

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

SAYONARA MARIA CALADO GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTITUMORAL DE NOVOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DA
BETULINA E DO ÁCIDO BETULÍNICO**

Recife

2016

SAYONARA MARIA CALADO GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTITUMORAL DE NOVOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DA
BETULINA E DO ÁCIDO BETULÍNICO**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da
Universidade Federal de Pernambuco, para a
obtenção do Título de Mestre em Inovação
Terapêutica**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Baggio Gnoato

Co-orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Recife

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Prof^a. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Carvalho

DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Prof^a. Dr^a. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Prof^a. Dr^a. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta

**VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof^a. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Gonçalves, Sayonara Maria Calado

Avaliação da atividade anti-inflamatória e antitumoral de derivados semissintéticos da betulina e do ácido betulínico / Sayonara Maria Calado. – Recife: O Autor, 2016.

69 f.: il.

Orientadores: Maira Galdino da Rocha Pitta, Simone Baggio Gnoato, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa em Inovação Terapêutica, 2016.

Inclui referências e apêndices

1. Câncer 2. Plantas medicinais I. Pitta, Maira Galdino da Rocha (orient.) II. Gnoato, Simone Baggio (coorient.) III. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-212

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: GONÇALVES, Sayonara

Título: Avaliação da Atividade Anti-inflamatória e Antitumoral de Novos Derivados Semissintéticos da Betulina e do Ácido Betulínico

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 15/08/2016

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria Danielly Lima de Oliveira

Instituição: UFPE

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Mariana Aragão Matos Donato

Instituição: FACIPE

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra

Instituição: UFPE

Assinatura: _____

RESUMO

GONÇALVES, S. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória e Antitumoral de Novos Derivados Semissintéticos da Betulina e do Ácido Betulínico. 2016. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Os produtos naturais estão sendo cada vez mais estudados por causa da sua abundância na natureza, gama de atividades e baixo custo. A betulina (BE) e o ácido betulínico (AB) são obtidos através de fontes naturais e entre suas atividades biológicas estão atividade anti-inflamatória e antitumoral. O câncer é uma doença de grande impacto social que mata milhões de pessoas todos os anos. Hoje, está bem estabelecido a íntima relação entre inflamação/tumorigênese. Sendo assim, 5 novos derivados da BE e 6 derivados do AB foram semissintetizados utilizando substituintes ésteres e halogênios como cloro e flúor. Dos 5 novos derivados da BE, 2 foram capazes de reduzir significativamente os níveis de $\text{INF-}\gamma$ e da COX-2. Em seguida, avaliamos a citotoxicidade celular dos novos derivados da BE (LAFIS 2a, 2b, 2c, 2d e 2e) e do AB (LAFIS 1a, 1b, 1c, 1d, 1e e 1f) frente a 4 linhagens de células tumorais e em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Os derivados da BE não apresentaram ação antineoplásica promissora ($\text{IC}_{50} > 70\mu\text{M}$), entretanto não foram citotóxicos para as PBMCs ($\text{IC}_{50} > 100\mu\text{M}$). Já os derivados do AB se mostraram citotóxicos para as PBMCs e não foram seletivos para as células tumorais.

Palavras-chave: Triterpenos. Citocinas. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Cancer is a disease of great social impact that kills millions of people every year. Today, it is well established the close relationship between inflammation/tumorigenesis. Natural products are increasingly being studied because of its abundance in nature, range of activities and low cost. The betulinic acid (BA) and betulin (BE) are obtained from natural sources and from their biological activities are antiinflammatory and antitumor activity. Therefore five new derivatives of BE and six derivatives of BA performed substitutions at C3 and C28 esters using groups and halogens such as chlorine and fluorine. The five new derivatives of BE, two inhibited significantly INF- γ and COX-2. Next, we evaluated in cell cytotoxicity of five new derivatives of betulin (LAFIS 2a, 2b, 2c, 2d and 2e) and AB (LAFIS 1a, 1b, 1c, 1d, 1e and 1f) derivatives, against the four tumor cell lines and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). BE derivatives showed no promising antiproliferative activity ($IC_{50} > 70\mu M$), but were not toxic to PBMCs ($IC_{50} > 100\mu M$). However, AB derivatives proved toxic to PBMC and not selective for tumor cell lines.

Keywords: triterpenes. Cytokines. cytotoxicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Betulina e seus derivados	18
2.2 Ácido betulínico e seus derivados	21
2.3 Inflamação e câncer	26
2.4 Câncer: Uma visão geral	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 Caracterização do Estudo	34
4.2 Derivados semissintéticos da Betulina e do Ácido betulínico	34
4.3 Seleção do grupo controle	39
4.4 Aspectos éticos	39
4.5 Coleta de sangue	39
4.6 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico	39
4.7 Ensaio de citotoxicidade das PBMCs do grupo controle	40
4.8 Determinação das citocinas	40
4.9 Western Blotting	41
4.10 Manutenção das células neoplásicas	41
4.11 Cultura das PBMCs para dosagem de citocinas	42
4.12 Ensaio de citotoxicidade das células neoplásicas	42
4.13 Determinação do IC ₅₀ e índice de seletividade	42
4.14 Análises estatísticas	43

5 RESULTADOS	44
5.1 Teste de citotoxicidade da BE e de seus novos derivados em PBMCs	44
5.2 Avaliação dos níveis da citocina INF- γ no sobrenadante de cultura dos voluntários saudáveis	44
5.3 Avaliação dos níveis da citocina IL-17A no sobrenadante de cultura dos voluntários saudáveis	46
5.4 Avaliação dos níveis da citocina IL-6 no sobrenadante de cultura dos voluntários saudáveis	47
5.5 Avaliação da modulação proteica de COX-2	48
5.6 Teste de citotoxicidade dos novos derivados da Betulina frente às linhagens de células tumorais	49
5.7 Teste de citotoxicidade dos derivados do Ácido betulínico frente às linhagens de células tumorais	50
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	54
8 REFERÊNCIAS	55
9 APÊNDICE	
1 Identificação do novos derivados da BE	58
2 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	62

1 INTRODUÇÃO

Atualmente muitos compostos de origem natural vêm sendo inseridos na prática clínica para o tratamento de diversas enfermidades crônicas. A Betulina (BE) (lup-20(29)-ene-3 β ,28-diol) e o ácido betulínico (AB) (3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico) são compostos naturais pertencente à classe dos triterpenos (YOGEE SWARI; SRIRAM, 2005). A literatura tem demonstrado uma gama de atividades biológicas para esses dois compostos assim como, para seus derivados, entre elas atividade antitumoral e anti-inflamatória (POTZE et al., 2014; EMMERICH et al., 2014).

Em 2000, já haviam indícios de que a resposta inflamatória estava associada à presença do tumor. Na década subsequente, a pesquisa sobre as interseções entre a inflamação e patogênese do câncer evoluiu, produzindo demonstrações convincentes de que as células do sistema imunológico inato e adaptativo auxiliam a progressão tumoral (HANNAH e WEIBERG 2000; DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010). Dessa forma, evidências indicam que as células inflamatórias do sistema imunológico podem atuar ativamente promovendo o crescimento do tumor, secretando moléculas bioativas para o seu microambiente, promovendo a angiogênese, invasão e metástase (PORTA et al., 2009; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A carcinogênese leva à transformação de células anormais, autossuficientes em relação aos sinais de crescimento, capazes de burlar o sistema de morte, crescendo e expandindo-se ininterruptamente. O crescimento tumoral é beneficiado pela angiogênese, no qual aumenta o fluxo sanguíneo, assim como de nutrientes e assim permite que ele invada tecidos e órgãos próximos, como também ocorra a metástase para tecidos mais distantes (GREENMAN C et al., 2007; YADAV et al., 2010). Hoje, o câncer é uma das principais causas de morte e morbidade em todo o mundo. Estimativas sugerem que para o ano de 2030 ocorra o aparecimento de 27 milhões de novos casos, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivendo com a doença (“WHO | Cancer”, 2015).

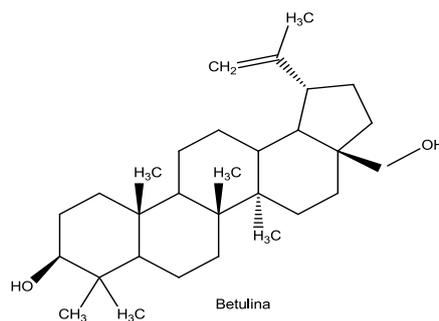
Nas duas últimas décadas grandes avanços quanto ao entendimento molecular do câncer permitiu o desenvolvimento de novas terapias e ferramentas auxiliares para o seu diagnóstico (KUMAR; SHARMA; KUMAR TIWARI, 2012). No entanto, as particularidades biológicas inerentes a cada tipo de tumor, juntamente com a resistência das células tumorais aos quimioterápicos, impulsionam a busca de novas substâncias potencialmente ativas para combater essa doença (ROSAS et al., 2013).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Betulina e seus derivados

A Betulina (BE) (lup-20(29)-ene-3 β , 28-diol) é um lupano pertencente à classe dos triterpenos pentacíclicos (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura química da betulina



Fonte - YOGEESWARI e SRIRAM, 2005

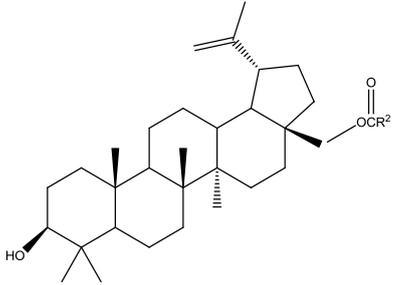
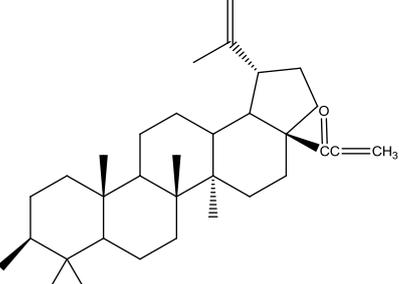
A BE é abundante na natureza, podendo ser obtida através de diversas fontes vegetais como por exemplo, a partir da casca da *Betula papyrifera* (Betulaceae) popularmente conhecida como carvalho branco (*white birch*). A BE também pode ser obtida através da conversão do AB e atualmente está disponível comercialmente (Sigma Aldrich) (TIJJANI et al., 2012). Como sendo da classe dos triterpenos pentacíclicos, a BE possui um amplo espectro de atividades biológicas entre elas antitumoral, antibacteriana, atividades anti-inflamatórias e antivirais (YOGEESWARI; SRIRAM, 2005).

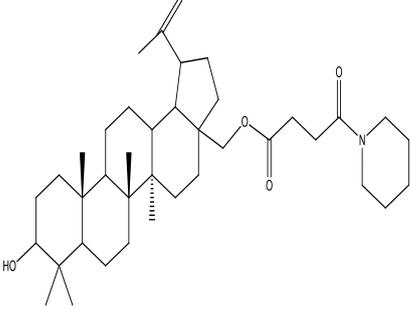
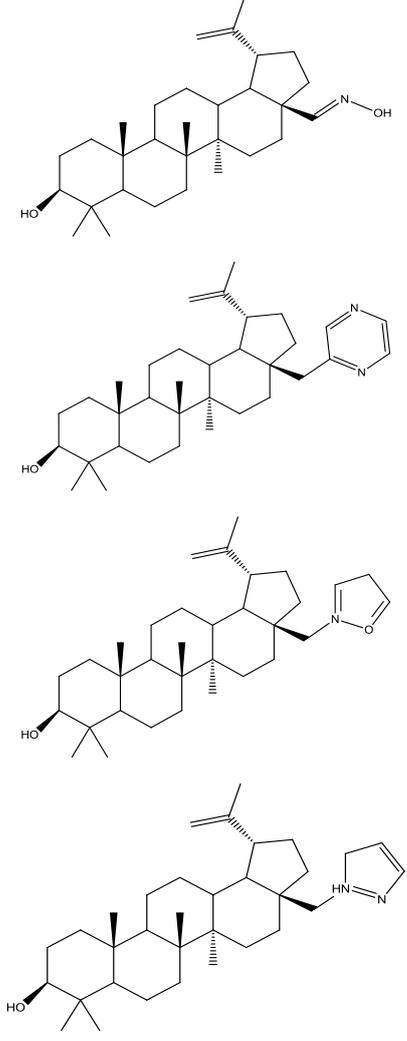
Zhao e colaboradores (2015) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito séptico renal da betulina em camundongos. Eles puderam observar que a betulina inibia o sinal do fator nuclear kappa-B (NF-kB), reduziu os níveis de creatinina sérica e uréia, além de diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) nos camundongos sépticos.

