAUT, V, LEFEBVRE, T, ISSAD. T. O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark? **Frontiers in endocrinology**,v.4, pp.99, 2013.

FASTAIA J., DUMONT, A. Pathogenesis of ascites in mice with peritoneal carcinomatosis. **J Natl Cancer Inst.**, v.56, pp.547-549, 1976.

FATHERS, K.E., BELL, E.S., RAJADURAI, C.V., CORY, S., ZHAO, H., MOURSKAIA, A., ZUO, D., MADORE, J., MONAST, A., MES-MASSON, A.M., GROSSET, A.A., GABOURY, L., HALLET M., SIEGEL, P., PARK, M. Crk adaptor proteins act as key signaling integrators for breast tumorigenesis. **Breast Cancer Res.**, v.14, pp.74, 2012.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, pp. 81-95. 2000.

FEOKTISTOV I, RYZHOV S, GOLDSTEIN A.E. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors. **Circ Res.**, v.92, pp. 485-492, 2003.

FERIGOLO, P. C.; SAGRILLO, M. R. Genotoxicidade relacionada ao consumo de chimarrão. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria. **Disciplinarum Scientia.**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2013.

FERRARA N, GERBER HP, LECOUTER J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med.**, v.9, pp.669–76, 2003.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England Journal of Medicine**, v.285, n.21, pp.1182–1186, 1971.

FRIDMAN, W.H., PAGÈS F, SAUTÈS-FRIDMAN C, GALON J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nat Rev Cancer**, v.12, pp.298-306, 2012.

FIGUERAS, J., TORRAS, J., VALLS, C., LLADO, L., RAMOS E. Marti-Rague J, *et al.* Surgical resection of colorectal liver metastases in patients with expanded indications: a single-center experience with 501 patients. **Dis Colon Rectum**, v.50, n.4, pp.478-88, 2007.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat Med**, v.1, pp.27–31, 1995.

FRAJACOMO. F.T., DE SOUZA PADILHA, C., MARINELLO, P.C., GUARNIER, F.A., CECCHINI, R., DUARTE, J.A., Deminice, R.. Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. v.71, p.83–89, 2015.

FRAJACOMO. F.T., DE SOUZA PADILHA, C., MARINELLO, P.C., GUARNIER, F.A., CECCHINI, R., DUARTE, J.A. Duarte. Solid Ehrlich carcinoma reproduces functional and biological characteristics of cancer cachexia. **Life Sciences**, v.162, pp. 47–53, 2016.

FU, Y.; KADIOGLU, O.; WIENCH, B.; WEI, Z.; GAO, C.; LUO, M.; GU, C.; ZU, Y.; EFFERTH, T. Cell cycle arrest and induction of apoptosis by cajanin stilbene acid from *Cajanus cajan* in breast cancer cells. **Phytomedicine**, v.22, pp. 462–468, 2015.

FUNG, K.Y., MANGAN, NE, CUMMING, H, HORVAT, JC, MAYALL, JR, STIFTER, SA, DE WEERD, N, ROISMAN, LC, ROSSJOHN, J, ROBERTSON, SA, SCHJENKEN, JE, PARKER B, GARGETT, CE, NGUYEN, HP, CARR, DJ, HANSBRO, PM, HERTZOG, PJ. Interferon- ϵ protects the female reproductive tract from viral and bacterial infection. **Science**, v.339, n.1088–1092, 2013.

FYLAKTAKIDOU, K. C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; LITINAS, K.E.; NICOLAIDES, D.N. Natural and Synthetic Coumarin Derivatives with Anti-Inflammatory / Antioxidant Activities *Curr. Pharm. Des.*, v.10, p.3813-3833, 2004.

GAD, S. C. **Animal Models in Toxicology**. 2 ed. Flórida: CRC Press, 2007.

GALDIERO, M. R.; GARLANDA, C.; JAILLON, S. *et al.* Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. **Journal Cellular Physiology**, v. 228, p. 1404–12, 2013.

GARAZD, M. M.; GARAZD, Y. L.; SHILIN, S. V. Modified coumarins. I. Synthesis of 5-phenyl-7H-furo[2,3-g]chromen-7-ones and 9-phenyl-7H-FURO-[2,3-F]CHROMEN-7-ONES. **Chem Nat Compd**. v. 36, n. 5, p. 478-484, 2000.

GARCÍA-CABALLERO, M.; POVEDA, B. M.; MEDINA, M. Á.; QUESADA, A. R. Targeting Tumor Angiogenesis for Cancer Prevention. In: (Ed.). **Molecular Targets and Strategies in Cancer Prevention**: Springer, 2016. p.117-149.

GRANT, D. M. Detoxification pathways in the liver. **J Inherit Metab Dis.**, v. 14, pp. 421-430, 1991.

GERMANAS, J.; PANDAYA, A. G. Alkylating agentes. **Dermatologic Therapy, Copenhagen**, v. 15, pp. 317 – 324, 2002.

GROSS, P.; WEHRLE, R.; BUSSEMAKER, R. Hyponatremia: Pathophysiology, differential diagnosis and new aspects of treatment. **Clinical Nephrology**, v. 46, p. 273-276, 1996.

GUENOVA E., WATANABE R., TEAGUE, J.E.; DESIMONE J.A., JIANG Y., DOWLATSHAHI M., SCHLAPBACH C., SCHAECHTEL, K.; ROOK, A.H. TAWA M., FISHER D.C., KUPPER T.S., CLARK, R.A. TH2 cytokines from malignant cells suppress TH1 responses and enforce a global TH2 bias in leukemic cutaneous T-cell lymphoma. **Clin Cancer Res.**, v.19, n.14, pp.3755–3763, 2013.

GOSHIMA, S.; KANEMATSU, M.; KONDO, H.; YOKOYAMA, R.; KAJITA, K.; TSUGE, Y. WATANABE, H. SHIRATORI, Y. ONOZUKA M.; MORIYAMA, N. Diffusion-weighted imaging of the liver: optimizing b value for the detection and characterization of benign and malignant hepatic lesions, **J Magn Reson Imaging**, v.28, pp.691–697, 2008.

GOPINATHAN, L.; RATNACARAM, C.K.; KALDIS, P. Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development. **Results Probl. Cell Differ**, v.53, pp.365–389, 2011.

GORDON S., MARTINEZ F.O. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. **Immunity**, v.32 n.5, pp.593–604. 2010.

GORGULHO, C. M.; Efeito da concentração citostática de 5-Fluorouracil sobre a imunogenicidade de células de câncer de colorretal murino MC-38. Monografia.

GU, D, CHEN, Z, ZHAO H, DU W, XUE F, GE J, SUI T, WU H, LIU B, LU S, ZHANG L, YANG R. Th1 (CXCL10) and Th2 (CCL2) chemokine expression in patients with immune thrombocytopenia. **Hum Immunol.** v.71, p.586-91, 2010.

GUENOVA E., SKABYTSKA Y., HOETZENECKER W., et al. IL-4 abrogates TH17 cell-mediated inflammation by selective silencing of IL-23 in antigen-presenting cells. **PNAS**; v.112, pp.2163–2168, 2015.

GUERRA, F.Q., DE ARAÚJO R.S., DE SOUSA J.P., PEREIRA F. O., MENDONÇA-JUNIOR F.J., BARBOSA-FILHO J.M., DE OLIVEIRA LIMA E. Evaluation of Antifungal Activity and Mode of Action of New Coumarin Derivative, 7-Hydroxy-6-nitro-2H-1-benzopyran-2-one, against *Aspergillus* spp. **Evid based complement alternat med.**, v.2015, pp.1-8, 2015.

GUICHARD, A., HUMBERT, P., TISSOT, M., MURET, P., COURDEROT-MASUYER, C, VIENNET, C. Effects of topical corticosteroids on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis: *In vitro* comparison on HaCaT. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 2, p.422-429, 2014.

GRUNE, T, SIEMS, W, UHLIG, R, JAKSTADT, M. Adenine Metabolism of Ehrlich Mouse Ascites Cells in Proliferating and Resting Phases of Tumor Growth. **Biochemical Int.**, v.26, n.2, pp.199-209, 1992.

