

DERIVADOS OLEANANOS E URSANOS E SUA IMPORTÂNCIA NA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS COM ATIVIDADE ANTITUMORAL, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE

Luciana Dalla Vechia, Simone C. B. Gnoatto e Grace Gosmann*

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre - RS, Brasil

Recebido em 8/2/08; aceito em 10/12/08; publicado na web em 11/5/09

Revisão

OLEANANE AND URSANE DERIVATIVES AND THEIR IMPORTANCE ON THE DISCOVERY OF POTENTIAL ANTITUMOUR, ANTIINFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT DRUGS. Oleanolic and ursolic acids are triterpenes that exist abundantly in the plant kingdom. They show antitumor activity and their cytotoxic activity was already evaluated against a broad range of cell lines. The inhibition of enzymes involved in the metabolism of DNA and the induction of apoptosis are known events that have been related to the antitumor activity of these triterpenes. The antiinflammatory and antioxidant activities also seem to play an important role in their antitumor activity. In this review, it is presented an overview of the importance of the potential antitumor, antiinflammatory and antioxidant activities of these triterpenoid derivatives. Also, we propose a structural-activity relationship to triterpenes containing oleanane or ursane skeleton and their cytotoxic activity.

Keywords: antitumour; oleanane; ursane.

INTRODUÇÃO

No campo da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, a especialidade oncológica tem despertado o interesse de muitos, devido à deficiência de um arsenal terapêutico abrangente e eficaz. O câncer é uma das maiores causas de morte no mundo e, por consequência, tornou-se uma preocupação de saúde pública. Do total de 7,9 milhões de mortes em 2007, 13% foram ocasionadas por doenças neoplásicas.¹ Considerando a situação atual, uma nova alternativa para o tratamento do câncer é urgente, visto que muitas células malignas não respondem à farmacoterapia disponível ou até mesmo desenvolvem resistência a estes agentes.²

Nosso grupo de pesquisa há décadas tem trabalhado na investigação de produtos naturais como fonte de novos fármacos. A partir de estudos com saponinas e agliconas triterpênicas de espécies de *Ilex*, foi possível isolar e purificar diversos compostos, entre esses, o ácido ursólico. Assim, planejamos a síntese de diversos derivados do ácido ursólico visando a atividade antimalárica. Após esforços contínuos, pudemos propor uma relação estrutura-atividade para os derivados sintetizados quanto à atividade antimalárica, como também foi possível estabelecer um provável mecanismo de ação plasmocida através de estudos de dinâmica molecular.³ Sendo assim, nossa trajetória no estudo de triterpenos nos proporcionou uma vasta experiência no estudo desta classe química, assim como, nos estimula a buscar novas potencialidades terapêuticas destes compostos.

É surpreendente a ampla abordagem farmacológica encontrada na literatura para os triterpenos ácido oleanólico (AO) **1**, e seu isômero ácido ursólico (AU) **2** (Figura 1). Os usos tradicionais de plantas contendo AU e AO também são muitos, e podemos citar brevemente o uso como antiinflamatório, hepatoprotetor, analgésico, cardiotônico, sedativo e tônico, sendo muitos destes usos comprovados cientificamente.⁴ Destaca-se, sobretudo, e este é o enfoque desta revisão, a atividade antitumoral exibida por estes dois triterpenos e seus derivados, a qual vem sendo comprovada por trabalhos na área.

Dados preliminares que sustentam o potencial antitumoral destes triterpenos já foram relatados e, neste contexto, podemos citar as inibições da promoção tumoral *in vivo*,⁵ do crescimento tumoral

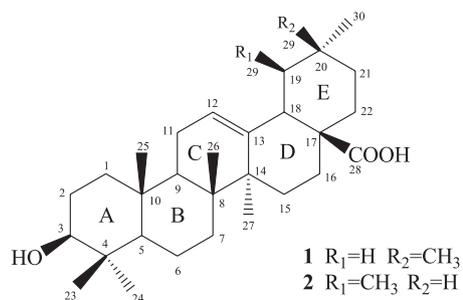


Figura 1. Estrutura química do ácido oleanólico (1) e ácido ursólico (2)

em camundongos com tumores implantados,⁶ da ativação aguda do antígeno do vírus Epstein-Barr⁷ e da angiogênese *in vitro*⁸ e a indução da diferenciação celular,⁹ apresentadas por estes compostos.

Sabe-se que a citotoxicidade de compostos orgânicos é também frequentemente explorada na terapia oncológica. A atividade citotóxica destes triterpenos foi testada frente a uma grande diversidade de linhagens celulares. A Tabela 1 apresenta os valores de IC₅₀ destes triterpenos para as diferentes linhagens estudadas e que estão disponíveis na literatura.¹⁰⁻¹⁷ Estas informações são discutidas ao longo do texto.

Observa-se que AO e AU apresentam potencial atividade antitumoral e os esqueletos oleanano e ursano são interessantes farmacóforos na busca de potenciais agentes terapêuticos. O estudo de substâncias derivadas de plantas, como protótipos, certamente contribui para obtenção de fármacos mais efetivos e menos tóxicos. Dessa maneira, a presente revisão tem por objetivo discutir o conhecimento atual relativo à atividade antitumoral desses triterpenos, apresentando, primeiramente, os mecanismos de ação relatados para estes compostos quanto a esta atividade. Posteriormente, uma relação estrutura-atividade (REA) foi por nós proposta quanto à atividade citotóxica desses triterpenos e seus derivados.

MECANISMOS DE AÇÃO RELACIONADOS COM A ATIVIDADE ANTITUMORAL DE AO E AU

Ao revisarmos o mecanismo de ação antitumoral de triterpenos na literatura, é possível observar que as informações disponíveis

*e-mail: grace.gosmann@ufrgs.br

Tabela 1. Inibição da proliferação celular do AO e AU em diferentes linhagens celulares

Composto	Linhagem Celular	IC ₅₀ (μ M)	Metodologia ^a	Ref.
Ácido oleanólico	L1210 - Leucemia murina	32,3	Trypan Blue, 24 h	10
	HL-60 - Leucemia humana pró-mielocítica	70,6		
	K562 - Leucemia humana mielogênica	>100	Trypan Blue, 24 h	11
	HSC-2 - Carcinoma oral escamoso humano	285	MTT, 24 h	12
	HCT15 - Carcinoma de cólon humano	60	MTT, 72 h	13
Ácido ursólico	L1210 - Leucemia murina	14,6	Trypan Blue, 24 h	10
	HL-60 - Leucemia humana pró-mielocítica	10,9		
	K562 - Leucemia humana mielogênica	~24	Trypan Blue, 24 h	11
	HSC-2 - Carcinoma oral escamoso humano	63,6	MTT, 24 h	12
	HCT15 - Carcinoma de cólon humano	30	MTT, 72 h	13
	M4Beu - Melanoma humano	12,5-15	Trypan Blue, 48 h	14
	PC-3 - Carcinoma de próstata ^b	32,6	MTT, 48 h	15
	LNCap - Carcinoma de próstata ^c	15,7		
	NUGC-3 - Carcinoma estomacal humano	30	MTT, 48h	16
	HepG2 - Carcinoma hepatocelular humano	18	MTT, 48 h	17
R-HepG2 - Carcinoma hepatocelular humano resistente à quimioterapia	15			

^aCorresponde à técnica utilizada para a visualização da viabilidade celular e o número de horas de tratamento com a amostra ; ^bPC-3 - linhagem celular receptor androgênio negativo e glicocorticóide positivo; ^cLNCap - linhagem celular receptor androgênio positivo e glicocorticóide negativo.

ainda são muitas vezes inconsistentes e confusas. Nesta revisão, é apresentado o conhecimento atual sobre o mecanismo de ação antitumoral de AO e AU, de forma estruturada procurando correlacionar os trabalhos disponíveis na literatura. Esta seção foi dividida de forma a contemplar as três principais atividades farmacológicas que estão relacionadas ao mecanismo antitumoral destes triterpenos, ou seja, citotóxica, antiinflamatória e antioxidante.