Zalesinska e colaboradores (2015) avaliaram as propriedades citotóxicas de 5 novos derivados da betulina contra o carcinoma epidermóide. Eles constataram que a maior citotoxicidade desses derivados ocorreu nos 2 compostos contendo uma cadeia lateral de lisina ($IC_{50} = 7 \text{ mM}$) e ornitina ($IC_{50} = 10 \text{ mM}$). Concluindo que os novos derivados exibem uma melhor atividade antitumoral em relação ao seu precursor não modificado, a betulina.

A BE possui em sua estrutura química três posições ativas, um grupo hidroxila secundário na posição C-3, o grupo hidroxila primário na posição C-28 e uma dupla ligação C-C no C-20, onde podem ocorrer modificações químicas para se obter diferentes derivados (DINH NGOC et al., 2014). Apesar de sua gama de atividades, a BE é extensivamente estudada como um potente agente antitumoral (ZUCO et al., 2002). O quadro 3 ilustra alguns trabalhos usando derivados da BE contra diversas linhagens tumorais, afim de avaliar sua citotoxicidade e mecanismos de ação.

Quadro 1 – Estudos utilizando derivados da BE

ESTRUTURA QUÍMICA DO DERIVADO	RESULTADOS	REFERÊNCIA
	<ul style="list-style-type: none"> O derivado se mostrou 500 vezes mais potente que a BE e 100 vezes mais citotóxico do que a cisplatina (controle positivo) contra as linhagens CEM e CCRF ($IC_{50} = 0,02 \mu\text{g/ml}$). 	Boryczka et al., 2013
	<ul style="list-style-type: none"> IC_{50} entre 1 e $20 \mu\text{M}$ contra a linhagem de melanoma (G361). 	Bebenek et al., 2015

	<ul style="list-style-type: none"> • IC₅₀ = 4,3; 4,5; 5,2; 7,5 e 5,2 μM nas linhagens respectivamente: MGC-803 (Carcinoma gástrico), PC3 (carcinoma de próstata), BCAP-37 (câncer de mama), A375 (melanoma), e MCF-7 (câncer de mama) • Induziu apoptose nas células MGC-803 na dose de 10 μM. 	<p>Yang et al., 2015</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Inibiram a síntese de iNOS • Apenas o último derivado foi capaz de inibir IL-6, MCP-1 e COX-2 na concentração de 10μM. 	<p>Laavola et al., 2016</p>

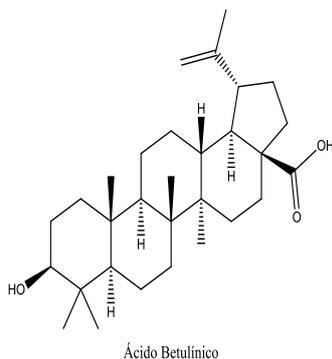
	<ul style="list-style-type: none"> • Lys (IC₅₀ = 7 μM) e a Orn (IC₅₀ = 10 μM) foram citotóxicos para a linhagem HaCaT (Carcinoma epidermóide) • Apoptose das células Os compostos contendo Orn, Dab e Dap induziram a apoptose da linhagem HaCaT pela ativação da caspase 3. 	<p>Zalesinska et al., 2015</p>
--	--	--------------------------------

Fonte – Criado pela autora.

2.2 Ácido betulínico e seus derivados

O Ácido Betulínico (AB) (3β-hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico) é um lupano pertencente à classe dos triterpenos pentacíclicos (Figura 2).

Figura 2 – Estrutura química do Ácido Betulínico



Fonte: YOGEE SWARI e SRIRAM, 2005

O AB pode ser obtido através de uma ampla variedade de espécies vegetais, porém em pequenas concentrações (Quadro 2), sendo isolados principalmente a partir das cascas da *Platanus acerifolia* (DZUBAK et al., 2006). Devido à sua pequena concentração encontrada naturalmente e grande procura para síntese de produtos terapêuticos, o AB também pode ser obtido a partir da oxidação da hidroxila primária do C-28 do seu precursor, a betulina (SIEWERT et al., 2014).

Quadro 2 – Fontes naturais do Ácido Betulínico

Nome Botânico	Nome Popular	Família	Referência
<i>Hypericum lanceolatum</i>	Erva-de-são-joão	Hypericaceae	Zofou, et al 2011
<i>Breynia fruticosa (L.)</i>	Begonia	Euphorbiaceae	Qiu, et al 1996
<i>Myrciaria dubia</i>	Camu-camu	Myrtaceae	Zanatta, et al 2005
<i>Ficus polita Vahl.</i>	Figueira	Moraceae	Kuete, et al 2008.
<i>Diospyros crassiflora</i>	Caqui-do-cerrado	<i>Ebenaceae</i>	Tangmou, et al 2006.
<i>Sorbus decora</i>	Piteira-brava	Rosaceae	Leduc, et al 2006
<i>Cássia obtusifolia</i>	Fedegoso	Leguminosae	Joshi, et al 2003.
<i>Potentilla discolor</i>	Mimosa	Rosaceae	Xue, et al 2006
<i>Artocarpus rigida</i>	Jaqueira	Moraceae	Ko, et al 2005
<i>Callistemon lanceolatus DC.</i>	Escovilhão-carmesim	Myrtaceae	Simpson, et al 2006

Fonte – Tese Maria de Lourdes, 2012

O AB é conhecido por possuir uma ampla variedade de efeitos farmacológicos, incluindo atividade antitumoral em várias linhagens de câncer, antiviral, antimalária, antibacteriana, além de suas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (YOGEE SWARI, SRIRAM, 2005; SOICA et al., 2014). Apesar da vasta gama de atividades biológicas citadas anteriormente, a atividade que vem sendo mais investigada nos últimos anos, é a antitumoral. O AB possui um potencial citotóxico, inibitório do crescimento celular assim como, indutor da morte programada das células tumorais (apoptose) (GHEORGHEOSU et al., 2014). Além de sua alta especificidade para as células tumorais, descobriu-se que o AB possui baixa ou nenhuma citotoxicidade *in vitro* para as células normais (PEZZUTO, 1999).

Liu e Luo (2012) pela primeira vez avaliaram o efeito e o mecanismo de ação do AB sobre a linhagem de carcinoma da nasofaringe (CNE2). Eles constataram que o AB induziu a apoptose nessa linhagem através da ativação de caspases, fragmentação do DNA e a liberação do citocromo C. Essas observações sugerem que o AB possa servir como um potente agente para o tratamento do câncer de nasofaringe.

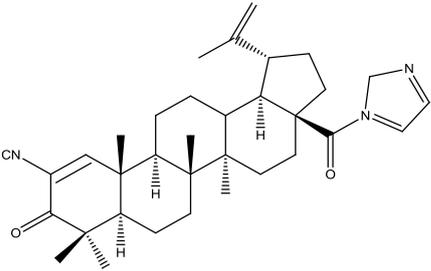
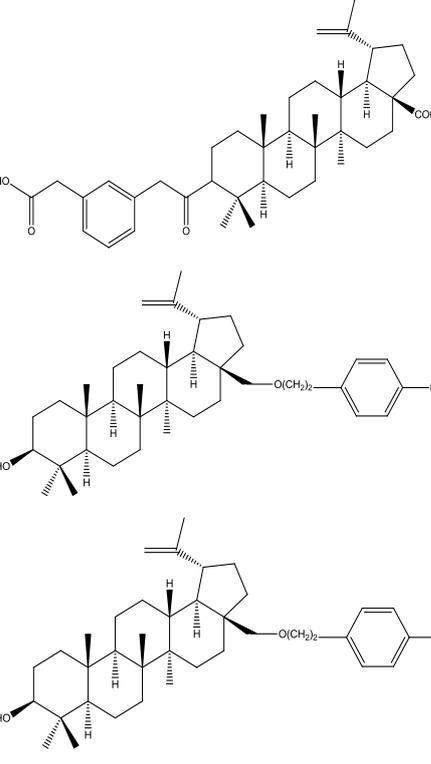
Em 2014, Park e colaboradores realizaram um estudo para avaliar o potencial efeito protetor e terapêutico do ácido betulínico em doenças ósseas associadas ao câncer de mama. Como resultado, observou-se que o AB reduziu a viabilidade das células tumorais (MDA MB 231, câncer de mama) para 35% na dose de 20µM, além de inibir a osteoclastogênese induzida pelo receptor ativador do fator nuclear kappa B (NFκB). Estes resultados sugerem o efeito protetor do AB para prevenção da metástase óssea nos pacientes com tumor de mama.

Apesar de sua funcionalidade uma das principais desvantagens do AB é a sua baixa hidrossolubilidade. Assim, se torna importante a busca pela síntese de derivados mais solúveis. As derivações são facilmente possíveis nas posições C-3, C-20, C-28 e C-30. A introdução de açúcares no C-3 e / ou no C-28 melhora a hidrossolubilidade e aumenta citotoxicidade dos derivados do AB

(GAUTHIER C. et al., 2011). Vários estudos com derivados do AB já foram realizados afim de caracterizar suas atividades e seus possíveis mecanismos de ação, principalmente em linhagens tumorais (Quadro 3).

Devido a sua fácil obtenção, baixa toxicidade nas células normais e sua ampla gama de atividades, o AB se torna um triterpeno promissor a ser usado para o tratamento de diversas enfermidades, entre elas as doenças de cunho inflamatório e o câncer (MARIA DE LOURDES, 2012).

Quadro 3 – Estudos utilizando derivados do AB

ESTRUTURA QUÍMICA DO DERIVADO	RESULTADOS	REFERÊNCIA
	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição de NO • Induziu a apoptose em Linhagens de leucemia (Jukart e U937), Mieloma (RPMI 8226) na concentração de 1μM. 	<p>Liby et al., 2007</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição do proteassoma (IC50 = 1,42; 1,56 e 1,80μM respectivamente) 	<p>Qian et al., 2011</p>

	<ul style="list-style-type: none"> • Citotoxicidade 18 e 45 vezes maior que o AB para contra a linhagem de hepatocarcinoma bem diferenciado (HepG2) • Parada na fase S do ciclo celular • Indução da apoptose pela ativação da caspase 3,8 e 9 • Liberação do citocromo C 	<p>Santos et al., 2011</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • IC50 entre 1,76 e 2,51 μM nas linhagens tumorais: A2780 (ovário), 8505c (tíróide anaplásico), 518A2 (melanoma), MCF-7 (mama) e A549 (carcinoma do pulmão) • 5x mais seletivo para as células cancerosas do que para os fibroblastos. 	<p>Baratto et al., 2013</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • IC50 entre 1,3 e 2,24 μM contra as linhagens tumorais: 518A2 (melanoma); A2780 (ovário); A549 (carcinoma do pulmão); MCF-7 (mama); e 8505c (tiroide). 	<p>Emmerich et al., 2014</p>

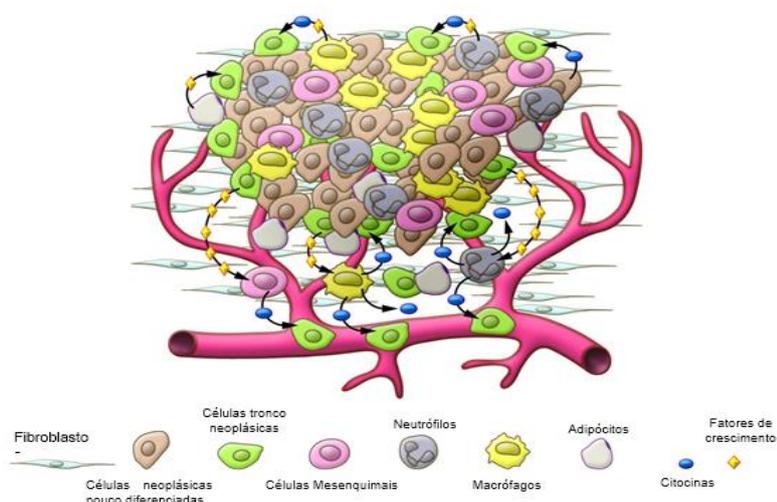
Fonte – Criado pela autora.

2.3 Inflamação e câncer

Em 1856, Rudolf Virchow, pela primeira vez mostrou que a inflamação pode ser um fator predisponente para vários tipos de câncer. Atualmente, os dados sugerem que pelo menos um a cada sete tumores malignos resultam de processos inflamatórios (AGGARWAL et al., 2010).