GURRAPU, S., JONNALAGADDA, S.K., ALAM M.A., RONAYNE, C.T., NELSON, G.L., SOLANO, L.N., LUETH, E.A., DREWES, L.R., MEREDDY, V.R.. Coumarin carboxylic acids as monocarboxylate transporter 1 inhibitors: *In vitro* and *in vivo* studies as potential anticancer agents. **Bioorg Med Chem Lett.** v.26, n.14, pp.3282-6, 2016.

HAGHIGHI, F.; MATIN, M.M.; BAHRAMI, A.M.; IRANSHAHI, M.; RASSOULI, F.; HAGHIGHITALAB, A. The cytotoxic activities of 7-isopentenylcoumarin on 5637 cells via induction of apoptosis and cell cycle arrest in G2/M stage. **Daru.**, v.22, n.1, p.3., 2014.

HAGENAARS A, KNAPEN D, MEYER IJ, VAN DER VEN K, HOFF P, DE COEN W. Toxicity evaluation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in the liver of common carp (Cyprinus carpio). **Aquat Toxicol**; v.88, pp.155–63, 2008.

HALAK, B. K., MAGUIRE, H. C.; LATTIME, E. C. Tumor-induced interleukin-10 inhibits type 1 immune responses directed at a tumor antigen as well as a non-tumor antigen present at the tumor site. **Cancer Res.**, v.59, n.4, pp.911–917, 1999.

HAMDI, N.; AL-AYED, A. S.; SAID, R. B.; et al. Synthesis and characterization of new thiazolidinones containing coumarin moieties and their antibacterial and antioxidant activities. **Molecules**. v. 17, pp. 9321-9334, 2012.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, D.J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, **Cell**, v.86, pp.353–364,1996.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v., 100, pp.57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation, **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HARRIS, D J, ATKINSON ,G, BATTERHAM, A, GEORGE K, CABLE N T., and others. “Lifestyle Factors and Colorectal Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Associations with Leisure-Time Physical Activity.” **Colorectal Disease.**, v.11, n.7, pp.689–701, 2009.

HAZLETON, L.W., MURER, H.K., THIESSEN, R. Jr, TUSING TW, ZEITLIN BR. Toxicity of coumarin. **J Pharmacol Exp Ther.** 1956 Nov; 118(3):348-58.

HELLER, N.M., GWINN, W.M., DONNELLY, R.P., CONSTANT, S.L., KEEGAN, A.D. IL-4 engagement of the type I IL-4 receptor complex enhances mouse eosinophil migration to eotaxin-1 in vitro. **PLoS ONE**, v. 7, n.6, pp.39673, 2012.

HENLEY, S.A.; DICK, F.A. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. **Cell Div.**, v.7, n.10, 2012.

HENRY, J. B. Diagnóstico clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. Barueri: Manole, 2008.

HICKOK J. R.; THOMAS, D. D. Nitric Oxide and Cancer Therapy: The Emperor has NO Clothes. **Curr Pharm Des.**; v.16, n.4, pp. 381–391, 2010.

HIROSE, Y., SIMON, J.A., OU, H.C. Hair Cell Toxicity in Anti-cancer Drugs: Evaluating an Anti-cancer Drug Library for Independent and Synergistic Toxic Effects on Hair Cells Using the Zebrafish Lateral Line. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology.**, v.12, pp 719–728. 2011.

HONG, S. J., WU, W. C.; LAI, Y. H.; WU, K. Y. Mechanism of 5-Fluorouracil-Induced Apoptosis on Cultured Corneal Endothelial Cells. **Open Journal of Apoptosis**, v.3, pp.5-15, 2014.

HUANG, Y.Q., LU, X., MIN, H., WU, Q.Q., SHI, X.T., BIAN, K.Q., ZOU, X.P. Green tea and liver cancer risk: A meta-analysis of prospective cohort studies in Asian populations. **Nutrition**, v. 32, pp.3–8, 2016.

HUDES G, CARDUCCI M, TOMCZAK P, DUTCHER J, FIGLIN R, KAPOOR A, ET AL. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. **N ENGL J MED.**, v.356, pp. 2271-81, 2007.

HUI, A.M.; KANAI, Y.; SAKAMOTO, M.; TSUDA, H.; HIROHASHI, S. Reduced p21WAF1/CIP1 expression and p53 mutation in hepatocellular carcinomas. **Hepatology**, v.25, pp.575–579, 1997.

HWANG, E.S. Transcriptional regulation of T helper 17 cell differentiation. **Yonsei Med J**, v.51, n.4, pp.484–491, 2010.

INCE, S., KUCUKKURT, I., DEMIREL, H.H., ACARÖZ, D.A., AKBEL, E., CIGERCI, I.H. Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats. **Chemosphere**. v.108, pp.197–204, 2014.

IRANSHAHI M., ASKARI, M. SAHEBKAR, A. ADJIPAVLOU-LITINA, D. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin, **J. Pharm. Sci.** v.17, pp.99-103, 2009.

IBRAHIM, N. M. The behavior of certain coumarins and furanocoumarins toward sulfur reagents. **SciencOpen**. v. 181, p. 1773-1784, 2006.

ITKONEN HM, MINNER S, GULDVIK IJ, SANDMANN MJ, TSOURLAKIS MC, BERGE V, SVINDLAND A, SCHLOMM T AND MILLS IG. O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. **Cancer Res.**; v.73, pp. 5277-5287, 2013.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

IARC (International Agency for Research on Cancer) . 2010. "Alcohol Consumption and Ethyl Carbamate." Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, IARC, Lyon, France.

JAIN, R.K. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. **Cancer Cell.**; v.26, n.5, pp.605–22, 2014.

JIAN D.; XIAOLI, T. Natural products against cancer: a comprehensive bibliometric study of the research projects, publications, patents and drugs. **Journal of Cancer Research and Therapeutics.**, v.10, n.5, pp.27, 2014.

JOE, A.K.; LIU, H.; SUZUI, M.; VURAL, M.E.; XIAO, D.; WEINSTEIN, I.B. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. **Clin. Cancer Res.**, v.8, pp. 893–903, 2002.

JORGE, S. G. Exames laboratoriais. Hepcentro, 2006. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br/exames.htm>>.

JÚNIOR, V.F.O.; RAJÃO, A.L.; FERNANDES, M.B.S.; OLIVEIRA, E.; SANTOS, M.M.; GUIMARÃES, P.D.F. Influência dos Anestésicos locais na imunomodulação e recorrência do câncer: uma revisão de literatura, **Research**, v. 1, pp. 573, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KANG, C.; MUNAWIR, A.; CHA, M.; SOHN, E. T.; LEE, H.; KIM, J. S.; YOON, W. D.; LIM, D.; KIM, E. Cytotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.150, pp.85-90, 2009.

KAMETANI, S., OIKAWA, T., KOJIMA-YUASA, A., KENNEDY, D.O., NORIKURA, T., HONZAWA, M., MATSUI-YUASA, I. Mechanism of growth inhibitory effect of cape aloe extract in Ehrlich ascites tumor cells. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 53, n. 6, pp. 540–546, 2007.

KAO, J.T.; CHUAH, S.K.; HUANG, C.C.; CHEN, C.L.; WANG, C.C.; HUNG, C.H.; CHEN, C.H.; WANG, J.H.; LU, S.N.; LEE, C.M. p21WAF1 is an independent survival prognostic factor for patients with hepatocellular carcinoma after resection. **Liver Int.**, v.27, pp.772–781, 2007.

KARIMIAN, A., AHMADI, Y., YOUSEFI, B. MULTIPLE functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA Repair.**, v. 42, pp. 63–71, 2016.

KASUMBWE, K., VENUGOPALA, K.N., MOHANLALL, V., ODHAV, B. Synthetic Mono/di-halogenated Coumarin Derivatives and Their Anticancer Properties. **Anticancer Agents Med Chem.**, v. 26, pp.554, 2016.

KEROL, K., YIĞITASLAN, S., ÜNEL, Ç., KAYGISIŞ, B., YILDIRIM, E. Evaluation of Cisplatin Neurotoxicity in Cultured Rat Dorsal Root Ganglia via Cytosolic Calcium Accumulation. **Balkan Med J. Mar.**, v.33, n.2, pp.144–151, 2016.

KIEUHOA, T., KATHERINE, K. MATTHAY, STEVEN, G. D. Targeted antiangiogenic agents in combination with cytotoxic chemotherapy in preclinical and clinical studies in sarcoma. **Clinical Sarcoma Research**, v.6, n.9, 2016.