O papel da atividade citotóxica no contexto da atividade antitumoral de triterpenos

As pesquisas sobre o provável mecanismo de ação envolvido na ação citotóxica destes triterpenos têm avançado muito, no entanto, as informações que se tem a respeito ainda são insuficientes. Na última década surgiram diversos estudos de biologia molecular procurando investigar o alvo primário de ação e as vias de sinalização celulares que são alteradas em células tratadas com estes triterpenos e que, conseqüentemente, culminariam com a morte celular, ou apoptose.

O provável gatilho da “morte celular programada”, ou apoptose, parece ser a inibição de enzimas metabólicas do DNA, no entanto isso não é claramente estabelecido. Independentemente disto, esta abordagem molecular pode ser utilizada como ferramenta na inibição do crescimento tumoral, seja como agente antitumoral ou como adjuvante da terapia antitumoral. Cisplatina, bleomicina (A₂ e B₂), neocarzinostatina e agentes monofuncionais alquilantes do DNA podem ser potencializados com o uso de inibidores de enzimas metabólicas do DNA.¹⁸

Neste contexto, muitos trabalhos surgiram na tentativa de explicar a apoptose mediada por estes triterpenos através da inibição de enzimas importantes nos mecanismos de reparo e replicação celular, como DNA polimerase β ,^{18,19} DNA ligase²⁰ e as topoisomerases I e II.¹⁶ Como foi possível verificar, estes triterpenos inibem as enzimas

metabólicas do DNA inespecificamente, atuando em todo o aparato celular responsável pela manutenção da estabilidade do genoma, afetando negativamente os processos de replicação e reparo celular, podendo levar a célula à morte. Conforme Kim e colaboradores,²¹ o AU seria capaz de inibir o processo inicial de replicação do DNA através da inibição destas enzimas, as quais são fundamentais neste processo, desencadeando um sinal de interrupção do ciclo celular ou apoptose na célula.

A apoptose

Simultaneamente à publicação destas informações sobre a inibição enzimática, surgiram dados na literatura tentando caracterizar o processo apoptótico desencadeado por estes compostos. A apoptose é orquestrada por uma família de cisteína proteases chamadas caspases.²² Duas vias apoptóticas são possíveis. Uma delas, a via extrínseca, ocorre através da ligação de ligantes em seus receptores morte de membrana (ligantes Fas, TNF α e TRAIL), recrutamento de FADD e ativação da caspase-8.²³ A outra via, chamada de via intrínseca ou mitocondrial, envolve a liberação de citocromo *c* da mitocôndria, desencadeada pela proteína Bax, membro pró-apoptótico da família Bcl2. A liberação de citocromo *c* leva à ativação de Apaf-1, uma proteína ATP ou dATP dependente capaz de se ligar à pró-caspase-9, formando um apoptossomo capaz de auto-ativar a caspase-9.²² Tanto a caspase-8 quanto a caspase-9 ativadas desencadeiam a ativação de outras caspases (caspases-3,-6,-7) capazes de clivar substratos celulares levando à apoptose.²²

A partir desse conhecimento, procurou-se caracterizar as mudanças morfológicas ocasionadas na célula causadas pelo tratamento com AU, que apontariam a um processo apoptótico responsável pela citotoxicidade destes compostos. Fragmentação do DNA e ativação da caspase-3, eventos típicos da apoptose foram observados em células leucêmicas, células de carcinoma de próstata, câncer endometrial, hepatocarcinoma e melanoma tratadas com AU.^{10,14,15,21,24, 25} No en-

tanto, a via responsável pela apoptose mediada pelo AU necessitava melhor detalhamento. Achiwa e colaboradores, em 2005, apontaram a via mitocondrial como responsável pela apoptose em células pré-apoptóticas de câncer endometrial tratadas com AU, pois demonstraram um aumento na liberação de citocromo *c*, enquanto que os níveis da proteína Bcl2 estavam diminuídos.²⁴ Resultados semelhantes foram encontrados em células pré-apoptóticas de melanoma que apresentaram colapso da membrana mitocondrial e alteração do balanço Bax/Bcl2, e em células pré-apoptóticas de carcinoma de próstata que apresentaram diminuição do nível de proteínas Bcl2.^{14,15} Porém, em outros estudos, é relatada a passagem pela via extrínseca, como foi observado em células pré-apoptóticas de carcinoma de pulmão, as quais apresentaram um aumento na expressão de receptores Fas e no nível de ligantes Fas.²⁶

Observa-se, desta maneira, que não há unanimidade na literatura quanto a via responsável pela apoptose desencadeada pelo AU. É importante lembrar que há a possibilidade de que ambas as vias estejam sendo desencadeadas levando a célula à morte, ou mesmo que, em diferentes linhagens celulares, o mecanismo apoptótico possa seguir rumos diferentes.

Modulação da expressão genética

Seguindo outro raciocínio, houve trabalhos em relação à modulação da expressão genética em células tratadas com AU. Sabe-se que em células neoplásicas existe um desbalanceamento na expressão de genes responsáveis pela regulação de processos como morte celular, sobrevivência, mitose celular, entre outros. Por isso, a investigação de como a célula se comporta quanto à expressão destes genes em células tratadas com AU pode dar um indício de como ele provoca apoptose celular. Estudos considerando o gene p53, PTEN e o fator de transcrição NF- κ B são apresentados a seguir.

O gene p53, gene supressor tumoral, codifica o fator de transcrição p53, que é ativado para promover transcrição de genes alvo quando ocorre surgimento de DNA alterado, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos.²⁷ AU demonstrou ser capaz de ativar o fator de transcrição p53 em queratinócitos,²⁸ e induzir a expressão de p53 em células de câncer de pulmão.²⁶ PTEN também é um gene supressor tumoral, capaz de bloquear a progressão das células a partir da fase G-1, induzir a apoptose e modular negativamente a via de sinalização PI3K/Akt (fosfatidilinositol 3-cinase) e MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno). O nível das proteínas das vias PI3K/Akt e MAPK foi medido em células de câncer endometrial tratadas com AU e foi observada diminuição bastante significativa do nível das proteínas em relação ao controle.²⁹