A inflamação é uma característica fundamental para o microambiente da maioria dos tecidos neoplásicos. Células inflamatórias como macrófagos e fibroblastos, fatores de transcrição, enzimas como a ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e citocinas como INF- γ , IL-6 e IL-17A são um dos principais componentes do infiltrado leucocitário do microambiente tumoral, como mostrado na figura 3 (MANTOVANI; SICA, 2010; COUSSENS LM e WERB Z, 2009; HANAHAN; COUSSENS, 2012; SCHWITALLA et al., 2013).

Figura 3 - Componentes do microambiente tumoral.



Fonte - KORKAYA et al., 2011. Adaptado pela Autora.

A capacidade de evasão do sistema imune presente nas células tumorais é baseada na modificação das vias de ativação das células imunes, que passam a atuar como pró-tumorais (ALLAVENA; MANTOVANI, 2012; SPANO et al., 2012). Sendo assim, algumas citocinas do sistema imune passam a auxiliar o desenvolvimento do tumor.

O interferon- γ (INF- γ) atua em diversos elementos do sistema imune como na maturação das células dendríticas apresentadoras de antígenos, ativação das células natural killer, linfócitos T citotóxicos e macrófagos (GOGAS et al., 2006). Gomes e colaboradores em 2010 identificaram que o receptor beta para o INF- γ (INF γ R2) era um supressor da proteína BAX. Esta proteína é responsável por acelerar a morte celular programada, a apoptose. Sendo assim, a presença do fragmento IFN γ R2 pode conferir às células cancerosas resistência apoptótica.

Outro componente da resposta humoral, a citocina IL-6 foi encontrada em níveis elevados no soro de pacientes com câncer e na biopsia de alguns tumores sólidos (CHANG e CHANG, 2003; KAI et al., 2005). Estudos com camundogons geneticamente modificados têm demonstrado a importância da IL-6 no crescimento tumoral, promoção e proliferação das células cancerígenas influenciando a progressão neoplásica (ANCRILE; LIM; COUNTER, 2007; BROMBERG; WANG, 2009; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Comparados a tecidos não-tumorais, órgãos cancerígenos apresentam uma expressão bastante significativa da citocina IL-17A, sugerindo que o próprio tumor produz fatores que atraem essas células para o sítio cancerígeno, auxiliando seu desenvolvimento e angiogênese (SU et al 2010; BAILEY et al 2014).

Uma das moléculas centrais do processo inflamatório são as ciclo-oxigenases (COXs) (HARIZI, 2015). As COXs são alvos terapêuticos dos anti-inflamatórios não esteroidais amplamente utilizados na prática clínica. Ademais, sabe-se que além de ter um papel central nas doenças inflamatórias, a COX desempenha papéis antitumor (QU; LIU, 2015). Estudos anteriores demonstraram que COX-2 é encontrada em grandes concentrações em diversos tipos de tumores sólidos, desempenhando a função de promover angiogênese, invasão e metástases dos tumores como também, resistência a apoptose (EBERHART et al., 1994, HWANG et al., 1998, KOGA et al., 199,

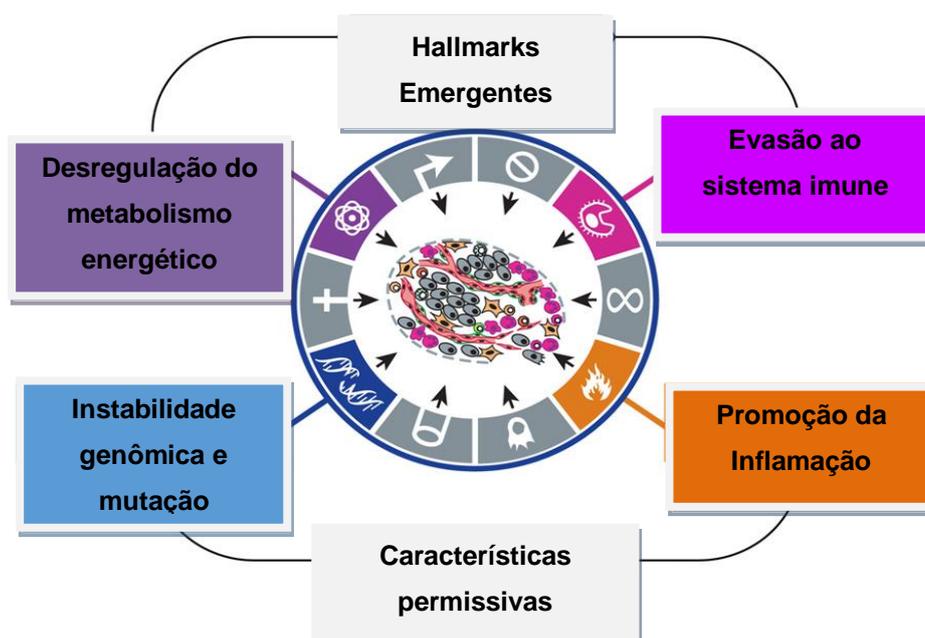
TUCKER et al., 1999, NARUSE et al., 2006, ZHAO et al., 2011, SAINI et al., 2012).

Mais um ponto de ligação entre câncer e inflamação é através do tipo de morte das células tumorais, a necrose. Na necrose as células tornam-se hipertróficas e lisam, liberando seu conteúdo para o microambiente local (GALLUZZI; KROEMER, 2008; ZHONG et al., 2015). Pode-se dizer que a morte celular por necrose é uma morte celular pró-inflamatória, no qual as células necróticas recrutam células inflamatórias do sistema imune, cuja função é fazer um levantamento da extensão do dano tecidual e remover os restos necróticos (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Esforços vêm sendo feitos para definir os mecanismos moleculares relacionados à progressão tumoral. Acredita-se que para o desenvolvimento do tumor, as células adquiriam capacidades biológicas necessárias para o complexo desenvolvimento neoplásico. Estas capacidades compreendem 6 diferentes etapas biológicas, chamadas de marcos do câncer, são elas: proliferação sustentada, fuga aos inibidores de crescimento, resistência à morte celular, indução da angiogênese, imortalidade replicativa, invasão e metástase (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Além dessas capacidades, Hanahan e Weinberg (2011), adicionam mais quatro marcos aos 6 já propostos: o microambiente inflamatório, instabilidade genômica, reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição imune, também representam eventos que sinalizam e favorecem a transformação neoplásica (Figura 4) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 4 - Quatro novos marcos responsáveis pelo desenvolvimento do câncer



Fonte - HANAHAN & WEINBERG, 2011. Figura traduzida pela autora.

A malignidade do câncer é dependente da quebra da ordem do microambiente tecidual, da invasão celular por estímulos proliferativos e da sua capacidade de metástase para órgãos distantes (INGBER, 2008). Entre as várias propostas conhecidas, o início da tumorigênese e a progressão do câncer dependem de um estímulo proliferativo, seja este dependente de hormônios, de danos ao genoma ou de fatores de crescimento (HARRIS et al., 2004). Com base nisso, grandes descobertas durante a investigação do câncer nos últimos anos têm abordado a complexidade dos fatores que envolvem a evolução do tumor, especialmente a participação do sistema imune e dos componentes inflamatórios (HERZIG; CHRISTOFORI, 2002; BASKAR et al., 2012).

2.4 Câncer: Uma Visão Geral

A carcinogênese é definida como proliferações clonais, onde eventos genéticos, epigenéticos, além de fatores ambientais promovem alterações na fisiologia celular, determinando a transição de um estado celular normal para um estado maligno (DALZIEL et al., 2014).

Nas últimas décadas o câncer tomou uma proporção significativamente grande, sendo considerado um evidente problema de saúde pública (WHO, 2016). Encontra-se entre as principais causas de morbidade e mortalidade, com cerca de 14,1 milhões de novos casos, 8,2 milhões de mortes e 32,6 milhões de pessoas vivendo com câncer (dentro de 5 anos após o diagnóstico), além de ser esperado um aumento de 70% de novos casos para as próximas duas décadas (Cancer World Report, 2014).

No Brasil, o câncer de próstata lidera o ranking de incidência em homens, excluindo o câncer de pele não-melanoma com uma média de 61,2 mil casos por 100.000 habitantes (Figura 5). Mais comum nos homens a partir dos 60 anos, é considerado o câncer da terceira idade (INCA, 2016).

Figura 5 – Estimativas de novos casos de câncer em homens no Brasil para os anos de 2016 e 2017.

Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	61.200	28,6%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%
Cólon e Reto	16.660	7,8%
Estômago	12.920	6,0%
Cavidade Oral	11.140	5,2%
Esôfago	7.950	3,7%
Bexiga	7.200	3,4%
Laringe	6.360	3,0%
Leucemias	5.540	2,6%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%
Linfoma não Hodgkin	5.210	2,4%
Pele Melanoma	3.000	1,4%
Linfoma de Hodgkin	1.460	0,7%
Glândula Tireoide	1.090	0,5%
Todas as Neoplasias sem pele*	214.350	
Todas as Neoplasias	295.200	



Fonte de dados: INCA. Disponível em <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estimativas-no-mundo/1705/1/>>.

O câncer da mama é o tipo de neoplasia mais comum entre as mulheres, apresentando-se como uma das doenças com a maior heterogeneidade genotípica, fenotípica e clínica (RAKHA; ELLIS, 2014). As estimativas apontam que na população mundial a sobrevida média das pacientes 5 anos após o tratamento seja de 61% (INCA, 2010). No Brasil, em 2012 foi estimado o aparecimento de 52.680 novos casos e 12.098 mortes por neoplasias malignas da mama (INCA, 2012). Em mulheres, excluindo o câncer de pele não-melanoma, as maiores taxas de óbito e de incidência são causadas pelo câncer de mama, acometendo uma média de 57,96 mil casos a cada 100.000 habitantes (Figura 6).

Figura 6 – Estimativas de novos casos de câncer em mulheres no Brasil para os anos de 2016 e 2017.

Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	57.960	28,1%
Cólon e Reto	17.620	8,6%
Colo do útero	16.340	7,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Estômago	7.600	3,7%
Corpo do útero	6.950	3,4%
Ovário	6.150	3,0%
Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%
Leucemias	4.530	2,2%
Cavidade Oral	4.350	2,1%
Esôfago	2.860	1,4%
Pele Melanoma	2.670	1,3%
Bexiga	2.470	1,2%
Linfoma de Hodgkin	1.010	0,5%
Laringe	990	0,5%
Todas as Neoplasias sem pele*	205.960	
Todas as Neoplasias	300.870	



Fonte de dados: INCA. Disponível em <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estimativas-no-mundo/1705/1/>>.

O Linfoma de Burkitt (LB) é um subtipo de Linfoma não Hodgkin, muito agressivo. Dentre as neoplasias, o LB apresenta a maior taxa de proliferação celular, podendo duplicar de tamanho em apenas 24 horas (AFANAS et al., 2011). Nas regiões endêmicas, ele representa cerca de 50% dos tumores malignos e 90% dos linfomas diagnosticados em crianças com um pico de incidência aos 6 anos de idade (OREM et al., 2011). No Brasil, também há uma

predominância desse tipo de linfoma em crianças, principalmente na região nordeste do país (OREM et al., 2007).

O hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular é o subtipo de câncer de fígado mais agressivo, ocorrendo em 80% dos casos. Segundo o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) em 2013 ocorreram cerca de 8.772 mortes por hepatocarcinoma, sendo 5.012 em homens e 3.759 em mulheres (SIM, 2013).

As estimativas para o ano de 2016 e 2017 apontam para o aparecimento de aproximadamente 596.070 novos casos de câncer. Onde 51% (214.350) ocorram em homens (Figura 5) e 49% (205.960) ocorram em mulheres (Figura 6), reforçando a magnitude do problema no país.

Desde a descoberta da estrita relação câncer/inflamação, o interesse pela pesquisa de alvos moleculares envolvidos nas vias inflamatórias relacionadas ao câncer vem crescendo a cada dia. Nesse contexto, é de extrema importância a busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças de cunho inflamatório, dentre as quais encontra-se o câncer.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória e antineoplásica de novos derivados semissintéticos da betulina e do ácido betulínico.

3.2 Específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos novos derivados semissintéticos da BE e do AB em células mononucleares do sangue periférico de voluntários saudáveis;
- Avaliar a citotoxicidade dos novos derivados semissintéticos da BE e do AB em linhagens de células tumorais, provenientes do câncer de mama (MCF-7), próstata (DU145), linfoma de Burkitt's (RAJI) e hepatocarcinoma bem diferenciado (Hep-G2);
- Investigar a atividade moduladora da BE e de seus derivados semissintéticos sobre as citocinas INF- γ , IL-17A e IL-6 da BE;
- Avaliar a expressão proteica de COX-2 pela BE e por seus novos derivados semissintéticos;
- Avaliar a seletividade dos novos derivados semissintéticos da BE e do AB.