KIM, E.K.; KWON, K.B.; SHIN, B.C.; SEO, E.A.; LEE, Y.R.; KIM, J.S.; PARK, J.W.; PARK, B.H.; RYU, D.G. Scopoletin induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by activations of nuclear factor kappaB and caspase-3. **Life Sci.**, v.77, pp. 824-836, 2005.

KIM, J.H., KIM J.K., AHN E.K., KO H.J., CHO Y.R., LEE C.H., KIM Y.K., BAE G.U., OH, J.S., SEO, D.W. Marmesin is a novel angiogenesis inhibitor: Regulatory effect and molecular mechanism on endothelial cell fate and angiogenesis. **Cancer Letters**. v.369, pp.323–330, 2015.

KOBAYASHI, M., FITZ, L., RYAN, M., HEWICK, R.M., CLARK, S.C., CHAN, S., LOUDON, R., SHERMAN, F., PERUSSIA, B., TRINCHIERI, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (Nksf), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J Exp Med.**, v.170, pp. 827–845, 1989.

KOSTOVA, I.; BHATIA, S.; GRIGOROV, P.; BALKANSKY, S.; PARMAR, V.S.; PRASAD, A.K.; SASO, L. Curr. Coumarins as Antioxidants. **Med. Chem.**, v.18, p.3929-3951, 2011.

KOTHARI N, ALMHANNA K. Current status of novel agents in advanced gastroesophageal adenocarcinoma. **J Gastrointest Oncol.**, v.6, n. 1, pp. 60-74, 2015.

KRALJEVIĆ, T.G., HAREJ A., SEDIĆ M., PAVELIĆ S.K., STEPANIĆ V., DRENJANČEVIĆ D., TALAPKO J., RAIĆ-MALIĆ S. Synthesis, *in vitro* anticancer and antibacterial activities and in silico studies of new 4-substituted 1,2,3-triazole–coumarin hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.124, pp.794–808, 2016.

KUMAR, V., AHMED D, VERMA A, ANWAR F, ALI M, MUJEEB M. Umbelliferone β -D-galactopyranoside from *Aegle marmelos* (L.) corr. an ethnomedicinal plant with antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidative activity. **BMC Complement Altern Med.**, v.13, pp.273. 2013.

LASEK, W., ZAGOZDZON, R., JAKOBISIAK, M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? **Cancer Immunol Immunother**, v.63, pp.419-435, 2014.

LEBER. M.F, EFFERTH, T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). **Int J Oncol.**, v.34, pp.881–95, 2009.

LECHNER MG, RUSSELL SM, BASS RS, et al. Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. **Immunotherapy**, v.3, pp.1317-1340, 2011.

LEITE, C. A. V G; COSTA, J.V.G.; CALLADO, R.B.; TORRES, J.N.L.; JÚNIOR, R.C.P.L.; RIBEIRO, R.A. Receptor tyrosine kinases: therapeutic implications in cancer. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v.8, n.29, pp.130-142, 2012.

LEWIS, A. M., S.; VARGHESE; 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. **J. Transl. Med.**, v.4, pp.48, 2006.

LI, Y., YANG, X., SU, L.J., FLAIG, T.W. Pazopanib synergizes with docetaxel in the treatment of bladder cancer cells. **Urolog.**, v.79, n.1, pp.233, 2011.

LIANG, H.E., REINHARDT, R.L., BANDO, J.K., SULLIVAN, B.M., HO, I.C., LOCKSLEY, R.M. Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity. **Nat Immunol.**, v.13, n.1, pp.58–66. 2012

LIM, S. S., VOS, T., FLAXMAN, A. D., DANAEI, G., SHIBUYA, K. “A Comparative Risk Assessment of Burden of Disease and Injury Attributable to 67 Risk Factors and Risk Factor Clusters in 21 Regions, 1990–2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.” **The Lancet**, v.380, n.9859, pp.2224–60, 2012.

LIU, W1; LI, SY; HUANG, XE; CUI, JJ; ZHAO, T; ZHANG, H. Inhibition of tumor growth in vitro by a combination of extracts from *Rosa roxburghii* Tratt and *Fagopyrum cymosum*. **Asian Pac J Cancer Prev.**, v.13, pp.2409-2414, 2012.

LIU, M.; CHEN, X.; HUANG, Y.; FENG, P.; GUO, Y.; YANG, G.; CHEN, Y. Hybrids of Phenylsulfonylfuroxan and Coumarin as Potent Antitumor Agents. **J. Med. Chem.**, v.57, n.22, pp. 9343–9356, 2014.

LIU, C.; VICTOR, W.C. CHANG, K.Y.H.; GIN, VIET, T.N. Genotoxicity of perfluorinated chemicals (PFCs) to the green mussel (*Perna viridis*). **Science of the Total Environment**, v.487, p.117–122, 2014.

LIU, H., WANG, Y., SHARMA, A., MAO, R., JIANG, N., DUN, B., SHE, J.X. Derivatives containing both coumarin and benzimidazole potently induce caspase-dependent apoptosis of cancer cells through inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling. **Anticancer Drugs**, v.26, n.6, pp.667-77, 2015,

LIZEE, G., OVERWIJK, W.W., RADVANYI, L., GAO, J., SHARMA, P., HWU, P. Harnessing the power of the immune system to target cancer. **Annu Rev Med**, v.64, pp.71-90, 2013.

LODE, H.N.; DREIER, T.; XIANG, R.; VARKI, N.M.; KANG, A.S., REISFELD, R.A. Gene therapy with a single chain interleukin 12 fusion protein induces T cell-dependent protective immunity in a syngeneic model of murine neuroblastoma. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, pp.2475–2480, 1998.

LOPEZ, J.S.; BANERJI, U. Combine and conquer: challenges for targeted therapy combinations in early phase trials. **Nature Reviews Clinical Oncology**. v.96, pp.1-10, 2016.

LU, X., QIAN, CN., MU, Y.G., et al. Serum CCL2 and serum TNF- α -two new biomarkers predict bone invasion, post-treatment distant metastasis and poor overall survival in nasopharyngeal carcinoma. **Eur J Cancer**, v.47, pp.339-346, 2011.

LUO, K.W; SUN, J.G.; CHAN J.W.; YANG, L.; WU, S.H.; FUNG, K.P.; LIU, F.Y. Anti-cancer effects of imperatorin isolated from *Angelica dahurica*: induction of apoptosis in HepG2 cells through both death-receptor-and mitochondria- mediated pathways, **Chemotherapy**, v.57, 449-459, 2011.

LV, X.G.; JI, M.Y.; DONG, W.G.; LEI, X.F.; LIU, M.; GUO, X.F.; WANG, J.; FANG, C. EBP50 Gene Transfection Promotes 5-Fluorouracil-Induced Apoptosis in Gastric Cancer Cells through Bax- and Bcl-2-Triggered Mitochondrial Pathways. **Molecular Medicine Reports**, v.5, p.1220-1226, 2012.

MACEACHERN SJ, PATEL BA, KEENAN CM, DICAY M, CHAPMAN K, MCCAFFERTY DM, SAVIDGE TC, BECK PL, MACNAUGHTON WK, SHARKEY KA. Inhibiting Inducible Nitric Oxide Synthase in Enteric Glia Restores Electrogenic Ion Transport in Mice With Colitis. **Gastroenterology**, v.149, pp. 445–455, 2015.

MAEDA, H.; Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. **J. Control. Release**, v.164, pp. 138–144, 2012.

MANTOVANI A, ALLAVENA P, SICA A, BALKWILL F. Cancer-related inflammation. **Nature**, v.454, pp. 436–44, 2008.

MANVAR, A.; BAVISHI, A.; RADADIYA, J.; PATEL, V.; VORA, N.; DODIA, K.; RAWAL, A. Diversity oriented design of various hydrazides and their *in vitro* evaluation against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strains Bioorg. **Med. Chem. Lett.**, v.21, p.4728-4731, 2011.

MALKANTHI, E.; PATERSON, E.; BARNES, D. M. An open label pilot study to evaluate the efficacy of Spanish black radish on the induction of phase I and phase II enzymes in healthy male subjects. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. Vol.14, pp.475, 2014.