Quanto à modulação de NF- κ B, existem alguns aspectos relevantes que devem ser abordados previamente. NF- κ B é um fator de transcrição que está envolvido na expressão de genes relacionados com a tumoração e que pode ser ativado por diversos estímulos, como carcinógenos, agentes inflamatórios, promotores tumorais como fumaça de cigarro, ésteres de forbóis, ácido ocaico, H₂O₂ e TNF (fator de necrose tumoral). A manutenção de um nível apropriado da ativação de NF- κ B é essencial para a célula; no entanto, a ativação constitutiva deste fator de transcrição está relacionada a diversos tipos de câncer.^{30,31} A interferência na ativação deste fator de transcrição em células tratadas com AU foi avaliada por Sishodia e colaboradores, em 2003, os quais demonstraram que o AU inibe a fosforilação de subunidades do NF- κ B necessária para torná-lo ativo, em células leucêmicas. Os autores propõem que o AU esteja inibindo a ativação de NF- κ B através de múltipla inibição de proteínas cinases responsáveis pela fosforilação destas subunidades, no entanto, isto ainda não foi comprovado.³⁰

Como pode ser verificado, muitos estudos foram realizados com o intuito de desvendar o processo citotóxico desencadeado por estes

triterpenos, sobretudo estudos realizados com o AU. No entanto, ainda não se tem uma visão clara a respeito da sequência correta de eventos moleculares desencadeados na célula que culminariam na morte celular. A inibição de enzimas metabólicas do DNA pode ser o gatilho inicial para a indução da apoptose, contudo, são poucos os estudos que afirmam indubitavelmente esta hipótese. Apesar disto, sabe-se que ocorre apoptose em células tratadas com estes triterpenos, que há aumento do nível de ativação das caspases e que há interferência em reguladores centrais de mecanismos de desenvolvimento, proliferação e morte celular, como é o caso de p53, da via PI3K/Akt, da via MAPK e do NF- κ B. Sendo assim, a continuação desses estudos provavelmente levará à descoberta completa deste mecanismo de ação responsável pela atividade citotóxica destes triterpenos nos próximos anos.

O papel da atividade antiinflamatória no contexto da atividade antitumoral de triterpenos

A inflamação crônica é associada com uma alta incidência de câncer. O processo inflamatório é geralmente acompanhado de estresse oxidativo, responsável por gerar mutações progressivas levando ao desenvolvimento tumoral. O AU e outros triterpenóides comuns em plantas são muito bem conhecidos por sua atividade antiinflamatória e, sendo assim, é possível que a atividade antitumoral dos mesmos também esteja relacionada às suas propriedades antiinflamatórias.³²

Enzimas como iNOS e COX-2 estão envolvidas na inflamação, tendo papel importante na resposta dos tecidos ao dano e a agentes infecciosos.³³ Apesar da atividade fisiológica destas enzimas ser benéfica ao organismo, a excessiva expressão delas implica na patogenia de muitas doenças. Agentes que possam inibir a expressão ou a atividade destas enzimas geralmente induzidas por citocinas inflamatórias são potenciais agentes antiinflamatórios e quimiopreventivos. Este último termo é entendido como agentes que possam prevenir a progressão de lesões pré-malignas a lesões malignas.³⁴

Desta maneira, triterpenos sintéticos derivados do AO e AU (compostos **3** e **4**, Figura 2) foram testados quanto à modulação dos níveis das enzimas iNOS e COX-2 em macrófagos de camundongos ativados por citocinas inflamatórias. O resultado foi uma diminuição na taxa de transcrição destas duas enzimas que foi relacionado com a supressão do fator de transcrição NF- κ B, crítico para a indução de enzimas como iNOS e COX-2.³⁴ Ressaltamos que a inibição da ativação de NF- κ B por estes triterpenos é abordada tanto no contexto da atividade citotóxica quanto antiinflamatória. Isto ocorre devido à ampla influência deste fator de transcrição em diversos processos celulares, leia-se aqui processos regulatórios do ciclo celular e processos inflamatórios.

Este modelo experimental foi utilizado por Honda e colaboradores para avaliar a atividade antiinflamatória e quimiopreventiva de diversos outros derivados sintéticos oleanano e ursano.³⁵ Utilizando macrófagos de camundongos induzidos por citocinas inflamatórias, mediu-se o potencial antiinflamatório através da capacidade de diminuição da produção de óxido nítrico, a qual está relacionada à diminuição da expressão da enzima iNOS.

Dentre os derivados sintetizados por Honda e colaboradores, os compostos **5**, **6**, **7** e **8** (Figura 2) demonstraram ser altamente ativos para a inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos ativado por IFN- γ . Os valores de IC₅₀ observados para estes compostos quanto à inibição da produção de óxido nítrico em camundongos ativado por IFN- γ foram de 0,0002 e 0,0001 μ M, 0,0035 e 0,014 nM, respectivamente. O composto **5**, sobretudo, (abreviado em inglês por CDDO, ácido 2-ciano-3,12-dioxolean-1,9(11)-dien-28-óico) foi também avaliado quanto à sua atividade citotóxica³⁶ apresentando resultados

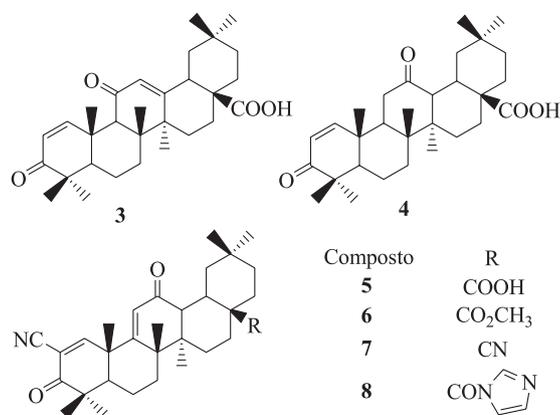


Figura 2. Estrutura química dos compostos sintéticos 3-8

promissores, sendo apontado como candidato a fármaco antitumoral. Atualmente o composto **5** está sendo submetido a estudos clínicos de fase 1 para o tratamento de leucemia e tumores sólidos.³⁷

Nota-se, desta maneira, que a atividade antiinflamatória está intimamente relacionada à atividade quimiopreventiva e antitumoral. Representando isto, está o composto **5**, um composto multifuncional, que é capaz de agir em diversas vias moleculares celulares para exercer sua atividade.³⁷ Sabe-se, hoje, que além da inibição da ativação do fator de transcrição NF- κ B e seu mecanismo antiinflamatório, o composto **5** também é capaz de induzir a diferenciação celular³⁸ e a apoptose³⁹ e inibir a invasão por células tumorais.⁴⁰

O papel da atividade antioxidante no contexto da atividade antitumoral de triterpenos

A atividade antioxidante, assim como a atividade antiinflamatória, também está relacionada às atividades antitumoral e quimiopreventiva pois, como apresentado anteriormente, o estresse oxidativo, ou seja, a produção de radicais livres, pode causar dano ao DNA provocando, assim, mutações que podem ser permanentes e, muitas vezes, levar à malignidade.⁴¹ Embora referenciado como responsável pela atividade antitumoral em alguns trabalhos, esta abordagem é menos utilizada que as anteriores. Apresentaremos a seguir dois trabalhos representativos que apontam o processo antioxidante como mecanismo quimiopreventivo e antitumoral.