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização do Estudo

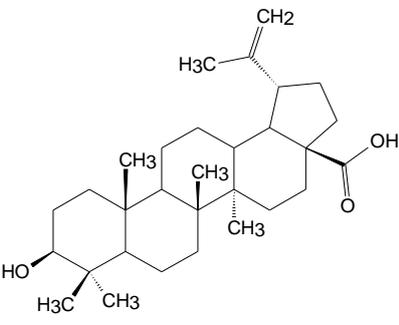
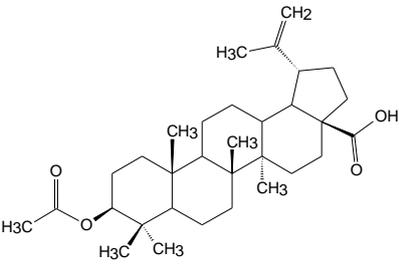
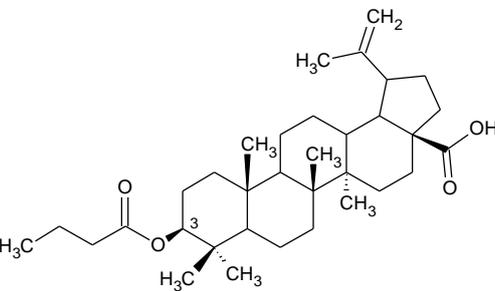
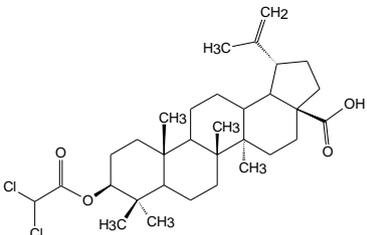
Esta pesquisa foi do tipo experimental. Desenvolvido na Universidade Federal de Pernambuco, no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) do Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica – Suely Galdino (NUPIT-SG). No período de Agosto de 2014 à Julho de 2016.

4.2 Derivados semissintéticos do ácido betulínico e da betulina.

Tendo em vista o potencial biológico destes triterpenos, o AB foi obtido a partir das cascas de *Platanus acerifolia* (DA SILVA et al., 2013) e a BE adquirida comercialmente (Sigma Aldrich).

Os derivados semissintetizados do AB pertencem à série descrita por Silva e colaboradores (2013). Desta maneira as análises de ponto de fusão, espectrometria de massas (HR-EI-MS) e espectrometria de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C , 300 e 75 MHz) foram realizadas e comparadas com os dados descritos por Silva e colaboradores (2013). A partir desta comparação foi confirmada a estrutura química dos compostos obtidos bem como pureza adequada para os ensaios biológicos. Dados referentes aos derivados do AB estão dispostos no Quadro 4.

Quadro 4 – Dados referentes ao Ácido Betulínico e seus derivados

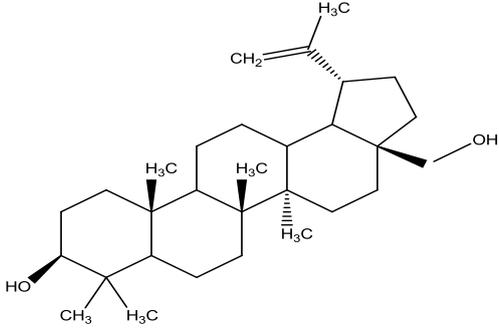
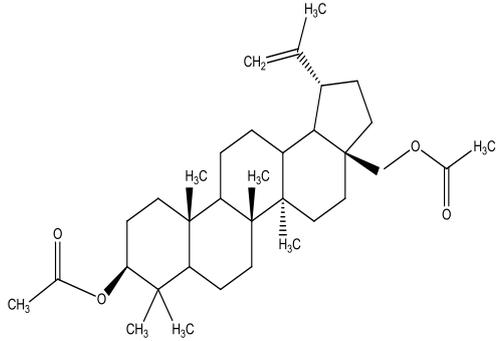
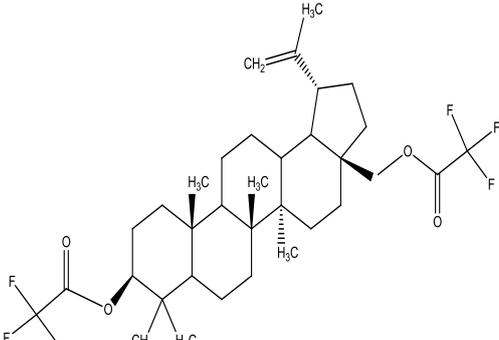
CÓDIGO	PESO MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR	NOME QUÍMICO
AB	456,3593		$C_{30}H_{48}O_3$	Ácido Betulínico
1a	498,3703		$C_{32}H_{50}O_4$	3-O-acetil ácido betulínico
1b	526,4016		$C_{34}H_{54}O_4$	3-O-trifluoroacil ácido betulínico
1c	566,2924		$C_{32}H_{48}Cl_2O_4$	3-O-dicloroacil ácido betulínico

1d	554,4329		$C_{36}H_{58}O_4$	3-O- isobutil ácido betulínico
1e	526,7901		$C_{34}H_{54}O_4$	3-O- butanoil ácido betulínico
1f	552,3420		$C_{32}H_{47}F_3O_4$	3-O- hexanoil ácido betulínico

Fonte – Criado pela autora

Para os derivados da BE, duas porções da molécula foram modificadas devido à presença de uma segunda hidroxila na posição C-28 com a mesma reatividade daquela na posição C-3. Dados referentes aos novos derivados da BE estão dispostos no Quadro 5.

Quadro 5 – Dados referentes à Betulina e seus derivados

CÓDIGO	PESO MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR	NOME QUÍMICO
BE	442,3805		C ₃₀ H ₅₀ O ₂	Betulina
2a	526,4016		C ₃₄ H ₅₄ O ₄	3,28-O-acetil betulina
2b	634,3451		C ₃₄ H ₄₈ F ₆ O ₄	3,28-O-trifluoracil betulina

2c	662,2457		$C_{34}H_{50}Cl_2O_4$	3,28-O-dicloroacil betulina
2d	582,4642		$C_{38}H_{64}O_4$	3,28-O-isobutil betulina
2e	582,4642		$C_{38}H_{62}O_4$	3,28-O-butanoil betulina

Fonte – Criado pela autora

Assim, um total de onze derivados foram obtidos através da substituição da hidroxila por um grupamento éster com diferentes características na cadeia lateral, tais como variação do número de carbonos e presença de halogênios, como cloro e flúor. Os dados referentes à síntese dos derivados do AB podem ser encontrados em (SILVA et al., 2013) e os dados da síntese dos derivados da BE encontram-se no Anexo 2.

4.3 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos – Centro de ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (PROTOCOLO/CEP/CCS/UFPE N°1.351.357) (Anexo 4).

4.4 Seleção do grupo controle

A amostra foi composta por 12 voluntários saudáveis homens e/ ou mulheres acima de 18 anos, recrutados do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT/ UFPE). Todos obedeceram aos critérios de inclusão e exclusão, assim como assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 3).

4.5 Coleta de sangue

Após aplicação e assinatura do TCLE, foram coletadas amostras de sangue periférico por profissional competente através de punção venosa. Foram coletados dois tubos de sangue com heparina como anticoagulante, totalizando 18mL de sangue periférico. As amostras foram coletadas no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) do Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica – Suely Galdino (NUPIT-SG), situado na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde foram processadas, identificadas e armazenadas para posterior utilização.

4.6 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

Após a coleta de sangue, as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) contidas em tubos com heparina foram isoladas por centrifugação com Ficoll Paque TM Plus (*GE Healthcare Bio-Sciences*).

4.7 Ensaio de citotoxicidade das PBMCs do grupo controle

O teste de citotoxicidade dos novos derivados foi realizado *in vitro* nas PBMCs dos voluntários saudáveis pertencentes ao grupo controle. Os testes foram realizados em triplicata de amostras e triplicata das doses dos compostos.

O método MTT é uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) (Sigma Aldrich) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Com o auxílio da câmara de Neubauer foi realizado a contagem de células e o ajuste celular para 1×10^6 células/mL. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e posteriormente foram adicionados os derivados nas concentrações de 1, 10 e 100 μ M. Foram utilizados 3 tipos de controle, (1) controle não tratado apenas com células. (2) controle com o solvente dos compostos, Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich) e (3) controle com a droga já utilizada na prática clínica, a Doxorrubicina (Sigma Aldrich). Após 48 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, foi adicionado 20 μ L da solução de MTT (0,5mg/mL), e incubado por mais 3 horas na estufa. Em seguida, foi adicionado 130 μ l da solução de Dodecil sulfato de sódio – SDS à 20% para dissolução do precipitado. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 570nm (BioTek EL808), após 24 horas.

4.8 Cultura das PBMCs para dosagem de citocinas

As PBMCs isoladas a partir do sangue periférico dos voluntários sadios foram cultivadas (1×10^6 células/1000 μ L) em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Gibco), 10 mM de HEPES (*4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid*) (Gibco) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco).

Estas células foram estimuladas ou não com *forbol 12-miristato 13-acetato* (PMA) e Ionomicina (Sigma Aldrich) 2 e 5 μ L respectivamente e sob

condições específicas como a utilização dos novos derivados da betulina nas doses de 1, 10 e 100 μ M. Foi utilizado ainda como controle não tratado e controle negativo, um poço apenas com células e outro com Metilprednisolona (MP) (Pfizer) na concentração de 100 μ M. As PBMCs foram cultivadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer -20°C graus para posterior dosagem das citocinas pelo método ELISA.

4.9 Determinação das Citocinas

As citocinas dosadas para o estudo foram: INF- γ (BD Biosciences), IL-6 (BD Biosciences) e IL-17A (Ebioscience). Foram quantificadas no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) pelo método ELISA (*Immuno Sorbent Enzyme Linked Assay*), seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores. Para o estudo o limite de detecção de cada teste foi de 4,6875, 1,5625 e 3,90625 respectivamente.

4.10 Western Blotting

Foi utilizada a linhagem de células U937 (monócitos). Os monócitos foram plaqueados na concentração de 10⁶ célula/ml e posteriormente estimulados com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* LPS 0111:B4 (10 μ g/mL). Para o controle negativo foram utilizados o inibidor não-seletivo de COX-1, o ácido acetil-salicílico (AAS) na dose de 10 μ g/mL assim como o inibidor de COX-2, a dexametasona na dose de 10 μ M. Para o grupo teste, foram adicionados os novos derivados 2a, 2c e 2e, assim como a BE. Após 48 horas, as células foram recolhidas dos poços e lavadas com PBS1x.

Para a análise da expressão proteica foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%. Em seguida as proteínas contidas no gel foram transferidas para membrana de PVDF (Amersham Hybond-P PVDF Membrane). As membranas foram incubadas overnight com COX-2 e β -actina, utilizada como normalizador. Em seguida, o anticorpo secundário foi adicionado na membrana e incubado por 2 horas. As bandas colorimétricas reveladas foram fotografadas em aparelho fotodocumentador e suas densitometrias

determinadas pelo software ImageJ. A quantificação final foi dada através da razão entre as expressões da proteína de interesse e a β -actina, utilizada como normalizador.

4.11 Manutenção das células neoplásicas

A avaliação da atividade antitumoral foi realizado em linhagens neoplásicas humanas adquiridas do BCRJ (Banco de células do Rio de Janeiro). As linhagens tumorais em estudo foram Hep-G2 (Hepatocarcinoma bem diferenciado), RAJI (Linfoma de Burkitt), DU 145 (Câncer de próstata) e MCF-7 (Câncer de mama). As células foram cultivadas em garrafa de cultura contendo meio RPMI 1640 ou DMEM suplementados com L-Glutamina (Gibco), 10% de Soro Bovino Fetal (Gibco), 10 mM de HEPES (Gibco) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco) em estufa de CO₂ 5 % a 37°C.

4.12 Ensaio de citotoxicidade nas células neoplásicas

As células foram plaqueadas na concentração de 10⁴ células/100 μ l em placas de 96 poços. Foram utilizadas as mesmas condições para os derivados e os controles, como descritos no item 4.8. Após 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, foi adicionado 20 μ L da solução de MTT (0,5mg/mL), e incubado por 3 horas na estufa. Em seguida, foi adicionado 130 μ l da solução de SDS à 20% para dissolução do precipitado. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 570nm (BioTek EL808), após 24 horas.