MALUMBRES, M.; HARLOW, E.; HUNT, T.; HUNTER, T.; LAHTI, J.M.; MANNING, G.; MORGAN, D.O.; TSAI, L.-H.; Wolgemuth, D.J. Cyclin-dependent kinases: A family portrait. **Nat. Cell Biol.**, v.11, pp.1275–1276, 2009.

MARTEL DE C, FERLAY J, FRANCESCHI S, VIGNAT J, BRAY F. “Global Burden of Cancers Attributable to Infections in 2008: A Review and Synthetic Analysis.” **The Lancet Oncology**, v.13, n.6, pp. 607–15, 2012.

MARTIN-ARAGON S, BENEDI JM, VILLAR AM. Effects of the antioxidant (6,7-Dihydroxycoumarin) esculentin on the glutathione system and lipid peroxidation in mice. **Gerontology**, v.44, pp.21–25, 1998.

MARUMOTO, S.; MIYAGAWA, M. Microbial reduction of coumarin, psoralen, and xanthyletin by *Glomerella cingulate*. **Tetrahedron**. v. 67, p. 495-500, 2011.

MARTIN-MORENO J M, SOERJOMATARAM I, MAGNUSSON G. Cancer Causes and Prevention: A Condensed Appraisal in Europe in 2008. **European Journal of Cancer**, v.44, n.10, pp.1390–403, 2008.

MAZUMDAR M, GIRI S, GIRI A. Role of quercetin on mitomycin C induced genotoxicity: Analysis of micronucleus and chromosome aberrations in vivo. **Mutat Res.**, v.721, pp.147–152, 2011.

MATTOS, A. A., DANTAS-CORRÊA, E. B., Tratado de hepatologia. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.

MARTIROSYAN A, PETREK M, KISHORE A, MANUKYAN G. Immunomodulatory effects of therapeutic plasma exchange on monocytes in antiphospholipid syndrome. **Exp Ther Med**. v.12, p.1189–1195, 2016.

MCCORMACK V A, BOFFETTA P. Today's Lifestyles, Tomorrow's Cancers: Trends in Lifestyle Risk Factors for Cancer in Low- and Middle-Income Countries.” **Annals of Oncology**, v.22, n.11, pp. 2349–57, 2011.

MEDEIROS MAZZORANA D, NICOLAU V, MOREIRA J, DE AGUIAR AMARAL P, DE ANDRADE VM. Influence of Mikania laevigata Extract over the Genotoxicity Induced by Alkylating Agents. **ISRN Toxicology**, v. 2013, pp.1-7, 2013.

MELO, J. O. F.; DONNICI, C. L.; AUGUSTI,R.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, C.B.V.; FERREIRA, M.L.G.; CUNHA, A.C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, n.3, p.569-579, 2006.

MIMICA X, ACEVEDO F, ODDO D, IBÁÑEZ C, MEDINA L, KALERGIS A, CAMUS M, SÁNCHEZ C. Evaluación del valor pronóstico de la relación neutrófilos/linfocitos en cáncer de mama de subtipos agresivos. **Rev Med Chile**. v.144: p.691-696, 2016.

MOTZER RJ, HUTSON TE, TOMCZAK P, MICHAELSON MD, BUKOWSKI RM, OUDARD S, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with

interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. **J Clin Oncol.** v.27, pp.3584-90, 2009.

MOTZER RJ, HUTSON TE, CELLA D, REEVES J, HAWKINS R, GUO J, et al. Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. **N Engl J Med.**, v.369, pp.722-31, 2013.

MOLLER A, SIRMA H, HOFMANN TG, RUE ER S, KLIMCZAK E, DROGE W, et al. PML is required for homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2)-mediated p53 phosphorylation and cell cycle arrest but is dispensable for the formation of HIPK domains. **Cancer Res**, v.63, n.15, pp. 4310–4, 2003.

MONNINKHOF E M, ELIAS S G, VLEMS F A, TWEEL I VAN DER, SCHUIT A J.. “Physical Activity and Breast Cancer: A Systematic Review.” **Epidemiology**, v.18, n.1, pp.137–57, 2007.

MUMM JB, EMMERICH J, ZHANG X, CHAN I, WU L, MAUZE S, et al. IL-10 Elicits IFN γ -Dependent Tumor Immune Surveillance. **Cancer Cell**, v.20, pp. 781–96, 2011.

MUNKLEY, J; ELLIOTT, D.J. Hallmarks of glycosylation in cancer. **Oncotarget.**, v.7, pp. 35478-35489, 2016.

MURAI, M. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. **Nat Immunol.**, v.10, pp. 1178–1184, 2009.

NAGORICHNA, I. V.; DUBOVIK, I. P.; GARAZD, M. M.; et al. Substituted 2-(7-oxofuro[3,2-g]chromen-6-yl) acetic acids, modified psoralen analogs, were synthesized by linear fusion of a furan ring to the coumarin system. **Chem Nat Compd.** v. 39, p. 253-261, 2003.

NAKANO, K., ANDO, H., KUROKAWA, S. et al. Association of decreased mRNA expression of multidrug and toxin extrusion protein 1 in peripheral blood cells with the development of flutamide-induced liver injury. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.75, pp.1191, 2015.

NASCIMENTO, F. R. F.; CRUZ, G. V. B.; PEREIRA, P. V. S.; MACIEL, M. C. G.; SILVA, L. A.; AZEVEDO, A. P. S.; BARROQUEIRO, S. B.; GUERRA, R. N. M. Ascitic and Solid Tumor Inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. Treatment. **Life Sciences**, v.78, p. 2650-2653, 2006.

NEELGUNDMATH M, DINESH KR, MOHAN CD, LI F, DAI X, SIVEEN KS, PARICHARAK S, MASON DJ, FUCHS JE, SETHI G, BENDER A, RANGAPPA KS, KOTRESH O. Novel synthetic coumarins that targets NF- κ B in Hepatocellular carcinoma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.25, p.893–897, 2015.

NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**, v75, pp. 311-35, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, v.79, n.3, pp. 629–661, 2016.

NOORDHUIS, P.; HOLWERDA, U.; VAN DER WILT, C. L.; VAN GROENINGEN, C. J.; SMID, K.; MEIJER, S.; PINEDO, H. M.; PETERS, G. J. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annals of Oncology**, v. 15, p. 1025–1032, 2004.

NORRBY K. Mast cells and angiogenesis. **APMIS**, v.110, pp.355-371. 2002

ODEGHE, O.; UWAKWE, A.; MONAGO, C. Antiplasmodial activity of methanolic stem bark extract of *Anthocleista grandiflora* in mice. **IJAST**. v. 2 n.4, p. 142-148, 2012.

OECD. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OECD Guideline for testing of chemicals n. 474, 1997.

OECD. Test No 423: Acute oral toxicity – acute toxic class method, 2001.

OKADA F. In ammation-related carcinogenesis: current ndings in epidemiological trends, causes and mecha- nisms. **Yonago Acta Med**. v.57, 65-72, 2014.

OFT, M. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. **Cancer Immunology Research**, v. 2, n. 3, p. 194-9, 2014.

OKOMODA, V.T.; ATAGUBA, G.A.; AYUBA, V.O. Hematological Response of *Clarias gariepinus* Fingerlings Exposed to Acute Concentrations of Sunsate®, **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v.9, n.2, pp.271–278, 2013.

OLIVEIRA L. P.; PINHEIRO, R. C.; VIEIRA M. S.; PAULA J. R.; BARA M. T.; VALADARES, M. C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., *Punicaceae* **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 201-207, 2010.

OLMEDO, D.; SANCHÓ, R.; BEDOYA, L. M.; et al. 3-Phenylcoumarins as inhibitors of HIV-1 replication. **Molecules**. v. 17, p. 9245-9257, 2012.

OLIVEIRA, T. A importância da alimentação durante o tratamento do câncer. 2010. Disponível em: <<http://www.oncoguia.com.br/site/interna.php?cat=75&id=344&menu=54>>. Acesso em: 30 jun. 2015.

PARHAR RS, ZOU M, AL-MOHANNA FA, BAITEI EY, ASSIRI AM, MEYER BF, SHI Y. IL-12 immunotherapy of BrafV600E-induced papillary thyroid cancer in a mouse model. **Lab Invest** v.96, pp.89-97 2016.

