

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA- CAMPUS GOVERNADOR
VALADARES**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

Elaine Carlos Scherrer Ramos

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO CITOTÓXICO E IMUNOMODULADOR DE
DERIVADOS DO ÁCIDO URSÓLICO**

Governador Valadares

2018

Elaine Carlos Scherrer Ramos

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO CITOTÓXICO E IMUNOMODULADOR DE
DERIVADOS DO ÁCIDO URSÓLICO**

Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação Multicêntrico na área de Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM) para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro
Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Simão Machado

Governador Valadares

2018

Dedico este trabalho ao meu Deus, o autor da minha vida e arquiteto do meu destino, por ter me possibilitado estar firme durante toda essa trajetória. Sem Ele, não poderia estar aqui agradecendo a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A minha família, sempre acreditaram em minha capacidade, isso me fortaleceu para fazer o melhor de mim. Em especial a minha tia Profa. Dra. Jane Faria Scherrer que foi a minha inspiração para cursar biologia e prosseguir na vida acadêmica.

Ao meu esposo, Edmilson, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me incentivando e cuidando para que eu estivesse tranquila para desenvolver meu trabalho. Seu companheirismo, amizade, paciência e amor, foram essenciais para a concretização deste trabalho. Obrigada por ter feito do meu sonho nosso sonho!

Aos meus filhos, Lucas e Sarah, que certamente sentiram minha ausência e impaciência diante do desgaste em muitos momentos quando da elaboração desta dissertação e no transcorrer do curso. Obrigada pela paciência e carinho. Vocês são minha inspiração e espero inspirá-los também com meu exemplo. Tudo isso é por vocês também. Amo vocês!

A minha orientadora, Profa. Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro, competantíssima pesquisadora e professora, por compartilhar conhecimento, pela paciência, pela dedicação, pela responsabilidade com a qual realiza o seu trabalho e principalmente pelo seu coração tão nobre. Obrigada também, pelos incentivos nos momentos mais difíceis, e por transpor seu papel de orientadora, ao se tornar minha amiga.

Ao Prof. Dr. Caio César de Souza Alves, pela disponibilidade prestada e apoio que sempre me proporcionou.

Aos meus amigos do laboratório de imunologia que compartilharam comigo esses momentos. Em especial Lorena, Bolivar, Marluce, Pedro, Rafael e Thalisson. Obrigado pela solidariedade, amizade e cumplicidade.

A Profa. Dra. Fabiana Simão Machado pela coorientação. E ainda aos professores e amigos do mestrado, pela amizade e companheirismo durante estes dois anos.

A Profa. Dra. Ydia Mariele Valadares responsável pela síntese dos compostos utilizados neste estudo e experimento.

Aos amigos do Departamento de Microbiologia pelo auxílio em diversos momentos. Em especial a Thaís pela prontidão em me ajudar. A Profa. Dra. Gabriela Freitas Ferreira pela sua dedicação, paciência e amizade.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG e a Universidade Federal de Juiz de Fora pelo suporte financeiro fornecido ao projeto.

"Não há limites para o conhecimento, só há obstáculos para a ignorância."

Carolina Salmoria Casaril

RESUMO

O ácido ursólico (ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oico) é um triterpeno pentacíclico, composto de 30 átomos de carbono, usualmente obtido a partir da extração e da purificação de diversas espécies vegetais. Estudos demonstram efeitos benéficos do ácido ursólico (AU), incluindo sua capacidade imunomoduladora, anti-inflamatória, antitumoral e inibidor da metástase. Estudos sugerem que modificações estruturais do AU podem ampliar os efeitos biológicos benéficos deste composto. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito citotóxico e imunomodulador de derivados do ácido ursólico. Dezoito derivados semissintéticos foram preparados e cedidos para a verificação de atividades biológicas. Inicialmente, foram realizados testes em células de adenocarcinoma alveolar humano (A549), avaliando o efeito citotóxico e pró-apoptótico dos compostos. O efeito dos derivados do ácido ursólico foi também avaliado em macrófagos RAW264.7, analisando a viabilidade celular, a produção de óxido nítrico e a produção de fator de necrose tumoral. Em ambas as linhagens de células foi verificada a influência dos derivados na expressão do fator de transcrição NF- κ B. As células A549 e RAW264.7 foram tratadas com os derivados nas concentrações de (7,5, 15, 30, 60 e 90 μ M), por 3, 24 e 48 horas. Os compostos AUD1, AUD5, AUD6, AUD8, AUD11, AUD12, AUD13 e AUD16 foram capazes de reduzir a viabilidade e a expressão de NF- κ B nas células A549, em uma ou mais concentrações testadas. O composto AUD1 foi capaz de reduzir a viabilidade celular nas concentrações 30, 60 e 90 μ M, sendo significativamente mais eficaz que o AU nestas concentrações. Além disso, AUD1, AUD5, AUD6 e AUD8 induziram apoptose, sendo os derivados AUD1 e AUD8 significativamente mais eficaz que AU na indução da apoptose. Em relação aos macrófagos RAW264.7, somente os compostos AUD12, AUD13, AUD15 e AUD16 não promoveram redução da produção de NO. Todos os demais compostos reduziram a produção de NO em pelo menos uma das concentrações testadas, sem afetar a viabilidade celular. AUD2 promoveu a melhor produção de NO na menor concentração (7,5 μ M) com IC₅₀>90 μ M. Os compostos AUD1, AUD3, AUD4, AUD5, AUD6, AUD7, AUD8, AUD11, AUD12, AUD13, AUD14, AUD15 e AUD18 foram capazes de reduzir a expressão de NF- κ B em todas as concentrações testadas. Em relação ao TNF, todos os compostos avaliados foram capazes de inibir a produção desta citocina pelas células RAW264.7 nas concentrações de 60 e 90 μ M. Ao realizar o estudo das modificações estruturais em relação as atividades biológicas é possível sugerir que a esterificação na posição C-28 ou ainda a manutenção do grupamento hidroxila no C-3 parecem importantes para o aumento da citotoxicidade dos compostos quando testadas em células A549. Além disso, quando avaliado o efeito imunomodulador na resposta inflamatória, a esterificação (C-3 e/ou C-28) potencializa a ação dos derivados do ácido ursólico em células RAW264.7.

Palavras-chave: ácido ursólico, NF- κ B, antitumoral, A549, RAW264.7, anti-inflamatória

ABSTRACT

The ursolic acid (3 β -hydroxy-urs-12-en-28-oic acid) is a pentacyclic triterpene constituted by 30 carbon atoms that is usually obtained through the extraction and purification in different plants. The anti-inflammatory, anti-tumoral, immunomodulatory and anti-metastatic activity of ursolic acid (UA) has already been shown in different studies. Structural modifications in important portions of UA can amplify the beneficial biological effects of this compound. With this, it was synthesized 18 semisynthetic compound derivatives of ursolic acid (UAD1-UAD18), which can be promising molecules to treat diseases that need new therapeutic options. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the cytotoxic and immunomodulatory effects of these ursolic acid derivatives. To verify the biological activities was realized tests in the adenocarcinoma human alveolar basal epithelial cells (A549) evaluating the cytotoxic and the proapoptotic effects of these compounds. The murine macrophage cells (RAW264.7) were used to evaluate the effects of the UADs on cellular viability, nitric oxide production and tumoral necrosis factor production. In both cells was evaluated the expression of NF- κ B. A549 and RAW264.7 were treated with UA or UADs in the concentrations of 7.5 μ M, 15 μ M, 30 μ M, 60 μ M and 90 μ M during 3, 24 or 48 hours. The compounds UAD1, UAD5, UAD6, UAD8, UAD11, UAD12, UAD13 and UAD16 were able to reduce the viability and the expression of NF- κ B in A549 cells, in at least one of the concentrations. UAD1 was able to reduce the cellular viability in the concentrations of 30 μ M, 60 μ M and 90 μ M, being more effective than UA. Moreover, UAD1, UAD5, UAD6 and UAD8 induced the apoptosis of A549, being, UAD1 and UAD8, significantly more effective than UA. In RAW264.7, only the compounds AUD12, AUD13, AUD15 and AUD16 were not capable of promoting the reduction of NO production. The other compounds reduced the NO production in at least one of the concentrations, without cytotoxicity (IC₅₀). AUD2 showed the better reduction of NO in the lower concentration, with IC₅₀>90 μ M. The compounds UAD1, UAD3, UAD4, UAD5, UAD6, UAD7, UAD8, UAD11, UAD12, UAD13, UAD14, UAD15 and UAD18 were able to reduce the NF- κ B expression in all tested concentrations, however, all the compounds reduced the production of TNF in the RAW264.7 cells in the concentrations of 60 μ M and 90 μ M. In conclusion, when was related the structure to the biological activity of the compounds, can be suggested that the esterification at C-28 or the conservation of the hydroxyl at C-3 seems to be important for the cytotoxicity of the compounds against A549 cells. Furthermore, when evaluated the immunomodulatory effect on the inflammatory response, the esterification (C-3 and/or C-28) enhances the action of the ursolic acid derivatives on RAW264.7 cells.

Keywords: ursolci acid, NF- κ B, antitumoral, A549, RAW264.7, anti-inflammatory

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do ácido ursólico.....	17
Figura 2	Esquema das estruturas químicas dos derivados semissintéticos do ácido ursólico.....	28
Figura 3	Esquema das estruturas químicas dos derivados semissintéticos do ácido ursólico.....	29
Figura 4	Esquema das estruturas químicas dos derivados semissintéticos do ácido ursólico.....	30
Figura 5	Determinação de apoptose em células A549 por citometria de fluxo.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Viabilidade celular de A549 após 48 horas de cultura tratadas com ácido ursólico e seus derivados nas concentrações de 30, 60 e 90 μ M.....	35
Tabela 2	Viabilidade celular de A549 após 24 horas de cultura tratadas com ácido ursólico e seus derivados nas concentrações de 30, 60 e 90 μ M.....	36
Tabela 3	Porcentagem da expressão de NF- κ B em A549 tratadas com ácido ursólico e seus derivados nas concentrações de 30, 60 e 90 μ M, após 24 horas de cultura.....	37
Tabela 4	Produção de NO por macrófagos RAW264.7 tratados com ácido ursólico e seus derivados, após 48 horas de cultura e IC50.....	40
Tabela 5	Expressão de NF- κ B e porcentagem de produção de citocina pró-inflamatória TNF por células RAW264.7 estimuladas com LPS e IFN- γ , tratadas com ácido ursólico ou seus derivados após 3 horas de cultura.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E CÓDIGOS

ANOVA	Método estatístico de análise de variância
AP-1	Proteína-1 ativadora
ASTC-al	Linhagem de câncer de pulmão humano
AU	Ácido ursólico
AUD1	Derivado do ácido ursólico 1 (3β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila)
AUD2	Derivado do ácido ursólico 2 (3β -acetóxi-urs-12-en-28-oato de metila)
AUD3	Derivado do ácido ursólico 3 (3β -acetóxi-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila)
AUD4	Derivado do ácido ursólico 4 (3β -acetóxi-urs-9,12-dien-28-oato de metila)
AUD5	Derivado do ácido ursólico 5 (3β ,11,28-trihidroxi-urs-12-eno)
AUD6	Derivado do ácido ursólico 6 (3β -hidroxi-urs-12-en-28-al)
AUD7	Derivado do ácido ursólico 7 (3β ,28-diacetóxi-urs-11,13(18)-dieno)
AUD8	Derivado do ácido ursólico 8 (3β -hidróxi-urs-11-en-28,13-eter)
AUD9	Derivado do ácido ursólico 9 (3β ,28-diidroxi-urs-12-eno)
AUD10	Derivado do ácido ursólico 10 (3β -oxo-urs-12-en-28-oato de metila)
AUD11	Derivado do ácido ursólico 11 (3,11-dioxo-urs-12-en-28-oato de metila)
AUD12	Derivado do ácido ursólico 12 (3,4-seco-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila)
AUD13	Derivado do ácido ursólico 13 (3β -acetóxi-urs-12-en-28-óico)
AUD14	Derivado do ácido ursólico 14 (3β -acetóxi-urs-11-en-28,13 β -lactona0)
AUD15	Derivado do ácido ursólico 15 (3-hidroxi-oxima-urs-12-en,28- oato de metila)
AUD16	Derivado do ácido ursólico 16 (3β -hidroxi-11-oxours-12-em-28-oato de metila)
AUD17	Derivado do ácido ursólico 17 (3-oxo, 11-hidroxi-urs-12-em-28-oato de metila)
AUD18	Derivado do ácido ursólico 18 (3β , 28 diidroxi-urs-9,12 dieno)
A549	linhagem de adenocarcinoma alveolar humano
Bad	Proteína Bcl-2 associada à morte
Bax	Proteína X associada ao Bcl-2
Bcl-2	Célula B de linfoma 2
Bcl-3	Célula B de linfoma 3
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bel-7402	Células de carcinoma hepatocelular humano
BGC-823	Células de câncer gástrico humano
COX	Ciclooxigenase
DAMPs	Padrões moleculares associados à danos

DMSO	Dimetilsulfóxido
ERK	Quinases reguladas por sinais extracelulares
H460	Linhagem celular de câncer de pulmão do tipo não pequena
HCT-116	Câncer de cólon retal humano
HL-7702	Células humanas do fígado
HeLa	Células epiteliais de adenocarcinoma humana
HELF	Fibroblastos de pulmão de embrião humano
HepG2	Célula de hepatoma humana
HL-60	linhagem de leucemia promielocítica humana HL-60
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
IC ₅₀	Concentração que inibitória de 50%
IKK	Proteína quinase de IκB
IKK α	Proteína quinase alfa de IκB
IKK β	Proteína quinase beta de IκB
IκB α	Proteína Inibitória kappa B alfa
IL	Interleucina
IFN	Interferon
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
Jurkat	Célula de leucemia linfótica aguda
J774A.1	Macrófagos murinos
K562	Linhagem celular humana de leucemia
LPS	Lipopolissacarídeo
LoVo	Linhagem de células de câncer de cólon
Lucena	Derivada de K562 multidroga resistente
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humano
MDA-MB-231	Linhagem celular de câncer de mama humano
MGC-803	Células de câncer gástrico humano
MTT	Brometo de dimetilazol difeniltetrazólio
NK	células <i>natural Killer</i>
NO	Óxido Nítrico
NF-κB	Fator nuclear <i>kappa B</i>
NEMO	Modulador essencial de NF-κB
NF-AT	Fator nuclear de células T ativadas
O ²⁻	Ânion superóxido

ONOO ⁻	Ânion peroxinitrito
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
p50	Subunidade (p50) do fator nuclear NF-κB
p65	Subunidade (p65) do fator nuclear NF-κB
PI	Iodeto de propídio
RRPs	Receptores reconhedores de padrões
Rel-B	Subunidade (Rel-B) do fator nuclear NF-κB
RAW264.7	Macrófagos da espécie <i>Mus musculus</i>
SKOV3	Linhagem celular de carcinoma ovariano humano
SW480	Linhagem de células de câncer de cólon
THP-1	Células leucêmicas humanas
T24	Câncer humano de bexiga
T47D	Linhagem celular de câncer de mama humano
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	Ácido ursólico e suas atividades anti-inflamatória e antitumoral.....	17
2.2	Derivados do ácido ursólico.....	22
3	OBJETIVO.....	26
3.1	Objetivo Geral.....	26
3.2	Objetivos Específicos.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	Derivados do ácido ursólico.....	27
4.2	Cultura celular.....	31
4.3	Avaliação da citotoxicidade do ácido ursólico e seus derivados em células A549 e RAW264.7.....	31
4.4	Determinação da produção de óxido nítrico (NO) por células RAW264.7 tratadas com do ácido ursólico e seus derivados	32
4.5	Avaliação da expressão de NF- κ B por células A549 e RAW264.7 tratadas do ácido ursólico e seus derivados em células A549 e RAW264.7.....	32
4.6	Dosagem da citocina TNF por células RAW264.7 tratadas com do ácido ursólico e seus derivados	32
4.7	Avaliação de apoptose e necrose em células A549 tratadas como os derivados AUD1, AUD5, AUD6, AUD8 e AUD18).....	33
4.8	Análise Estatística.....	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	Atividade dos derivados do ácido ursólico na viabilidade celular de A549.....	35
5.2	Atividade dos derivados do ácido ursólico na expressão de NF- κ B por células A549	37
5.3	Indução da apoptose por derivados do ácido ursólico (AUD1, AUD5, AUD6, AUD8 e AUD16) em células A549.....	38
5.4	Atividade dos derivados do ácido ursólico na viabilidade celular de macrófagos RAW264.7 e na produção de NO.....	39

5.5	Atividade dos derivados do ácido ursólico na expressão de NF- κ B e na porcentagem de produção de TNF.....	41
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são importantes fontes para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos podendo ser utilizados diretamente ou como base para a projeção de moléculas com atividade biológica. O ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oico denominado ácido ursólico (AU) é um triterpeno pentacíclico, composto de 30 átomos de carbono, sendo usualmente obtido a partir da extração e da purificação de diversas espécies vegetais. Estudos demonstram efeitos benéficos do AU, incluindo sua capacidade imunomoduladora, anti-inflamatória, antitumoral e antimetastásica. Diversos estudos foram realizados visando a obtenção de análogos mais potentes do AU, principalmente nos carbonos das posições C-3, C-11, C-28 deste composto (ALVES MONTEATH et al., 2017; BAI et al., 2011; LEAL et al., 2012; MA et al., 2005; MENG et al., 2015; SHOA et al., 2011; WANG et al., 2013).