Chen e colaboradores, em 2002, relacionaram o potencial quimiopreventivo do AU à capacidade de inibir a geração de superóxido em leucócitos sob estresse oxidativo induzido.⁴² Esta atividade antioxidante poderia estar relacionada também à atividade antitumoral, como apontaram mais recentemente Ovesná e colaboradores.¹¹ Segundo estes autores, AO e AU são capazes de inibir as quebras na fita de DNA induzidas por peróxido de hidrogênio em células leucêmicas, e este seria um indício do mecanismo responsável pela atividade antileucêmica destes triterpenos.

PROPOSTA DE RELAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE TRITERPENOS E SUA ATIVIDADE CITOTÓXICA (REA)

O estudo da REA de compostos orgânicos é considerado, atualmente, uma ferramenta fundamental no planejamento de novos protótipos de fármacos. Com este intuito, nesta seção abordaremos a relação estrutura-atividade (REA) de compostos triterpênicos com esqueleto oleanano e ursano quanto à sua atividade citotóxica. Utilizamos dados disponíveis na literatura para a construção desta proposta de REA, considerada inédita para estes compostos quanto à atividade citotóxica. Tanto compostos naturais como sintéticos que

preservem o esqueleto ursano e oleanano foram avaliados neste estudo, de acordo com a diversidade química disponível na literatura. Como apresentado anteriormente, o mecanismo de ação antitumoral destes compostos é ainda pobremente conhecido. Sabe-se apenas que as atividades citotóxica, antiinflamatória e antioxidante contribuem para este mecanismo de alguma forma, mas a maneira como isto ocorre não é, ainda, suficientemente clara. Desta maneira, discutiremos uma REA focada na atividade citotóxica destes compostos, devido a uma maior diversidade de estudos nesta área. É importante salientarmos que ainda não foi identificado um alvo primário destes triterpenos na célula; sendo assim, o estudo da REA quanto à atividade citotóxica ficará restringido apenas aos dados biológicos de inibição da proliferação celular de células tumorais. Apesar de que a resposta citotóxica obtida para triterpenos do tipo oleanano e ursano é muito dependente do tipo de célula em ensaio, abordaremos as características moleculares gerais que são importantes para essa atividade citotóxica.

Iniciaremos a discussão desta REA através da comparação de potência entre AO e AU, de acordo com os dados da Tabela 1. Segundo os valores de IC₅₀ para a inibição da proliferação celular observa-se, de maneira geral, que AU é mais potente que seu isômero AO, embora o contrário seja observado em algumas linhagens celulares. Desta maneira, podemos afirmar que o esqueleto ursano é mais potente que o esqueleto oleanano quanto à atividade citotóxica.

Revisando a literatura, outras informações importantes podem ser reunidas e discutidas. O estudo de Ma e colaboradores, em 2005, avaliou além do AU alguns derivados naturais e sintéticos deste. Os compostos que são discutidos nesta revisão estão apresentados na Figura 3 e os dados biológicos encontram-se na Tabela 2. De acordo com a avaliação da citotoxicidade destes compostos, podem ser levantadas as seguintes informações: o composto **9**, que possui hidroxila em C-3 com configuração α e hidroxila em C-19, não apresentou citotoxicidade e o composto **10**, que apresenta um grupamento hidroximetila em C-17, também não apresentou citotoxicidade; a presença de acetila em C-3 e metil-éster em C-28, como no composto **11**, resultou em perda da citotoxicidade; os derivados hidroximino em C-3 (compostos **12** e **13**) apresentaram citotoxicidade nas quatro linhagens celulares, respectivamente; dentre os isômeros 3-amino, a configuração 3β (composto **14**) foi 20 vezes mais potente que a 3α (composto **15**) e, os compostos **16** e **17**, com grupamento aminoalquila na posição 28, apresentaram alta citotoxicidade contra as três linhagens celulares testadas.⁴³

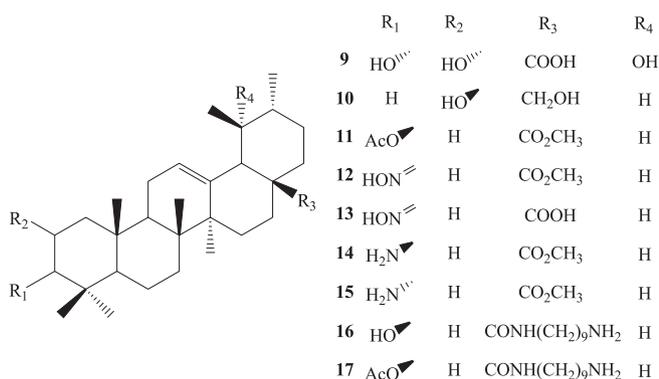
A partir dos dados obtidos neste estudo⁴³ propomos algumas conclusões a respeito da REA que são relevantes e que podem ser sustentadas por outros estudos na área, como será apresentado posteriormente. Um grupamento doador de ligação de hidrogênio na posição 3 ou na posição 28 é essencial para a atividade citotóxica, pois o composto **11** não apresenta atividade significativa; a carbonila na posição 17 é necessária para a atividade citotóxica, pois o composto **10** não mostrou atividade citotóxica significativa mesmo havendo um grupamento doador de hidrogênios em C-3; a configuração do grupamento ligado ao C-3 é importante para a atividade, pois o composto **9** (configuração alfa) não apresentou atividade significativa, enquanto que o composto **14** (configuração beta) foi muito mais ativo que o composto **15** (configuração alfa); também a presença de grupamento amina tanto em C-3 como em C-28 aumenta significativamente a atividade citotóxica (os compostos **14**, **16** e **17** são os mais ativos).⁴³

Dentre os compostos sintetizados por Ma e colaboradores, o composto **14**, que apresenta um substituinte amina primária em C-3, foi o mais ativo, apresentando atividade citotóxica significativa frente às quatro linhagens de células testadas no estudo. Os compostos **16** e **17**, com grupamento amina em C-28, também apresentaram atividade citotóxica importante nas linhagens celulares em que foram testados.⁴³ Por conseguinte, observa-se que estes compostos altamente ativos têm

Tabela 2. Citotoxicidade de AO, AU e seus derivados em diferentes linhagens celulares

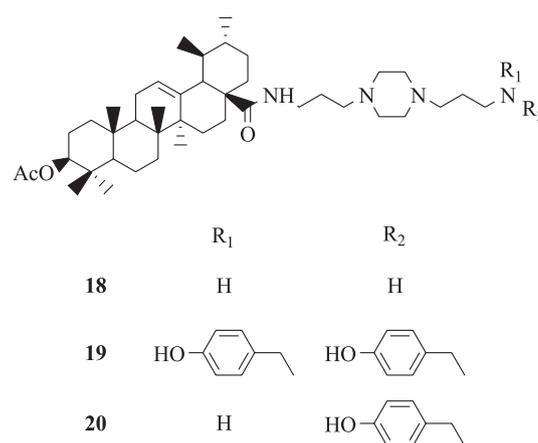
Composto	Linhagem Celular – IC ₅₀ (µM)				Ref.	Composto	Linhagem Celular – IC ₅₀ (µM)	Ref.
	<i>HL-60</i>	<i>BGC</i>	<i>Bel-7402</i>	<i>HeLa</i>			<i>SK-MEL</i>	
AU	157,9	117,8	98,7	108,3		31c	380	
9	>200	>200	>200	>200		32a	378	
10	>200	>200	>200	>200		32b	333	
11	>200	>200	>200	>200		32c	484	
12	113,9	113,9	81,4	107	43	33	INATIVO	46
13	183,2	147,7	120,3	133,4		34	155	
14	4,27	5,34	3,6	5,1		35a	180	
15	169,9	>200	84,6	117,9		35b	166	
	<i>HL-60</i>	<i>BGC</i>	<i>MDA-MB-435</i>			35c	200	
16	8,4	50,5	13,5			<i>NRP.152</i>		
17	7,9	55	149,4		AO	>5,0		
	<i>HSC-2</i>	<i>HSG</i>			AU	>5,0		
AU	63,6	105,3			36	>5,0		
AO	285,1	504,4			37	>5,0		
25	21,2	25,4		12	38	3,8		
26	44,5	55,1			39	>5,0	47	
27	43	51,2			40	>5,0		
28	209,9	304,5			41	>5,0		
29, 30	34,7	47,3			42	1,5		
	<i>SK-MEL</i>			43	2,4			
AO	112			46	44	0,7		
31a	380				45	0,3		
31b	269							