PARHI, P.; MOHANTY, C.; SAHOO, S.K. Nanotechnology-based combinational drug delivery: An emerging approach for cancer therapy. **Drug Discov. Today**, v.17, pp.1044–1052, 2012.

PAUL W.E., ZHU J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? **Nat Rev Immunol**, v.10, n.4, pp.225–235, 2010.

PENG, X.M.; DAMU, G.L.; ZHOU, C. Current Developments of Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry Curr. **Pharm. Des.**, v.19, p.3884-3930, 2013.

PEREIRA EC, LUCETTI DL, BARBOSA-FILHO JM, DE BRITO EM, MONTEIRO VS, PATROCÍNIO MC, DE MOURA RR, LEAL LK, MACEDO DS, DE SOUSA FC, DE BARROS VIANA GS, VASCONCELOS SM. Coumarin effects on amino acid levels in mice prefrontal cortex and hippocampus. **Neurosci. Lett.**, v.454, pp. 139–142, 2009.

PEREZ-ATAYDE AR, SALLAN SE, TEDROW U, CONNORS S, ALLRED E, FOLKMAN J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. **Am J Pathol.**, v.150, pp. 815–21, 1997.

PÉREZA, B. E; SOUTOB, T. Ethnobotanical Knowledge of Sarrapia (*Dipteryx odorata* [AUBL.] WILLD.) Among Three Non-Indigenous Communities of the Lower Caura River Basin, Venezuela. **Journal of Ethnobiology**, v.31, n.1, pp.128-149, 2011.

PLUCHINO, K.M.; HALL, M.D.; GOLDSBOROUGH, A.S.; CALLAGHAN, R.; GOTTESMAN, M.M. Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance. **Drug Resist. Update**, v.15, pp.98–105, 2012.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. **Checkpoint Controls and Cancer: Volume 2: Activation and Regulation Protocols**, p. 301-311, 2004.

PRIETO, P.; BAIRD, A. W.; BLAAUBOER. B. J.; CASTELL RIPOLL, J. V.; CORVI, R.; DEKANT, W.; DIETL, P.; GENNARI, A.; GRIBALDO, L.; GRIFFIN, J. L.; HARTUNG, T.; HEINDEL, J. J.; HOET, P.; JENNINGS, P.; MAROCCHIO, L.; NORABERG, J.; PAZOS, P.; WESTMORELAND, C.; WOLF, A.; WRIGHT, J.; PFALLER, W. The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. **Alternatives to laboratory animals**. v. 34, n. 3, p.315-41, 2006.

PUCCI F, VENNERI MA, BIZIATO D, *et al*. A distinguishing gene signature shared by tumour-infiltrating Tie2-expressing monocytes, blood ‘resident’ monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships. **Blood**, v.114, pp.901–914, 2009.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**. v.43, n.2, p.86-101, 1998.

PRADOS, J.; MELGUIZO, C.; ORTIZ, R.; VÉLEZ, C.; ALVAREZ, P. J.; ARIAS, J. L.; RUÍZ, M. A.; GALLARDO, V.; ARANEGA, A. Doxorubicin-Loaded

Nanoparticles: New Advances in Breast Cancer Therapy, **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1058-1070, 2012.

QIAN B, DENG Y, IM JH, MUSCHEL RJ, ZOU Y, LI J, LANG RA, POLLARD JW.. A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. **PLoS ONE**, v.4, pp.6562, 2009.

QIAN, B. Z. & POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell** v.141, pp.39–51, 2010.

QIN, L.F.; NG, I.O. Expression of p27KIP1 and p21WAF1/CIP1 in primary hepatocellular carcinoma: Clinicopathologic correlation and survival analysis. **Hum. Pathol.**, v.32, n.778–784, 2001.

RAASCHOU-NIELSEN O, ANDERSEN Z J, BEELEN R, SAMOLI E, STAFOGGIA M. AND OTHERS. Air Pollution and Lung Cancer Incidence in 17 European Cohorts: Prospective Analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). **The Lancet Oncology**, v.14, n.9, pp.813–22, 2013.

RAMU R, S SHIRAHATTI P, S NS, ZAMEER F, LAKKAPPA DHANANJAYA B, M N N. Assessment of In Vivo Antidiabetic Properties of Umbelliferone and Lupeol Constituents of Banana (*Musa* sp. var. Nanjangud Rasa Bale) Flower in Hyperglycaemic Rodent Model. **PLoS One**, v.11, n.3, pp.135 -151, 2016.

REEVES G K, PIRIE K, GREEN J, BULL D, BERAL V. “Comparison of the Effects of Genetic and Environmental Risk Factors on In Situ and Invasive Ductal Breast Cancer.” **International Journal of Cancer**, v.131, n.4, pp.930–37, 2012.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FOSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA**, v. 21, p. 89-96, 1993.

RHODES D.R., YU J., SHANKER K., DESHPANDE N., VARAMBALLY R., GHOSH D., BARRETTE T., PANDEY A., CHINNAIYAN A.M. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data- mining platform. **Neoplasia**, v.6, pp.1–6, 2004.

RIBEIRO, R.A., WANDERLEY, C.W., WONG, D.V., MOTA, J.M., LEITE, C.A., SOUZA, M.H., CUNHA, F.Q., LIMA-JÚNIOR, R.C. Irinotecan and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 2, pp.1-13, 2016.

RIBATTI, D; CRIVELLATO, E. Mast cells, angiogenesis, and tumor growth, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1822, pp.2-8, 2010.

ROCA, H; MATTHEW J. C., CHI Y., ZACHARY S. V., PAUL C., AJJAI S. ALVA, J. HERNANDEZ, DAVID F., STEPHANIE D, PATRICK N. J. IL-4 induces proliferation in prostate cancer PC3 cells under nutrient-depletion stress through the activation of the JNK-pathway and survivin upregulation. **J Cell Biochem**. v.5 pp.1569–1580, 2012.

RODRIGUES, R.O; MOREIRA, L.M.A; SILVA, E.R.J.; TRINDADE, J.P.T; ROCHA, L.M.; SANTO, L.D.E. MOREIRA, S. C. Ensaio do micronúcleo como indicador de genotoxicidade em indivíduos com albinismo e histórico prévio de câncer de pele. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.12, pp. 194-197, 2013.

ROOS, W.P.; BATISTA, L.F.; NAUMANN, S.C.; WICK, W.; WELLER, M.; MENCK, C.F.; KAINA, B. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O(6)-methylguanine. **Oncogene**, p. 186–197, 2007.

ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. **Cancer Letters**, v. 332, p. 237–248, 2013.

ROQUE, V. M. N.; FORONES, N. M. Avaliação da qualidade de vida e toxicidades em pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia adjuvante baseada em fluoropirimidinas. **Arq. Gastroenterol.** v. 43, n.2, pp. 94-101, 2006.

ROSSELLI S., MAGGIO A.M., FARAONE N., SPADARO V., MORRIS-NATSCHKE S.L., BASTOW K.F., LEE K.H., BRUNO M. The cytotoxic properties of natural coumarins isolated from roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae) and of synthetic ester derivatives of aegelinol. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 12, pp. 1701–1706, 2009.

RUSSO, M. W.; JACOBSON, I. M. How to use statins in patients with chronic liver disease. **Cleve Clin J Med**. v. 71, pp. 58-62, 2002.

SAFARZADEH, E.; SANDOGHCHIAN, S. S.; BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment, **Adv Pharm Bull**, v. 4, p. 421-427, 2014.

SAHEBKAR, A. Citrus auraptene: A potential multifunctional therapeutic agent for nonalcoholic fatty liver disease. **Ann Hepatol**. v. 10, p. 575-577, 2011.

SALLUSTO F, LANGENKAMP A, GEGINAT J, LANZAVECCHIA A. Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v.251, pp.167-71, 2000.

SANTOS O.J., SAUAIA FILHO E.N., NASCIMENTO F.R., JÚNIOR F.C., FIALHO E.M., SANTOS R.H., SANTOS R.A., SERRA I.C. Use of raw *Euphorbia tirucalli* extract for inhibition of ascitic Ehrlich tumor. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**. vol.43. pp 19-21, 2016.