4.13 Determinação de IC₅₀ e índice de seletividade

Com os resultados da citotoxicidade obtidos através do método MTT, foi calculado o IC₅₀ (concentração mínima capaz de inibir 50% da proliferação celular) de cada composto nas linhagens estudadas. Os dados são estimados a partir da curva dose resposta pelo programa Oringin Pro 8. O índice de seletividade (IS), indica se o composto é seletivo ou não para linhagens tumorais. Sendo assim, o IS corresponde à divisão entre o valor do IC₅₀ de cada derivado na linhagem de células normais (PBMCs) e o valor do

IC₅₀ de cada derivado nas linhagens de células neoplásicas. ($IS = IC_{50} \text{ PBMC} / IC_{50} \text{ células neoplásicas}$).

De acordo com a literatura, são considerados seletivos os compostos com $IS \geq 3$, indicando que o composto estudado é três vezes mais seletivo para a linhagem de células neoplásicas do que para as células normais (BÈZIVIN et al., 2003).

4.14 Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism® versão 6. O teste estatístico utilizado na análise da dosagem das citocinas no sobrenadante de cultura foi o Wilcoxon. Os dados estão apresentados como mediana máxima e mínima. O IC₅₀ referente à toxicidade frente às linhagens neoplásicas foi calculado pelo software Origin versão 8.0. Os resultados foram considerados significantes quando o $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

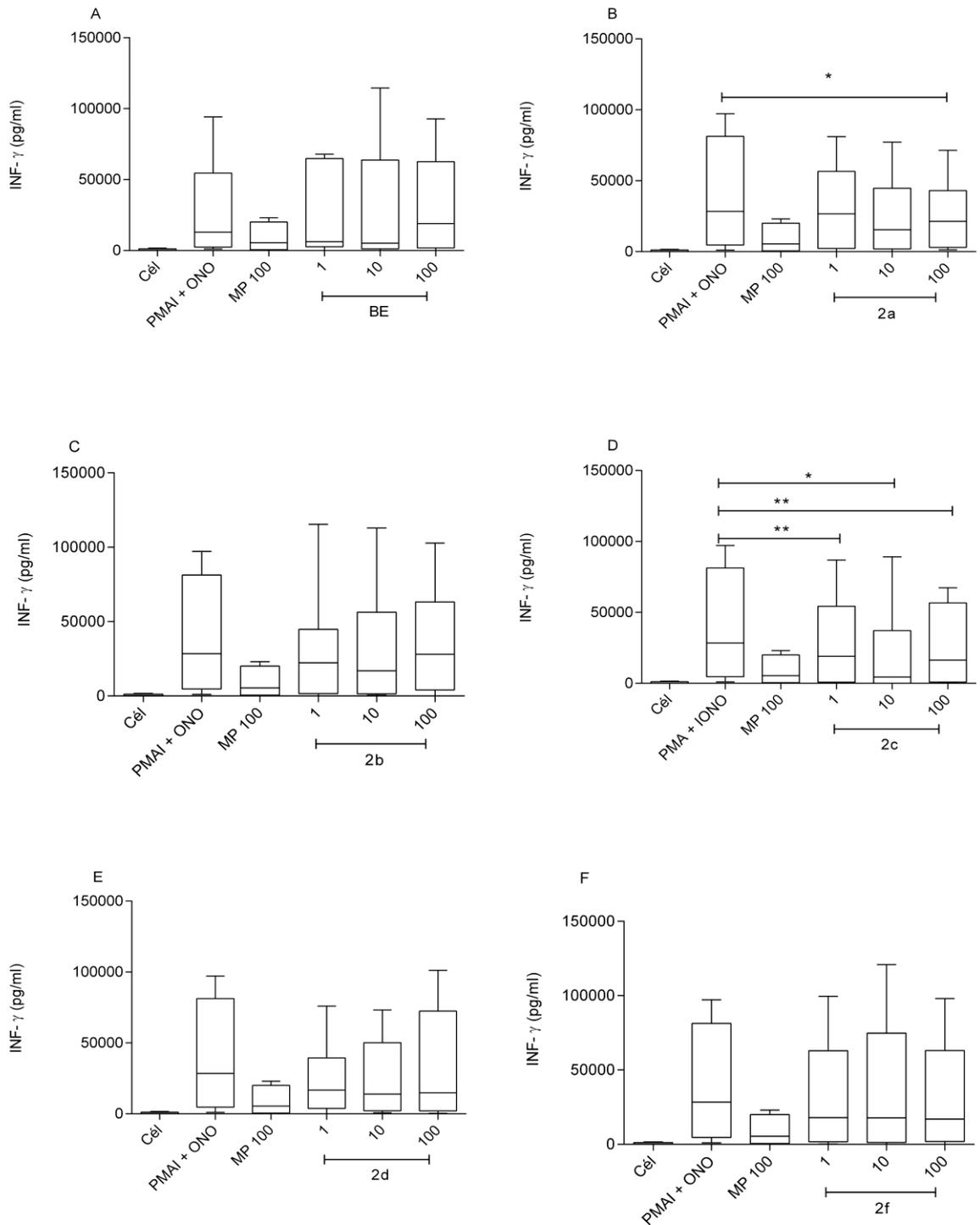
5.1 Teste de Citotoxicidade dos Novos Derivados da Betulina em PBMC's

Inicialmente os novos derivados semissintéticos da BE 2a, 2b, 2c, 2d e 2e foram avaliados quanto a sua citotoxicidade em PBMCs, através do método MTT. Os novos derivados, assim como o seu precursor (BE) apresentaram $IC_{50} > 100 \mu M$. Como não se mostraram citotóxicos, os novos derivados da BE foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir a produção de algumas citocinas chave no processo inflamatório: INF- γ , IL-17A e IL-6.

5.2 Avaliação dos níveis da citocina INF- γ no sobrenadante de cultura dos voluntários saudáveis.

Os resultados da dosagem da citocina INF- γ no sobrenadante de cultura de 8 voluntários sadios são apresentados em média e mediana (figura 7). O derivado 2a apresentou redução estatisticamente significativa sobre a produção da citocina INF- γ ($p=0,0391$), apenas na dose de $100 \mu M$. O derivado 2c apresentou redução estatisticamente significativa da citocina INF- γ ($p^*0,0156$), ($p^{**}0,0078$) quando comparado ao controle positivo PMA+IONO. Os demais derivados (2b, 2d e 2e) e a BE não mostraram nenhuma ação moduladora da citocina em questão, não apresentando significância estatística ($p < 0,05$).

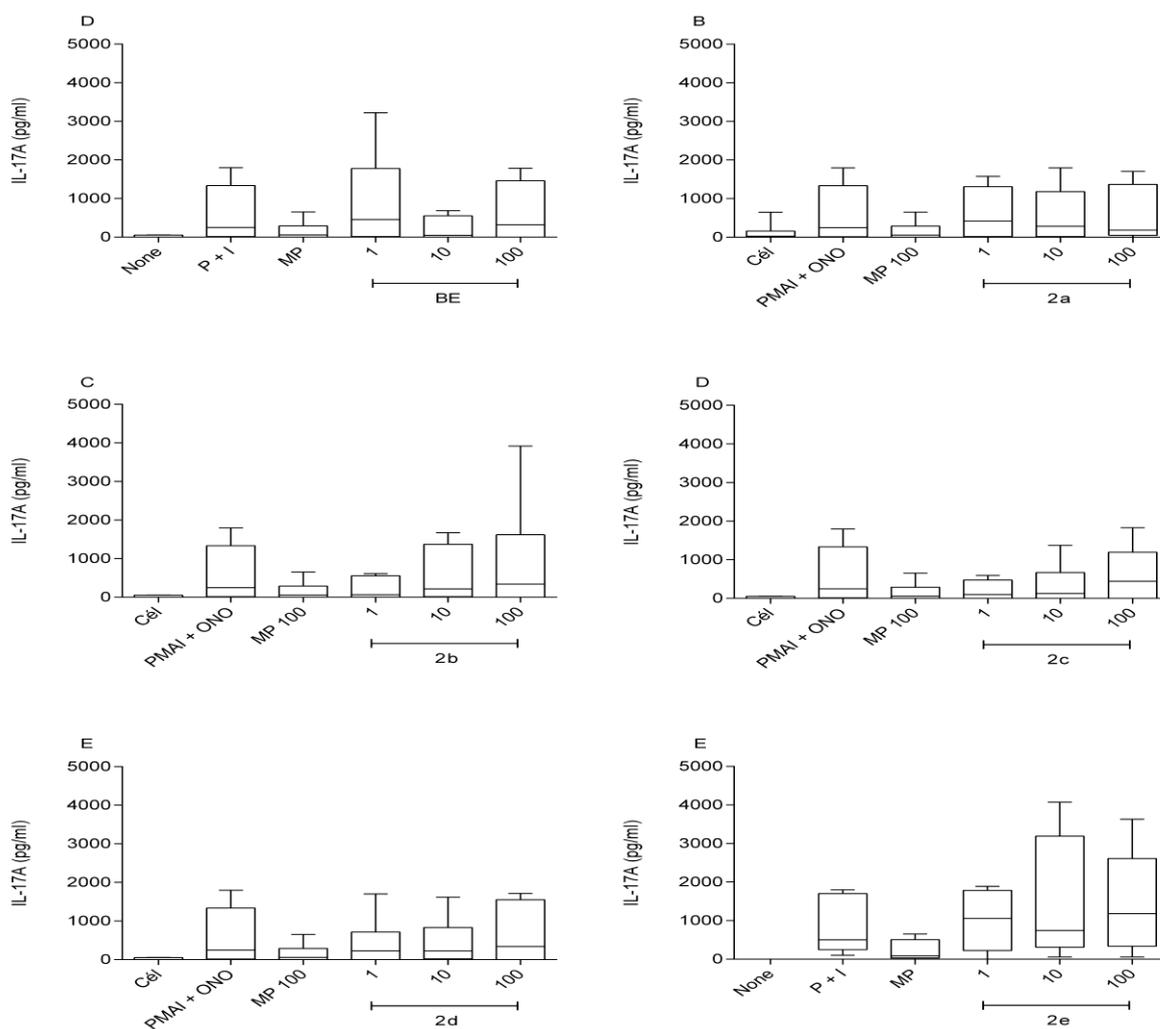
Figura 7 – Dosagem de INF- γ (pg/ml) no sobrenadante de cultura de voluntários sadios na presença de PMA+Ionomicina, Metilprednisolona e dos derivados semissintéticos da BE, nas doses de 1, 10 e 100 μ M.



5.3 Avaliação dos níveis da citocina IL-17A no sobrenadante de cultura dos voluntários saudáveis.

Os resultados da dosagem da citocina IL-17A no sobrenadante de cultura de 8 voluntários saudáveis são apresentados em média e mediana (figura 8). Apenas o derivado 2e na dose de 10 μ M mostrou significância estatística na redução da produção da citocina pró-inflamatória IL-17A ($p = 0,0313$) quando comparado ao controle positivo PMA+IONO. Os demais derivados (2a, 2b, 2c e 2d) e a BE não mostraram nenhuma ação moduladora da citocina ($p < 0,05$).