HL-60 – Leucemia humana pró-mielocítica; BGC-823 – Câncer gástrico humano; Bel-7402 – Carcinoma hepatocelular humano; HeLa – Câncer cervical humano; MDA-MB-435- Câncer de mama humano; HSC-2 - Carcinoma oral escamoso; HSG – Tumor de glândula salivária; SK-MEL – Melanoma maligno humano; NRP.152 – Células de próstata

**Figura 3.** Estrutura química dos compostos 9-17

em comum a presença de grupamentos substituintes nitrogenados em C-3 ou em C-28.

A importância de grupamentos substituintes aminados ligados à molécula de AU também é relatada quanto à atividade antimalárica. Em trabalho desenvolvido por nosso grupo, os derivados *N*-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-*O*-acetilursolamida apresentaram potência muito mais acentuada que seu protótipo ácido 3-*O*-acetilursólico, quando testados frente à cepa de *Plasmodium falciparum* FcB1 (resistente à cloroquina). Os compostos mais ativos desta nova classe **18**, **19**, e **20** (Figura 4) apresentaram IC₅₀ de 170, 160 e 78 nM, respectivamente, enquanto o ácido 3-*O*-acetilursólico apresentou IC₅₀ igual a 24,93 µM e a cloroquina apresentou IC₅₀ igual a 0,13 µM.³

**Figura 4.** Estrutura química dos compostos 18-20

É possível traçar um paralelo entre os dados obtidos a partir do estudo de Ma e colaboradores⁴³ e o estudo de Gnoatto e colaboradores,³ que avalia a atividade antimalárica de derivados do AU. Comparando-se as estruturas dos compostos com substituinte amina **18-20**, avaliados quanto à atividade antimalárica, com a estrutura dos compostos com substituinte amina **14**, **16** e **17**, avaliados quanto à atividade antitumoral, verifica-se que esses compostos apresentam grupamentos doadores de ligação de hidrogênio em C-28. Também, o composto **14**, o mais ativo da série, apresenta um grupo doador de

ligação de hidrogênio na posição 3. Esses resultados indicam que grupamentos doadores de ligação de hidrogênio, como as aminas, potencializam a atividade antitumoral assim como a atividade antimalárica.

Ao avaliarmos o estudo de Sun e colaboradores, outra relação entre a estrutura e a atividade pode ser estabelecida. Segundo estes autores, o ácido 3 β -hidróxi-olean-12-en-27-óico (**21**) e o ácido 3 β -hidróxi-urs-12-en-27-óico (**22**) (Figura 5) quando testados frente à linhagem celular de carcinoma cervical escamoso (Hela) foram extremamente mais ativos (IC_{50} = 8,6 e 8,9 μ M, respectivamente) que o AO (IC_{50} >220 μ M), tendo potência similar ao fármaco cisplatina (IC_{50} = 6,9 μ M). Esses dois compostos diferem do AO e do AU pela posição da carboxila que, no caso dos compostos **21** e **22**, se encontra em C-14 e não em C-17. Sendo assim, de acordo com esse estudo, a posição da carboxila desses triterpenos afeta significativamente a atividade citotóxica, pois o composto **21** é cerca de 15 vezes mais ativo que seu análogo AO.⁴⁴

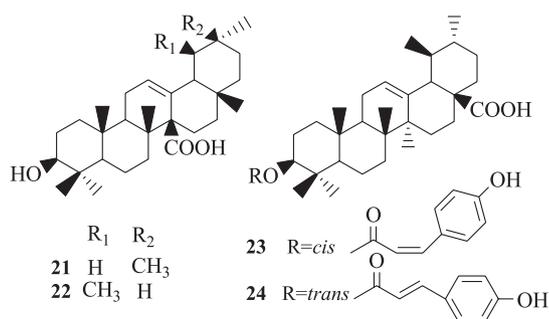


Figura 5. Estrutura química dos compostos 21-24

Quanto à esterificação da posição 3 do esqueleto triterpênico em derivados do AU, há dois estudos disponíveis na literatura.^{32,45} No estudo de Murphy e colaboradores, ésteres 3-hidróxi-cinâmicos, como os compostos **23** e **24** (Figura 5), demonstraram ser mais citotóxicos que o AU (IC_{50} entre 93 a 230 μ M), e ainda, o isômero *cis* (composto **23**, *cis*-3-*O*-*p*-hidroxicinamoil-ursólico) demonstrou ser mais potente (IC_{50} entre 18 a 46 μ M) que o isômero *trans* (composto **24**, *trans*-3-*O*-*p*-hidróxi-cinamoil-ursólico, IC_{50} entre 25 a 100 μ M).³² É importante salientar que apesar de os derivados serem esterificados, a posição 3 não perdeu a presença de um grupamento doador de ligação de hidrogênio, visto que o grupamento hidróxi-cinamoil apresenta uma hidroxila livre. Note que estes resultados corroboram com os dados obtidos por Ma e colaboradores⁴³ e Gnoatto e colaboradores.³

Taniguchi e colaboradores¹² avaliaram a atividade citotóxica de triterpenos naturais frente a algumas linhagens celulares. Dentre esses triterpenos estavam AO (**1**), AU (**2**), ácido 2 α ,3 β -diidróxi-ursólico (**25**), ácido maslínico (**26**), ácido tormêntico (**27**), ácido 2 α ,19 α -diidróxi-3-oxo-urs-12-en-28-óico (**28**), ácido 3-*O*-*cis*-*p*-cumaroil-tormêntico (**29**) e ácido 3-*O*-*trans*-*p*-cumaroil-tormêntico (**30**) (Figura 6, Tabela 2). Para carcinoma oral escamoso (HSC-2), os compostos hidroxilados, como **25**, **26** e **27** e os ésteres hidróxi-cinâmicos **29** e **30**, mostraram atividade citotóxica maior que AU, **28** e AO. Esse estudo aponta para a importância da presença de hidroxila em C-3 (**28** vs. **25** e AU) e do esqueleto ursano (**25** vs. **26** e AU vs. AO) para a atividade citotóxica de triterpenos.