SAJI, H., KOIKE, M., YAMORI, T., SAJI, S., SEIKI, M., MATSUSHIMA, K., TOI, M. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. **Cancer**, v.92, pp.1085–1091, 2001.

SASHIDHARA, K. V.; KUMAR, A.; CHATTERJEE, M.; RAO, K.B.; SINGH, S.; VERMA, A.K.; PALIT, G. Discovery and synthesis of novel 3-phenylcoumarin

derivatives as antidepressant agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v.21, p.1937-1941, 2011.

SCHMID, M.C., AVRAAMIDES, C.J., FOUBERT, P., SHAKED, Y., KANG, S.W., KERBEL, R.S., VARNER, J.A. Combined blockade of integrin- α 4 β 1 plus cytokines SDF-1 α or IL-1 β potently inhibits tumor inflammation and growth. *Cancer Res.* v.71, pp.6965–6975, 2011.

SCHRODER, K., HERTZOG, P.J., RAVASI, T., HUME, D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* v.75, n.2, pp.163–189, 2004.

SCICINSKI J, ORONSKY B, NING S, KNOX S, PEEHL D, KIM MM, LANGECKER P, FANGER G. NO to cancer: The complex and multifaceted role of nitric oxide and the epigenetic nitric oxide donor, RRx-001. *Redox Biol.* v.6, pp.1–8. 2015.

SEGURA, J.A., BARBERO, L.G., MAREQUEZ, J. Ehrlich ascites tumor unbalances splenic cell populations and reduced responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immunol Lett.*, v.74, pp.111–115, 2000.

SERBAN F, ARTENE SA, GEORGESCU AM, PURCARU SO, TACHE DE, ALEXANDRU O, DRICU A. SERBAN, FLORENTINA; STEFAN-ALEXANDRU ARTENE, ADA MARIA GEORGESCU, STEFANA OANA PURCARU, DANIELA ELISE TACHE, OANA ALEXANDRU, AND ANICA DRICU. Epidermal growth factor, latrophilin, and seven transmembrane domain-containing protein 1 marker, a novel angiogenesis marker. *Onco Targets Ther.* v.8, pp.3767–3774, 2015.

SHEN H, YU X, YANG F, ZHANG Z, SHEN J, SUN J, CHOKSI S, JITKAEW S, SHU Y. Reprogramming of Normal Fibroblasts into Cancer-Associated Fibroblasts by miRNAs-Mediated CCL2/VEGFA Signaling. *PLoS Genet.* v.12, n.8, pp.44-62, 2016.

SHI, Y, PARHAR R.S., ZOU M., et al. Gene therapy of anaplastic thyroid carcinoma with a single-chain interleukin-12 fusion protein. *Hum Gene Ther*, v.14, pp.1741–1751, 2003.

SHIN, E. CHOI, K.M. YOO, H.S. LEE, C.K.; HWANG, B.Y LEE, M.K. Inhibitory effects of coumarins from the stem barks of *Fraxinus rhynchophylla* on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells, *Biol. Pharm. Bull.*, v.33, pp.1610-1614, 2010.

SIEMS, W.G., GRUNE, T., SCHMIDT, H., TIKHONOV, Y.V.; PIMENOV, M.A. Purine Nucleotide Levels in Host Tissues of Ehrlich Ascites Tumor Bearing Mice in different growth phases of the Tumor. *Cancer Res.*, v.53, pp.5143-5147, 1993.

SILVA, A. E.; SANTOS, F. G. A.; CASSALI, G. D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 4, p. 658-661, 2006.

SILVA, J. C.; LIMA-SARAIVA, S.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R.; ALMEIDA, J. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 94, p. 18-23, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; et al. Farmacognosia – Da planta ao medicamento, 5ª Ed. Santa Catarina: Editora da UFSC; e Rio Grande do Sul: Editora da UFRGS, 2004.

SINGH S, DABUR R, GATNE MM, SINGH B, GUPTA S. *In vivo* Efficacy of a Synthetic Coumarin Derivative in a Murine Model of Aspergillosis. **PLoS ONE**, v.9, n.8, pp.103-109, 2014.

SIU W.H.L., CAO J., JACK R.W., WU R.S.S., RICHARDSON B.J., XU L., et al. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B a P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). **Aquat Toxicol.** v.66, pp.381–92, 2004.

SKOG S, HE Q, TRIBUKAIT B. Lack of Correlation Between Thymidine Kinase Activity and Changes of DNA Synthesis With Tumour Age: An In Vivo Study in Ehrlich Ascites Tumour. **Cell Tissue Kinetics**, v.23, pp.603-617, 1990.

SOLIMAN, A.M., FAHMY, S.R., EL-ABIED, S.A. Anti-neoplastic activities of sepia officinalis ink and coelatura aegyptiaca extracts against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Int J Clin Exp Pathol.** v.8, p.3543–3555, 2015.

SONG, Z., VARANI, J., GOLDSTEIN, I.J. Differences in Cell Surface Carbohydrates and in Laminin and Fibronectin Synthesis Between Adherent and Non-adherent Ehrlich Ascites Tumor Cells. **Int. J. Cancer**, v.55, pp.1029-1035, 1993.

SPINO, C.; DODIER, M.; SOTHEESWARAN, S. “Anti-HIV coumarins from calophyllum seed oil,” **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 24, pp.3475–3478, 1998.

STANCA, C. M.; BABAR, J.; SINGAL, V.; OZDENEROL, E.; ODIN, J. A. Pathogenic role of environmental toxins in immune-mediated liver diseases. **J Immunotoxicol.**, v. 5, pp. 59-68, 2008.

STEGER, F.; HAUTMANN, M. G. KOLBL, O. 5-FU-induced cardiac toxicity - an underestimated problem in radiooncology? **Radiation Oncology.**, v. 7, pp. 212, 2012.

STEIN, M., KESHAV, S., HARRIS, N., GORDON, S. Interleukin4potentllyenhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **J Exp Med**, v.176, pp.287–292, 1992.

STERN, A.S., PODLASKI, F.J., HULMES, J.D., et al. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. **Proc Natl Acad Sci USA**; v.87, pp.6808–6812, 1990.

STERNBERG, C.N., DAVIS, I.D., MARDIAK, J., SZCZYLIK, C., LEE, E., WAGSTAFF, J. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. **J Clin Oncol.**, v.28, pp.1061-8, 2010.

STEWART, B.S., WILD, C.P. World Cancer Report 2014. WHO.

STRASSER, A.; CORY, S.; ADAMS, J.M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **EMBO Journal**, v. 30, n. 18, p. 3667-83, 2011.

SUZUKI T, GRÚZ P, HONMA M, ADACHI N, NOHMI T. The role of DNA polymerase in translesion synthesis across bulky DNA adducts and cross-links in human cells. **Mutat Res.**, v.791, pp.35–41, 2016.

SWINNEY, D.C., ANTHONY, J. How were new medicines discovered? **Nat Rev Drug Discov.**, v.10, pp.507-19, 2011.

SZCZEPANIK AM, SIEDLAR M, SZURA M, KIBIL W, BRZUSZKIEWICZ K, BRANDT P, KULIG J. Preoperative serum chemokine (C-C motif) ligand 2 levels and prognosis in colorectal cancer. **Pol Arch Med Wewn.** v.125, n.6, pp.443-45, 2015.

SZEKANECZ Z, VEGVARI A, SZABO Z, et al. Chemokines and chemokine receptors in arthritis. **Front Biosci Schol Ed**, v.2, pp.153-167, 2010.

TALMADGE, J.E., FIDLER, I.J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer Res.**, v.70, pp. 5649–5669. 2010.

TANAKA S, TATSUGUCHI A, FUTAGAMI S, GUDIS K, WADA K, SEO T, MITSUI K, YONEZAWA M, NAGATA K, FUJIMORI S, TSUKUI T, KISHIDA T, SAKAMOTO C. Monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage cyclooxygenase 2 expression in colonic adenoma. *Gut*, v.55: pp.54-61, 2006.

TANNOCK, I.F. A Comparison of Cell Proliferation parameters in Solid and Ascites Ehrlich Tumors. **Cancer Res.** v.29, pp.1527-1534, 1969.

THAKUR, A; SINGLA, R.; JAITAK, V. Coumarins as anticancer agents: a review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies, **Eur. J. Med. Chem.**, v.101, pp.476-495, 2015.