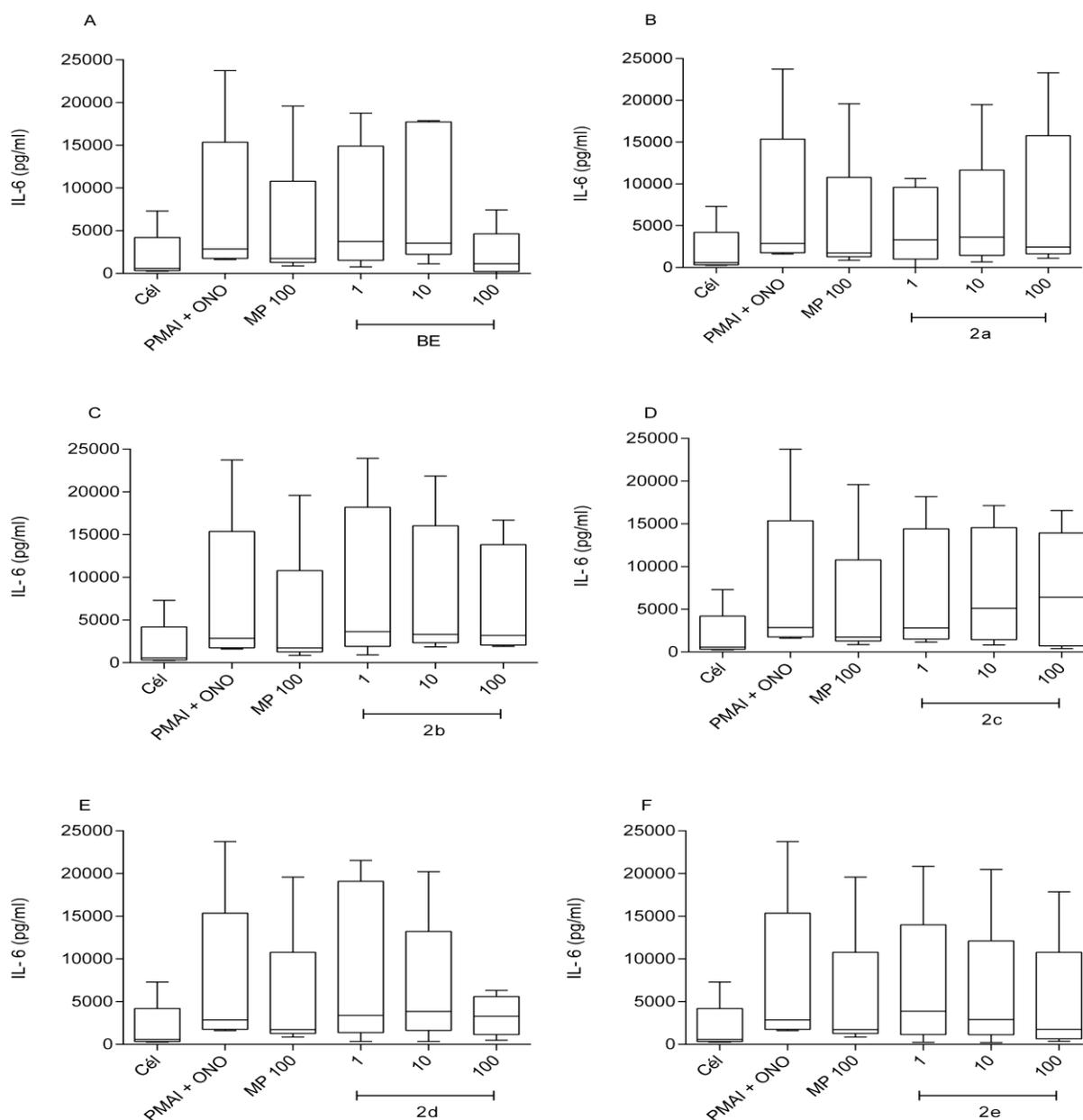
Figura 8 – Dosagem de IL-17 (pg/ml) no sobrenadante de cultura de voluntários sadios na presença de PMA+Ionomicina, Metilprednisolona e dos derivados semissintéticos da BE, nas doses de 1, 10 e 100 μ M.



5.4 Avaliação dos níveis da citocina IL-6 no sobrenadante de cultura dos voluntários saudáveis.

De acordo com a figura 9, observamos que os derivados (2a, 2b, 2c, 2d e 2e) e a BE não mostraram atividade imunomoduladora estatisticamente significativa sobre a produção da citocina pró-inflamatória IL-6 ($p < 0,05$).

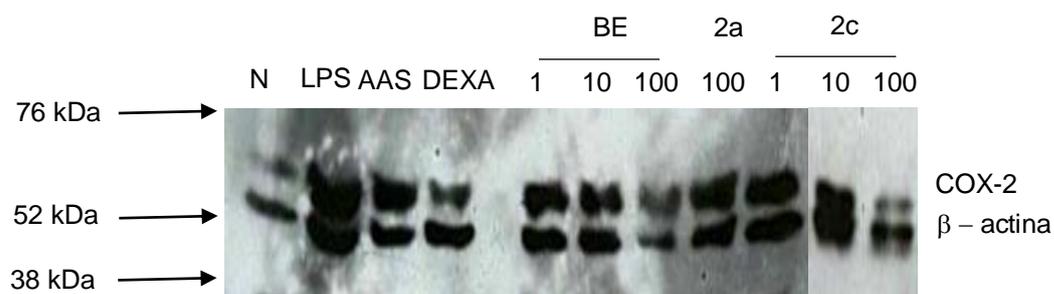
Figura 9 – Dosagem de IL-6 (pg/ml) no sobrenadante de cultura de voluntários sadios na presença de PMA+Ionomicina, Metilprednisolona e dos derivados semissintéticos da BE, nas doses de 1, 10 e 100 μ M.



5.5 Avaliação da modulação proteica de COX-2

Os derivados 2a e 2c, juntamente com a BE foram avaliados quanto à modulação proteica de COX-2. O efeito desses 3 compostos foram comparados ao agente utilizado na prática clínica, Dexametasona (DEXA). Nossos dados mostram que a BE parece inibir a expressão de COX-2 de maneira dose dependente. 2a (100 μ M) apresentou redução relativa igual à DEXA. O derivado 2c (100 μ M) chama atenção pela maior inibição de COX-2 quando comparado à droga muito utilizada na prática clínica, a dexametasona.

Figura 10 – Efeito da BE e dos seus derivados 2a e 2c na expressão de COX-2 em linhagem de monócitos (U937) analisado por Western blotting. β – actina foi utilizada como normalizador. N – controle de células, LPS – estímulo, AAS – inibidor não seletivo de COX, DEXA – Inibidor seletivo de COX-2.



5.6 Teste de citotoxicidade dos novos derivados da Betulina

Os resultados da avaliação da atividade antitneoplásica *in vitro* dos novos derivados da betulina frente às linhagens celulares estão apresentados na tabela 1, representados pelo IC₅₀ e IS.

Tabela 1 - Efeito citotóxico dos novos derivados da betulina (IC₅₀)* e (IS) frente às células normais e células neoplásicas.

Compostos	RAJI (Linfoma de Burkitt's)		MCF-7 (Câncer de mama)		Hep-G2 (Hepatocarcinoma bem diferenciado)		DU145 (Câncer de próstata)		PBMC (Células mononucleares do sangue periférico)
	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀
BE	45,78 ± 0,71	2,18	45,21 ± 13,40	2,21	72,23 ± 3,42	1,38	49,36 ± 13,43	2,02	>100
2a	85,10 ± 4,78	1,17	>100	-	88,71 ± 0,00	1,12	>100	-	>100
2b	92,00 ± 3,07	1,08	>100	-	85,86 ± 0,00	1,16	>100	-	>100
2c	89,45 ± 7,60	1,11	>100	-	89,27 ± 0,00	1,12	>100	-	>100
2d	95,53 ± 6,75	1,04	>100	-	60,47 ± 0,00	1,65	>100	-	>100
2e	96,75 ± 3,28	1,03	>100	-	86,09 ± 0,00	1,16	>100	-	>100
Doxorrubicina	11,91 ± 9,15	8,39	2,71 ± 0,87	36,90	39,22 ± 14,48	2,54	6,88 ± 1,06	14,53	>100

*IC₅₀: Dose que inibe 50% do crescimento celular (microgramas /mL), Média. ± Desvio Padrão

**IS: Índice de Seletividade

Na tabela 1 podemos observar que todos os derivados 2a, 2b, 2c, 2d e 2e apresentaram IC₅₀ >100 nas células normais e nas linhagens MCF-7 e DU145. Dessa forma não foi possível calcular o IS para esses derivados. Para as linhagens RAJI e Hep-G2 os derivados apresentaram IC₅₀ menores aos encontrados nas células normais. Entretanto esses derivados não se mostraram seletivos para tais linhagens. A doxorrubicina, não foi tóxica para as células normais IC₅₀>100 e se mostrou seletiva para as células neoplásicas, exceto para a linhagem Hep-G2 IS<3.

5.7 Teste de citotoxicidade dos novos derivados do Ácido Betulínico

Os resultados da toxicidade em PBMCs e avaliação da atividade antitumoral *in vitro* dos novos derivados do AB frente às linhagens celulares estão apresentados na tabela 2, representados pelo IC₅₀ e IS.

Tabela 2 – Efeito citotóxico dos novos derivados do ácido betulínico (IC₅₀)* e (IS)** frente às células normais e células neoplásicas.

Compostos	RAJI (Linfoma de Burkitt's)		MCF-7 (Câncer de mama)		Hep-G2 (Hepatocarcinoma bem diferenciado)		DU 145 (Câncer de próstata)		PBMC (Células mononucleares do sangue periférico)
	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀
AB	1,95 ± 5,40	3,26	31,82 ± 0,00	0,19	0,09 ± 0,28	67,65	66,57 ± 4,15	0,09	6,36 ± 2,84
1a	6,55 ± 6,09	1,02	21,62 ± 0,01	0,30	5,10 ± 1,10	1,30	68,49 ± 8,01	0,09	6,68 ± 2,30
1b	7,54 ± 7,71	0,74	53,92 ± 1,77	0,10	4,99 ± 0,48	1,12	70,22 ± 5,06	0,07	5,60 ± 1,12
1c	6,52 ± 7,68	0,85	12,72 ± 0,84	0,43	5,07 ± 0,84	1,08	71,67 ± 7,86	0,07	5,52 ± 1,63
1d	18,49 ± 9,43	0,33	90,18 ± 3,77	0,06	5,58 ± 1,13	1,10	91,05 ± 3,94	0,06	6,16 ± 3,01
1e	9,41 ± 8,23	0,67	20,19 ± 0,00	0,31	4,92 ± 0,84	1,29	62,42 ± 7,98	0,10	6,37 ± 0,99
1f	7,69 ± 7,96	1,13	50,35 ± 2,14	0,17	5,50 ± 0,31	1,59	>100 ± 0,78	0,08	8,75 ± 1,89
Doxorrubicina	11,91 ± 9,15	8,39	2,71 ± 0,87	36,90	39,22 ± 14,48	2,54	6,88 ± 1,06	14,53	>100

*IC₅₀: Dose que inibe 50% do crescimento celular (microgramas /mL), Média. ± Desvio Padrão

**IS: Índice de Seletividade

Na tabela 2, observamos que para as linhagens RAJI e Hep-G2 os derivados 1a, 1b, 1c, 1e e 1f, apresentaram IC₅₀ próximo ao IC₅₀ das PBMCs, exceto pelo derivado 1d, no qual apresentou IC₅₀ 3x superior ao encontrado nas PBMCs. Para as linhagens MCF-7 e DU145 os derivados (1a – 1f) apresentaram IC₅₀ de 2X a 10x superior ao IC₅₀ das células normais. Nenhum dos 6 derivados se mostraram seletivos para as células tumorais. A doxorrubicina, controle negativo, não se mostrou citotóxica frente às células normais, apresentando IC₅₀>100. Esta também se mostrou seletiva para linhagem RAJI, assim como o AB IS>3.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho relatou pela primeira vez a semissíntese de 5 novos derivados da BE com substituintes na posição C-3 e C-28, projetados para a busca de novos alvos anti-inflamatórios.

De acordo com nossos resultados, observamos que as modificações realizadas para se obter os derivados 2a e 2c os tornaram mais eficazes quanto a sua atividade anti-inflamatória do que o seu precursor, a BE. Nenhum estudo anterior sintetizou derivados a partir da BE utilizando os mesmos substituintes para os nossos derivados, tornando a síntese e atividade de nossos derivados inéditas.

Poucos são os trabalhos na literatura que avaliaram o efeito anti-inflamatório da betulina e de seus derivados (BERNARD et al., 2001; ALAKURTTI et al., 2006; ZHANG et al., 2015; LAAVOLA et al., 2016). Tampouco são os estudos que relacionaram derivados da BE com atividade moduladora de algumas citocinas. Não foi encontrado na literatura, estudos que avaliaram a capacidade de modulação das citocinas INF- γ e IL-17A pela BE e seus derivados. Sendo assim, nosso ponto de partida foi avaliar a capacidade que a BE e seus novos derivados teriam de reduzir a produção das citocinas pró-inflamatórias INF- γ , IL-6 e IL17A. A BE e seus derivados não foram capazes de modular significativamente as citocinas IL-6 e IL-17A. No entanto, a utilização dos substituintes *O*-acetil (2a) e do halogenio cloro (2c) nas posições C-3 e C-28 simultaneamente, deram potenciais características imunomoduladoras de INF- γ e anti-inflamatórias através da inibição de COX-2 a esses dois novos derivados.

Laavola e colaboradores (2016) realizou modificações estratégicas na estrutura da BE, adicionando grupamentos formil e pirazol gerando dessa forma derivados capazes de reduzir a expressão da citocina pró-inflamatória IL-6 e da enzima COX-2 de maneira significativa. Sendo assim, após observar a modulação significativa de INF- γ , decidimos investigar a ação dos novos derivados em outra molécula central do processo infamatório, a COX-2.