Outro comportamento pode ser observado no estudo de Taniguchi e colaboradores¹² em relação à configuração da hidroxila em C-3. O composto **27** (Figura 6), com hidroxila em beta, foi citotóxico apresentando IC_{50} entre 43-51,2 μ M nas linhagens celulares testadas, enquanto o composto **9** (Figura 3), com hidroxila em alfa, foi inativo em doses de até 200 μ M nas linhagens celulares testadas. Estes resultados reafirmam a tendência de que compostos com substituintes

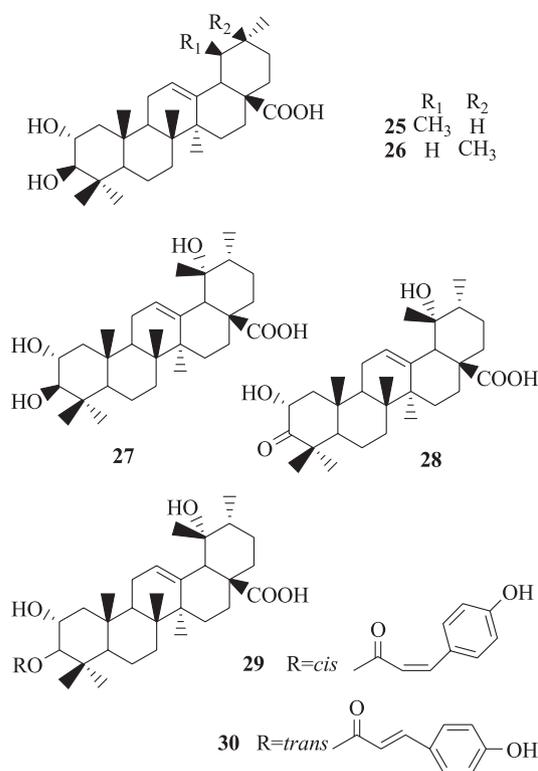


Figura 6. Estrutura química dos compostos 25-30

em C-3 com configuração beta são mais ativos que compostos com substituintes em C-3 com configuração alfa.

Outro estudo verificou a importância do esqueleto oleanano para a atividade citotóxica. Análogos de AO (compostos **31-35**, Figura 7) foram sintetizados,⁴⁶ sendo que somente os anéis A e B foram mantidos e vários grupamentos foram ligados à molécula através de um substituinte estireno ou benzila. A atividade citotóxica desses compostos foi avaliada utilizando-se células de melanoma maligno humano (SK-MEL) (Tabela 2). Os compostos sintetizados foram menos potentes que AO. Apesar de não haver, nesse estudo, diversidade estrutural suficientemente ampla, é possível observar que grupamentos polares, como carboxila ou ciano, mimetizando a carboxila em C-28 do AO, originaram compostos com atividade próxima à do AO (**34** é o composto mais ativo) que análogos com grupos menos polares como éster metílico (**33** é inativo), realçando a importância de um grupamento polar nessa posição.⁴⁶

Para concluir, apresentamos o estudo de Finlay e colaboradores.⁴⁷ Este estudo avaliou a atividade citotóxica de compostos sintéticos obtidos a partir do AO e do AU (compostos **36-45**, Figura 8), os quais possuem modificações na posição 3, como oxidação da hidroxila desta posição e clivagem do ciclo A. A atividade citotóxica dos compostos foi avaliada frente à linhagem celular NRP.152 (Tabela 2) e os resultados principais demonstraram que os derivados ursano e oleanano têm atividade similar (**36** e **37**, **38** e **39**, **40** e **41**, **42** e **43** e **44** e **45**), e os derivados com grupos aldeído (**42** e **43**) e amina (**44** e **45**) apresentam atividade bastante significativa (0,3-2,4 μ M). Neste estudo, como discutido anteriormente, foi observado também que compostos com grupamentos doadores de hidrogênio (tipo aminas), como **44** e **45**, têm sua atividade citotóxica potencializada.

Reunindo todos os dados de estudos a respeito da atividade citotóxica de triterpenos do tipo oleanano e ursano apresentados, e considerando as tendências gerais observadas, podemos organizar uma proposta de REA. Quanto à posição 3, observamos que a configuração β do substituinte ligado ao carbono C-3 é necessária

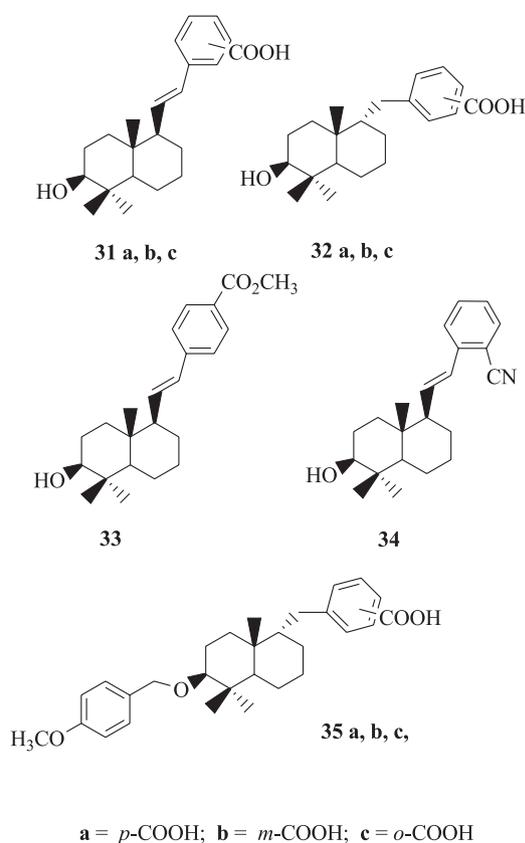


Figura 7. Estrutura química dos compostos 31-35

para atividade; observa-se também que substituintes do tipo amina nesta posição aumentam significativamente a atividade assim como a esterificação com grupamento hidroxicinâmico. Quanto ao ciclo A, nota-se que a clivagem deste ciclo leva a um aumento da atividade, sobretudo quando houver substituinte amina. Quanto ao substituinte em C-17 observa-se que grupamento hidroximetila diminui a ati-

Quadro 1. REA para triterpenos do tipo oleanano e ursano quanto à sua atividade citotóxica.

<p>Substituinte em C-3:</p> <ul style="list-style-type: none"> • a configuração beta do substituinte é necessária para atividade; • grupamento amina aumenta significativamente a atividade; • esterificação com grupamento hidroxicinâmico aumenta a atividade. 	<p>Substituinte em C-17:</p> <ul style="list-style-type: none"> • grupamento hidroximetila diminui a atividade; • grupamentos aminoalquila em C-28 levam a compostos altamente citotóxicos
<p>A clivagem do ciclo A aumenta a atividade citotóxica se houver substituinte amina.</p>	<p>A transferência da carboxila do C-17 para o C-14 leva ao aumento da atividade.</p>
<p>1 R₁=H R₂=CH₃ 2 R₁=CH₃ R₂=H</p>	
<p>Características gerais:</p> <ul style="list-style-type: none"> • presença de doador de ligação de hidrogênio em C-3 ou C-28 aumenta a atividade; • hidroxilação da estrutura aumenta a atividade; • o esqueleto oleanano completo parecer ser necessário para a atividade; • o esqueleto ursano é mais potente do que o oleanano. 	