TOOMER, K. H.; CHEN, Z. Autoimmunity as a double agent in tumor killing and cancer promotion. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 18, p. 1-14, 2014.

TRACEY, D. KLARESKOG, L. SASSO, E. HSALFELD, . J. G. TAK, P. P. **Pharmacol. Ther.**, v.117, pp.244. 2008.

TREPAT, X., CHEN, Z., JACOBSON, K. Cell Migration. **Compr Physiol.**, v.2, pp.2369–2392, 2012.

TSUI P, DAS A, WHITAKER B, TORNETTA M, STOWELL N, KESAVAN P, KAISER E, LACY ER, YAN L, SNYDER LA, SWEET R. Generation,

characterization and biological activity of CCL2 (MCP-1/ JE) and CCL12 (MCP-5) specific antibodies. **Hum. Antibodies**, v.16, pp.117–125, 2007.

UENO, T, TOI M, SAJI H, MUTA M, BANDO H, KUROI K, KOIKE M, INADERA H, MATSUSHIMA K. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.6, pp.3282–3289, 2000.

URREGO, D.; TOMCZAK, A.P.; ZAHED, F.; STUHMER, W.; PARDO, L.A. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* v. 2014, pp.369, 2014.

URRUTICOECHEA, A.; R. ALEMANY, J. BALART, A. VILLANUEVA, F. VIÑALS AND G. CAPELLÁ. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. **Current Pharmaceutical Design**, v.16, pp.3-10, 2010.

VALASTYAN S, WEINBERG RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell.**; v.147, pp.275–92, 2011.

VALKOVIC, T. LUCIN, K., KRSTULJA, M., DOBI-BABIC, R.; JONJIC, N. Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human invasive ductal breast cancer. **Pathol. Res. Pract**, v.194, pp.335–340, 1998.

VALLO S, MICHAELIS M, ROTHWEILER F, BARTSCH G, GUST KM, LIMBART DM, RÖDEL F, WEZEL F, HAFERKAMP A, CINATL J JR. Drug-Resistant Urothelial Cancer Cell Lines Display Diverse Sensitivity Profiles to Potential Second-Line Therapeutics., **Transl Oncol.** v.8, p. 210-216, 2015.

VANINI, F.; KASHFI, K.; NATHB, N.; The dual role of iNOS in cancer. **Redox Biol.** v.6, pp.334–343, 2015.

VASKO L, VASKOVA J, FEJERCAKOVA A, MOJZISOVA G AND PORACOVA J. Comparison of some antioxidant properties of plant extracts from *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Eleutherococcus senticosus* and *Stevia rebaudiana*. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.**, v.50, pp. 614-622, 2014.

VASSALLOA, J. D.; KAETZELB, R. S.; BORNA, S. L., LEWISA, C. L.; LEHMAN-MCKEEMANA, L. D.; REEDC, D. J. γ -Glutamyl transpeptidase null mice fail to develop tolerance to coumarin-induced Clara cell toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, pp.1612–1618, 2010.

VASUDEV, N.S; REYNOLDS, A.R.: Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. **Angiogenesis**, v.17, pp.471-494, 2014.

VENDRAMINI-COSTA DB, DE CASTRO IB, RUIZ AL, MARQUISSOLO C, PILLI RA, DE CARVALHO JE. Effect of goniiothalamine on the development of Ehrlich solid tumor in mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, P. 6742–6747, 2010.

VENUGOPALA K.N., RASHMI V., ODHAV B. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. **BioMed Research International**. vol. 24. pp. 14-28, 2013.

VERSTRAELEN S, PEERS B, MAHO W, HOLLANDERS K, REMY S, BERCKMANS P, COVACI A, WITTERS H. Phenotypic and biomarker evaluation of zebrafish larvae as an alternative model to predict mammalian hepatotoxicity. **J Appl Toxicol**, v. 36, pp.1194-1206, 2016.

VIEIRA, J. MATSUZAKI, P.. NAGAMINE M. K. "Inhibition of ascitic Ehrlich tumor cell growth by intraperitoneal injection of Pfa a paniculata (Brazilian ginseng) butanolic residue," **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, pp. 609–613, 2010.

VILLELA I.V., DE OLIVEIRA I.M., DA SILVA J., HENRIQUES J.A. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, v.605 pp.78–86, 2006.

VINCENT P.C., NICHOLLS A. Comparision of the growth of the Ehrlich ascites tumor in male and female mice. **Cancer Research**, v.27, pp.1058-1065, 1967

VISCONTI R, DELLA MONICA R, GRIECO D. **Cell cycle** checkpoint in **cancer**: a therapeutically targetable double-edged sword. **J Exp Clin Cancer Res.**, v.35, n.1, pp.153, 2016.

VORONOV, E., D. S. SHOUVAL, Y. KRELIN, E. CAGNANO, D. BENHARROCH, Y. IWAKURA, C. A. DINARELLO, R. N. APTE.. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.100, pp.2645–2650, 2003.

WANG L, GAGEY-EILSTEIN N, BROUSSY S, REILLE-SEROUSSI M, HUGUENOT F, VIDAL M, LIU WQ. Design and Synthesis of C-Terminal Modified Cyclic Peptides as VEGFR1 Antagonists. **Molecules**, v.19, pp.15391-15407, 2014b.

WANG, SF, YIN Y, WU X, QIAO F, SHA S, LV PC1, ZHAO J, ZHU HL.Synthesis, molecular docking and biological evaluation of coumarin derivatives containing piperazine skeleton as potential antibacterial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.22, p.5727–5737. 2014.a.

WANG, Y.H., LIU YH, HE GR, LV Y, DU GH. Esculin improves dyslipidemia, inflammation and renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, pp.1.8, 2015.

WANG S., GAO X., SHEN G.. Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity. **Nature**, v.6, pp.101-117, 2016.

WASHABAU, R. J.; CHANDLERS, M.L., STEINER, J.M., SYRING, R.J., TWEDT, D.C., WAHSABAU, R.J., WILLARD, M.D. CHAPTER 61—Liver

WCRF (World Cancer Research Fund) and AICR (American Institute for Cancer Research) . 2007. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: WCRF and AICR.

WELLS, L., SLAWSON, C., HART, G.W. The E2F-1 associated retinoblastoma-susceptibility gene product is modified by O-GlcNAc. **Amino Acids.**, v.40, pp.877-883, 2011.

WON, H.O. LEE, SEONG HUN CHOI, SU JIN KANG, CHANG HYUN SONG, SOO JIN PARK, YOUNG JOON LEE and SAE KWANG KU. Genotoxicity testing of *Persicariae Rhizoma* (*Persicaria tinctoria* H. Gross) aqueous extracts. **Exp Ther Med** v. 12, p. 123–134, 2016.

World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death (Fact sheet N°310). 2014; 1–5. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.

WU, D. C., LIU, J. M., CHEN, Y. M., YANG, S., LIU, S. M., CHEN, L. T., WHANG-PENG, J. Mitomycin-C induced hemolytic uremic syndrome: a case report and literature review. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 27, n. 2, pp. 115-118, 1997.

WU, T.T.; ZHOU, S.H. Nanoparticle-based targeted therapeutics in head-and-neck cancer. **International journal of medical sciences**, v. 12, n. 2, p. 187, 2015.

WYNN, T.A., CHAWLA, A., POLLARD, J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v.496 n.7446, pp.445–455, 2013.

XAVIER, B., CALDEZ, M. J., KALDIS, P. The Complex Relationship between Liver Cancer and the Cell Cycle: A Story of Multiple Regulations. **Cancers.**, v. 6, pp.79-111, 2014.

XIANG, L.P., WANG A., YE J.H., ZHENG X.Q., POLITO C.A., LU J.L., LI Q.S., LIANG Y.R. Suppressive Effects of Tea Catechins on Breast Cancer., **Nutrients**. v.8, p 1-15, 2016.

XIU, L.; DA-ZHI. S.; JIAN-PENG, J.; BING. Y.; ZHI-FENG. Q.; XUAN., L.; PIN-KANG. W.; XIAO-QIANG, Y. Anticancer effects of traditional Chinese herbs with phlegm-eliminating properties – An overview. **Q1 Journal of Ethnopharmacology**, 2015.