A modificação estrutural do AU em posições químicas consideradas importantes na atividade biológica, sugerem ampliação dos efeitos biológicos benéficos observados até o presente momento. Com base no conhecimento do potencial biológico deste triterpeno, foram testados no presente estudo dezoito compostos derivados semissintéticos do AU que poderão ser promissoras moléculas para o uso no tratamento de doenças que necessitam de novas opções terapêuticas.

Pesquisas avaliando a atividade do AU e seus derivados já foram realizadas, algumas relacionadas à células tumorais, mas diferem das investigações apresentadas no presente trabalho em relação a linhagem celular e aos testes realizados (KASHYAP; TULI; SHARMA, 2016). Cada linhagem celular de câncer apresenta especificidades que advêm de alterações celulares que se acumulam e se interagem ao longo das transformações de células normais em tumorais, diversas vias de sinalização (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O Fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) é um fator de transcrição que desempenha papel importante na carcinogênese, bem como na regulação da resposta inflamatória (SORRIENTO et al., 2012). Algumas pesquisas já demonstraram a intervenção do AU na via de NF- κ B, promovendo a morte celular de diferentes linhagens de câncer humano (GAI et al., 2013; MA et al., 2014; SHISHODIA et al., 2003) e a capacidade de modular a resposta inflamatória (CHUN et al., 2014; PATIL et al., 2015).

Diante do exposto acima, considerando a disponibilidade de dezoito compostos derivados semissintéticos do AU este estudo propôs realizar uma triagem citotóxica com todos os dezoito compostos em células da linhagem de adenocarcinoma alveolar humano

(A549). Além disso, será avaliada a atividade imunomoduladora pelos dezoito derivados dos ácido ursólico em macrófagos murinos RAW264.7 estimulados com Interferon- γ (IFN- γ) e Lipopolissacarídeo (LPS).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ácido ursólico e suas atividades anti-inflamatória e antitumoral

As plantas são popularmente utilizadas para o tratamento de diversas doenças e fonte constante de estudos na busca de novos compostos terapêuticos, tanto no objetivo de potencializar os efeitos de medicamentos já existentes, assim como na descoberta de novos compostos terapêuticos para doenças que não possuem tratamento efetivo (HUANG et al., 2009; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ et al., 2017; SOLOWEY et al., 2014; SULTANA et al., 2014; YADAV et al., 2010). Dentro deste contexto, estudos vêm sendo realizados para a obtenção de compostos bioativos que possam ser utilizados na prevenção e também no tratamento de diversas doenças (BACANLI et al., 2017; HASSAN et al., 2014; HUANG et al., 2009; LI et al., 2017; KOEHN; CARTER, 2005; SULTANA et al., 2014).

Entre os diversos compostos extraídos de plantas é possível destacar o AU apresentado na Figura 1, um triterpeno pentacíclico encontrado em diversas plantas, incluindo maçã, manjerição, *cranberry*, menta, alecrim, orégano e ameixa (CHECKER et al., 2012; IKEDA; MURAKAMI; OHIGASHI, 2008; LIU, 1995; SARAVANAN; PUGALENDI, 2006; OVESNÁ; KOZICS; SLAMEŇOVÁ, 2006).

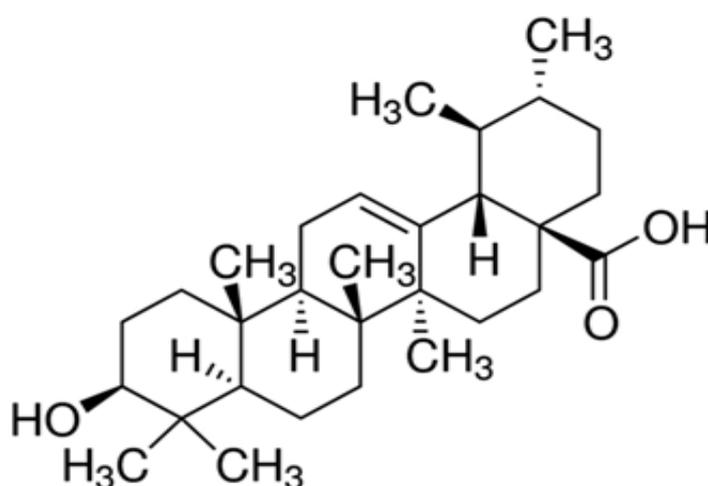


Figura 1: Estrutura química do ácido ursólico (Fonte:PENG et al., 2006)

O AU apresenta múltiplos alvos intracelulares e extracelulares destacando-se por suas atividades anti-inflamatória e antitumoral, entre outras (ACHIWA et al., 2005; CHECKER et

al., 2012; DO NASCIMENTO et al., 2014; IKEDA et al., 2006; IKEDA; MURAKAMI; OHIGASHI, 2008; HUSSAIN et al., 2017; ZANG et al., 2014).

A inflamação é tipicamente vista como uma resposta protetora localizada em um tecido danificado, por exemplo, por um processo infeccioso, ou ainda outros estímulos danosos, e tem por objetivo isolar e destruir o agente agressivo, preparando o tecido atingido para eventual reparação. A importância da inflamação para a homeostase tanto em tecidos lesados como no organismo como um todo é evidenciada pelo fato de que deficiências na resposta inflamatória comprometem o indivíduo, sugerindo que a inflamação é um importante processo fisiológico (GRANGER; SENCHENKOVA, 2010).

A exposição do tecido à padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que são reconhecidos por receptores de reconhecedores de padrões (RRP) na superfície das células residentes, tais como, macrófagos e células dendríticas, que estimula a liberação de mediadores pró-inflamatórios ativando o endotélio dos vasos sanguíneos e iniciando uma cadeia de eventos que culmina com a transmigração de leucócitos e sua penetração no tecido infectado ou agredido (MEDZHITOV, 2010; MODLIN, 2012; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Diversas substâncias estão envolvidas na modulação da resposta imune durante os processos patológicos (MA et al., 2014). A resposta estabelecida durante o desenvolvimento de um processo patológico envolve mediadores, tais como espécies reativas de oxigênio, citocinas, quimiocinas que irão atuar na modulação do sistema imunológico, no objetivo de conter o desenvolvimento da doença. Esses mediadores são também possíveis alvos de substâncias terapêuticas. (COUSSENS; WERB, 2002; KARIN, 2008; YADAV et al., 2010).

O óxido nítrico (NO) é um poderoso mediador pró-inflamatório, gerado naturalmente a partir de L-arginina pela ação da NO sintase (NOS) e está envolvido na regulação de diversos processos fisiológicos incluindo neurotransmissão e eventos do sistema imunológico. O NO, o ânion superóxido (O_2^-) e o seu produto de reação ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) podem ser gerados em excesso durante a resposta do hospedeiro contra danos causados por patógenos ou outros compostos, tais como compostos químicos contribuindo para a patogênese de diversas doenças, incluindo o câncer. O processo inflamatório é atribuído, em parte, à liberação de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos e macrófagos ativados (FANG et al., 2007; WALLACE; IGNARRO; FIORUCCI, 2002; ZHANG et al., 2017).

Diversos estudos realizados demonstram a capacidade do AU em atuar inibindo a atividade *in vitro* de macrófagos. Suh e colaboradores (1998) observaram que o AU é capaz de suprimir a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS).

Ryu e colaboradores (2000), relataram a capacidade de AU inibir a produção de NO em células RAW264.7. Kim e colaboradores (2015) ao realizarem estudos com células RAW264.7 estimuladas com LPS observaram que o AU foi capaz de inibir a produção de NO por essas células.

Entre os diversos mecanismos de ação do AU é possível destacar sua ação inibitória na expressão do fator de transcrição NF- κ B. Estudos mostram que o NF- κ B está envolvido tanto na ativação de mediadores inflamatórios, tais como iNOS, COX-2, citocinas, fatores de crescimento, nos processos de apoptose e, portanto, será destacado ao longo deste texto (FULDA; DEBATIN, 2006; GARG; AGGARWAL, 2002; KIM; HAWKE; BALDWIN, 2006; PERKINS, 2006; SORRIENTO et al., 2012).

O NF- κ B é expresso no citoplasma da maioria dos tipos celulares e sua atividade é controlada por uma família de proteínas inibidoras do fator de transcrição NF- κ B (I κ B) que se ligam ao dímero de NF- κ B promovendo a sua inibição. (HAYDEN; GHOSH, 2004). A ativação de NF- κ B é regulada por sinais que degradam I κ B. Existem, basicamente, duas vias de sinalização para a ativação do NF- κ B: a via clássica ou canônica, que promove a ativação do complexo contendo a subunidade do NF- κ B denominada RelA (p65) e a via não canônica (alternativa), que resultam na ativação de complexos contendo subunidade (Rel-B) do fator nuclear NF- κ B (Rel-B) (LAWRENCE, 2009).

O NF- κ B pode se apresentar na forma de hetero ou homodímeros, sendo o heterodímero p65/p50 o mais abundante na grande maioria das células, provenientes da via clássica. Quando o heterodímero p65/p50 encontra-se associado a proteína inibidora kappa B alfa (I κ B α) o heterodímero p65/p50 matem-se inativo no citoplasma. A degradação de I κ B α é mediada por proteínas quinases de I κ B (IKK) formada pelas subunidades catalíticas proteína quinase alfa de I κ B (IKK- α) e proteína quinase beta de I κ B (IKK- β) e a subunidade proteína regulatória (IKK- γ), também conhecida como modulador essencial de NF- κ B (NEMO). As proteínas da família de I κ B- α são fosforiladas, liberando a forma dimérica ativa de NF- κ B. O NF- κ B (p65/p50) transloca para o núcleo e liga em regiões específicas do DNA regulando a transcrição de genes-alvos (GARG; AGGARWAL, 2002; HAYDEN; GHOSH, 2008; WANG et al., 1999).

No estudo de Chun e colaboradores (2014) o AU inibiu a ativação de NF- κ B, interferindo na fosforilação da subunidade inibitória do I κ B- α , o que resultou na redução da expressão de quimiocinas e na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Em modelo experimental de colite, Chun e colaboradores (2014) demonstraram a capacidade do AU em reduzir os sinais clínicos da inflamação.

Ma e colaboradores (2014) observaram que o AU apresenta potentes efeitos protetores contra a inflamação induzida por tetracloreto de carbono em camundongos, por meio da inibição do fator de necrose tumoral (TNF) e redução da expressão do NF- κ B. O aumento da sinalização por NF- κ B está relacionado com o início e a progressão da inflamação e doenças autoimunes associadas, além disso, estudos mostram também a relação deste fator de transcrição com o câncer (HOESEL; SCHMID, 2013; PATIL et al., 2015; SUN, 2014). Estudos mostram que a ativação de NF- κ B bloqueia a apoptose e promove a proliferação de células tumorais dando início à sobrevivência prolongada destas células (GARG; AGGARWAL, 2002; GILMORE, 2006; HAYDEN; GHOSH, 2012).

Patil e colaboradores (2015), em estudo com macrófagos murino (RAW264.7) estimulada com LPS, observaram que o AU inibiu a expressão NF- κ B ao inibir a fosforilação de IKK- β .

Checker e colaboradores (2012) observaram a capacidade do AU em inibir a ativação, proliferação e a secreção de citocinas por linfócitos T, linfócitos B e macrófagos. Esta propriedade foi atribuída a capacidade desse triterpenóide em inibir os fatores de transcrição como NF- κ B, proteína-1 ativadora (AP-1) e fator nuclear de células T ativadas (NF-AT) envolvidos na resposta inflamatória (CASTRO et al., 2012; CHECKER et al., 2012; ROONEY et al., 1995). Também foi atribuído ao AU presente no *cranberry* (*Vaccinium macrocarpon*), a capacidade de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias interleucina (IL)1 β , IL-6, IL-8 e TNF por células mononucleares do sangue periférico (HUANG et al., 2009).

O TNF é uma citocina pró-inflamatória, que possui importantes funções, tais como a indução de outras citocinas e mediadores lipídicos da inflamação, de proliferação, diferenciação celular e apoptose (TRACEY, 2008). O TNF existe em duas formas, a solúvel e ligado a membrana celular. A forma solúvel é liberada das células após a clivagem enzimática do seu precursor ligado à membrana. A enzima responsável por esse processo é a *TNF-alpha-converting enzyme* (TACE). Ambas as formas são biologicamente ativas. Embora as células da linhagem de monócitos / macrófagos sejam a principal fonte de TNF em doenças inflamatórias, uma ampla gama de células pode produzir TNF, incluindo mastócitos, linfócitos T e B, células *natural killer* (NK), neutrófilos, células endoteliais e células do músculo cardíaco, fibroblastos e osteoclastos (BRADLEY, 2008). O TNF pode exercer seus efeitos pela interação com dois subtipos de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), que são o TNFR1 (p55 ou CD120a), constitutivamente expresso em todas as células, com exceção dos eritrócitos, e o TNFR2 (p75 ou CD120b), que é geralmente induzido e

preferencialmente expresso em células endoteliais e em células hematopoiéticas. O TNFR1 está associado com funções citotóxicas e pró-inflamatórias, causando injúria tecidual, enquanto o TNFR2 promove a ativação, migração e proliferação celular, atuando no reparo tecidual e angiogênese (CROFT; BENEDICT; WARE, 2013).

O AU presente em partes verdes frescas de *Salvia connivens* possui efeito anti-inflamatório atribuído a capacidade de reduzir os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF e aumentar a produção de IL-10 em estudo *in vitro*, utilizando com macrófagos murinos (J774A.1) estimulados com LPS (GONZÁLEZ-CHÁVEZ et al., 2017).

Chen e colaboradores (2013) verificaram que o AU atenuou a lesão pulmonar aguda induzida por LPS em um modelo murino, juntamente com a inibição da produção de TNF, IL-1 β e IL-6 e a elevação da expressão de IL-10.

Em relação a atividade antitumoral, diversos estudos mostram a atividade anticancerígena do AU tanto *in vitro*, em diversas linhagens celulares, como *in vivo*, em distintos modelos de tumor (CARGNIN; GNOATTO, 2017; CHECKER et al., 2012; IKEDA; MURAKAMI; OHIGASHI, 2008; KASHYAP; TULI; SHARMA, 2016; PENG et al., 2016; SHANMUGAM et al., 2012).

O AU possivelmente atua por diversas vias promovendo a destruição das células tumorais, inibindo angiogênese e metástase. O AU protege os tecidos saudáveis contra a inflamação e o estresse oxidativo, fatores importantes para a formação de neoplasias (JIANG et al., 2015; LIU, KUNMEI et al., 2013; MA et al., 2014).

Ma e colaboradores (2005) verificaram que o AU isolado das cascas de maçã *Malus pumila* Mill apresentou atividade inibitória do crescimento das seguintes linhagens tumorais: linhagem de leucemia promielocítica humana HL-60, células de câncer gástrico humano (BGC-823), células epiteliais de adenocarcinoma humano (Hela) e células de carcinoma hepatocelular humano (Bel-7402).

No estudo de Liu e colaboradores (2013) o AU inibiu a metástase de células A549 de uma maneira dose dependente, suprimindo a expressão do gene AEG-1, correlacionando com a inibição de NF- κ B em células A549. As células cancerígenas são caracterizadas por uma atividade anormalmente alta de NF- κ B, o que leva a proliferação intensa e torna este fator de transcrição um dos principais alvos da oncoterapia moderna (GILMORE, 2006).

Bergamin e colaboradores (2017) investigaram os efeitos do AU *in vitro* e *in vivo* em célula C6 de gliomas. Os resultados *in vitro* mostraram que o AU diminuiu o número de células C6 de gliomas, aumentando a fração sub-G1 e induzindo a morte apoptótica, acompanhada do aumento dos níveis da proteína caspase-3 envolvida na indução da apoptose.

O AU *in vitro* foi capaz inibir a proliferação celular e induzir a apoptose em linhagem de células de câncer de cólon (SW480) e linhagem de células de câncer de cólon (LoVo) através da modulação simultânea das múltiplas vias de sinalização, entre elas o NF- κ B (WANG et al., 2013).

Luo e colaboradores (2017), em estudo *in vitro* com linhagem celular de câncer de mama humano (T47D), adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e linhagem celular de câncer de mama humano (MDA-MB-231) demonstraram que o AU suprimiu os níveis de IKK- α e I κ B- α , que regulam a fosforilação do NF- κ B e reduzindo desta forma a produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-1 β , IL-18, IFN- γ , TNF e IL-6. No mesmo estudo a expressão de proteínas antiapoptóticas célula B de Linfoma B (Bcl-2) e *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-xL) foram reduzidas após a administração de AU, em todas as linhagens celulares utilizadas, acompanhadas do aumento das proteínas pró-apoptóticas, proteína Bcl-2 associada a morte (Bad) e proteína X associada ao Bcl-2 (Bax).

Li e colaboradores (2010) ao combinar o AU com quimioterápicos mostraram que a ação sinérgica promoveu a redução da expressão do NF- κ B, sendo necessário desta forma uma dose menor de quimioterápicos necessários para induzir a apoptose na linhagem de câncer de pulmão humano (ASTC-al) e HeLa.

Desta forma, observa-se que alguns estudos atribuem as possíveis atividades anticancerígenas, anti-inflamatórias e próapoptóticas do AU à sua capacidade de inibir o NF- κ B (SHISHODIA et al., 2003; ZERIN et al., 2016).

Apesar do promissor potencial terapêutico do AU, a sua fraca solubilidade em água resulta em sua baixa biodisponibilidade e, em última instância, restringe seu potencial de aplicação na clínica (JIANG et al., 2017). Sendo assim, modificações na estrutura do AU são amplamente investigadas para melhorar suas atividades biológicas e biodisponibilidade (BAI et al., 2011; CHADALAPAKA et al., 2008; CHEN et al., 2015; DAR et al., 2016; GU et al., 2015; LIU et al., 2012; MA et al., 2014; RASHID et al., 2013; SIEWERT et al., 2014; SHAO et al., 2011; TIAN et al., 2017; TU et al., 2009).

2.2 Derivados do ácido ursólico

As modificações químicas realizadas na estrutura do AU geralmente se concentraram principalmente no grupo álcool na posição C-3, na insaturação em anel C na posição C-12 com o carbono 13, e no ácido carboxílico na posição C-28. Derivados semissintéticos do AU

obtidos em estudos anteriores tem demonstrado uma atividade citotóxica mais promissora contra linhagens tumorais em relação ao AU (CHEN et al., 2015; LEAL et al., 2012).

Segundo dados da literatura, as posições 3, 11 e 28, e os anéis A, C e D do esqueleto triterpênico são alvos potenciais para transformações químicas, visando o incremento das atividades biológicas como antimicrobiana e antioxidante, antidiabética, anticancerígenas, anti-inflamatória, entre outras (BAI et al., 2011; CHEN et al., 2015; DAR et al., 2016; DO NASCIMENTO et al., 2014; DONG et al., 2015; LEAL et al., 2012; LIN et al., 2015; MA et al., 2005; NELSON et al., 2015; ; NKEH-CHUNGAG et al., 2014; SHAO et al., 2011; YANG et al., 2015;).

No objetivo de favorecer o efeito biológico do AU Tian e colaboradores (2017) realizaram modificações estruturais na posição C-28 e verificaram que os derivados triterpenoides pentacíclicos apresentaram um aumento significativo na atividade antiproliferativa contra linhagens tumorais quando comparado com compostos originais.

Ma e colaboradores (2005) realizaram alterações estruturais nas posições C-3, C-28 e C-11 do AU extraído da maçã *Malus pumila* Mill e avaliaram por ensaio de viabilidade por Brometo de dimetilazol difeniltetrazólio (MTT) a atividade citotóxica em quatro diferentes linhagens tumorais: HL-60, Bel-7402, Hela e BGC. Eles relataram que a presença de função ácido carboxílico ou hidroxila nas posições 3 e 28 são importantes para a atividade citotóxica, e ainda que a esterificação das posições 3 e 28 leva à perda da atividade citotóxica, indicando que a presença de grupo doador de hidrogênio em ambas as posições, ou em uma delas, é essencial para a atividade citotóxica frente as linhagens de câncer testadas.

Meng e colaboradores (2009) sintetizaram dezenove derivados de ácido ursólico modificados nas posições C-3 e C-28. A atividade citotóxica dos derivados foi avaliada contra HeLa, BGC-823 e Linhagem celular de carcinoma ovariano humano (SKOV3). Os compostos N-[3β-acetoxiurs-12-en-28-oila]-2-aminoetanol oacetato e N-[3β-acetoxi-urs-12-en-28-oila]-2-amino-1-propanol acetato foram ativos na inibição do crescimento das células HeLa através da indução da apoptose e da parada do ciclo celular na fase S de uma maneira dependente da dose.

Com objetivo de melhorar a atividades hepatoprotetora e antitumoral, Meng e colaboradores (2010) sintetizaram oito novos derivados do AU com substituições nas posições C-3, C-11 e C-28. Meng e colaboradores (2010) observaram que o composto N-[3β-acetoxiurs-12-en-28-oila]-3-morfolina-4-il-1-propilamina apresentou atividade antitumoral significativa contra as três linhagens de câncer humano: HeLa, BGC-823 e SKOV3 e com maior citotoxicidade quando comparado com o AU. Os resultados de Meng e colaboradores

(2012) após a síntese de dezoito novos compostos com modificações nas posições C-3 e C-28 do AU mostraram dois compostos N-[3 β -acetoxiurs-12-en-28-oila]-morfolina e N-[3 β -propionilox-urs-12-en-28-oila]-morfolina que apresentaram alta atividade citotóxica contra linhagens tumorais humanas, em ensaio realizado por MTT. Em 2015, Meng e colaboradores sintetizaram onze novos derivados do AU com substituição nas posições de C-2, C-3 e C-28 e avaliaram as atividades citotóxicas *in vitro* contra três linhagens celulares de câncer HeLa, célula de hepatoma humana (HepG2) e BGC-823.

Hua e colaboradores (2015), em estudo com uma série de derivados sintéticos do AU modificado nas posições C-3 e C-28 apresentavam baixa citotoxicidade em células humanas do fígado (HL-7702) e alta atividade antiproliferativa *in vitro* contra as Células de câncer gástrico humano (MGC-803), câncer de cólon retal humano (HCT-116), câncer humano de bexiga (T24), HepG2 e A549.

Para avaliar os efeitos dos derivados do AU Mendes e colaboradores (2016) sintetizaram vários compostos derivados com um anel A modificado, utilizando o AU como composto de partida. A atividade antiproliferativa foi testada em linhagens celulares de carcinoma pulmonar de células não-pequenas. O composto mais ativo nas culturas foi o 3,4-seco-3-N-propilamida-4(23)-en-12- β -fluor-urs-13,28 β -lactona que induziu a apoptose via ativação de caspase-8 e caspase-7.

Segundo Dar e colaboradores (2016) os derivados sintéticos de benzidilina do AU apresentaram melhor atividade citotóxica contra diferentes linhagens celulares de carcinoma humano incluindo as linhagens: A549, MCF-7, HCT-116 e células leucêmicas humanas (THP-1) em comparação ao AU. No mesmo estudo o derivado mais ativo foi submetido a procedimentos para compreender o mecanismo de ação da substância. Os resultados revelaram que a apoptose induzida por esse composto em células HCT-116, resultou na parada do ciclo celular na fase G1, causando a acumulação de citocromo c no citosol, aumentando os níveis da expressão das proteínas pró-apoptóticas caspase-9 e caspase-3.

Alves Monteath e colaboradores (2017) extraíram o AU de flores *Ixora coccínea*, em seguida realizaram modificações em sua estrutura nas posições C-3 e C-28 na tentativa de encontrar compostos mais ativos. O AU e seus derivados foram testados para avaliar os seus efeitos citotóxicos contra duas linhagens celulares de câncer humano (A549 e linhagem celular de câncer de pulmão do tipo não pequena-H460) e contra linhagem celular humana de leucemia K562 multidrogas resistente (Lucena), célula de leucemia linfótica aguda (Jurkat) e HL-60. Mostraram que os efeitos citotóxicos do AU e do derivado oxidado o ácido 3-oxo-urs-

12-en-28-óico eram maiores nas linhagens de câncer A549, H460, K562, Lucena e HL-60 quando comparados com o agente quimioterápico cisplatina.

Em seus estudos com derivados do AU, Shao e colaboradores (2011) mostraram que o derivado do AU, N-[3b-acetoxiurs-12-en-28-oila]-2-aminodietanol apresentou uma atividade significativa contra linhagens de células tumorais e menor citotoxicidade contra Fibroblastos de pulmão de embrião humano (HELF) em comparação com o AU.

Zhang e colaboradores (2017) realizaram um estudo para avaliar a produção de NO em células RAW264.7 que foram estimuladas por LPS e tratadas com biometabólitos derivados do AU. Em seus estudos os autores demonstraram que as células RAW 264.7 quando tratadas com os biometabólitos derivados do AU identificados como ácido 1 β ,11a-diidroxi-3-oxo-urs-12-en-28-oico e 1 β -hidroxi-3-oxo-urs-12-en-28, 13-lactona, exibiram produção significativamente reduzidas de NO com os valores IC50 de 1,243 e 1,711 μ M, respectivamente. Huang e colaboradores (2009) relataram a capacidade do AU e dois derivados do AU com modificações na posição C-3: *cis-3-O-p-Hydroxycinnamoylursolic acid* e *trans-3-O-p-Hydroxycinnamoylursolic acid* em inibirem a translocação de NF- κ B para o núcleo de células mononucleares do sangue periférico humano e conseqüentemente, inibirem a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF.

Desta forma, é possível observar que existem estudos avaliando a viabilidade celular de derivados do AU em células tumorais. Entretanto, em relação à avaliação da modulação da resposta em macrófagos e mediadores inflamatórios com os derivados do AU conforme apresentado por Zhang e colaboradores são mais são mais restritos, o que torna ainda mais relevante a obtenção de novos dados.

Tendo em vista as diversas atividades biológicas já relatadas para o AU, bem como para alguns derivados sintéticos, é grande o interesse na avaliação da atividade de derivados deste triterpeno, visando obter substâncias bioativas que poderão viabilizar estudos futuros relacionando estrutura química-atividade biológica, constituindo o ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o efeito citotóxico e imunomodulador de derivados do ácido ursólico.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* os efeitos dos derivados do ácido ursólico (AUDs) na viabilidade celular de linhagem de adenocarcinoma alveolar humano A549 e macrófagos murinos da linhagem RAW264.7;

- Avaliar *in vitro* os efeitos dos AUDs na expressão de NF- κ B em linhagem de adenocarcinoma alveolar humano A549;

- Avaliar a indução de apoptose por AUDs em células de adenocarcinoma alveolar humano A549;

- Avaliar *in vitro* os efeitos dos AUDs na produção de NO e TNF por células RAW264.7 estimuladas com IFN- γ e LPS;

- Avaliar *in vitro* os efeitos dos AUDs na expressão de NF- κ B em macrófagos RAW 264.7 estimulados com IFN- γ e LPS;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Derivados do ácido ursólico

Para a realização dos ensaios propostos no presente projeto, foram empregados dezoito derivados semissintéticos do ácido ursólico (AUD1 a AUD18), com modificações principalmente os carbonos nas posições C-3, C-11 e C-28, obtidos no Departamento de Química Farmacêutica da Universidade de Salamanca, Espanha pela Profa. Dra. Ydia Mariele Valadares da UFJF-campus Governador Valadares (Figuras 2, 3, 4). Os compostos foram testados nas concentrações de 7,5, 15, 30, 60 e 90 μ M (BAI et al., 2011; DONG et al., 2015; PATIL et al., 2015). O ácido ursólico para obtenção dos derivados semissintéticos foi isolado de *Jacaranda caroba* e *Remijia ferruginea*.

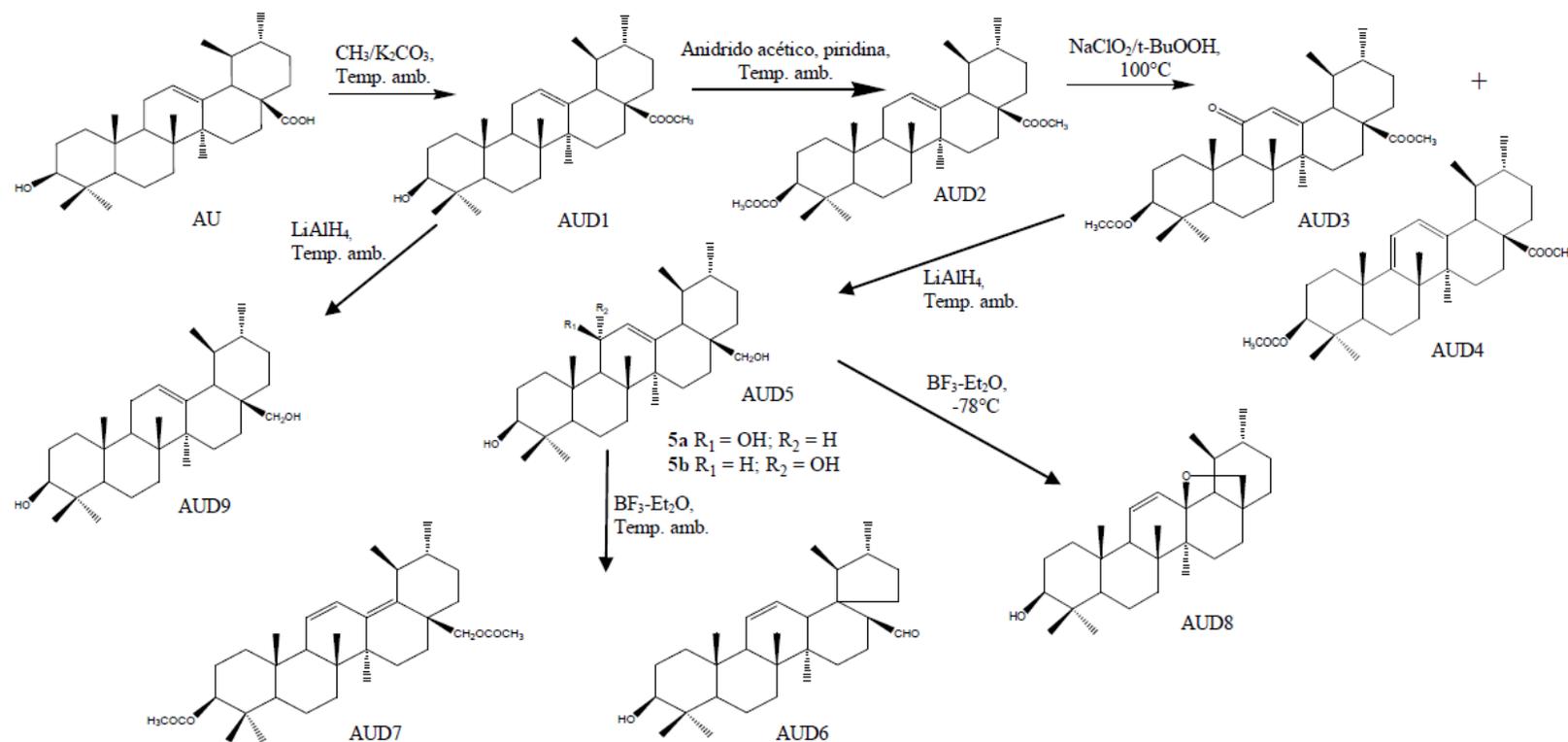


Figura 2: Derivados semi-sintéticos do ácido ursólico (AU): 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD1), 3 β -acetóxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD2), 3 β -acetóxi-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (AUD3), 3 β -acetóxi-urs-9,12-dien-28-oato de metila (AUD4), 3 β ,11,28-trihidroxi-urs-12-eno (AUD5), 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-al (AUD6), 3 β ,28-diacetóxi-urs-11,13(18)-diene (AUD7), 3 β -hidróxi-urs-11-en-28,13-eter (AUD8), 3 β ,28-diidroxi-urs-12-eno (AUD9).

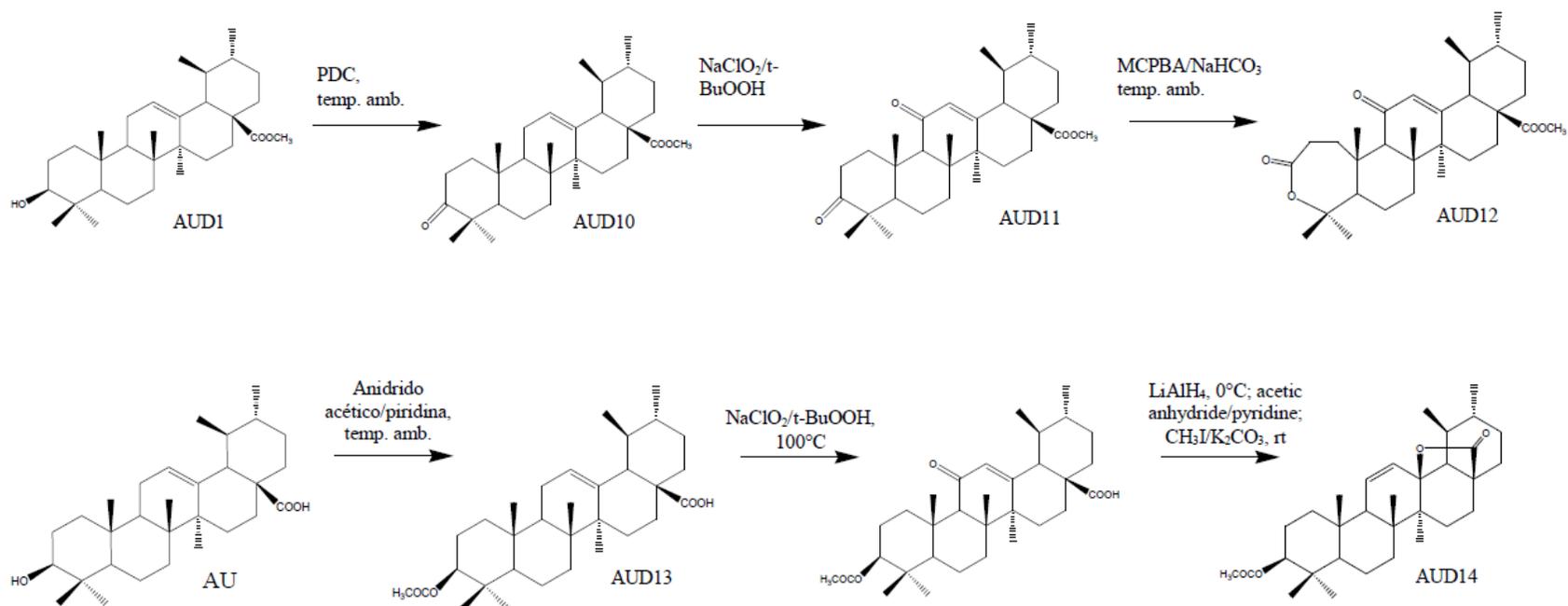


Figura 3: Derivados semi-sintéticos do ácido ursólico (AU): 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD1), 3 β -oxo-urs-12-en-28-oato de metila (AUD10), 3,11-dioxo-urs-12-en-28-oato de metila (AUD11), 3,4-seco-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (AUD12), 3 β -acetóxi-urs-12-en-28-óico (AUD13), 3 β -acetóxi-urs-11-en-28,13 β -lactona (AUD14).

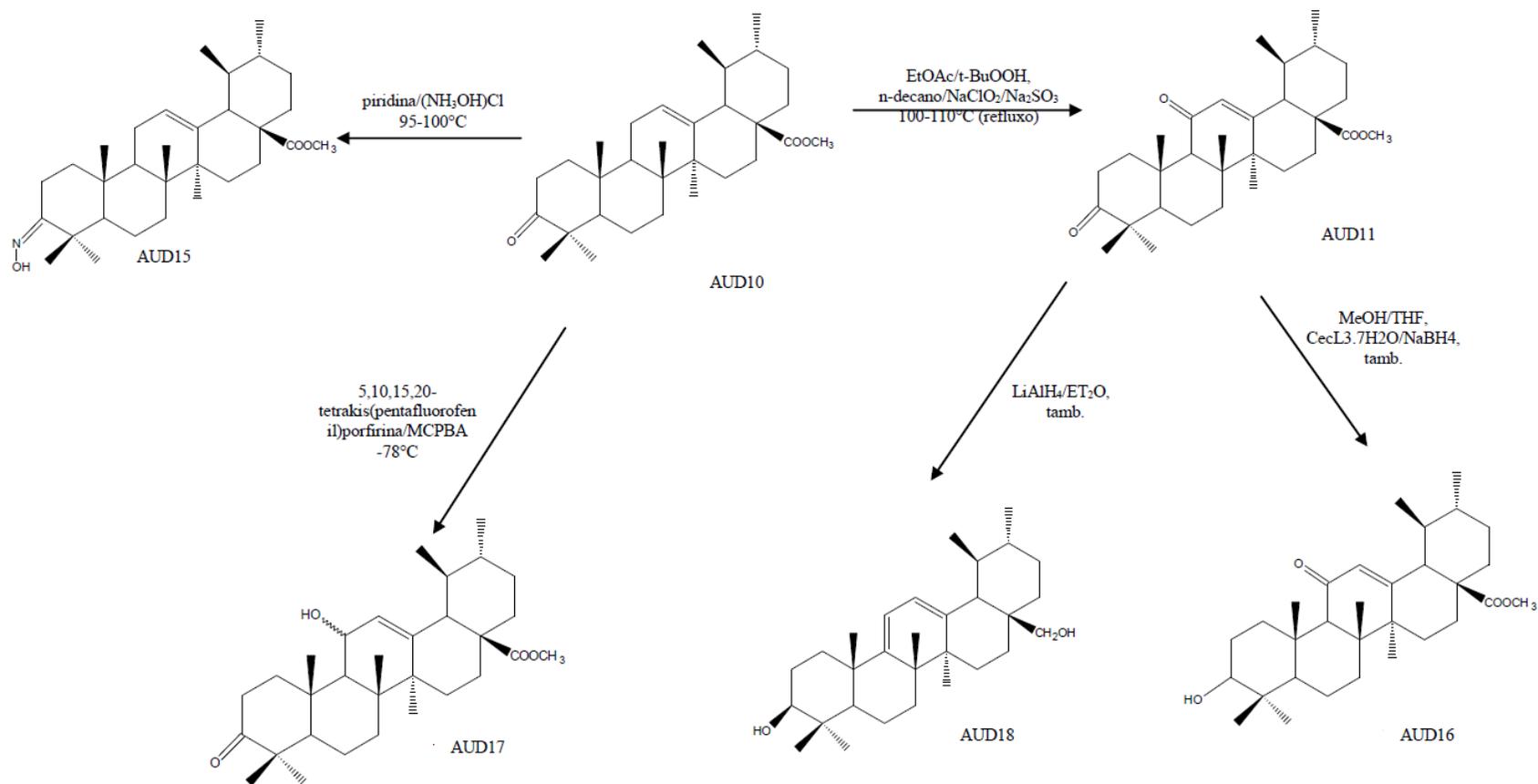


Figura 4: Derivados semi-sintéticos do ácido ursólico (AU): 3-hidroxi-oxima-urs-12-en,28- oato de metila (AUD15), 3,11-dioxo-urs-12-en-28-oato de metila (AUD11), 3 β -oxo-urs-12-en-28-oato de metila (AUD10), 3 β -hidroxi-11-oxours-12-em-28-oato de metila (AUD16), 3-oxo, 11-hidroxi-urs-12-em-28-oato de metila (AUD17), 3 β , 28 diidroxi-urs-9,12 dieno (AUD18).

4.2 Cultura celular

Macrófagos murinos RAW264.7 (2×10^5 células/mL) e células de adenocarcinoma alveolar humano A549 (2×10^5 células/mL) foram cultivados em placas de 96 poços, a 37 °C em 5% de CO₂, em RPMI-1640 suplementado com 2mM L-glutamina, 100 µg/mL de antibiótico (estreptomicina e penicilina), 5% de soro fetal bovino. As células RAW264.7 foram cultivadas por 3, 24 e 48 horas na presença ou ausência do AU e dos AUDs (AUD1 a AUD18) nas concentrações de 7,5, 15, 30, 60 e 90 µM, estimulados ou não com LPS (1µg/mL) e IFN- γ (0,9 ng/mL). As culturas de A549 foram realizadas em 24 e 48 horas na presença ou ausência do AU e dos AUDs (AUD1 a AUD18) nas concentrações de 7,5, 15, 30, 60 e 90 µM. Para controle, as seguintes culturas foram realizadas: células estimuladas ou não sem os tratamentos, células estimuladas ou não na presença de dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%. As concentrações e os tempos de cultura e estímulos variaram de acordo com o experimento e serão detalhados a seguir (CASTRO et al., 2012).

4.3 Avaliação da citotoxicidade do ácido ursólico e seus derivados em células A549 e RAW264.7

A viabilidade dos macrófagos e de A549 foi determinada pelo método colorimétrico do MTT (corante *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* - Sigma, St, Louis, MO, USA). Para o teste os sobrenadantes dos poços da cultura foram cuidadosamente removidos após transcorrido o tempo de cultura. Para as células RAW264.7 foram avaliadas células cultivadas durante 3 e 48 horas e para células A549 foram avaliados os tempos de cultura de 24 e 48 horas. Transcorridos os tempos necessários de cultivos o sobrenadante de cada poço foi removido e 100 µL de RPMI foram adicionados em todos os poços contendo as células cultivadas e em seguida 10µL de MTT (5mg/mL) também foram acrescentados a cada poço. As placas foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Transcorrido o período de 4 horas a reação foi finalizada com a retirada do meio e a adição de 100µl de DMSO (CORRÊA et al., 2010; CASTRO et al., 2012). Para A549 foram apresentadas a porcentagem de viabilidade celular. Na apresentação da citotoxicidade dos compostos em RAW264.7 foi calculado o índice de citotoxicidade (IC50%) que corresponde a concentração do composto que induz 50% do máximo de inibição (WYSKA; MAGER; KRZYZANSKI, 2003).

4.4 Determinação da produção de óxido nítrico (NO) por células RAW264.7 tratadas com do ácido ursólico e seus derivados

A concentração de NO (indiretamente determinada pela dosagem de nitrito) foi medida pelo método de Griess (GRIESS, 1879.; TSIKAS, 2007), no sobrenadante de 48 horas de cultura de macrófagos RAW264.7. As células RAW264.7 foram cultivadas por 48 horas na presença do AU ou dos AUDs (AUD1 a AUD18) nas concentrações de 7,5, 15, 30, 60 e 90 μM , estimulados LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e IFN- γ (0,9 ng/mL), para controle foram utilizadas células estimuladas não tratadas e células não estimuladas e não tratadas. Para realização do teste 100 μL de sobrenadante de cada poço foram transferidos para placas de 96 poços, posteriormente foi acrescentado igual volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de *N*-(1-naftil)-etileno diamina hidrocloreto, 5% H_3PO_4 , Sigma, St, Louis, MO, USA). A produção de nitritos foi quantificada pela comparação a uma curva padrão com diferentes concentrações de NaNO_2 . A absorbância medida a 540 nm. A porcentagem de produção de NO foi calculada levando em consideração o controle de produção, células RAW264.7 não tratadas e estimuladas com LPS e IFN- γ (CASTRO et al., 2012; CORRÊA et al., 2010).

4.5 Avaliação da expressão de NF- κB por células A549 e RAW264.7 tratadas do ácido ursólico e seus derivados em células A549 e RAW264.7

Para a análise da expressão de p65 (indiretamente NF- κB) as células foram cultivadas na presença ou ausência do ácido ursólico (AU) e dos derivados do ácido ursólico (AUD1 a AUD18) nas concentrações de 7,5, 15, 30, 60 e 90 μM . A cultura de macrófagos RAW264.7 (1×10^6 células/mL) estimulados ou não com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e IFN- γ (0,9 ng/mL) foi mantida por 3h (PATIL et al., 2015). A cultura de A549 (1×10^6 células/mL) foi mantida por 24h (WANG et al., 2013). Transcorridos os tempos de cultura as células foram removidas e a marcação de NF- κB processada conforme o kit do fabricante (NF-KPA-B (PS529)-PE 558423, BD, Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), as células foram adquiridas no FACSVerse e analisadas no software FCSexpress.

4.6 Dosagem da citocina TNF por células RAW264.7 tratadas com do ácido ursólico e seus derivados

Placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão específico, incubadas *overnight*, em seguida lavadas com PBS-Tween quatro vezes e bloqueadas com PBS-Soro Fetal por 30 minutos. Após este período, as placas foram lavadas

novamente e, em seguida as amostras (sobrenadante de cultura de macrófagos RAW264.7 estimulados com LPS (1 μ g/mL) e IFN- γ (0,9 ng/mL tratados com AU e seus derivados por 3 horas de cultura e os respectivos controles sobrenadantes de cultura de macrófagos estimulados não tratados e sobrenadante de cultura de macrófagos não estimulados e os padrões de citocinas foram colocados. As placas foram então incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Terminada a incubação, as placas foram lavadas e o 2^o anticorpo biotinizado acrescentado, a placa foi incubada por mais 1 hora à temperatura ambiente. Mais quatro lavagens foram feitas e, após a colocação do conjugado enzimático, as placas foram incubadas por mais 1 hora. Transcorrido o tempo de 1 hora, a reação foi revelada pela adição do substrato e por fim bloqueada com ácido sulfúrico 2N e a leitura feita em leitor de microplacas (a 450 nm). As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações do recombinante (TNF BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) (CASTRO et al., 2012).

4.7 Avaliação de apoptose e necrose em células A549 tratadas como os derivados AUD1, AUD5, AUD6, AUD8 e AUD18

Para a realização do teste de apoptose foram escolhidos os compostos com melhores resultados no teste de MTT 24 e 48 horas. Para detecção de apoptose foi utilizado o Kit de detecção de apoptose Anexina V (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific*). Para realização do ensaio 1x10⁶ células A549 foram cultivadas em microplacas de 96 poços e incubadas na ausência ou presença do AU e seus derivados AUD1, AUD5, AUD6, AUD8, AUD16 na concentração de 90 μ M. Após 36 horas de cultura as células foram tripsinizadas e lavadas com tampão fosfato. Após lavagem das células as mesmas foram marcadas com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo (PI), conforme instruções do fabricante. As células foram então incubadas em temperatura ambiente por 15 min no escuro, e posteriormente foi feita a aquisição dos dados em citômetro de fluxo (FACSVerse, BD Biosciences). Os dados foram analisados no software FCSEXpress 3.0 (De Novo software) (SHAO et al., 2011; BAI et al 2011).

4.8 Análise Estatística

Os resultados apresentados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes e são mostrados como média \pm desvio padrão. A significância de diferença foi analisada usando o teste t de Student, teste de Mann-Whitney e ANOVA quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Atividade dos derivados do ácido ursólico na viabilidade celular de A549

Na Tabela 1 são apresentados os resultados de viabilidade de A549 após 48 horas de cultura de A549 tratada com o AU e seus derivados AUD1 a AUD18.

Tabela1: Viabilidade celular de A549 tratadas com ácido ursólico (AU) e seus derivados (AUD1-AUD18) nas concentrações de 30 ,60 e 90 μ M em 48 horas de cultura.

Compostos ^a	Porcentagem de viabilidade celular (%)		
	30 μ M ^b	60 μ M ^b	90 μ M ^b
AU	99,66 \pm 2,544	*23,45 \pm 1,475	*2,883 \pm 0,1866
AUD1	##3,67 \pm 0,4082	##0,123 \pm 0,04889	##0,056 \pm 0,01595
AUD2	95,67 \pm 1,165	96,25 \pm 2,925	92,39 \pm 2,928
AUD3	100	100	*90,3 \pm 1,243
AUD4	100	100	100
AUD5	93,75 \pm 1,209	*74,5 \pm 2,276	*33,36 \pm 1,244
AUD6	100	*74,2 \pm 1,307	*33,75 \pm 2,842
AUD7	99,4 \pm 5,785	100	100
AUD8	98,8 \pm 2,358	*75,25 \pm 4,396	*46,38 \pm 2,009
AUD9	95,61 \pm 6,373	*77,28 \pm 3,965	*62,03 \pm 3,867
AUD10	100	98,98 \pm 1,499	*83,18 \pm 3,391
AUD11	89,29 \pm 2,716	89,21 \pm 4,467	*81,69 \pm 6,851
AUD12	100	*82,53 \pm 3,701	*61,22 \pm 1,091
AUD13	100	100	*68,54 \pm 1,559
AUD14	100	117,2 \pm 1,981	100
AUD15	93,28 \pm 4,502	*80,67 \pm 6,735	*82,1 \pm 3,867
AUD16	96,2 \pm 4,095	*31,21 \pm 5,891	##0,643 \pm 0,2082
AUD17	100	100	100
AUD18	99,01 \pm 4,021	100	*68,0 \pm 3,520

*p<0,05 células tratadas *versus* células não tratada (100% de viabilidade); # p<0,05 *versus* AU; a Compostos ácido ursólico (AU) e derivados do ácido ursólico (AUD1 a AUD18); b Concentrações em μ M utilizadas.

Com os resultados apresentados na Tabela 1 é possível observar que os compostos AUD1, AUD3, AUD5, AUD6, AUD8, AUD9, AUD10, AUD11, AUD12, AUD13, AUD15, AUD16, AUD18 foram capazes de reduzir a viabilidade celular das células A549 em uma ou mais entre as concentrações testadas, quando em comparação ao controle (células A549 não tratadas). O composto AUD1 foi capaz de reduzir a viabilidade celular nas concentrações 30,

60 e 90 μ M, sendo significativamente mais eficaz que o AU nestas concentrações. O composto AUD16 reduziu a viabilidade celular a valores significativamente menores que AU na concentração de 90 μ M. A alteração sobre a viabilidade celular de A549 foi também avaliada após 24 horas de cultivo de A549 tratadas com AU e seus derivados (Tabela 2). Conforme apresentado na tabela 2, em 24 horas de cultivo apenas os compostos AU (90 μ M), AUD1 (60 μ M; 90 μ M), AUD6 (90 μ M), AUD16 (90 μ M) foram capazes de reduzir a viabilidade celular em relação ao grupo controle (células A549 não tratadas).

Tabela 2: Viabilidade celular de A549 tratadas com ácido ursólico (AU) e seus derivados (AUD1-AUD18) nas concentrações de 30, 60 e 90 μ M em 24 horas de cultura.

Compostos ^a	Porcentagem de viabilidade celular (%)		
	30 μ M ^b	60 μ M ^b	90 μ M ^b
AU	100	91,47 \pm 3,738	*33,91 \pm 1,656
AUD1	100	**28,59 \pm 4,78	**5,36 \pm 0,2
AUD2	100	100	100
AUD3	100	100	100
AUD4	100	100	99,5 \pm 4,66
AUD5	100	100	100
AUD6	100	100	*55,24 \pm 2,025
AUD7	100	100	100
AUD8	100	100	100
AUD9	100	100	98,65 \pm 9,19
AUD10	100	100	100
AUD11	96,44 \pm 3,816	99,81 \pm 3,745	90,5 \pm 1,754
AUD12	100	100	100
AUD13	100	100	98,15 \pm 12,25
AUD14	100	100	100
AUD15	100	100	100
AUD16	100	89,93 \pm 6,192	**26,92 \pm 3,389
AUD17	100	100	100
AUD18	91,49 \pm 1,522	88,75 \pm 3,44	97,91 \pm 0,746

*p<0,05 células tratadas *versus* células não tratada (100% de viabilidade); # p<0,05 versus AU; a Compostos ácido ursólico (AU) e derivados do ácido ursólico (AUD1 a AUD18); b Concentrações em μ M utilizadas.

Nas concentrações testadas de 7,5µM, 15µM nenhum dos compostos estudados foram hábeis em reduzir a viabilidade celular de A549 tratadas em 24 ou 48 horas. Não houve diferença estatística entre os controles A549 não tratada e A549 tratada com o diluente DMSO.

5.2 Atividade dos derivados do ácido ursólico na expressão de NF-κB por células A549

Após 24 horas de tratamento foi avaliado a expressão de NF-κB em células A549, apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Porcentagem da expressão de NF-κB em A549 tratadas com ácido ursólico (AU) e seus derivados (AUD1-AUD18) nas concentrações de 30 ,60 e 90 µM, após 24 horas de cultura.

Compostos ^a	Expressão de NF-κB (%)		
	30µM ^b	60µM ^b	90µM ^b
AU	*83,12±0,04	*65,74±0,94	*41,96±0,453
AUD1	*84,06±0,034	#*39,63±0,285	#*30,55±0,32
AUD2	90,51±0,04	91,41±0,216	*83,66±0,129
AUD3	93,83±0,025	91,34±0,135	90,72±0,15
AUD4	89,92±0,277	92,24±0,05	*83,06±0,018
AUD5	89,38±0,216	91,4±0,242	*86,4±0,23
AUD6	*94,5±0,216	92,4±0,158	*81,46±0,254
AUD7	90,37±0,129	89,51±0,22	*85,36±0,02
AUD8	93,59±0,222	89,15±0,086	*81,82±0,19
AUD9	90,85±0,089	89,15±0,086	90,8±0,04
AUD10	*94,52±0,202	93,72±0,1	92,74±0,135
AUD11	89,35±0,08	*87,61±0,04	*87,59±0,207
AUD12	91,13±0,072	88,17±0,409	*74,02±0,132
AUD13	*86,52±0,271	*75,18±0,034	*78,18±0,02
AUD14	*84,92±0,034	*80,53±0,27	*75,72±0,037
AUD15	89,37±0,14	89,63±0,092	91,45±0,193
AUD16	*94,23±0,069	*86,94±0,141	*77,19±0,689
AUD17	92,18±0,129	89,43±0,441	91,34±0,09
AUD18	*96,22±0,025	*95,37±0,12	90,37±0,317

*p<0,05 células tratadas *versus* células não tratada (percentual de expressão de A549 não tratada = 91,50±0,565); # p<0,05 versus AU; a Compostos ácido ursólico (AU) e derivados do ácido ursólico (AUD1 a AUD18); b Concentrações em µM utilizadas. Para a análise da expressão NF-κB foi avaliado a fosforilação do domínio da p65 (indiretamente NF-κB) das células A549 cultivadas na presença ou ausência do ácido ursólico (AU) e dos derivados do ácido ursólico (AUD1 a AUD18) nas concentrações de 7,5, 15, 30, 60 e 90 µM por 24 horas.

Os resultados demonstram que os compostos AU, AUD1, AUD2, AUD4, AUD5, AUD6, AUD7, AUD8, AUD11, AUD12, AUD13, AUD14 e AUD16 foram capazes de inibir a expressão de NF- κ B. Os compostos AUD1, AUD13 e AUD14 reduziram nas concentrações de 30, 60 e 90 μ M. Os compostos AUD6, AUD10, AUD16 e AUD18 na concentração de 30 μ M foram diferentes do controle promovendo um aumento na expressão de NF- κ B por células A549. O composto UAD6 reduziu a expressão do fator de transcrição na concentração de 90 μ M. O composto AUD16 por sua vez reduziu a expressão do fator de transcrição nas concentrações de 60 e 90 μ M. O composto AUD18 manteve o aumento da expressão de NF- κ B na de 60 μ M. Nas concentrações testadas de 7,5 e 15 μ M nenhum dos compostos estudados foram hábeis em reduzir a expressão de NF- κ B em A549.

5.3 Indução da apoptose por derivados do ácido ursólico (AUD1, AUD5, AUD6, AUD8 e AUD16) em células A549

Para verificar se a existência de apoptose induzida pelos derivados do AU nas células A549, em função da morte celular evidenciada em ensaio de MTT, foi realizado o ensaio de apoptose. Com base nos resultados obtidos no MTT, foram selecionados os derivados AUD1, AUD5, AUD6, AUD8 e AUD16. Os resultados são apresentados na Figura 5.

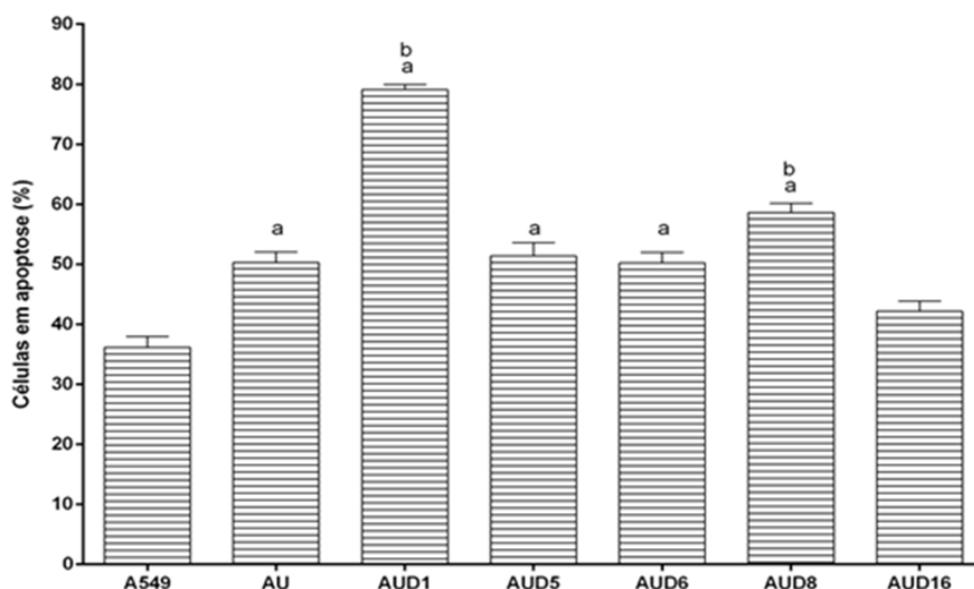


Figura 5 Determinação de apoptose em células A549 por citometria de fluxo. As células A549 foram tratadas com 90 μ M de Ácido ursólico (AU) e seus derivados (AUD1, AUD5, AUD6, AUD8, AUD16). Após 36 horas cultura e tratamento, a apoptose foi determinada por citometria de fluxo baseada na coloração de anexinaV. A apoptose é representada por porcentagens relativas de células apoptóticas. a= $p < 0,05$ diferenças significativas entre as células A549 tratadas com derivados do AU *versus* células A549 sem tratamento (grupo controle); b= $p < 0,05$ diferenças significativas entre as células A549 tratadas com AUD *versus* células A549 tratadas com AU.

A Figura 5 mostra o resultado de apoptose das células A549 após 36 horas de tratamento com 90 μ M de AU e seus derivados selecionados. O composto AUD1 foi o melhor indutor de apoptose nas células A549. Os compostos AUD1 e AUD8 induziram a apoptose estatisticamente diferente dos controles (células A549 tratadas com AU e A549 sem tratamento).

Os compostos AU, AUD5 e AUD6 também induziram a apoptose, mas com diferença estatística em relação controle A549 sem tratamento ($p < 0,05$). O composto AUD16 não apresentou diferença estatística na indução de apoptose em relação aos controles. Não houve diferença estatística para o controle quando analisada a indução de necrose pelo AU ou AUDs.

5.4 Atividade dos derivados do ácido ursólico na viabilidade celular de macrófagos RAW264.7 e na produção de NO

Na Tabela 4 são apresentados os resultados de produção de NO por macrófagos RAW 264.7 tratados com AU ou os AUDs, estimulados com LPS e IFN- γ após 48 horas de cultura. Na mesma tabela é apresentado o índice de citotoxicidade (IC50%) obtidos pelo teste de MTT com macrófagos RAW264.7 não estimulados tratados com AU ou seus AUDs e os respectivos controles correspondentes as células não tratadas.

Na concentração 7,5 μ M apenas os compostos AUD1, AUD2 e AUD6 são capazes de inibir a produção de NO em relação ao grupo controle (células RAW264.7 estimuladas não tratadas). Em 15 μ M os compostos AU, AUD2, AUD3, AUD6, AUD8 e AUD9 são capazes de inibir a produção de NO ($p < 0,05$). Ao utilizar 30 μ M os compostos AUD2, AUD3, AUD4, AUD5, AUD6, AUD7, AUD8, AUD9, AUD10, AUD17 e AUD18 reduzem a produção de NO ($p < 0,05$).

Avaliando a concentração de 60 μ M é possível observar que os compostos AUD2, AUD3, AUD4, AUD6, AUD7, AUD9, AUD10, AUD11, AUD17 e AUD18 foram capazes de inibirem a produção de NO.

Ao avaliarmos o efeito dos compostos a 90 μ M observamos que os compostos AUD2, AUD3, AUD4, AUD7, AUD9, AUD10, AUD11 e AUD14 foram capazes de reduzir a produção de NO em relação ao controle ($p < 0,05$) com valores de IC50 superiores a 90 μ M. A inibição não pode ser considerada nos compostos que apresentaram a redução da produção de NO em concentrações superiores ao IC50, uma vez que pode estar relacionada a morte celular.

Tabela 4: Produção de NO por macrófagos RAW 264.7 tratados com ácido ursólico e seus derivados, após 48 horas de cultura e IC50.

Compostos ^a	Produção de Óxido Nítrico (μM)					
	7,5 μM^b	15 μM^b	30 μM^b	60 μM^b	90 μM^b	IC50 (μM)
AU	13,11 \pm 0,942	*9,65 \pm 0,508	^c 3,05 \pm 1,163	^c 1,99 \pm 0,154	^c 2,12 \pm 0,833	17,06
AUD1	*9,63 \pm 0,147	^c 3,98 \pm 0,438	^c 4,69 \pm 0,073	^c 2,63 \pm 0,369	^c 1,66 \pm 0,073	9,64
AUD2	*7,46 \pm 0,886	*8,05 \pm 0,305	*8,55 \pm 0,471	*6,69 \pm 1,101	*4,75 \pm 0,611	>90
AUD3	13,94 \pm 1,467	*9,99 \pm 1,845	*9,13 \pm 1,026	*7,96 \pm 1,331	*6,10 \pm 1,759	>90
AUD4	16,85 \pm 0,816	14,32 \pm 0,634	*10,47 \pm 0,926	*8,05 \pm 1,354	*8,94 \pm 0,271	>90
AUD5	13,01 \pm 1,715	11,41 \pm 1,331	*8,39 \pm 1,103	^c 2,98 \pm 0,375	^c 4,56 \pm 0,272	39,89
AUD6	*9,93 \pm 1,535	*10,72 \pm 1,625	*10,75 \pm 0,194	*4,08 \pm 0,723	^c 0,93 \pm 0,214	74,62
AUD7	13,69 \pm 0,814	11,51 \pm 2,404	*8,18 \pm 2,218	*7,09 \pm 0,993	*5,83 \pm 1,534	>90
AUD8	11,81 \pm 1,598	*10,79 \pm 1,034	*9,85 \pm 0,597	^c 3,63 \pm 0,532	^c 3,46 \pm 0,698	47,25
AUD9	16,59 \pm 0,519	*10,98 \pm 1,750	*10,87 \pm 0,667	*5,95 \pm 0,296	*5,51 \pm 0,949	>90
AUD10	9,93 \pm 2,290	12,19 \pm 1,108	*9,86 \pm 0,865	*5,96 \pm 0,149	*6,05 \pm 2,123	>90
AUD11	12,23 \pm 1,847	10,11 \pm 2,374	10,28 \pm 2,818	*9,15 \pm 0,077	*9,89 \pm 1,255	>90
AUD12	20,98 \pm 3,343	21,06 \pm 1,018	13,23 \pm 1,551	12,77 \pm 1,211	12,55 \pm 0,538	88,76
AUD13	15,472 \pm 3,038	20,44 \pm 3,287	15,32 \pm 4,584	13,32 \pm 1,348	^c 8,57 \pm 0,748	34,6
AUD14	16,32 \pm 2,268	16,33 \pm 1,413	13,77 \pm 1,885	10,98 \pm 1,605	*7,25 \pm 1,923	>90
AUD15	22,13 \pm 5,718	14,76 \pm 0,336	17,34 \pm 2,241	10,82 \pm 1,703	10,59 \pm 2,221	>90
AUD16	14,15 \pm 3,235	13,59 \pm 0,565	10,28 \pm 4,061	^c 9,02 \pm 0,071	^c 7,62 \pm 1,826	24,6
AUD17	11,33 \pm 2,671	12,46 \pm 2,605	*10,45 \pm 0,631	*8,91 \pm 1,259	^c 6,01 \pm 0,419	80,05
AUD18	11,89 \pm 3,721	12,46 \pm 1,381	*10,52 \pm 1,345	*8,58 \pm 1,301	^c 6,98 \pm 0,561	63,4

*p<0,05 Produção de NO por macrófagos RAW254.7 tratados com ácido ursólico (AU) ou derivados do ácido ursólico (AUD) e estimulados com LPS e IFN- γ menor que o macrófagos RAW264.7 estimulados com LPS e IFN- γ porém não tratados (produção de NO= 14,77 \pm 2,523); a Compostos ácido ursólico (AU) e derivados do ácido ursólico (AUD1 a AUD18); b Concentrações utilizadas de AU e dos AUD; Índice de citotoxicidade (IC50);c A redução de NO não pode ser considerada por estar acima do IC50.

5.5 Atividade dos derivados do ácido ursólico na expressão de NF- κ B e na porcentagem de produção de TNF

Na tabela 5 são apresentados os resultados da expressão do fator de transcrição NF- κ B e da produção de citocina próinflamatória TNF por células RAW264.7 estimuladas com LPS e IFN- γ após 3 horas de tratamento com AU ou os AUDs. Os resultados apresentados na tabela 5 demonstram que os compostos AU, AUD1, AUD3, AUD4, AUD5, AUD6, AUD7, AUD8, AUD11, AUD12, AUD13, AUD14, AUD15 e AUD18 foram capazes de reduzir a expressão de NF- κ B em todas as concentrações testadas. O composto AUD2 reduziu a expressão de NF- κ B nas concentrações de 15, 30, 60 e 90 μ M e AUD9 em 60 e 90 μ M.

O composto AUD16 aumentou a expressão de NF- κ B em 7,5 e 15 μ M, mas reduziu a expressão significativamente em relação ao controle na concentração de 90 μ M. O composto AUD17 também aumentou a expressão de NF- κ B na concentração de 7,5 μ M, porém reduzindo nas concentrações de 30, 60 e 90 μ M. O composto AUD10 apresentou um aumento na expressão de NF- κ B nas concentrações de 30 e 90 μ M.

Em relação a produção de TNF a tabela 5 mostra que todos os compostos foram capazes de reduzir a produção de TNF pelas células RAW264.7 nas concentrações de 60 e 90 μ M. Os compostos AUD12, AUD13, AUD14, AUD15 reduziram em todas as concentrações testadas. Os compostos AUD7 e AUD18 só não foram capazes de reduzir na concentração de 7,5 μ M.

Já os compostos AU, AUD2, AUD3, AUD4, AUD5, AUD6, AUD8 e AUD9 reduziram apenas nas concentrações de 60 e 90 μ M. Entretanto alguns destes compostos apresentaram aumento do TNF nas demais concentrações testadas (Tabela 5).

Os compostos AUD1, AUD10 e AUD11 foram capazes de reduzir a produção de TNF nas concentrações de 30, 60 e 90 μ M.

Tabela 5: Expressão de NF-κB e porcentagem de produção de citocina pró-inflamatória TNF por células RAW264.7 estimuladas com LPS e IFN-γ e tratadas com ácido ursólico ou seus derivados após 3 horas de cultura.

Compostos ^a	NF-κB (%)					TNF (%)				
	7,5μM ^b	15 μM ^b	30 μM ^b	60 μM ^b	90 μM ^b	7,5μM ^b	15 μM ^b	30 μM ^b	60 μM ^b	90 μM ^b
AU	*14,47±0,805	*13,59±0,288	*7,91±0,111	*8,153±0,313	*6,953±0,198	94,88±7,95	>100	90±8,08	*16,13±5,98	*23,98±2,09
AUD1	*13,43±0,815	*12,77±0,322	*11,98±0,505	*9,653±0,083	*3,028±0,11	>100	>100	*74,55±9,52	*11,07±0,33	*17,98±1,79
AUD2	18±0,152	*15,11±0,281	*14,78±0,189	*11,27±0,319	*8,45±0,076	>100	>100	89,05±6,69	*31,73±2,18	*30,41±1,36
AUD3	*10,82±0,48	*15,06±0,153	*14,45±0,093	*10,43±0,222	*8,76±0,2	>100	>100	>100	*33,48±2,08	*33,01±2,72
AUD4	*11,82±0,232	*9,77±0,372	*11,11±0,201	*9,17±0,256	*10,47±0,164	>100	>100	91,13±15,32	*41,8±2,78	*32,64±4,11
AUD5	*12,35±0,299	*15,42±0,201	*12,22±0,232	*12,75±0,182	*13,96±0,241	>100	>100	>100	*48,02±1,28	*32,38±1,6
AUD6	*12,09±0,133	*12,08±0,12	*12,08±0,057	*13,97±0,159	*13,93±0,27	>100	>100	>100	*36,66±2,82	*28,24±1,03
AUD7	*11,32±0,12	*12,09±0,108	*11,65±0,163	*11,10±0,181	*11,84±0,139	92,24±6,34	*67±1,72	*37,97±3,85	*15,78±0,81	*14,82±2,14
AUD8	*13,4±0,102	*13,64±0,189	*15,12±0,156	*14,96±0,119	*14,54±0,152	>100	>100	79,98±12,35	*19,55±0,63	*14,43±0,71
AUD9	16,68±0,277	16,15±0,477	16,27±0,193	*11,75±0,116	*15,52±0,237	>100	>100	>100	*19,83±0,63	*14,56±1,83
AUD10	*15,38±0,119	*14,66±0,226	^c 17,73±0,287	*16,67±0,338	^c 18,40±0,353	>100	84±6,38	*42,33±0,96	*17,58±1,13	*16,26±0,69
AUD11	*13±0,18	*12,71±0,266	*14,81±0,292	*15,26±0,306	*14,04±0,171	98,29±7,94	77,09±8,78	*55,8±3,63	*21,72±1,52	*16,87±0,56
AUD12	*10,49±0,046	*9,04±0,55	*13,66±0,54	*11,29±0,855	*11,98±0,109	*65,47±3,35	*49,87±1,07	*19,48±1,19	*6,5±0,25	*4,71±0,43
AUD13	*10,98±0,178	*9,64±0,226	*11,62±0,24	*11,21±0,231	*8,96±0,091	*70,83±3,9	*51,3±2,07	*24,66±1,48	*9,69±0,55	*12,39±1,03
AUD14	*9,93±0,226	*11,07±0,19	*9,968±0,057	*11,79±0,26	*9,37±0,276	*80,24±4,08	*53,41±2,69	*16,34±0,73	*10,92±1,41	*10,81±0,59
AUD15	*10,35±0,07	*10,08±0,169	*9,708±0,189	*10,36±0,177	*9,34±0,19	*62,27±3,38	*61,05±3,85	*27,68±2	*11,50±1,14	*10,46±0,6
AUD16	^c 21,02±0,09	^c 22,69±0,462	16,29±0,205	15,66±0,08	*3,38±0,11	>100	*93,81±4,97	*50,35±1,39	*10,81±0,92	*4,67±0,46
AUD17	^c 21,15±0,185	17,2±0,5	*15,14±0,234	*15,12±0,29	*13,39±0,102	>100	>100	>100	*74,88±0,55	*40,87±3,34
AUD18	*14,82±0,045	*11,27±0,036	*11,72±0,19	*12,12±0,136	*11,49±0,178	85,76±2,36	*69,51±1,2	*71,82±4,95	*61,87±4,4	*25,20±2,09

*p<0,05 RAW254.7 estimuladas com LPS e IFN-γ não tratados com ácido ursólico (AU) ou derivados do ácido ursólico (AUD) (NFκB: 17,24±0,41; TNF:100%) e *versus* RAW254.7 estimuladas com LPS e IFN-γ e tratadas com AU ou AUD. a Compostos ácido ursólico (AU) e derivados do ácido ursólico (AUD1 a AUD18); b Concentrações em μM utilizadas.c Concentração onde a expressão de NF-κB foi estatisticamente maior que o controle (NF-κB: 17,24±0,41).

6 DISCUSSÃO

O AU é um triterpeno pentacíclico obtido a partir da extração e da purificação de várias espécies vegetais, apresentando efeitos farmacológicos consideráveis (HUANG et al., 2009; JIANG et al., 2015; LI et al., 2017; LI et al., 2011; LIU et al., 2013; MA et al., 2005; MICOTA et al., 2014; WANG et al., 2013; YADAV et al., 2010). Pesquisas mostram que esse triterpeno possui atividade antiproliferativa contra linhagens de células tumorais humanas, antimicrobiana, atividade anti-inflamatória, imunomoduladora, entre outras atividades biológicas (GAI et al., 2013; GAO et al., 2016; GONZÁLEZ-CHÁVEZ et al., 2017; NELSON et al., 2015; ULLEVIG et al., 2014; YANG et al., 2016; ZERIN et al., 2015).

No presente trabalho foi possível observar que alguns dos compostos derivados do AU foram capazes de reduzir a viabilidade celular de A549 (AUD1, AUD3, AUD5, AUD6, AUD8, AUD9, AUD10, AUD11, AUD12, AUD13, AUD15, AUD16, AUD18). Dentre esses, o composto AUD1 apresentou o melhor resultado. A análise da modificação estrutural sugere que a melhor atividade citotóxica do composto AUD1 em relação ao AU pode ser atribuída a esterificação do grupo carboxílico na posição C-28. Bai e colaboradores (2011) ao produzirem derivados do AU por esterificação em posições C-3 ou C-28 do AU revelaram que a esterificação do grupo carboxílico seria importante para aumentar a citotoxicidade contra linhagens de células de câncer humano (HT-29, HepG2 e BGC-823), devido ao aumento na lipofilicidade e melhor permeabilidade da membrana.

Após 48 horas de tratamento, os compostos AUD5, AUD6, AUD8 e AUD9 apresentaram citotoxicidade contra as células A549 nas concentrações de 60 μ M e 90 μ M, já composto AUD18 foi citotóxico apenas na concentração de 90 μ M. É importante ressaltar que na estrutura química desses compostos foi mantido o grupo hidroxila na posição C-3. Ma e colaboradores (2005) relataram que o grupo doador de hidrogênio na posição C-3 e/ou C-28 é essencial para atividade citotóxica dos compostos derivados do AU, o que pode justificar a atividade citotóxica destes compostos. A ausência da hidroxila no C-3 nos compostos AUD10 e AUD11 pode ter prejudicado a citotoxicidade dos mesmos em relação aos compostos anteriormente citados. Ainda assim, foi possível observar diferença estatística na redução da viabilidade celular de A459 em relação ao controle quando tratadas com estes compostos (MA et al., 2005).

O composto AUD16 apresentou elevada citotoxicidade em A549, sendo estruturalmente semelhante ao composto AUD1. Estruturalmente o composto AUD16 apresenta apenas um grupamento cetona no C-11 que o difere do AUD1. Desta forma,

possivelmente sua atividade biológica pode ser justificada pelas mesmas características estruturais do composto AUD1 (BAI et al., 2011). Na concentração de 90 μ M os compostos AUD1 e AUD16 apresentaram citotoxicidade para A549 significativamente maior do que o AU.

O derivado AUD13 sofreu uma esterificação no C-3, mas manteve o grupo carboxílico no C-28. Conforme Bai e colaboradores (2011) a esterificação no C-3 ou no C-28 aumenta a citotoxicidade. Por outro lado, o composto AUD12 apresenta uma estrutura mais diferenciada com dois grupamentos cetona nas posições C-3 e C-11 e ainda uma esterificação no C-28, demonstrando uma significativa redução da viabilidade em A549 quando comparado ao grupo controle. Entretanto, não foi possível concluir qual modificação estrutural contribuiu para a atividade biológica desses derivados semissintéticos.

No presente trabalho foi avaliada a citotoxicidade e a redução do NF- κ B dos derivados semissintéticos do AU. Entre os compostos foram selecionados cinco derivados para a avaliação do teste de indução de apoptose e necrose: AUD1, AUD5, AUD6, AUD8 e AUD16. No ensaio de apoptose os compostos AUD1, AUD5, AUD6 e AUD8 apresentaram diferença estatística em relação ao controle, células A549 não tratadas. Os compostos AUD 1 e AUD8 promoveram maior percentual de indução de apoptose, sendo estatisticamente diferentes das células A549 não tratadas e também das células A549 tratadas com AU. Em relação à necrose não houve diferença estatística entre os compostos.

Desta forma, entre os compostos estudados é possível destacar o composto AUD1 que reduziu a viabilidade celular de A549, diminuiu a expressão de NF- κ B (menor quantidade de p65 fosforilada) e induziu a apoptose de células A549. É importante ressaltar que estudos anteriores, já haviam relatado a atividade citotóxica deste composto, entretanto, não em linhagem de A549, assim como não verificaram a influência deste derivado na expressão de NF- κ B e na indução da apoptose em células tumorais (LEAL et al., 2012; MA et al., 2005; TU et al., 2009).

O NF- κ B promove a sobrevivência celular e a regulação positiva da expressão de genes para proliferação e metástase tumoral, incluindo fatores antiapoptóticos (FULDA; DEBATIN, 2006; GARG; AGGARWAL, 2002; KIM; HAWKE; BALDWIN, 2006; PERKINS, 2006; SORRIENTO et al., 2012). Sabendo que o NF- κ B é um fator de transcrição que desempenha um papel importante na carcinogênese, bem como na regulação da resposta inflamatória, a inibição da sua atividade é uma estratégia terapêutica potencial para o tratamento do câncer. Zanotto-Filho e colaboradores (2009) mostraram que a inibição de NF- κ B promove a morte nas células malignas ao passo que as células sadias não foram afetadas, o

que reforça o potencial de indução de morte celular e, principalmente a seletividade dos inibidores desta via de sinalização.

Os resultados apresentados corroboraram com os estudos dos demais autores no que se refere ao papel de NF- κ B como um potencial alvo para indução de morte em células tumorais e também na inibição dos processos anti-inflamatórios (SHISHODIA et al., 2003; SORRIENTO et al., 2009; ZANOTTO-FILHO et al., 2009).

É importante ressaltar que existem outras vias de sinalização que podem ser alvos destes compostos. A fosfatidilinositol 3 quinase /proteína quinase B (PI3K/ AKT) seria uma possível via de investigação, pois está envolvida na proliferação celular, crescimento, sobrevivência, angiogênese, apoptose, síntese proteica, metabolismo e diferenciação celular (ENGELMAN; LUO; CANTLEY, 2006). Outra via relevante para futuras pesquisas seria a das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), por sua participação no controle de processos fisiológicos fundamentais, tais como crescimento, proliferação, diferenciação e migração celulares e apoptose. Entre os grupos caracterizados de MAPKs, destacam-se: quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase Jun N-terminal (JNK) e p38 (CARGNELLO; ROUX, 2011). Em estudo realizado por Wang e colaboradores (2013), os pesquisadores observaram que o AU inibiu a fosforilação de Akt e ERK, suprimindo a proliferação das linhagens celulares de câncer humano (SW480, LoVo). Bergamin e colaboradores (2017) em estudos realizados com as células de glioma C6, observaram que o AU diminui a fosforilação de Akt, reduzindo a proliferação celular e ainda promoveu a apoptose.

Luo e colaboradores (2017) observaram que o tratamento com AU pode inibir a proliferação de linhagens de células de câncer humano (T47D, MCF-7 e MDA-MB-231) por inativação da via de sinalização PI3K / AKT.

Em relação aos compostos AUD4, AUD6, AUD7, AUD8, AUD12 e AUD18 não foi possível encontrar trabalhos verificando a citotoxicidade em células tumorais com o objetivo de correlacionar com os resultados obtidos no presente trabalho.

Na linhagem de macrófagos murinos RAW264.7 os compostos AUD2, AUD3, AUD4, AUD7, AUD9, AUD10, AUD11, AUD14 e AUD15 apresentaram IC₅₀ superior a 90 μ M. Compostos diesterificados (AUD2, AUD3, AUD4, AUD7) apresentam menor capacidade citotóxica. Ma e colaboradores (2005) relataram que a esterificação de ambos os carbonos C-3 e C-28 diminui a capacidade citotóxica do composto. Além disso, foi observado que estes compostos inibiram a produção de NO, com destaque para o composto AUD2 que teve a maior redução de NO na menor concentração testada.

Os compostos AUD10 e AUD11, que também reduziram a produção de NO, possuem cetona no carbono C-3 e éster no carbono C-28 modificações estruturais que podem estar relacionadas à menor atividade citotóxica destes compostos. Foi possível observar que a presença de mais uma cetona no carbono C-11 no composto AUD11 parece ter influenciado a capacidade de inibição do NO, tornando-o menos efetivo que o AUD10. Zhang e colaboradores (2017) em estudo *in vitro* com células RAW264.7 demonstraram que a introdução do grupamento cetona na estrutura do AU contribui para redução da produção de NO por esses macrófagos.

No presente estudo também foi avaliado o efeito do AU e seus AUDs, na expressão de NF- κ B e na produção de TNF por macrófagos RAW264.7 ativados por LPS e IFN- γ para verificar o papel imunomodulador dos compostos. No presente trabalho foi possível observar que todos os compostos foram capazes de reduzir a expressão de NF- κ B e produção de TNF em uma ou mais das concentrações testadas. AUD12, AUD13, AUD14 e AUD15 foram capazes de reduzir expressão de NF- κ B e TNF em todas as concentrações testadas.

Estudos mostram que o NF- κ B é um fator de transcrição bem conhecido no processo inflamatório, responsável por induzir a transcrição de diversos genes mediadores pró e anti-inflamatórios, inclusive de TNF (WALLACE; MILLER, 2000). No presente trabalho a redução na expressão de NF- κ B foi acompanhada da redução da produção de TNF com destaque para o composto AUD12, que possui uma composição química complexa, sendo uma lactona, com um grupo cetona no C-11 e esterificação no C-28.

No presente trabalho as modificações químicas realizadas para obtenção dos AUDs sugerem a manutenção da capacidade desses compostos em atuar no fator de transcrição NF- κ B e citocinas pró-inflamatórias, assim como o AU, conforme relatados por alguns autores (CHECKER et al., 2012; PATIL et al., 2015). Entretanto, a citotoxicidade dos AUDs apresentados é menor do que a do AU, com exceção do AUD1.

Desta forma, é possível observar que os derivados AUD12 e AUD15 reduziram a expressão de NF- κ B e a produção de TNF em células RAW264.7 em todas as concentrações testadas, mas não foram capazes de inibir a produção de NO. Os compostos AUD3, AUD4, AUD7 e AUD11 apresentaram baixa citotoxicidade contra esses macrófagos, além disso, foram capazes de reduzir a expressão de NF- κ B em todas as concentrações testadas, e inibir a produção de NO e TNF em diferentes concentrações. Portanto, esses compostos são promissores na atividade imunomoduladora. É importante ressaltar que esses derivados semisintéticos apresentam em comum a presença de éster na posição C-28.

O composto AUD2 apresentou IC50 acima de 90 μ M, sendo o composto que melhor reduziu NO nessa concentração, sem alterar a viabilidade celular. Foi capaz de inibir a expressão de NF- κ B em dose resposta e inibir a produção de TNF nas concentrações 30, 60 e 90 μ M. Sua modificação estrutural consiste na esterificação de ambos carbonos C-3 e C-28, o que reduz a sua citotoxicidade conforme observado por Bai e colaboradores (2011).

O composto AUD10 apesar de possuir uma IC50 maior que 90 μ M aumentou a expressão de NF- κ B em diferentes concentrações, porém reduziu a produção de NO e TNF, indicando uma possível via diferente de NF- κ B para inibição de TNF. A não inibição de NF- κ B acompanhada de uma inibição de TNF pelos derivados pode provavelmente envolver vias independentes de NF- κ B. Diversos estudos têm descrito vias que resultam na produção e inibição de TNF induzido por LPS, tais como proteína quinase mitógeno ativada, ERK1, ERK2 e cJun N-quinase terminal (AGGARWAL, 2003; BRADLEY, 2008).

É importante ressaltar que as atividades antitumoral e anti-inflamatória, apesar de apresentadas separadamente, estão correlacionadas no processo patológico. Atualmente, sabe-se que a inflamação é um componente crítico da progressão tumoral, muitos tipos de câncer surgem de locais de infecção, irritação crônica e inflamação (COUSSENS; WERB, 2002).

A ativação e presença constante de células imunológicas infiltradas nos tumores e a decorrente produção de citocinas neste microambiente, também podem colaborar para ativação da via de sinalização de NF- κ B *in vivo*, uma vez que grande parte dos mediadores inflamatórios sinaliza através de via clássica de NF- κ B (COUSSENS; WERB, 2002; LAWRENCE, 2009). Portanto, os inibidores da via NF- κ B podem reduzir a resposta inflamatória e potencializar os efeitos da quimioterapia contra o câncer (YAMAMOTO; GAYNOR, 2001).

Desta forma, estudos para compreender melhor os mecanismos de ação dos derivados semissintéticos do ácido ursólico tornam-se relevantes para o desenvolvimento de possíveis novas terapias.

7 CONCLUSÕES

- A esterificação na posição C-28 do AU gerou compostos (AUD1 e AUD16) com melhor potencial citotóxico contra as células A549;
- Os compostos AUD1 e AUD8 aumentaram a porcentagem de apoptose em células A549 quanto comparados ao AU. O composto AUD16 apesar da alta citotoxicidade não foi capaz de promover o aumento da apoptose em relação ao AU;
- A manutenção do grupamento hidroxila no C-3 foi importante para a citotoxicidade dos compostos quando testadas em células de adenocarcinoma de pulmão A549;
- Entre os compostos testados para avaliar a atividade imunomoduladora em macrófagos RAW264.7 com $IC_{50} > 90 \mu M$, o composto AUD2 foi o que apresentou melhor redução de NO na menor concentração testada;
- Os compostos estudados apresentaram resultados que merecem aprofundamento dos estudos de suas vias de atuação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHIWA, Y.; HASEGAWA, K.; KOMIYA, T.; UDAGAWA, Y. Ursolic acid induces Bax-dependent apoptosis through the caspase-3 pathway in endometrial cancer SNG-II cells. **Oncology Reports** v. 13, n. 1, p. 51–57, 2005.
- AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology** v. 3, n. 9, p. 745–756, 1 set. 2003.
- ALVES MONTEATH, S. A.F.; MACIEL, M. A. M.; VEGA, R. G.; DE MELLO, H.; DE ARAÚJO MARTINS, C.; ESTEVES-SOUZA, A.; GATTASS, C. R.; ECHEVARRIA, A. Ultrasound-assisted Extraction of Ursolic Acid from the Flowers of *Ixora coccinia* Linn (Rubiaceae) and Antiproliferative Activity of Ursolic Acid and Synthesized Derivatives. **Pharmacognosy magazine** v. 13, n. 50, p. 265–269, 2017.
- BACANLI, M.; AYDIN, S.; BAŞARAN, A. A.; BAŞARAN, N. Are all phytochemicals useful in the preventing of DNA damage? **Food and Chemical Toxicology** v. 109, p. 210–217, 2017.
- BAI, K. K.; CHEN, F. L.; YU, Z.; ZHENG, Y. Q.; LI, Y. N.; GUO, Y. H. Synthesis of [3 β -acetoxy-urs-12-en-28-oyl]-1-monoglyceride and investigation on its anti tumor effects against BGC-823. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** v. 19, n. 13, p. 4043–4050, 2011.
- BERGAMIN, L. S.; FIGUEIRÓ, F.; DIETRICH, F.; MANICA, F. M.; FILIPPI-CHIELA, E. C.; MENDES, F. B.; JANDREY, E. H. F.; LOPES, D. V.; OLIVEIRA, F.; H.; NASCIMENTO, I. S. C.; ULRICH, H.; BATTASTINI, A. M. O. Interference of ursolic acid treatment with glioma growth: An in vitro and in vivo study. **European Journal of Pharmacology** v. 811, p. 268–275, 2017.
- BRADLEY, JR. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology** v. 214, n. 2, p. 149–160, jan. 2008.
- CARGNELLO, M.; ROUX, P.P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 75, n. 1, p. 50–83, 2011.
- CARGNIN, S. T.; GNOATTO, S. B. Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: A valuable triterpenoid with functional properties. **Food Chemistry** v. 220, p. 477–489, 2017.
- CASTRO, S. B.R.; JUNIOR, C.O.R.; ALVES, C.C.S.; DIAS, A.T.; ALVES, L.L.; MAZZOCOLI, L.; ZOET, M.T.; FERNANDES, S.A.; TEIXEIRA, H.C.; ALMEIDA, M.V.; FERREIRA, A.P. Synthesis of Lipophilic Genistein Derivatives and Their Regulation of IL-12 and TNF- α in Activated J774A.1 Cells. **Chemical Biology and Drug Design** v. 79, n. 3, p. 347–352, 2012.
- CHA, D.S.; EUN, J.S.; JEON, H. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the leaves of *Eriobotrya japonica*. **Journal of Ethnopharmacology** v. 134, n. 2, p. 305–312, 2011.

- CHADALAPAKA, G.; JUTOORU, I.; MCALEES, A.; STEFANAC, T.; SAFE, S. Structure-dependent inhibition of bladder and pancreatic cancer cell growth by 2-substituted glycyrrhetic and ursolic acid derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** v. 18, n. 8, p. 2633–2639, 2008.
- CHECKER, R.; SANDUR, S.K.; SHARMA, D.; PATWARDHAN, R.S.; JAYAKUMAR, S.; KOHLI, V.; SETHI, G.; AGGARWAL, B.B.; SAINIS, K.B. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. **PLoS ONE** v. 7, n. 2, p.1932-6203, 2012
- CHEN, H.; GAO, Y.; WANG, A.; ZHOU, X.; ZHENG, Y.; ZHOU, J. Evolution in medicinal chemistry of ursolic acid derivatives as anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 92, p. 648–655, 2015.
- CHEN, H.; GAO, Y.; WANG, A.; ZHOU, X.; ZHENG, Y.; ZHOU, J. Ursolic acid inhibits nuclear factor- κ B signaling in intestinal epithelial cells and macrophages, and attenuates experimental colitis in mice. **Life Sciences** v. 110, n. 1, p. 23–34, 2014.
- CHUN, J.; LEE, C.; HWANG, S.W.; IM, J.P.; KIM, J. S. Ursolic acid inhibits nuclear factor- κ B signaling in intestinal epithelial cells and macrophages, and attenuates experimental colitis in mice. **Life Sciences** v. 110, n. 1, p. 23–34, 2014.
- CONFORTI, F.; MENICHINI, F. Phenolic compounds from plants as nitric oxide production inhibitors. **Current Medicinal Chemistry** v. 18, n. 8, p. 1137–1145, 2011.
- COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature** v. 420, n. 6917, p. 860–867, 2002.
- CROFT, M.; BENEDICT, C.A.; WARE, C.F. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. **Nature reviews. Drug discovery** v. 12, n. 2, p. 147–68, fev. 2013.
- DAR, B.A.; LONE, A.M.; SHAH, W.A.; QURISHI, M.A. Synthesis and screening of ursolic acid-benzylidene derivatives as potential anti-cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 111, p. 26–32, 2016.
- DO NASCIMENTO, P.; LEMOS, T.; BIZERRA, A.; ARRIAGA, Â.M.C.; FERREIRA, D.; SANTIAGO, G.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, J. Antibacterial and Antioxidant Activities of Ursolic Acid and Derivatives. **Molecules** v. 19, n. 1, p. 1317–1327, 2014.
- DONG, H.; YANG, X.; XIE, J.; XIANG, L.; LI, Y.; OU, M.; CHI, T.; LIU, Z.; YU, S.; GAO, Y.; CHEN, J.; SHAO, J.; JIA, L. UP12, a novel ursolic acid derivative with potential for targeting multiple signaling pathways in hepatocellular carcinoma. **Biochemical Pharmacology** v. 93, n. 2, p. 151–162, 2015.
- FANG, L.; ZHANG, Y.; LEHMANN, J.; WANG, Y.; JI, H.; DING, D. Design and synthesis of furoxan-based nitric oxide-releasing glucocorticoid derivatives with potent anti-inflammatory activity and improved safety. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** v. 17, n. 4, p. 1062–1066, 2007.
- FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer

chemotherapy. **Oncogene** v. 25, n. 34, p. 4798–4811, 2006.

GAI, L.; CAI, N.; WANG, L.; XU, X.; KONG, X. Ursolic acid induces apoptosis via Akt/NF- κ B signaling suppression in T24 human bladder cancer cells. **Molecular Medicine Reports** v. 7, n. 5, p. 1673–1677, 2013.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J.M.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L.; EL-DEIRY, W.S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.O.; KEPP, O.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D.C.; SHI, Y.; SIMON, H-U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell death and differentiation** v. 19, n. 1, p. 107–20, jan. 2012.

GAO, Y.S.; YUAN, Y.; SONG, G.; LIN, S.Q. Inhibitory effect of ursolic acid and oleanolic acid from *Eriobotrya fragrans* on A549 cell viability in vivo. **Genetics and Molecular Research** v. 15, n. 2, p. 1–8, 2016.

GARG, A.; AGGARWAL, B.B. Nuclear transcription factor- κ B as a target for cancer drug development. **Leukemia** v. 16, n. 6, p. 1053–1068, 2002.

GILMORE, T. D. Introduction to NF- κ B: Players, pathways, perspectives. **Oncogene** v. 25, n. 51, p. 6680–6684, 2006.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M.M.; RAMOS-VELÁZQUEZ, C.S.; SERRANO-VEGA, R.; PÉREZ-GONZÁLEZ, C.; SÁNCHEZ-MENDOZA, E.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, S. Anti-inflammatory activity of standardized dichloromethane extract of *Salvia connivens* on macrophages stimulated by LPS. **Pharmaceutical Biology** v. 55, n. 1, p. 1467–1472, 2017.

GRANGER, D. N.; SENCHENKOVA, E. **Inflammation and the Microcirculation**. [S.l.]: Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft** v. 12, n. 1, p. 426–428, 1 jan. 1879.

GU, W.; HAO, Y.; ZHANG, G.; WANG, S.; MIAO, T.; ZHANG, K. Synthesis, in vitro antimicrobial and cytotoxic activities of new carbazole derivatives of ursolic acid. **Bioorganic & medicinal chemistry letters** v. 25, n. 3, p. 554–7, 2015.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell** v. 144, p. 646–674, 2011.

HASSAN, L.E.A.; KHADEER AHAMED, M.B.; ABDUL MAJID, A.S.; BAHARETHA, H.M.; MUSLIM, N.S.; NASSAR, Z.D.; ABDUL MAJID, A.M.S. Correlation of antiangiogenic, antioxidant and cytotoxic activities of some Sudanese medicinal plants with phenolic and flavonoid contents. **BMC Complementary and Alternative Medicine** v. 14, n. 1, p. 1–14, 2014.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. NF- κ B, the first quarter-century: Remarkable progress and outstanding questions. **Genes and Development** v. 26, n. 3, p. 203–234, 2012.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. **Cell** v. 132, n. 3, p. 344–362, 2008.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Signaling to NF- κ B. **Genes & Development** v. 18, p. 2195–2224, 2004.

HOESEL, B.; SCHMID, J.A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer** v. 12, n. 1, p. 1, 2013.

HUA, S.; HUANG, R.; YE, M.; PAN, Y.; YAO, G.; ZHANG, Y.; WANG, H. Design, synthesis and in vitro evaluation of novel ursolic acid derivatives as potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 95, p. 435–452, 2015.

HUANG, Y.; NIKOLIC, D.; PENDLAND, S.; DOYLE, B.J.; LOCKLEAR, T.D.; MAHADY, G.B. Effects of cranberry extracts and ursolic acid derivatives on P-fimbriated *Escherichia coli*, COX-2 activity, pro-inflammatory cytokine release and the NF- κ B transcriptional response in vitro. **Pharmaceutical Biology** v. 47, n. 1, p. 18–25, 2009.

HUSSAIN, H.; GREEN, I.R.; ALI, I.; KHAN, I.A.; ALI, Z.; AL-SADI, A.M.; AHMED, I. Ursolic acid derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2012–2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents** v. 27, n. 9, p. 1061–1072, 2017.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; NISHIZAWA, T.; OHIGASHI, H. Ursolic Acid Enhances Cyclooxygenases and Tumor Necrosis Factor- α Expression in Mouse Skin. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** v. 70, n. 4, p. 1033–1037, 2006.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: An anti- And pro-inflammatory triterpenoid. **Molecular Nutrition and Food Research** v. 52, n. 1, p. 26–42, 2008.

IPPOUSHI, K.; AZUMA, K.; ITO, H.; HORIE, H.; HIGASHIO, H. [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774.1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions. **Life sciences** v. 73, n. 26, p. 3427–37, 14 nov. 2003.

JIANG, C.; XIAO, F.; GU, X.; ZHAI, Z.; LIU, X.; WANG, W.; TANG, T. Inhibitory effects of ursolic acid on osteoclastogenesis and titanium particle-induced osteolysis are mediated primarily via suppression of NF- κ B signaling. **Biochimie** v. 111, n. 3, p. 107–118, 2015.
Use the "Insert Citation" button to add citations to this document.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology** v. 49, n. 2–1, p. 57–68, 1995.

KARIN, M. The I κ B kinase - A bridge between inflammation and cancer. **Cell Research** v. 18, n. 3, p. 334–342, 2008.

KASHYAP, D.; TULI, H.S.; SHARMA, A.K. Ursolic acid (UA): A metabolite with

promising therapeutic potential. **Life Sciences** v. 146, p. 201–213, 2016.

KIM, H. J.; HAWKE, N.; BALDWIN, A. S. NF- κ B and IKK as therapeutic targets in cancer. **Cell Death and Differentiation** v. 13, n. 5, p. 738–747, 2006.

KIM, M.; KIM, J.N.; HAN, S.N.; KIM, H. Use the "Insert Citation" button to add citations to this document.

KOEHN, F.E; CARTER, G.T. Rediscovering natural products as a source of new drugs. **Discovery medicine** v. 5, n. 26, p. 159–64, abr. 2005.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology** v. 1, n. 6, p. 1–10, 2009.

LEAL, A.S.; WANG, R.; SALVADOR, J.A.R.; JING, Y. Synthesis of novel ursolic acid heterocyclic derivatives with improved abilities of antiproliferation and induction of p53, p21 waf1 and NOXA in pancreatic cancer cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** v. 20, n. 19, p. 5774–5786, 2012.

LI, G.; ZHANG, X.; YOU, J.; SONG, C.; SUN, Z.; XIA, L.; SUO, Y. Highly sensitive and selective pre-column derivatization high-performance liquid chromatography approach for rapid determination of triterpenes oleanolic and ursolic acids and application to Swertia species: Optimization of triterpenic acids extraction an. **Analytica Chimica Acta** v. 688, n. 2, p. 208–218, 2011.

LI, Q.; DONG, D.D.; HUANG, Q.P.; LI, J.; DU, Y.Y.; LI, B.; LI, H.Q.; HUYAN, T. The anti-inflammatory effect of Sonchus oleraceus aqueous extract on lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 cells and mice. **Pharmaceutical Biology** v. 55, n. 1, p. 799–809, 2017.

LIN, R.X.; GONG, L.L.; FAN, L. M.; ZHAO, Z.K.; YANG, S.L. Role of ursolic acid chalcone, a synthetic analogue of ursolic acid, in inhibiting the properties of CD133⁺ sphere-forming cells in liver stem cells. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology** v. 8, n. 2, p. 1427–1434, 2015.

LIU, K.; GUO, L.; MIAO, L.; BAO, W.; YANG, J.; LI, X.; XI, T.; ZHAO, W. Ursolic acid inhibits epithelial-mesenchymal transition by suppressing the expression of astrocyte-elevated gene-1 in human nonsmall cell lung cancer A549 cells. **Anti-Cancer Drugs** v. 24, n. 5, p. 494–503, 2013.

LIU, M.C.; YANG, S.J.; JIN, L.H.; HU, D.Y.; XUE, W.; SONG, B.A.; YANG, S. Synthesis and cytotoxicity of novel ursolic acid derivatives containing an acyl piperazine moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 58, p. 128–135, 2012.

LUO, J.; HU, Y.; WANG, H. Ursolic acid inhibits breast cancer growth by inhibiting proliferation, inducing autophagy and apoptosis, and suppressing inflammatory responses via the PI3K/AKT and NF-kappaB signaling pathways in vitro. **Experimental and therapeutic medicine** v. 14, n. 4, p. 3623–3631, 2017.

MA, C.; CAI, S.; CUI, J.; WANG, R.; TU, P.; HATTORI, M.; DANESHTALAB, M. The

cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 40, n. 6, p. 582–589, 2005.

MA, J.Q.; DING, J.; XIAO, Z.H.; LIU, C.M. Ursolic acid ameliorates carbon tetrachloride-induced oxidative DNA damage and inflammation in mouse kidney by inhibiting the STAT3 and NF- κ B activities. **International Immunopharmacology** v. 21, n. 2, p. 389–395, 2014.

MEDZHITOV, R. Innate immunity: quo vadis? **Nature Immunology** v. 11, n. 7, p. 551–553, jul. 2010.

MENDES, V.I.S.; BARTHOLOMEUSZ, G.A.; AYRES, M.; GANDHI, V.; SALVADOR, J.A.R. Synthesis and cytotoxic activity of novel A-ring cleaved ursolic acid derivatives in human non-small cell lung cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 123, p. 317–331, 2016.

MENG, Y.; LI, Y.; LI, F.; SONG, Y.; WANG, H.; CHEN, H. Synthesis and antitumor activity evaluation of new asiatic acid derivatives. **Journal of Asian Natural Products Research** v. 14, n. 9, p. 844–855, 2012.

MENG, Y.Q.; LIU, D.; CAI, L.L.; CHEN, H.; CAO, B.; WANG, Y.Z. The synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** v. 17, n. 2, p. 848–854, 2009.

MENG, Y.; SONG, Y.; YAN, Z.; XIA, Y. Synthesis and in vitro cytotoxicity of novel ursolic acid derivatives. **Molecules** v. 15, n. 6, p. 4033–4040, 2010.

MENG, F.; NING, H.; SUN, Z.; HUANG, F.; LI, Y.; CHU, X.; LU, H.; SUN, C.; LI, S. Ursolic acid protects hepatocytes against lipotoxicity through activating autophagy via an AMPK pathway. **Journal of Functional Foods** v. 17, p. 172–182, 2015.

MICOTA, B.; SADOWSKA, B.; PODSEDEK, A.; REDZYNIA, M.; RÓZALSKA, B. Leonurus cardiaca L. herb - a derived extract and an ursolic acid as the factors affecting the adhesion capacity of Staphylococcus aureus in the context of infective endocarditis. **Acta Biochimica Polonica** v. 61, n. 2, p. 385–388, 2014.

MODLIN, R.L. Innate Immunity: Ignored for Decades, but Not Forgotten. **Journal of Investigative Dermatology** v. 132, n. 3, p. 882–886, mar. 2012.

MORRIS, K.R.; LUTZ, R.D.; CHOI, H.; KAMITANI, T.; CHMURA, K.; CHAN, E.D. Role of the NF-kappaB signaling pathway and kappaB cis-regulatory elements on the IRF-1 and iNOS promoter regions in mycobacterial lipoarabinomannan induction of nitric oxide. **Infection and immunity** v. 71, n. 3, p. 1442–52, mar. 2003.

NELSON, A.T.; CAMELIO, A.M.; CLAUSSEN, K.R.; CHO, J.; TREMMEL, L.; DIGIOVANNI, J.; SIEGEL, D. Synthesis of oxygenated oleanolic and ursolic acid derivatives with anti-inflammatory properties. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** v. 25, n. 19, p. 4342–4346, 2015.

NKEH-CHUNGAG, B.N.; OYEDEJI, O.O.; OYEDEJI, A.O.; NDEBIA, E.J. Anti-inflammatory and Membrane-Stabilizing Properties of Two Semisynthetic Derivatives of

Oleanolic Acid. **Inflammation** v. 38, n. 1, p. 61–69, 2014.

OVESNÁ, Z.; KOZICS, K.; SLAMENŇOVÁ, D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis** v. 600, n. 1–2, p. 131–137, 30 ago. 2006.

PATIL, K.R.; MOHAPATRA, P.; PATEL, H.M.; GOYAL, S.N.; OJHA, S.; KUNDU, C.N.; PATIL, C.R. Pentacyclic triterpenoids inhibit ikk β mediated activation of nf- κ b pathway: In silico and in vitro evidences. **PLoS ONE** v. 10, n. 5, p. 1–30, 2015.

PENG, J.; REN, X.; LAN, T.; CHEN, Y.; SHAO, Z.; YANG, C. Renoprotective effects of ursolic acid on ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury through oxidative stress, inflammation and the inhibition of STAT3 and NF- κ B activities. **Molecular Medicine Reports** v. 14, n. 4, p. 3397–3402, 2016.

PERKINS, N.D. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. **Oncogene** v. 25, n. 51, p. 6717–6730, 2006.

RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, A.M.; GONZÁLEZ-ORTIZ, M.; MARTÍNEZ-ABUNDIS, E.; ACUÑA ORTEGA, N. Effect of Ursolic Acid on Metabolic Syndrome, Insulin Sensitivity, and Inflammation. **Journal of Medicinal Food** v. 20, n. 9, p. 882–886, 2017.

RASHID, S.; DAR, B.A.; MAJEED, R.; HAMID, A.; BHAT, B.A. Synthesis and biological evaluation of ursolic acid-triazolyl derivatives as potential anti-cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 66, p. 238–245, 2013.

ROONEY, J.W.; SUN, Y. L.; GLIMCHER, L.H.; HOEY, T. Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation. **Molecular and cellular biology** v. 15, n. 11, p. 6299–310, nov. 1995.

SARAVANAN, R; PUGALENDI, V. Impact of ursolic acid on chronic ethanol-induced oxidative stress in the rat heart. **Pharmacological reports : PR** v. 58, n. 1, p. 41–7, 2006.

SHANMUGAM, M.K.; ONG, T.H.; KUMAR, A.P.; LUN, C.K.; HO, P.C.; WONG, P.T.H.; HUI, K.M.; SETHI, G. Ursolic acid inhibits the initiation, progression of prostate cancer and prolongs the survival of TRAMP mice by modulating pro-inflammatory pathways. **PLoS ONE** v. 7, n. 3, p. 1–9, 2012.

SHAO, J.; DAI, Y.; XUE, J.; WANG, J.; LIN, F.; GUO, Y. In vitro and in vivo anticancer activity evaluation of ursolic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 46, n. 7, p. 2652–2661, 2011.

SHISHODIA, S.; MAJUMDAR, S.; BANERJEE, S.; AGGARWAL, B. Ursolic Acid Inhibits Nuclear Factor- κ B Activation Induced by Carcinogenic Agents through Suppression of I κ B α Kinase and p65 Phosphorylation : Correlation with Down-Regulation of Cyclooxygenase 2 , Matrix Ursolic Acid Inhibits Nuclear Factor- κ B. **The Journal of Cancer Research** p. 4375–4383, 2003.

SIEWERT, B.; WIEMANN, J.;KÖWITSCH, A.; CSUK, R. The chemical and biological potential of C ring modified triterpenoids. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 72,

p. 84–101, 2014.

SOLOWEY, E.; LICHTENSTEIN, M.; SALLON, S.; PAAVILAINEN, H.; SOLOWEY, E.; LORBERBOUM-GALSKI, H. Evaluating medicinal plants for anticancer activity. **Scientific World Journal** v. 2014, 2014.

SORRIENTO, D.; CAMPANILE, A.; SANTULLI, G.; LEGGIERO, E.; PASTORE, L.; TRIMARCO, B.; IACCARINO, G. Use the "Insert Citation" button to add citations to this document.

SORRIENTO, D.; ILLARIO, M.; FINELLI, R.; IACCARINO, G. To NF κ B or not to NF κ B: The Dilemma on How to Inhibit a Cancer Cell Fate Regulator. **Translational medicine @ UniSa** v. 4, n. 9, p. 73–85, 2012.

SUH, N.; BARCHOWSKY, A.; WILLIAMS, C.; BENOIT, N.E.; XIE, Q.; NATHAN, C.; GRIBBLE, G.W.; SPORN, M.B. Novel Triterpenoids Suppress Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and Inducible Cyclooxygenase (COX-2) in Mouse Macrophages Novel Triterpenoids Suppress Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and Inducible Cyclooxygenase (COX-2) in Mouse Macr. **Cancer** p. 717–723, 1998.

SULTANA, S.; ASIF, H.M.; NAZAR, H.M.I.; AKHTAR, N.; REHMAN, J.U.; REHMAN, R.U.. Medicinal plants combating against cancer - A green anticancer approach. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention** v. 15, n. 11, p. 4385–4394, 2014.

SUN, S.. Regulation of NF- κ B in Autoimmunity. **Trends Immunology** v. 34, n. 6, p. 282–289, 2014.

SUN, L.; LI, B.; SU, X.; CHEN, G.; LI, Y.; YU, L.; LI, L.; WEI, W. An Ursolic Acid Derived Small Molecule Triggers Cancer Cell Death through Hyperstimulation of Macropinocytosis. **Journal of Medicinal Chemistry** v. 60, n. 15, p. 6638–6648, 2017.

SKIDGEL, R.A.; GAO, X.; BROVKOVYCH, V.; RAHMAN, A.; JHO, D.; PREDESCU, S.; STANDIFORD, T.J.; MALIK, A.B. Nitric Oxide Stimulates Macrophage Inflammatory Protein-2 Expression in Sepsis. **The Journal of Immunology** v. 169, n. 4, p. 2093–2101, 15 ago. 2002.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell** v. 140, n. 6, p. 805–820, 19 mar. 2010.

TIAN, T.; LIU, X.; LEE, E.; SUN, J.; FENG, Z.; ZHAO, L.; ZHAO, C. Synthesis of novel oleanolic acid and ursolic acid in C-28 position derivatives as potential anticancer agents. **Archives of Pharmacal Research** v. 40, n. 4, p. 458–468, 2017.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E.H.; SALFELD, J.G.; TAK, P.P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. **Pharmacology & Therapeutics** v. 117, n. 2, p. 244–279, 1 fev. 2008.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B** v. 851, n. 1–2, p. 51–70, 15 maio 2007.

TU, H.; HUANG, A.; WEI, B.; GAN, K.; HOUR, T.; YANG, S.; PU, Y.; LIN, C. Ursolic acid derivatives induce cell cycle arrest and apoptosis in NTUB1 cells associated with reactive oxygen species. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 17, n. 20, p. 7265–7274, 2009.

ULLEVIG, S.L.; KIM, H.S.; NGUYEN, H.; HAMBRIGHT, W.S.; ROBLES, A.J.; TAVAKOLI, S.; ASMIS, R. Ursolic acid protects monocytes against metabolic stress-induced priming and dysfunction by preventing the induction of Nox4. **Redox Biology** v. 2, n. 1, p. 259–266, 2014.

WALLACE, J.L.; IGNARRO, L.J.; FIORUCCI, S. Potential cardioprotective actions of no-releasing aspirin. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 1, n. 5, p. 375–382, 2002.

WANG, C.Y.; GUTTRIDGE, D.C.; MAYO, M.W.; BALDWIN, A.S. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. **Molecular and cellular biology** v. 19, n. 9, p. 5923–5929, 1999.

WANG, J.; LIU, L.; QIU, H.; ZHANG, X.; GUO, W.; CHEN, W.; TIAN, Y.; FU, L.; SHI, D.; CHENG, J.; HUANG, W.; DENG, W. Ursolic Acid Simultaneously Targets Multiple Signaling Pathways to Suppress Proliferation and Induce Apoptosis in Colon Cancer Cells. **PLoS ONE** v. 8, n. 5, 2013.

WYSKA, E.; MAGER, D.E.; KRZYZANSKI, W. Methods of Estimation of IC 50 and SC 50 Parameters for Indirect Response Models from Single Dose Data. **Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 92, n. 7, p. 1438–1454, 2003.

YADAV, V.R.; PRASAD, S.; SUNG, B.; KANNAPPAN, R.; AGGARWAL, B.B. Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer. **Toxins** v. 2, n. 10, p. 2428–2466, 2010.

YAMAMOTO, Y; GAYNOR, R B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. **The Journal of clinical investigation** v. 107, n. 2, p. 135–42, jan. 2001.

YANG, L.; TANG, Q.; WU, J.; CHEN, Y.; ZHENG, F.; DAI, Z.; HANN, S.S. Inter-regulation of IGFBP1 and FOXO3a unveils novel mechanism in ursolic acid-inhibited growth of hepatocellular carcinoma cells. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research** v. 35, n. 1, p. 1–13, 2016.

YANG, X.; LI, Y.; JIANG, W.; OU, M.; CHEN, Y.; XU, Y.; WU, Q.; ZHENG, Q.; WU, F.; WANG, L.; ZOU, W.; ZHANG, Y.J.; SHAO, J. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Ursolic acid Derivatives as Potential Anticancer Prodrugs. **Chemical Biology & Drug Design** v. 86, n. 6, p. 1397–1404, 2015.

ZANG, L.L.; WU, B.N.; LIN, Y.; WANG, J.; FU, L.; TANG, Z.Y. Research progress of ursolic acid's anti-tumor actions. **Chinese Journal of Integrative Medicine** v. 20, n. 1, p. 72–79, 2014.

ZANOTTO-FILHO, A.; GELAIN, D.P.; SCHRÖDER, R.; SOUZA, L.F.; PASQUALI,

M.A.B.; KLAMT, F.; MOREIRA, J.C.F. The NF κ B-mediated control of RS and JNK signaling in vitamin A-treated cells: Duration of JNK–AP-1 pathway activation may determine cell death or proliferation. **Biochemical Pharmacology** v. 77, n. 7, p. 1291–1301, 1 abr. 2009.

ZERIN, T.; LEE, M.; JANG, W.S.; NAM, K.W.; SONG, H.Y.. Anti-inflammatory potential of ursolic acid in Mycobacterium tuberculosis-sensitized and Concanavalin A-stimulated cells. **Molecular Medicine Reports** v. 13, n. 3, p. 2736–2744, 2016.

ZERIN, T.; LEE, M.; JANG, W.S.; NAM, K.; SONG, H. Ursolic Acid Reduces Mycobacterium tuberculosis - Induced Nitric Oxide Release in Human Alveolar. **Molecules and cells** v. 38, n. 7, p. 610–615, 2015.

ZHANG, L.; CHEN, L.; CHENG, K.; ZHENG, M.; WEN, X.; ZHANG, P.; HAO, J.; GONG, Y.; ZHANG, X.; ZHU, X.; CHEN, J.; LIU, H.; JIANG, H.; LUO, C.; SUN, H. Identification of pentacyclic triterpenes derivatives as potent inhibitors against glycogen phosphorylase based on 3D-QSAR studies. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 46, n. 6, p. 2011–2021, 2011.

ZHANG, C.; XU, S.H.; MA, B.L.; WANG, W.; YU, B.Y.; ZHANG, J. New derivatives of ursolic acid through the biotransformation by Bacillus megaterium CGMCC 1.1741 as inhibitors on nitric oxide production. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** v. 27, n. 11, p. 2575–2578, 2017.