Após avaliar a ação anti-inflamatória dos novos derivados da BE, decidimos investigar a ação citotóxica desses derivados frente às linhagens de células tumorais. Estudos tem revelado que a síntese de derivados a partir do precursor betulina, tem gerado compostos mais citotóxicos e seletivos para células neoplásicas (BORYCZKA et al., 2013; BEBENEK et al., 2015; YANG et al., 2015; ZALESINSKA et al., 2015; LAAVOLA et al., 2016).

Dessa maneira, podemos observar que a estratégia de utilizar substituintes ésteres e halogênios como o cloro e o flúor nas posições C-3 e C-28 simultaneamente, tornaram os novos derivados da BE sem atividade antineoplásica promissora.

A série dos derivados do AB utilizada em nosso estudo foi descrita quanto a sua atividade antimalárica por Silva e colaboradores em 2013. Eles observaram que os derivados que possuíam cadeias laterais mais curtas eram mais eficazes contra o *P. falciparum*, 3-5 vezes mais ativos do que o AB, além de não serem citotóxicos para a linhagem de células renais (HEK293T).

Dinh ngoc e colaboradores em 2014, sintetizaram derivados a partir do ácido betulínico e da betulina e estes foram testados para avaliar a sua atividade citostática contra leucemia murina (L1210), carcinoma cervical humano (HeLa) e células linfoblásticas humanas tumorais (CEM). Os resultados mostram que alguns derivados do AB têm uma atividade citostática promissora *in vitro*, se tornando um possível agente anticâncer. Vários derivados também foram dotados de atividade antiviral contra o citomegalovírus humano, antiHCMV. Entretanto não foi utilizada nenhuma linhagem de célula normal para avaliar se os derivados eram seletivos ou tóxicos para as células saudáveis. Não podemos comparar os resultados obtidos por Dinh Ngoc e colaboradores (2014), uma vez que ele não comprovou a seletividade de seus derivados e se estes eram tóxicos para as células normais.

Em 2010, Kommera e colaboradores sintetizaram 5 derivados do ácido betulínico e 5 derivados da betulina e testaram esses derivados em 15 linhagens tumorais, além de usarem fibroblastos como suas células normais.

Eles observaram que 4 destes compostos não foram ativos contra as células em estudo mesmo nas maiores concentrações (100µM). Eles chegaram à conclusão que a adição de um grupo fenil, gera derivados com baixa atividade e menos citotóxicos. Isso ocorre devido ao fato de que esse grupamento possui uma estrutura rígida, tornando-os mais pesados, assim, reduzem a capacidade desses derivados de penetrarem na membrana celular. Comparando com o estudo de Kommera, o mesmo pode ter acontecido com algum dos nossos derivados da BE. Durante a semissíntese, grupos rígidos geraram compostos muito pesados e impossibilitado-os de penetrarem na membrana celular. Resultando na falta de atividade citotóxica desses derivados e falta de atividade moduladora contra as citocinas IL-6.

Sendo assim, nossos achados para os derivados do AB divergem com os dados da literatura. Trabalhos como os de Hsu e colaboradores (2013) e Khan e colaboradores (2016) assim como outros pesquisadores, tem demonstrado que as modificações realizadas na estrutura do AB, tem levado a desenvolver derivados mais citotóxicos e mais seletivos para diversas linhagens de células tumorais (Quadro 3).

7 CONCLUSÃO

A estratégia de adicionar grupamentos ésteres e halogênios como o flúor nas posições C-3 e C-28 simultaneamente na BE, afim de gerar derivados com potencial anti-inflamatório foi conquistada. Dos cinco derivados semissintetizados, dois mostraram efeito modulador da citocina pró-inflamatórias INF- γ . Além disso, a BE e os 2 novos derivados foram capazes de modular a expressão proteica de um dos componentes chave do processo inflamatório, a ciclo-oxigenase 2. O derivado 2c na dose de 100 μ M se destaca pela maior inibição de COX-2 do que a droga utilizada na prática clínica a dexametasona.

Quanto à avaliação tumoral dos novos derivados da BE, nenhum se mostrou com atividade citotóxica promissora frente às linhagens de células tumorais avaliadas. Já as modificações realizadas na semissíntese dos derivados do AB fizeram com que esses compostos se tornassem citotóxicos para as células normais (PBMCs) e não fossem seletivos para as células tumorais.

Mais ensaios são necessários para elucidar as vias pela qual os derivados da BE (2a e 2c) exercem os seus efeitos. Este estudo pode contribuir para a concepção e desenvolvimento de compostos anti-inflamatórios com possíveis alvos antitumorais a partir de fontes naturais.

8 REFERÊNCIAS

AGGARWAL, BB; VIJAYALEKSHMI, RV; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and cancer therapy: Short-term friend, long-term enemy. *Clin. Cancer*. v. 15. p. 425-430, 2010.

ALAKURTTI, S. et al. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 29, n. 1, p. 1–13, 2006.

ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: Tumour-associated macrophages: Undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment *Clinical and Experimental Immunology*, 2012.

ANCRILE, B.; LIM, K. H.; COUNTER, C. M. Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes and Development*, v. 21, n. 14, p. 1714–1719, 2007.

BARTON MD. Bevacizumab in neoadjuvant chemotherapy increases the pathological complete response rate in patients with triple-negative breast cancer. *CA: a cancer journal for clinicians* v. 00. p. 4–5 , 2014.

BASKAR, R. et al. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Science*, v. 9, n. 3, p. 193–199, 2012.

BERNARD, P. et al. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: Application to phospholipase A2 inhibitors. *Phytochemistry*, v. 58, n. 6, p. 865–874, 2001.

BORYCZKA et al. synthesis, structure and cytotoxic activity of new acetylenic derivatives of betulin. *Molecules*. v. 18. p. 4526-4543, 2013.

BREIVIK, J. The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. *Seminars in Cancer Biology*. v. 15, p. 51-60, 2005.

BROMBERG, J.; WANG, T. C. Inflammation and Cancer: IL-6 and STAT3 Complete the Link *Cancer Cell*, 2009.

DA SILVA, G. N. S. et al. Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. *Malaria journal*, v. 12, p. 89, 2013.

DALZIEL, M. et al. Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. *Science*, v. 343, n. January, p. 1235681,1 1235681,8, 2014.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

DENARDO, D. G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer metastasis reviews*, v. 29, n. 2, p. 309–16, 2010.

DINH NGOC, T. et al. Synthesis of triterpenoid triazine derivatives from allobetulone and betulonic acid with biological activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 22, n. 13, p. 3292–3300, 2014.

DZUBAK, P. et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural product reports*, v. 23, n. 3, p. 394–411, 2006.

EGBLAD, M.; ROSE, S. Q&A: Mikala Egeblad on tumor microenvironment. *Cancer discovery*, v. 4, n. 5, p. 503, 2014.

EMMERICH, D. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis and studies of anticancer properties of lupane-type triterpenoid derivatives containing a cisplatin fragment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 75, p. 460–466, 2014.

FUERTE, M. B. et al. Type I interferon response and innate immune sensing of cancer *Trends in Immunology*, 2013.

GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis *Cell*, 2008.

GHEORGHEOSU, D. et al. Betulinic acid as a potent and complex antitumor phytochemical: a minireview. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, v. 14, n. 7, p. 936–945, 2014.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer *Cell*, 2010.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, v. 21, n. 3, p. 309–322, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARIZI, H. Epigenetic Regulations of Inflammatory Cyclooxygenase-Derived Prostanoids: Molecular Basis and Pathophysiological Consequences. v. 2015, 2015.

HERZIG, M.; CHRISTOFORI, G. Recent advances in cancer research: Mouse models of tumorigenesis *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 2002.

INGBER, D. E. Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2008.

KUMAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR TIWARI, R. Application of microarray in breast cancer: An overview. *J Pharm Bioallied Sci*, v. 4, n. 1, p. 21–26, 2012.

LAAVOLA, M. et al. Betulin Derivatives Effectively Suppress Inflammation in Vitro and in Vivo. *Journal of Natural Products*, v. 79, p. 274–280, 2016.

MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Current Opinion in Immunology*, v. 22, n. 2, p. 231–237, 2010.

MURANSKI, P. et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*, v. 112, n. 2, p. 362–373, 2008.

PORTA, C. et al. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*, v. 214, n. 9-10, p. 761–777, 2009.

POTZE, L. et al. Betulinic acid-induced mitochondria-dependent cell death is counterbalanced by an autophagic salvage response. *Cell death & disease*, v. 5, n. 4, p. e1169, 2014.

QU, L.; LIU, B. Cyclooxygenase-2 promotes metastasis in osteosarcoma. *Cancer Cell International*, v. 15, n. 1, p. 69, 2015.

RAKHA, E. A; ELLIS, I. O. Breast cancer: updated guideline recommendations for HER2 testing. *Nature reviews. Clinical oncology*, v. 11, n. 1, p. 8–9, 2014.

SCHWITALLA, S. et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*, v. 152, n. 1-2, p. 25–38, 2013.

SIEWERT, B. et al. The chemical and biological potential of C ring modified triterpenoids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 72, p. 84–101, 2014.

SOICA, C. et al. Betulinic Acid in Complex with a Gamma-Cyclodextrin Derivative Decreases Proliferation and in Vivo Tumor Development of Non-Metastatic and Metastatic B164A5 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 5, p. 8235–8255, 2014.

SPANO, D. et al. Molecular networks that regulate cancer metastasis Seminars in Cancer Biology, 2012.

TAKAHASHI, H. et al. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. *Immunology Letters*, v. 98, n. 2, p. 189–193, 2005.

WHO | Cancer.

YADAV, V. R. et al. Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer. *Toxins*, v. 2, n. 10, p. 2428–2466, 2010.

YOGESHWARI, P.; SRIRAM, D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Current medicinal chemistry*, v. 12, n. 6, p. 657–666, 2005.

YORE, M.M. et al. The synthetic triterpenoid 1-[2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole blocks nuclear factor-kappaB activation through direct inhibition of I kappa B kinase beta. *Mol. Cancer Ther.* 5. p. 3232–3239, 2006.

ZALESINSKA et al. The new esters derivatives of betulin and betulinic acid in epidermoid squamous carcinoma treatment – In vitro studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 72. p. 91–97, 2015.

ZHANG, S.-Y. et al. Betulin inhibits pro-inflammatory cytokines expression through activation STAT3 signaling pathway in human cardiac cells. *European review for medical and pharmacological sciences*, v. 19, n. 3, p. 455–60, 2015.

ZHONG, RUI *et al.* The role of hypoxia-inducible factor-1 α in radiation-induced autophagic cell death in breast cancer cells. *Tumor Biology* , 2015.

APÊNDICE 1 - IDENTIFICAÇÃO DO NOVOS DERIVADOS DA BE

3,28-O-acetil betulina (2a)

O composto **2a** foi preparado usando anidrido acético. Obteve-se um pó branco com rendimento de 90%.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.03 (s, 15H, CH_3 -23; CH_3 -24; CH_3 -25; CH_3 -26 e CH_3 -27); 1.06 (m, 1H CH-13); 1.09 (t, 1H, CH-18); 1.12 (t, 2H, CH_2 -1); 1.24 (t, 2H, CH_2 -16); 1.36 (t, 2H, CH_2 -15); 1.39 (m, 4H, CH_2 -2 e CH_2 -21); 1.43 (t, 4H, CH_2 -11 e CH_2 -22); 1.50 (t, 2H, CH_2 -6); 1.51 (m, 2H, CH_2 -12); 1.56 (t, 2H, CH_2 -7); 1.62 (t, 1H, CH-5); 1.79 (br s, 3H, CH_3 -30); 1.84 (m, 2H, CH_2 -2); 1.86 (t, 1H, CH-9); 2.07 (s, 6H, CH_3 -32 e CH_3 -34); 2.44 (ddd, 1H, CH-19); 4.24 (dd, 2H, CH_2 -28); 4.46 (dd, 1H, CH-3); 4.58 (s, 1H, CH-29b); 4.68 (s, 1H, CH-29a).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 16.15 (C-25); 16.48 (C-26 e C-27); 18.15 (C-6); 19.09 (C-34); 20.78 (C-32); 21.06 (C-30); 21.32 (C-11); 25.12 (C-2); 26.90 (C-12); 23.68 (C-23 e C-24); 27.93 (C-15); 29.55 (C-21); 29.71 (C-16 e C-22); 35.53 (C-7); 37.03 (C-10); 37.53 (C-13); 37.77 (C-4); 38.36 (C-1); 40.86 (C-8); 42.66 (C-14); 48.74 (C-19); 46.28 (C-18); 47.69 (C-17); 50.25 (C-9); 55.35 (C-5); 62.78 (C-28); 80.89 (C-3); 109.88 (C-29); 150.09 (C-20); 170.99 (C-31); 171.60 (C-33).