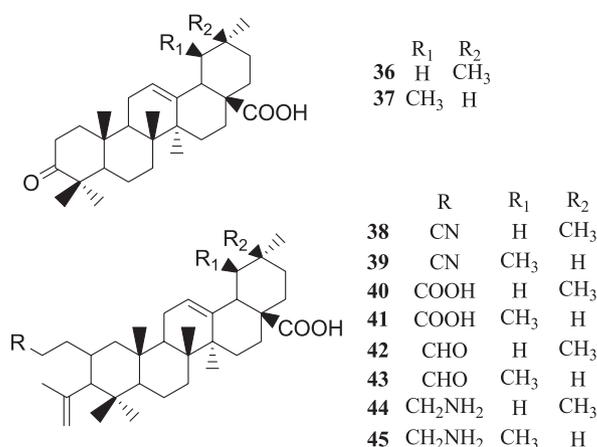


Figura 8. Estrutura química dos compostos 36-45

dade, e que grupamentos aminoalquila em C-28 levam a compostos altamente citotóxicos. A transferência da carboxila da posição 17 para a posição 14 também leva a um aumento da atividade. Quanto às características gerais da molécula pode-se estabelecer a seguinte REA: presença de doador de ligação de hidrogênio em C-3 ou C-28 aumenta a atividade; hidroxilação da estrutura aumenta a atividade; o esqueleto oleanano completo parecer ser necessário para a atividade e, o esqueleto ursano é mais potente que o oleanano. A REA proposta encontra-se sumarizada no Quadro 1.

CONCLUSÕES

Concluimos que, apesar da grande quantidade de estudos a respeito da atividade antitumoral, antiinflamatória e antioxidante de triterpenos do tipo oleanano e ursano, muito ainda precisa ser desvendado. Os mecanismos de ação envolvidos nessa atividade antitumoral estão relacionados com inibição de enzimas metabólicas do DNA, indução da apoptose, interferência com o p53, vias de sinalização PI3K/Akt e MAPK e interferência com o fator de transcrição NF-κB. No entanto, faltam estudos que correlacionem todos estes eventos e

que apontem indubitavelmente como ocorre o processo antitumoral na célula desencadeado por esses triterpenos. Esse conhecimento será fundamental na formulação de estratégias para o planejamento de novos fármacos.

Em relação à REA, utilizamos dados disponíveis na literatura para a construção desta proposta de REA que é considerada inédita para estes compostos quanto à atividade citotóxica. Foi possível propor algumas características moleculares importantes desses triterpenos para a atividade citotóxica. Da mesma forma, novas portas serão abertas neste campo à medida que a partir da REA proposta novos análogos podem ser racionalmente sintetizados. Dá-se destaque aos derivados aminados, que apresentaram alta atividade citotóxica quando comparados aos outros análogos. E, principalmente, destacamos o agente multifuncional, CDDO, apresentado como um potente agente antiinflamatório, quimiopreventivo e antitumoral que se encontra atualmente em estudos clínicos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES e PROPESQ/UFRGS pelas bolsas e suporte financeiro. Aos Profs. MSc. A. R. Zimmer (PUCRS) e Dr. H. Verli (UFRGS) pelos comentários e sugestões para a monografia de conclusão da disciplina de Estágio Curricular em Farmácia de L. Dalla Vechia, que foi a base deste artigo de revisão.

REFERÊNCIAS

1. <http://www.who.int/cancer/en/>, acessada em Abril 2009.
2. Gosttesman, M. M.; *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615.
3. Gnoatto, S. C. B.; Susplugas, S.; Dalla Vechia, L.; Ferreira, T. B.; Dassonville-Klimpt, A.; Zimmer, K. R.; Damailly, C.; Da Nascimento, S.; Guillon, J.; Grellier, P.; Verli, H.; Gosmann, G.; Sonnet, P.; *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 771.
4. Liu, J.; *J. Ethnopharmacol.* **1995**, *49*, 57; Mahato, S. B.; Garai, S. Em *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Herz, W.; Kirby, G. W.; Moore, R. E.; Steglich, W.; Tamm, Ch., eds.; Springer: Wien, 1998, p. 1-196; Liu, J.; *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 92.
5. Oguro, T.; Liu, J.; Klaassen, C. D.; Yoshida, T.; *Toxicol. Sci.* **1998**, *45*, 88; Huang, M. T.; Ho, C. T.; Wang, Z. Y.; Ferraro, T.; Lou, Y. R.; Stauber, K.; Ma, W.; Georgiadis, C.; Laskin, J. D.; Conney, A. H.; *Cancer Res.* **1994**, *54*, 701.
6. Hsu, H. Y.; Yang, J. J.; Lin, C. C.; *Cancer Lett.* **1997**, *111*, 7.
7. Banno, N.; Akihisa, T.; Tokuda, H.; Yasukawa, K.; Taguchi, Y.; Akazawa, H.; Ukiya, M.; Kimura, Y.; Suzuki, T.; Nishino, H.; *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1995.
8. Sohn, K. H.; Lee, H. Y.; Chung, H. Y.; Young, H. S.; Yi, S. Y.; Kim, K. W.; *Cancer Lett.* **1995**, *94*, 213.
9. Lee, H. Y.; Chung, H. Y.; Kim, K. H.; Lee, J. J.; Kim, K. W.; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1994**, *120*, 513.
10. Cipak, L.; Grausova, L.; Miadokova, E.; Novotny, L.; Rauko, P.; *Arch. Toxicol.* **2006**, *80*, 429.
11. Ovesná, Z.; Kozics, K.; Slamenová, D.; *Mutat. Res.* **2006**, *600*, 131.
12. Taniguchi, S.; Imayoshi, Y.; Kobayashi, E.; Takamatsu, Y.; Ito, H.; Hatano, T.; Sakagami, H.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Sugita, D.; Shimura, S.; Yoshida, T.; *Phytochemistry* **2002**, *59*, 315.
13. Li, J.; Guo, W. J.; Yang, Q. Y.; *World J. Gastroenterol.* **2002**, *8*, 493.
14. Harmand, P. O.; Duval, R.; Delage, C.; Simon, A.; *Int. J. Cancer* **2005**, *114*, 1.
15. Kassi, E.; Papoutsis, Z.; Pratsinis, H.; Aligiannis, N.; Manoussakis, M.; Moutsatsou, P.; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2007**, *133*, 493.
16. Mizushima, Y.; Iida, A.; Ohta, K.; Sugawara F.; Sakaguchi, K.; *Biochem. J.* **2000**, *350*, 757.
17. Tian, Z.; Lin, G.; Zheng, R. X.; Huang, F.; Yang, M. S.; Xiao, P. G.; *World J. Gastroenterol.* **2006**, *12*, 874.
18. Deng, J. Z.; Starck, S. R.; Hecht, S. M.; *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1624.
19. Chaturvedula, P. V. S.; Gao, Z.; Hecht, S. M.; Jones, S. H.; Kingston, D. G. I.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1463.
20. Tan, G. T.; Lee, S.; Lee, I. S.; Chen, J.; Leitner, P.; Besterman, J. M.; Kinghorn, A. D.; Pezzuto, J. M.; *Biochem. J.* **1996**, *314*, 993.
21. Kim, D. K.; Baek, J. H.; Kang, C. M.; Yoo, M. A.; Sung, J. W.; Chung, H. Y.; Kim, N. D.; Choi, Y. H.; Lee, S. H.; Kim, K. W.; *Int. J. Cancer* **2000**, *87*, 629.
22. Green, D. R.; *Cell* **1998**, *94*, 695.
23. <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/>, acessada em Abril 2009.
24. Achiwa, Y.; Hasegawa, K.; Udagawa, Y.; *Oncol. Rep.* **2005**, *14*, 507.
25. Achiwa, Y.; Hasegawa, K.; Komiya, T.; Udagawa, Y.; *Oncol. Rep.* **2005**, *13*, 51.
26. Hsu, Y. L.; Kuo, P. L.; Lin, C. C.; *Life Sci.* **2004**, *75*, 2303.
27. Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.; *Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à biologia molecular da célula*, Artes Médicas Sul: Porto Alegre, 1999.
28. Harmand, P. O.; Duval, R.; Liagre, B.; Jayat-Vignoles, C.; Beneytout, J. L.; Delage, C.; Simon, A.; *Int. J. Oncol.* **2003**, *23*, 105.
29. Achiwa, Y.; Hasegawa, K.; Udagawa, Y.; *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2007**, *71*, 31.
30. Sishodia, S.; Majumdar, S.; Banerjee, S.; Aggarwal, B. B.; *Cancer Res.* **2003**, *63*, 4375.
31. Dorai, T.; Aggarwal, B. B.; *Cancer Lett.* **2004**, *215*, 129.
32. Murphy, B. T.; Mackinnon, S. L.; Yan, X.; Hammond, G. B.; Vaisberg, A. J.; Neto, C. C.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3541.
33. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; *Rang & Dale Farmacologia*, 6ª ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2007.
34. Suh, N.; Honda, T.; Finlay, H. J.; Barchowski, A.; Williams, C.; Benoit, N. E.; Xie, K. W.; Nathan, C.; Gribble, G. W.; Sporn, M. B.; *Cancer Res.* **1998**, *58*, 717.
35. Honda, T.; Finlay, H. J.; Gribble, G. W.; Suh, N.; Sporn, M. B.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1623; Honda, T.; Rounds, B. V.; Gribble, G. W.; Suh, N.; Wang, Y.; Sporn, M. B.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2711; Honda, T.; Rounds, B. V.; Bore, L.; Favaloro Jr., F. G.; Gribble, G. W.; Suh, N.; Wang, Y.; Sporn, M. B.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3429; Honda, T.; Gribble, G. W.; Suh, N.; Finlay, H. J.; Rounds, B. V.; Bore, L.; Favaloro Jr., F. G.; Wang, Y.; Sporn, M. B.; *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1866; Honda, T.; Rounds, B. V.; More, L.; Finlay, H. J.; Favaloro Jr., F. G.; Suh, N.; Wang, Y.; Sporn, M. B.; Gribble, G. W.; *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4233; Honda, T.; Honda, Y.; Favaloro Jr., F. G.; Gribble, G. W.; Suh, N.; Place, A. E.; Rendi, M. H.; Sporn, M. B.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1027; Honda, T.; Sundararajan, C.; Yoshizawa, H.; Su, X.; Honda, Y.; Liby, K. T.; Sporn, M. B.; Gribble, G. W.; *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1731.
36. Suh, N.; Wang, Y.; Honda, T.; Gribble, G. W.; Dmitrovsky, E.; Hickey, W. F.; Maue, R. A.; Place, A. E.; Porter, D. M.; Spinella, M. J.; Williams, C. R.; Wu, G.; Dannenberg, A. J.; Flanders, K. C.; Letterio, J. J.; Mangelsdorf, D. J.; Nathan, C. F.; Nguyen, L.; Porter, W. W.; Ren, R. F.; Roberts, A. B.; Roche, N. S.; Subbaramaiah, K.; Sporn, M. B.; *Cancer Res.* **1999**, *59*, 336; Melichar, B.; Konopleva, M.; Hu, W.; Melicharova, K.; Andreeff, M.; Freedman, R. S.; *Gynecol. Oncol.* **2004**, *93*, 149; Gao, X.; Deeb, D.; Jiang, H.; Liu, Y.; Dulchavsky, S. A.; Gautam, S. C.; *J. Neurooncol.* **2007**, *84*, 147.
37. Liby, T. L.; Yore, M. M.; Sporn, M. B.; *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 357.
38. Wang, Y.; Porter, W. W.; Suh, N.; Honda, T.; Gribble, G. W.; Leesnitzer, L. M.; Plunket, K. D.; Mangelsdorf, D. J.; Blanchard, S. G.; Willson, T. M.; Sporn, M. B.; *Mol. Endocrinol.* **2000**, *14*, 1550.
39. Ito, Y.; Pandey, P.; Place, A.; Sporn, M. B.; Gribble, G. W.; Honda, T.; Kharbanda, S.; Kufe, D.; *Cell Growth and Differ.* **2000**, *11*, 261; Ito, Y.; Pandey, P.; Sporn, M. B.; Datta, R.; Kharbanda, S.; Kufe, D.; *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 1094; Pedersen, I. M.; Kitada, S.; Schimmer, A.; Kim, Y.; Zapata, J. M.; Charboneau, L.; Ramenti, L.; Andreeff, M.; Ben-net, F.; Sporn, M. B.; Liotta, L. D.; Kipps, T. J.; Reed, J. C.; *Blood* **2002**, *100*, 2965; Stadheim, T. A.; Suh, N.; Ganju, N.; Sporn, M. B.; Eastman, A.; *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 16448.
40. Mix, K. S.; Mengshol, J. A.; Benbow, U.; Vinventi, M. P.; Sporn, M. B.; Brinckerhoff, C. E.; *Arthritis Rheum.* **2001**, *44*, 1096.
41. Gerhäuser, C.; Klimo, K.; Heiss, E.; Neumann, I.; Eldeen, A. G.; Knauff J.; Liu, G. Y.; Sithimonchai, S.; Frank, N.; *Mutat. Res.* **2003**, *523-524*, 163.
42. Chen, G.; Lu, H.; Wang, C.; Yamashita, K.; Manabe, M.; Xu, S.; Kodama, H.; *Clin. Chim. Acta* **2002**, *320*, 11.
43. Ma, C. M.; Cai, S. Q.; Cui, J. R.; Wang, R. Q.; Tu, P. F.; Hattori, M.; Daneshmand, M.; *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 582.
44. Sun, H. X.; Ye, Y. P.; Pan, Y. J.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *90*, 261; Sun, H. X.; Zheng, Q. F.; Tu, J.; *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1189.
45. Setzer, W. N.; Rozmus, G. F.; Setzer, M. C.; Schmidt, J. M.; Vogler, B.; Reeb, S.; Jackes, B. R.; Irvine, A. K.; *J. Mol. Model.* **2006**, *12*, 703.
46. Assefa, H.; Nimrod, A.; Walker, L.; Sindelar, R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1619.
47. Finlay, H. J.; Honda, T.; Gribble, G. W.; Danielpour, D.; Benoit, N. E.; Suh, N.; Williams, C.; Sporn, M. B.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1769.