XU, G, SHI, C, GUO, D, WANG, L, LING, Y, HAN, X, LUO J. Functional-segregated coumarin-containing telodendrimer nanocarriers for efficient delivery of SN-38 for colon cancer treatment. **Acta Biomater.**, v.21, pp.85–98. 2015.

YAGHMAEI, S, GHALAYANI, P, SALAMI, S, NOURMOHAMMADIAN, F, KOHESTANIMOBARHAN S, IMENI, V. Hybrid Benzoxazole-Coumarin Compounds Induce Death Receptor-Mediated Switchable Apoptotic and Necroptotic Cell Death on HN-5 Head and Neck Cancer Cell Line, **Anticancer Agents Med Chem**, v.16. pp. 25, 2016.

YANG W.H., KIM J.E., NAM H.W., JU J.W., KIM H.S., KIM Y.S.; CHO J.W. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. **Nat Cell Biol.** v.8, pp.1074-1083, 2006.

YANG L., MOGHADDAS S., DEZVAREH H., BELKACEMI L., BARK S.J., BOSE R.N., DO L.H. Insights into the anti-angiogenic properties of phosphaplatins., **J Inorg Biochem.** v. 12, pp. 1-12, 2016.

YAO, G.; LEE, T.J.; MORI, S.; NEVINS, J.R.; YOU, L. A bistable Rb–E2F switch underlies the restriction point. **Nat. Cell Biol.**, v.10, pp. 476–482. 2008.

YE, X.; FRANCO, A. A.; SANTOS, H.; NELSON, D. M.; KAUFMAN, P. D.; ADAMS, P. D. Defective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest. **Mol. Cell**, v. 11, n. 51, 2003.

YOUNG, H.A., BREM, J.H. IFN-gamma: recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.316, pp.97–117, 2007.

YU, S.M., HU DH, ZHANG J.J. Umbelliferone exhibits anticancer activity via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. **Molecular medicine reports**, v.12, pp. 3869-3873, 2015.

ZBIDAH M., LUPESCU A, HERRMANN T, YANG W, FOLLER M, JILANI K, LANG F. Effect of honokiol on erythrocytes. **Toxicol In Vitro.**, v.27, n.6, pp.1737-45, 2013.
ZHANG, H., HAN, T; YU, C.H., JIANG, Y.P., PENG, C., RAN, X., QIN, L.P. Analysis of the chemical composition, acute toxicity and skin sensitivity of essential oil from rhizomes of *Ligusticum chuanxiong*. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.144, p.791–796, 2012.

ZHOU, Z.; FALCONE DJ, SUBBARAMAIAH K, DANNENBERG A.J. Macrophages induce COX-2 expression in breast cancer cells: role of IL-1 β autoamplification. **Carcinogenesis.** v.32, n.5, pp.695–702. 2011

ZHU, J, YAMANE, H., PAUL, W.E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annu Rev Immunol** 28:445–489, 2010.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A – Certidão do comitê de Ética em Uso Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO



João Pessoa, 11 de junho de 2014

CEUA Nº 3405/14

Ilmo(a). **Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral**
Departamento **Ciências Farmacêuticas - CC - UFPB**

Orientando(a): **Ryldene Marques Duarte da Cruz, (Iniciação Científica)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **10/06/2014** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AValiação da Toxicidade do Derivado Semi-Sintético CUMARÍNICO 2H-1-BENZOPIRAN-2-ONA, 7- PRENILOXI.**

Com previsão de empregar **109 Camundongos SWISS Fêmeas, 40 Camundongos SWISS Machos - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **30/05/2014 a 30/09/2014**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBIOTEC/UFPB

ANEXO B – Certidão do comitê de Ética em Uso Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



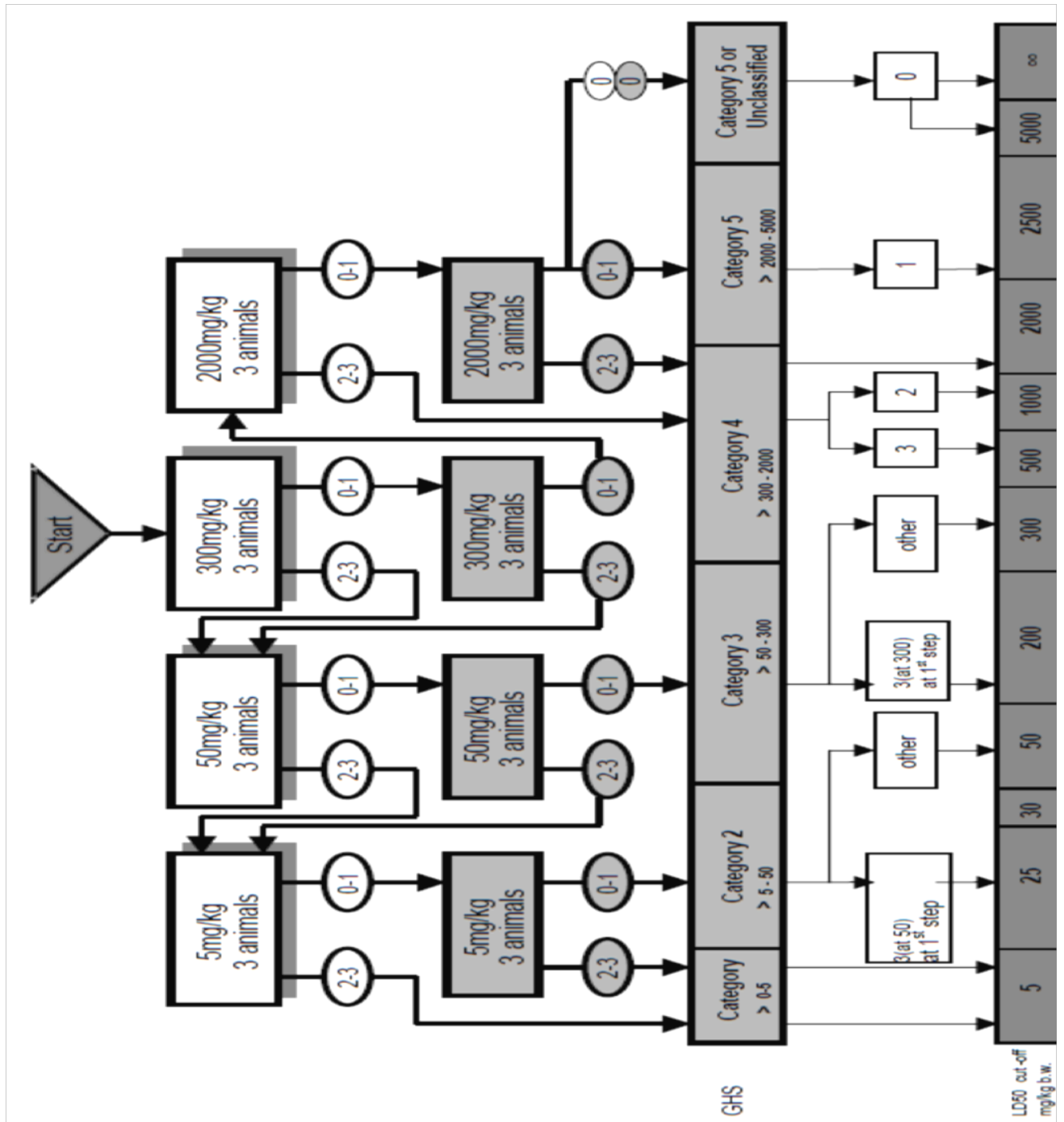
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação da atividade antitumoral do derivado semi-sintético cumarínico 2H-1-benzopirran-2-ona, 7-preniloxi”, protocolo nº 141/2015 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Marianna Vieira Sobral – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2015 a 2016
Espécie/linhagem	Camundongos Swiss (<i>Mus musculus</i>)
Número de animais	60 animais
Idade/peso	60 dias (25 a 30 g)
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Prof. Thomas George

Prof. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB

ANEXO C – Fluxograma de realização do teste de toxicidade aguda com uma dose inicial de 300 mg/kg.



FONTE: OECD, 423, 2001.

ANEXO D – Ficha de triagem farmacológica comportamental

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	0 min	15 min	30 min	60 min	4 h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Iritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarreia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Observações complementares: _____

FONTE: ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem farmacológica comportamental. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 11, p. 131-137