HRMS (ESI-MS, m/z); $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_4\text{Na}$: 549.7793; encontrado: 549.2620. Ponto de fusão: 210-214°C

3,28-O-trifluoracil betulina (2b)

O composto **2b** foi preparado usando o anidrido Bis(trifluoroacético). Um pó branco foi obtido com rendimento de 80%.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 0.83 (t, 2H, CH_2 -16); 0.99 (m, 1H, CH-13); 1.06 (s, 15H, CH_3 -23, CH_3 -24, CH_3 -25, CH_3 -26 e CH_3 -27); 1.08 (t, 1H, CH-18); 1.15 (t, 2H, CH_2 -1); 1.30 (m, 2H, CH_2 -12); 1.33 (t, 2H, CH_2 -15); 1.42 (m, 2H, CH_2 -21); 1.43 (t, 4H, CH_2 -11 e CH_2 -22); 1.45 (t, 2H, CH_2 -6); 1.62 (t, 1H, CH-5); 1.64 (t, 2H, CH_2 -7); 1.78 (br s, 3H, CH_3 -

30); 1.80 (m, 2H, CH₂-2); 1.84 (t, 1H, CH-9); 1.99 (ddd, 1H, CH-19); 4.15 (dd, 2H, CH₂-28); 4.58 (dd, 1H, CH-3); 4.62 (s, 1H, CH-29b); 4.71 (s, 1H, CH-29a).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 15.98 (C-26); 16.14 (C-27); 16.24 (C-25); 18.07 (C-6 e C-30); 19.08 (C-11); 20.77 (C-23 e C-24); 23.25 (C-2); 25.04 (C-12); 26.92 (C-15); 27.77 (C-21); 29.33 (C-16); 34.00 (C-22); 34.21 (C-7); 37.04 (C-10); 37.74 (C-13); 38.07 (C-4); 38.20 (C-1); 40.88 (C-8); 42.74 (C-14); 46.61 (C-18); 47.53 (C-17); 48.76 (C-19); 50.19 (C-9); 55.23 (C-5); 66.84 (C-28); 86.23 (C-3); 110.30 (C-29); 116.05 (C-32); 116.11 (C-34) 149.50 (C-20); 157.74 (C-31); 158.16 (C-33).

HRMS (ESI-MS, m/z); [M-H+2K]⁺ calculado para C₃₄H₄₇F₆O₄K₂: 711.2636; encontrado: 711.3934 . Ponto de fusão: 175-176°C.

3,28-O-dicloroacil betulina (2c)

O composto **2c** foi preparado usando anidrido dicloroacético. Um pó branco foi obtido com rendimento de 85%.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 0.99 (s, 15H, CH₃-23, CH₃-24, CH₃-25, CH₃-26 e CH₃-27); 1.06 (m, 3H, CH-13 e CH₂-16); 1.06 (t, 1H, CH-18); 1.13 (t, 2H, CH₂-1); 1.26 (m, 2H, CH₂-21); 1.30 (t, 2H, CH₂-15); 1.34 (m, 2H, CH₂-11); 1.42 (t, 2H, CH₂-7); 1.45 (m, 4H, CH₂-2 e CH₂-12); 1.51 (t, 2H, CH₂-6); 1.64 (t, 1H, CH-5); 1.74 (t, 2H, CH₂-22); 1.79 (br s, 3H, CH₃-30); 1.81 (t, 1H, CH-9); 2.00 (ddd, 1H, CH-19); 4.07 (dd, 2H, CH₂-28); 4.48 (dd, 1H, CH-3); 4.61 (s, 1H, CH-29b); 4.70 (s, 1H, CH-29a); 5.92 (s, 1H, CH-34); 5.96 (s, 1H, CH-32).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 15.96 (C-25); 16.11 (C-26); 16.32 (C-27); 18.01 (C-6); 19.08 (C-30); 20.74 (C-11); 23.19 (C-23 e C-24); 25.06 (C-2); 26.95 (C-12); 27.80 (C-15); 29.41 (C-21); 29.48 (C-16); 33.98 (C-7 e C-22); 34.29 (C-10); 37.01 (C-13); 37.66 (C-4); 38.21 (C-1); 40.84 (C-8); 42.70 (C-14); 46.75 (C-18); 47.66 (C-17); 48.80 (C-19); 50.17 (C-9); 55.28 (C-5); 64.43 (C-34); 64.78 (C-32); 66.16 (C-28); 80.90 (C-3); 109.08 (C-29); 149.70 (C-20); 164.30 (C-31); 164.96 (C-33).

HRMS (ESI-MS, m/z); $[M+H+2Na]^+$ calculado para $C_{34}H_{51}Cl_4O_4Na_2$: 711.5579; encontrado: 711.4124. Ponto de fusão: 166-170°C.

3,28-O-isobutil betulina (2d)

O composto **2d** foi preparado usando anidrido isobutírico. Obteve-se um pó branco com rendimento de 93%.

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 0.96 (t, 2H, CH_2 -16); 1.02 (s, 15H, CH_3 -23, CH_3 -24, CH_3 -25, CH_3 -26 e CH_3 -27); 1.06 (t, 1H, CH-18); 1.13 (m, 3H, CH_2 -1 e CH-13); 1.17 (d, 12H, CH_3 -33, CH_3 -34, CH_3 -37 e CH_3 -38); 1.38 (t, 4H, CH_2 -15 e CH_2 -21); 1.41 (m, 4H, CH_2 -2 e CH_2 -11); 1.49 (m, 4H, CH_2 -6 e CH_2 -12); 1.57 (t, 2H, CH_2 -7); 1.60 (t, 1H, CH-5); 1.67 (t, 2H, CH_2 -22); 1.79 (br s, 3H, CH_3 -30); 2.42 (m, 1H, CH-36); 2.53 (m, 1H, CH-32); 1.82 (t, 1H, CH-9); 2.03 (ddd, 1H, CH-19); 2.26 (t, 2H, CH_2 -36); 2.38 (t, 2H, CH_2 -32); 4.26 (dd, 2H, CH_2 -28); 4.44 (dd, 1H, CH-3); 4.57 (s, 1H, CH-29b); 4.67 (s, 1H, CH-29a).

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 16.05 (C-25); 16.07 (C-26); 16.59 (C-27); 19.12 (C-33, C-34, C-37 e C-38); 19.25 (C-6); 20.82 (C-11 e C-30); 23.68 (C-23 e C-24); 25.18 (C-2); 26.95 (C-12); 27.96 (C-15); 29.61 (C-21); 29.82 (C-16); 34.12 (C-22); 34.26 (C-36); 34.49 (C-32); 34.57 (C-7); 37.10 (C-10); 37.57 (C-13); 37.97 (C-1 e C-4); 38.36 (C-8); 40.91 (C-14); 42.73 (C-18); 46.57 (C-17); 48.83 (C-19); 50.29 (C-9); 55.39 (C-5); 62.42 (C-28); 80.35 (C-3); 109.88 (C-29); 150.19 (C-20); 176.82 (C-35); 177.52 (C-31).

HRMS (ESI-MS, m/z); $[M-2H+K]^+$ calculado para $C_{38}H_{60}O_4K$: 619.9789; encontrado: 619.3745. Ponto de fusão: 110-112°C.

3,28-O- butanoil betulina (LAFIS136)

O composto **LAFIS136** foi preparado usando anidrido butírico. Obteve-se um pó branco com rendimento de 64%.

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 0.96 (t, 6H, CH_3 -34 e CH_3 -38); 0.99 (s, 15H, CH_3 -23, CH_3 -24, CH_3 -25, CH_3 -26 e CH_3 -27); 1.02 (t, 1H, CH-18); 1.15 (m, 1H CH-13); 1.36 (t, 2H, CH_2 -16); 1.41 (m, 2H, CH_2 -12); 1.49 (t, 2H, CH_2 -6); 1.52 (t, 2H, CH_2 -1); 1.60 (t, 2H, CH_2 -7); 1.61 (t, 1H, CH-5); 1.63 (t, 2H, CH_2 -15); 1.64 (m, 2H, CH_2 -21); 1.67 (t, 2H, CH_2 -

11); 1.70 (t, 2H, CH₂-22); 1.74 (m, 2H, CH₂-37); 1.77 (m, 2H, CH₂-33); 1.78 (br s, 3H, CH₃-30); 1.84 (m, 2H, CH₂-2); 1.98 (t, 1H, CH-9); 2.21 (ddd, 1H, CH-19); 2.26 (t, 2H, CH₂-36); 2.38 (t, 2H, CH₂-32); 4.40 (dd, 3H, CH-3 e CH₂-28); 4.52 (s, 1H, CH-29b); 4.61 (s, 1H, CH-29a).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 13.71 (C-38); 14.72 (C-35); 16.54 (C-25); 18.14 (C-26); 18.53 (C-27); 18.62 (C-33 e C-37); 19.10 (C-6); 20.77 (C-11 e C-30); 23.76 (C-23 e C-24); 25.13 (C-2); 27.93 (C-12); 29.55 (C-15); 29.76 (C-16 e C-21); 34.08 (C-22); 34.56 (C-36); 36.40 (C-32); 36.75 (C-7); 37.03 (C-13); 37.53 (C-10); 37.80 (C-4); 38.34 (C-1); 40.86 (C-8); 42.67 (C-14); 46.37 (C-18); 47.70 (C-17); 48.74 (C-19); 50.24 (C-9); 55.34 (C-5); 62.35 (C-28); 80.55 (C-3); 109.83 (C-29); 150.15 (20); 173.54 (C-31); 174.16 (C-35).

HRMS (ESI-MS, m/z); [M+Na]⁺ calculado para C₃₈H₆₂O₄Na: 605.8563; encontrado: 605.3057. Ponto de fusão: 100-104°C.

APÊNDICE 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTI-INFLAMATÓRIA DOS NOVOS DERIVADOS SEMI-SINTÉTICOS DO ÁCIDO BETULÍNICO E DA BETULINA**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Sayonara Maria Calado Gonçalves, Rua padre carapuceiro 478/ apt:204 – Boa Viagem, CEP: 51020-280 Recife – PE. E-mail: sayonara_123_6@hotmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8346. Também participam também desta pesquisa: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, Prof^a. Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto, Prof^a. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta.

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

A pesquisa tem como objetivo avaliar possíveis mecanismos de ação (maneira como agem) associados aos saberes sobre derivados semissintéticos (produzidos a partir de produtos naturais quimicamente alteradas) a fim de encontrar novas alternativas naturais para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, assim como o tratamento de neoplasias malignas. A coleta será feita no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) em pessoas saudáveis como você e que serão incluídas no grupo controle com um total de 20 voluntários na pesquisa. Serão coletados, no braço, 18 mL de sangue (equivalente a 3 colheres de sopa).

Durante a pesquisa será coletado seu sangue uma única vez onde serão aproveitados os elementos que fazem parte do seu sangue para completar os ensaios laboratoriais. A coleta de sangue pode ser desconfortável, o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o braço do voluntário com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes, orientados para reduzir os riscos. O material coletado será processado para o isolamento das células polimorfonucleares sanguíneas que serão cultivadas e tratadas com os derivados semissintéticos do ácido betulínico e da betulina para os ensaios posteriores. Em caso dano físico ao voluntário pela coleta inadequada, o mesmo será assessorado e devidamente assistido pelos membros da equipe de pesquisa.

Os benefícios incluem o melhor entendimento da ação dos novos derivados semissintéticos do ácido betulínico e da betulina nas doenças inflamatórias e no câncer, bem como a descoberta dos mecanismos de ação dos novos derivados em indivíduos saudáveis como você. Os resultados desta pesquisa poderão contribuir significativamente com uma alternativa terapêutica

minimizando efeitos colaterais e melhorando a qualidade de vida dos pacientes com estas doenças.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (Nome, assinatura e CPF), ficarão armazenados em pastas de arquivo, sob a responsabilidade da pesquisadora Sayonara Maria Calado Gonçalves, no endereço acima informado, pelo período de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

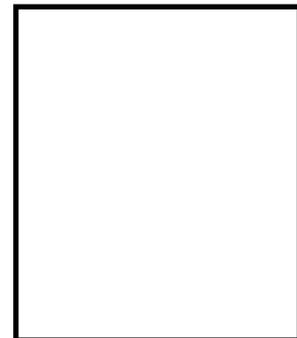
(Assinatura do Pesquisador)

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO
VOLUNTÁRIO (A)**

Eu, _____
_____, CPF _____,

abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo Avaliação da atividade antitumoral e anti-inflamatória dos novos derivados semissintéticos do ácido betulínico e da betulina, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data _____



Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura: