

Ana Rita Pessoa Marques

FITOCOMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA - ácido betulínico e derivados

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Maria José Gonçalves e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Rita Pessoa Marques, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n° 2011168495, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo desta Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 15 de Julho de 2016

(Ana Rita Pessoa Marques)

Aos meus pais e à minha irmã pelo exemplo, por todo o apoio e compreensão nas ausências e pela busca de concretizações pessoais e profissionais que sempre alimentaram em mim.

Aos meus avós pela dedicação e orgulho que sempre demonstraram.

À professora doutora Maria José Gonçalves pela orientação e por ter estado “sempre ao dispor”.

*Aos amigos da faculdade pela partilha destes anos tão especiais: Rafa, Durães, Mariana, Micaela, Judite, Maria João, Cristiana, Leonor, Mariana L, Viola, Anita, Laura, Sérgio e David.
Que nunca estes laços se rompam.*

À Sandra e à Sofia pelo “apadrinhamento” atento e sincero no meu percurso académico que agora termina, ao invés da nossa amizade.

Às companheiras de casa e amigas, Joana e Júlia, por todo o carinho e à Carina por estar sempre lá.

A Granada e ao Erasmus pelo estímulo pessoal e académico que me proporcionou.

E, por fim, a Coimbra por tudo...

OBRIGADA.

SIGLAS e ACRÓNIMOS

AIF – fator indutor de apoptose

Bcl-2 – *B-cell lymphoma 2*

BA – ácido betulínico

BN – betulina

CD95/Fas receptor/APO1 – *cluster of differentiation 95/apoptosis antigen 1*

CRLX-101 – camptotecina conjugada com co-polímero ciclodextrina-polietilenoglicol

DNA – ácido desoxirribonucleico

EMA – Agência Europeia do Medicamento

FDA – *Food and Drug Administration*

HIF-1 α – fator induzido por hipoxia tipo I α

OMS – Organização Mundial de Saúde

PARP – poli (ADP-ribose) polimerase

REA – relação estrutura-atividade

ROS – espécies reativas de oxigénio

TGF- β – fator de crescimento transformador β

TP-53 – proteína tumoral P53

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular

RESUMO

O cancro constitui, na atualidade, uma patologia preocupante no que respeita à investigação de novas terapêuticas, quer pela crescente incidência que apresenta, quer pelas taxas de mortalidade associadas. Os fenómenos de resistência da doença neoplásica associados a muitos dos tratamentos instituídos constitui uma barreira importante nesta área.

Neste sentido, são já utilizados na prática clínica oncológica diversos compostos fitoterápicos quer obtidos diretamente de plantas, quer como inspiração na síntese de derivados dos mesmos. Novos fitocompostos emergem, deste modo, destacando-se o ácido betulínico pela gama variada de ações terapêuticas que apresenta além da potente atividade antitumoral, ou ainda pelos derivados promissores já conhecidos e em estudo. Este composto é também promissor pela capacidade de contornar algumas resistências a fármacos, apresentando-se ainda como vantajoso pela sua seletividade para as células cancerígenas.

PALAVRAS-CHAVE: cancro, fitocompostos, quimioterapia, ácido betulínico.

ABSTRACT

Nowadays, cancer is an alarming disease in terms of new therapies investigation, not only because of its increasing incidence, but also due to the associated mortality rates. The development of tumor resistance is related to many of the established treatments which presents an important barrier in this area.

In this way, there are different phytochemical agents in clinical use that are either obtained directly from plants or used as models for chemical synthesis of new compounds. New plant-derived anticancer drugs are emerging, this work highlights betulinic acid as a molecule with potent antitumor activity as well as other biological activities. This compound shows a great promise in this field, due to its ability to bypass some forms of drug resistance as well as its selective action on cancer cells.

KEYWORDS: *cancer, phytochemicals, chemotherapy, betulinic acid.*

ÍNDICE de FIGURAS e TABELAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1. O papel da genética e do ambiente no desenvolvimento de cancro	3
Figura 2. Especificidades do cancro	4
Tabela 1. Descrição das especificidades do cancro	5
Figura 3. Especificidades emergentes e características por detrás da sobrevivência	5
Figura 4. Estrutura química da podofilotoxina e dos derivados etopósido e tenipósido	12
Figura 5. Estrutura química da camptotecina e análogos topotecano e irinotecano	12
Figura 6. Diagrama esquemático do composto CRLX-101	13
Figura 7. Estrutura química do ácido betulínico	13
Figura 8. Vias de Síntese do Ácido Betulínico a partir da Betulina	14
Figura 9. Resposta do tumor em cães após injeção intratumoral de NVX-207	17

ÍNDICE

Introdução	2
1. O cancro	2
1.1 A patologia, incidência atual e perspectivas futuras	2
1.2 A origem	3
1.3 A resistência da patologia ao tratamento e as suas especificidades	4
2. A quimioterapia no tratamento e controlo da doença	8
3. Fitocompostos com atividade antineoplásica	9
3.1 Fitocompostos em uso na prática clínica	10
3.1.1 Alcalóides da vinca	10
3.1.2 Taxol e derivados	11
3.1.3 Podofilotoxina e análogos semi-sintéticos	11
3.1.4 Camptotecina e derivados semi-sintéticos	12
4. O ácido betulínico e derivados	
4.1 Origem e isolamento do composto	13
4.2 Interesse terapêutico do ácido betulínico	15
4.3 Mecanismo de atuação na neoplasia e estudos REA	16
4.4 Derivados promissores – Ciclodextrina e NVX 207	17
Conclusão	18
Bibliografia	19

Introdução

A escrita desta monografia pretende uma abordagem acerca do interesse das plantas na obtenção de compostos com atividade quimioterápica, bem como fonte de inspiração dos mesmos na síntese de derivados, igualmente ativos e passíveis de uso na quimioterapia. Numa primeira parte, iremos abordar a realidade atual da prevalência mundial da patologia, bem como as perspectivas de incidência no futuro. Posteriormente, e após brevemente caracterizada a doença neoplásica, com enfoque nas especificidades da mesma, faremos um balanço dos fitocompostos mais em foco e em uso na prática clínica e, por fim, centrar-nos-emos no ácido betulínico procurando realçar, de entre as suas diversas atividades terapêuticas, a de agente antineoplásico bem como dos seus derivados cuja atividade promissora está ainda em investigação.

I. O Cancro

I.1 A patologia, incidência atual e perspectivas futuras

O cancro é, a nível mundial, a segunda principal causa de morte precedido apenas pela doença cardíaca. Todavia, é expectável que nos próximos anos se torne na principal ameaça à vida humana (GALI-MUHTASIB *et al.*, 2015; SIEGEL *et al.*, 2015). A Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê que, caso não consigamos atuar rapidamente, em 2030, a mortalidade provocada por esta doença aumente em cerca de 80% (KHAZIR *et al.*, 2014) Previstos estão, aproximadamente, 26 milhões de novos casos e 17 milhões de mortes por cancro nesse ano (THUN *et al.*, 2009). Devido a esta enorme dimensão, a temática do cancro, desde há já alguns anos, constitui uma matéria de estudo desafiante para toda a comunidade científica, sendo notável o progresso no desenvolvimento de novas terapêuticas, porém ainda não suficiente (GALI-MUHTASIB *et al.*, 2015).

Enquanto patologia, podemos caracterizar uma neoplasia pela ocorrência de um crescimento celular anómalo, sobre o qual o organismo não tem capacidade de autorregulação. Posto isto, são o crescimento e a divisão celular descontrolados que podem estar na origem de um tumor que, se composto por células de carácter maligno, pode afetar outras partes do corpo humano, isto é, pode ocorrer metástase (OCHWANG'I *et al.*, 2014). O desenvolvimento do cancro ocorre, regra geral, em cinco fases típicas podendo variar em algumas características, consoante o tecido afetado. A displasia constitui o primeiro sinal ao surgirem células anómalas que, caso não sejam capazes de regressar à normalidade promovem o cancro *in situ*. Se, por sua vez, o crescimento anormal se estender às áreas envolventes do tecido, estamos perante a fase do cancro localizado invasivo. As células neoplásicas tendem, posteriormente e muitas vezes, a

difundir-se envolvendo os nódulos linfáticos da região e, por fim, via corrente sanguínea ou linfática são ainda capazes de originar metástases em órgãos distantes. WHO, «National Cancer Control Programmes: Policies and managerial guidelines.», *Health (San Francisco)*, 1 (2002), 1–180.

1.2A origem

No que concerne à origem da doença neoplásica podemos relacioná-la, maioritariamente, com a exposição a agentes carcinogénicos no nosso quotidiano. Assim sendo, os hábitos de cada um, como o regime alimentar ou o consumo de tabaco, assumem uma relevância bastante superior à dos fatores genéticos que são raros. Alterações genéticas significativas e associadas ao cancro ocorrem geralmente como consequência de fatores externos WHO.. Estes fatores de risco modificáveis podem, assim, assumir um papel fulcral na prevenção do cancro, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (DANAEL *et al.*, 2005). Os gráficos A, B e C, a seguir apresentados, ilustram a diferente contribuição destes fatores no desenvolvimento de cancro (Fig. 1).

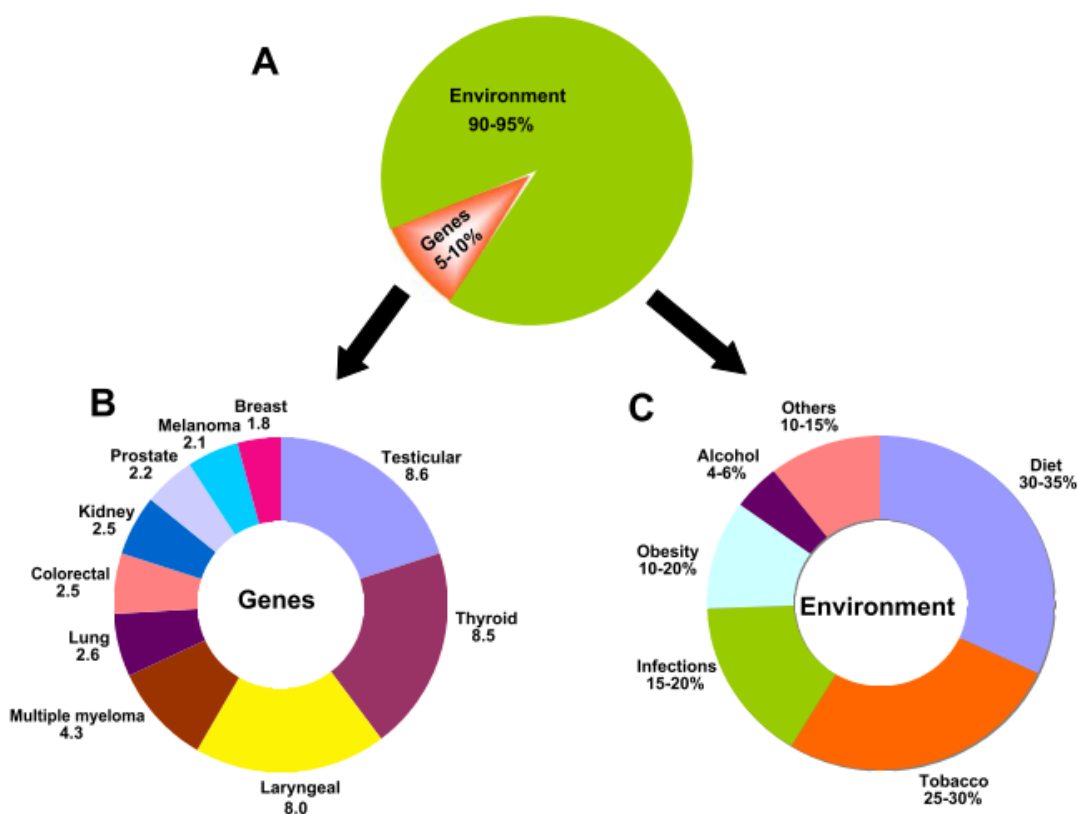


Figura 1. O papel da genética e do ambiente no desenvolvimento de cancro. A – Proporção entre fatores ambientais (90-95%) e genéticos (5-10%). B – Risco familiar de desenvolver a doença para alguns tipos de cancros. Os números representam a taxa de risco dos familiares de primeiro grau de quem padece da patologia, de acordo com a idade, face à população em geral. C – Percentagem contributiva de cada fator ambiental (fração esta atribuível ao número de mortes de cada fator). Adaptado de (ANAND *et al.*, 2008)

1.3 A resistência da patologia ao tratamento e as suas especificidades

A resistência à quimioterapia por parte das células cancerígenas constitui, em muitos casos, uma barreira prejudicial ao tratamento do doente (REBUCCI *et al.*, 2013). Os fenómenos de resistência do cancro aos fármacos antineoplásicos podem ter lugar em várias fases do tratamento, sendo essencial a compreensão destes mecanismos no desenvolvimento eficaz de novos compostos (DUMONTET *et al.*, 2010). A resistência intrínseca ou primária diz respeito às alterações genéticas pré-existentes ao tratamento e estabelece-se como principal causa de falha da quimioterapia. Paralelamente, a resistência secundária ou adquirida surge como resultado do tratamento com o fármaco (REBUCCI *et al.*, 2013). Importa salientar que, não somente à quimioterapia tradicional se associam os fenómenos de resistência, pois também em terapias mais recentes direccionadas a um dado alvo estes têm ocorrido (RAGUZ, YAGU, 2008).

O esquema, a seguir apresentado, visa demonstrar “*The hallmarks of cancer*”, isto é, as especificidades da patologia que permitem o crescimento tumoral e a sua disseminação via metástases. Apresentadas pela primeira vez em 2000, vieram os mesmos autores (HANAHAN *et al.*, 2011) mais tarde acrescentar duas características, às seis iniciais, envolvidas na patogénese de alguns ou talvez até todos os cancros. Por intermédio de uma tabela (Tabela 1) descrevem-se, na página seguinte e de forma sucinta, estes mecanismos de sobrevivência tumoral ilustrados na *figura 2* de forma esquemática.

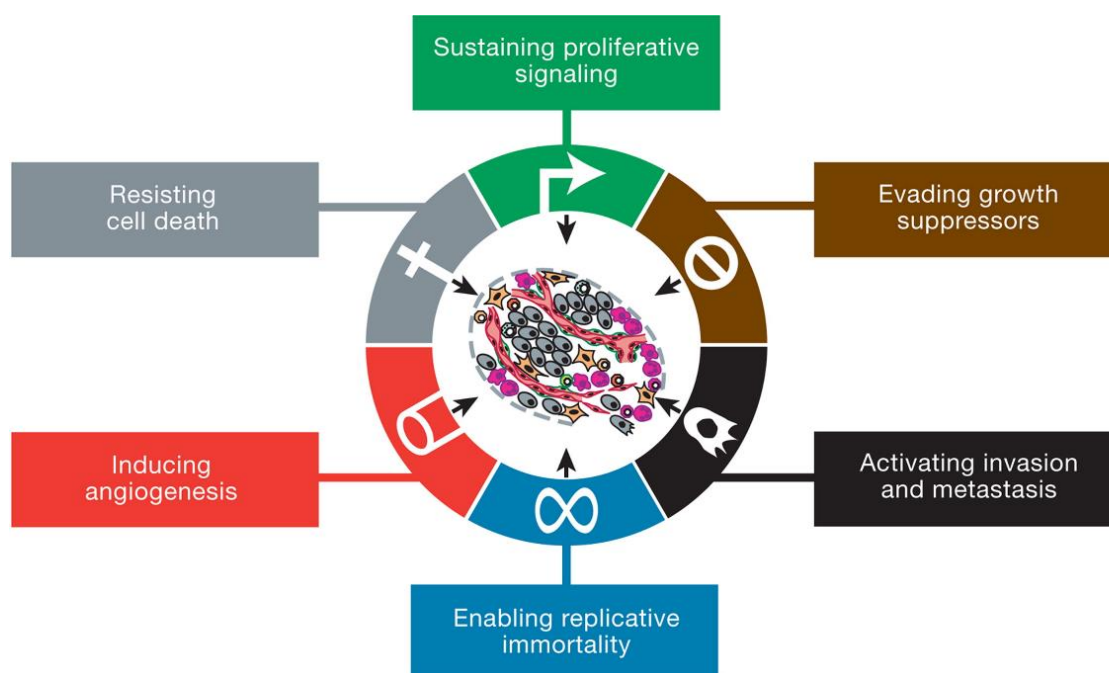


Figura 2. Especificidades do cancro. (Adaptado de HANAHAN, WEINBERG, 2011)

Estratégias de sobrevivência das células tumorais

Apesar de não ser claro o fenómeno de libertação de sinais promotores do crescimento e da divisão celular nos tecidos normais, por outro lado, este é mais claro nas células cancerígenas. Estas, ao desregularem os sinais mitogénicos, tornam-se capazes de decidir o seu próprio “destino” adquirindo, de formas diversas, a capacidade de proliferação, por exemplo através da/o:

SINAIS de PROLIFERAÇÃO SUSTENTADOS

- proliferação autócrina: auto-produção de fatores de crescimento aos quais elas mesmo respondem;
- envio de sinais de estimulação às células não tumorais do estroma associado ao tumor que respondem sustentando as células cancerígenas com fatores de crescimento;
- aumento dos recetores apresentados à superfície das células cancerígenas tornando-as hiper-reativas ou alterações estruturais nas moléculas do recetor que facilitam ligação resultando numa resposta celular exacerbada;
- desenvolvimento de vias que não necessitam da ligação do fator de crescimento – alterações *downstream*.

Nalgumas formas de cancro foram encontrados inativos dezenas de supressores tumorais que deveriam atuar como limitadores do crescimento e proliferação celulares. Os supressores tumorais codificam para duas proteínas protótipo:

EVASÃO aos SUPRESSORES de CRESCIMENTO

- Proteínas associadas ao retinoblastoma – integrando sinais de fontes principalmente extracelulares determinam se prossegue ou não o ciclo celular. As células tumorais, na ausência deste regulador de *feedback* negativo, proliferam de forma persistente.
- Proteínas P-53 – recebem informação relativa ao nível de *stress* intracelular suspendendo o ciclo se, por exemplo, existir um dano excessivo no genoma ou a oxigenação for fraca, até que tudo normalize.

Por outro lado, se verificar danos irreparáveis, P-53 pode direcionar a célula para apoptose.

**INVADINDO e
METASTIZANDO**

- Um dos fenômenos que se encontra devidamente estudado diz respeito à “*downregulation*” e ocasional inativação da E-caderina, uma molécula fulcral na adesão intercelular epitelial, nos carcinomas. Esta molécula, quando vê aumentada a sua expressão, atua contrariando a invasão e a metástase e, posto isto, quando sub-expressa suplementa a ocorrência destes fenômenos.

- Alterações nos genes que codificam para outras moléculas de adesão célula-a-célula ou célula-matriz extracelular, estão também presentes em carcinomas altamente invasivos, enquanto outras moléculas de adesão, associadas à embriogénese e inflamação, surgem muitas vezes sobrerreguladas nos mesmos.

A título de exemplo, merecem destaque de entre os últimos avanços para explicação da capacidade de invasão e metástase do cancro, o que refere o envolvimento das células do estroma na produção de sinais estimuladores da invasão ou ainda dos macrófagos, como fonte de enzimas capazes de degradar a matriz celular.

**PERMITINDO
“IMORTALIDADE
CELULAR”**

A enzima responsável pela adição de sequências específicas de DNA nas terminações do DNA telomérico – a telomerase – encontra-se expressa em níveis significativos na maioria das células espontaneamente imortalizada, como é o caso das cancerígenas. Tal atividade promove a resistência celular tanto à senescência como à crise/apoptose. Assim, o comprimento do DNA telomérico determinará a resistência à erosão e, subsequentemente, o número de linhagens celulares bem sucedidas. Comprimentos menores, devido à supressão da atividade da telomerase relacionam-se, deste modo, com menor proteção direcionando a célula para crise/apoptose (um dos entraves à proliferação juntamente com a senescência – estado não proliferativo mas viável para a célula).

A sobrerregulação dos fatores de crescimento do endotélio vascular, como o VEGF-A, quer via hipoxia quer via sinalização de oncogene, é promotora da proliferação e migração celular endotelial. Além destes,

**INDUZINDO
ANGIOGÊNESE**

também os fatores de crescimento do fibroblasto surgem como sinal pró-angiogénico tumoral.

Estudos recentes reportaram como relevante o papel dos pericitos como células de suporte mecânico e fisiológico presentes na superfície endotelial, contrariando estudos anteriores e revelando assim a sua importância na funcionalidade da neovasculatura tumoral. Por sua vez, também células como macrófagos, neutrófilos e mastócitos, ao infiltrarem tumores desenvolvidos ou lesões pré-malignas mostraram favorecer o processo angiogénico.

**RESISTINDO À
MORTE CELULAR**

Os reguladores da apoptose podem dividir-se em duas grandes vias: programa de apoptose extrínseco (que recebe e processa sinais extracelulares onde estão envolvidos, por exemplo Fas ligando/ Fas recetor); e a via intrínseca (que integra sinais intracelulares). Em ambas as vias, inicia-se a cascata de proteólise após ativação de uma protease latente culminando na destruição progressiva da célula e sua ingestão por células “vizinhas” ou células fagocíticas especializadas.

As células tumorais possuem a capacidade, via diferentes estratégias, de limitar a apoptose sendo a mais comum aquela que envolve a perda da proteína P-53 (eliminando o sensor crítico da via apoptótica).

Tabela 1. Descrição das especificidades do cancro (HANAHAN et al., 2011)

Hanahan e Weinberg (2011) referem ainda todas estas capacidades funcionais, adquiridas pelo cancro em prol da sua sobrevivência, como obtidas por intermédio de dois grandes eventos: as alterações genómicas das células tumorais com as mutações subsequentes e a inflamação promovida pelo próprio tumor. Estudos emergentes vieram sugerir, apesar de não estar ainda totalmente explícito para a comunidade científica, como especificidades adicionais de algumas formas de cancro as ilustradas na figura que se segue (Fig.3). Surge, deste modo, a capacidade de reprogramação do metabolismo celular no sentido de ancorar a contínua proliferação. Outra estratégia corresponde à habilidade de destruição da ação do sistema imune sobre as células cancerígenas, por exemplo impedindo a infiltração de linfócitos T citotóxicos e células *natural killer*, via libertação de fatores imunossupressores como o TGF- β (fator de crescimento transformador).

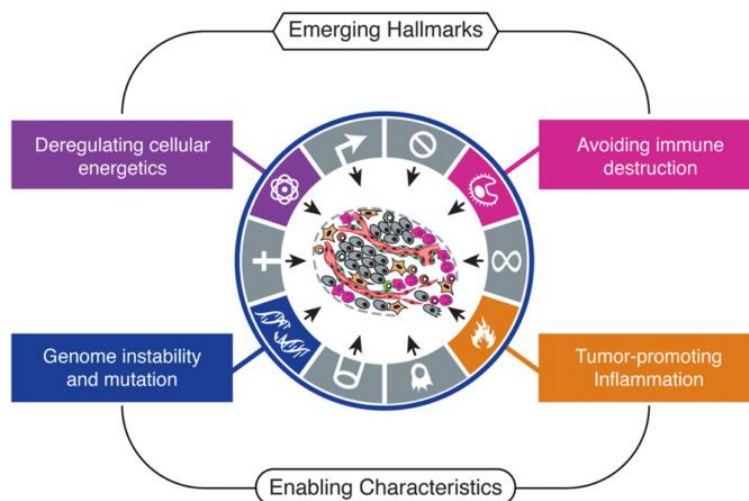


Figura 3. Especificidades emergentes e características por detrás da sobrevivência. (Adaptado de HANAHAN, WEINBERG, 2011)

2. A quimioterapia no tratamento e controlo da doença

No que respeita ao tratamento da patologia, surgem como opções a quimioterapia, a radioterapia, a cirurgia, a imunoterapia, a terapia hormonal ou o transplante de células estaminais (NCI, 2015). A eficácia destas intervenções depende, essencialmente, da localização e tipo de tumor e do estado da doença no qual se atua (OCHWANG'I *et al.*, 2014).

Podemos classificar a terapêutica do cancro em quatro tipos, de acordo com a finalidade da mesma. A quimioterapia curativa visa o controlo total do tumor podendo ser utilizada tanto em tumores localizados como disseminados (WHO, 2002). Estamos perante uma terapia neoadjuvante se esta for uma primeira intervenção perante o tumor, geralmente pré-operatória, em tumores de grandes dimensões, visando a redução do tamanho do mesmo para que se consiga uma remoção cirúrgica mais eficiente (WHO, 2002; NCI, s/d). Se, por outro lado, o tratamento ocorrer após uma intervenção primária e pretender a redução do risco de recidiva e/ou a destruição de metástases, estamos perante a terapêutica adjuvante (NCI, s/d). Por fim, a abordagem paliativa permite o alívio dos sintomas reduzindo o sofrimento causado pela doença, devendo iniciar-se no diagnóstico e ter lugar ao longo do decurso da doença até ao fim da vida do doente (NCI, s/d).

A quimioterapia é útil nestas abordagens terapêuticas, pois consegue tirar partido da capacidade de determinados fármacos para a destruição das células cancerígenas (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2008).

3. Fitocompostos com Atividade Antineoplásica

A prioridade, neste campo, tem sido a descoberta de novas terapêuticas, mais efetivas e a minimização ou eliminação da toxicidade dos efeitos secundários tão subjacentes à quimioterapia. A título de exemplo, o 5-fluorouracilo, a doxorubicina e a ciclofosfamida, conhecidos agentes quimioterápicos, são causadores de cardiotoxicidade e mielotoxicidade (FONSLOW *et al.*, 2013).

Uma das principais causas para tal problemática é a falta de seletividade dos compostos para as células cancerígenas (LIU *et al.*, 2013). Posto isto, perspectiva-se o desenvolvimento de fármacos capazes de matar as células tumorais ou torná-las benignas, sem que sejam afetadas as células não cancerígenas. Surgem, neste contexto, as plantas terrestres como uma fonte valiosa no desenvolvimento de agentes capazes de travar ou reverter o processo carcinogénico (SPORN *et al.*, 2005).

Desde os primórdios da medicina, as plantas são utilizadas no tratamento de doenças, pelo facto de possuírem uma diversidade de compostos de elevado valor terapêutico (NOSTRO *et al.*, 2000). Denomina-se planta medicinal aquela que possui constituintes quimicamente ativos capazes de induzir uma resposta fisiológica curativa no organismo humano ou animal na presença de dada patologia (HAMAYUN *et al.*, 2006). Nos últimos anos, tem vindo a aumentar a atenção sobre preciosos compostos fitoterápicos capazes de inibir, não só a génese tumoral em diferentes fases, mas também o processo inflamatório associado (SOLOWEY *et al.*, 2014). Os produtos naturais, derivados de plantas medicinais, consideram-se quimicamente efetivos e mais vantajosos, do ponto de vista da diminuição ou total eliminação dos efeitos secundários, frequentemente associados aos compostos químicos de origem sintética (HAMAYUN *et al.*, 2006). Dos agentes neoplásicos em uso na prática clínica, aproximadamente 60% teve origem natural incluindo plantas, organismos marinhos ou micro-organismos (CRAGG *et al.*, 2005). Cerca de 114.000 extratos com atividade anticancerígena foram analisados, a partir de 35.000 mil amostras de plantas de 20 países, pelo *National Cancer Institute*. No entanto, existe uma diversidade de plantas promissoras, nesta área, que não foram ainda totalmente estudadas (SHOEB, 2006).

3.1 Fitocompostos em Uso na Prática Clínica

Existem quatro grandes grupos de compostos antineoplásicos derivados de plantas já em uso nos tratamentos quimioterápicos. Apresentam-se, de seguida, mais em detalhe sendo eles os alcalóides da vinca (vimblastina, vincristina, vinorelbina); o taxol e os seus derivados semissintéticos (paclitaxel, docetaxel); a podofilotoxina e análogos (etopósido, tenipósido) e ainda a camptotecina e os respetivos derivados (topotecano, irinotecano) (KHAZIR *et al.*, 2014; PAN *et al.*, 2010).

3.1.1 ALCALÓIDES DA VINCA

Originários da vinca de Madagáscar, *Cathartus roseus L.*, os alcalóides vimblastina e vincristina foram os primeiros compostos com atividade anticancerígena a ser isolados. O seu mecanismo de ação no cancro envolve a inibição da polimerização das moléculas de tubulina, bloqueando assim a formação do fuso mitótico, o que mantém a célula em metafase, resultando em apoptose, apesar de não estar ainda devidamente esclarecido de que forma (KHAZIR *et al.*, 2014) (DARWICHE *et al.*, 2007). Recentemente, novas evidências mostraram que os alcalóides da vinca inibem a acumulação e a atividade do fator induzido por hipoxia (HIF-1 α), um fator de transcrição pró-angiogénico envolvido no crescimento e sobrevivência das células tumorais (POWIS *et al.*, 2004). Em condições normais de oxigenação, HIF-1 α é rapidamente degradado pela via proteolítica ubiquitina-proteossoma. Contudo, em ambiente de hipoxia é evitada a degradação deste fator, o que conduzirá à ativação de genes com funções essenciais na adaptação e ativação de vias de sobrevivência para a célula, sob estas condições (ESCUIN *et al.*, 2005). Do ponto de vista clínico, tal facto permite-nos constatar a relação entre a hipoxia do tumor e a ativação do HIF, as metástases e a capacidade de resistência do mesmo tanto à quimioterapia como à radioterapia, emergindo, deste modo, o interesse do HIF-1 α como alvo terapêutico do cancro (POWIS *et al.*, 2004).

A vinorelbina, análogo semissintético da vimblastina, revelou em 1989 atividade antitumoral em cancro da mama avançado, do pulmão e gastrointestinal tendo sido, cinco anos depois, aprovada pela *Food and Drug Administration (FDA)* (DARWICHE *et al.*, 2007; KHAZIR *et al.*, 2014). A Agência Europeia do Medicamento (EMA) aprovou em 2009, como terapêutica de segunda linha no cancro de bexiga avançado, um derivado da vinorelbina – a vinflunina; no entanto, nos EUA a FDA não aprovou ainda este composto (MAMTANI *et al.*, 2011). Novos ensaios clínicos de fase I e II estão a decorrer no sentido de avaliar a eficácia da vinflunina

noutros tumores sólidos avançados. Uma nova estratégia de administração, via injeção lipossomal de sulfato de vincristina, foi aprovada em 2012 pela FDA no tratamento da leucemia linfoblástica aguda, em doentes com segunda ou maior recidiva ou cuja terapêutica convencional falhou anteriormente (KHAZIR *et al.*, 2014).

3.1.2 TAXOL E DERIVADOS

Mais recentes aos alcalóides da vinca surgem, como fitocompostos antineoplásicos, os taxanos. A descoberta do paclitaxel (taxol®), obtido inicialmente a partir da casca do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia* Nutt.), revelou-se um sucesso nesta área tendo sido o primeiro composto encontrado com capacidade de promover a formação dos microtúbulos. O paclitaxel, bem como outros análogos, encontram-se acessíveis, sendo rentável a sua obtenção, em várias espécies de *Taxus* via semi-síntese dos seus precursores, como as bacatinas. No que concerne ao uso do paclitaxel na prática clínica, este tem lugar em vários cancros merecendo destaque o da mama, do ovário, sarcoma de Kaposi e cancro do pulmão de células não-pequenas, enquanto o docetaxel demonstra a sua atividade numa ampla gama de tumores. Porém, algumas limitações destes fármacos, tal como a incapacidade do paclitaxel penetrar no cérebro, que se julga dever-se à bomba de efluxo associada à glicoproteína P altamente expressa na barreira hemato-encefálica, obrigam ainda a comunidade científica a desenvolver esforços na síntese de análogos melhorados. Questões relacionadas com a citotoxicidade direcionada ao tumor, solubilidade e diminuição da toxicidade em células saudáveis são alguns dos focos principais. Já em fase de estudo pré-clínica com capacidade antineoplásica estão cerca de 23 taxanos (CRAGG *et al.*, 2005; KHAZIR *et al.*, 2014).

Uma nova formulação clinicamente mais vantajosa, em que o paclitaxel é administrado numa suspensão de albumina, Abraxane®, demonstrou, quando associado à radioterapia, potente atividade antitumoral (MIELE *et al.*, 2009).

3.1.3 PODOFILOTOXINA E ANÁLOGOS SEMI-SINTÉTICOS

Podophyllum peltatum L. constitui uma fonte de um lignano bioativo bastante interessante na área da quimioterapia – a podofilotoxina. Todavia, devido aos seus efeitos secundários como náuseas, vômitos, danos em tecidos saudáveis e outros, não é utilizada na prática clínica. Os análogos mais emblemáticos da podofilotoxina são o etopósido e o tenipósido, muito utilizados em tratamentos quimioterápicos de linfomas, cancro do testículo, do ovário, cancros cerebrais, leucemias agudas, entre outros. Estes derivados, contrariamente ao mecanismo de

inibição microtubular da podofilotoxina, atuam via inibição da atividade catalítica da topoisomerase II. Apesar dos análogos semi-sintéticos terem contornado a problemática da toxicidade, o etopósido apresenta ainda entraves como a fraca biodisponibilidade ou a resistência do tumor ao fármaco, emergindo a necessidade de busca de novos análogos deste (KHAZIR *et al.*, 2014; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

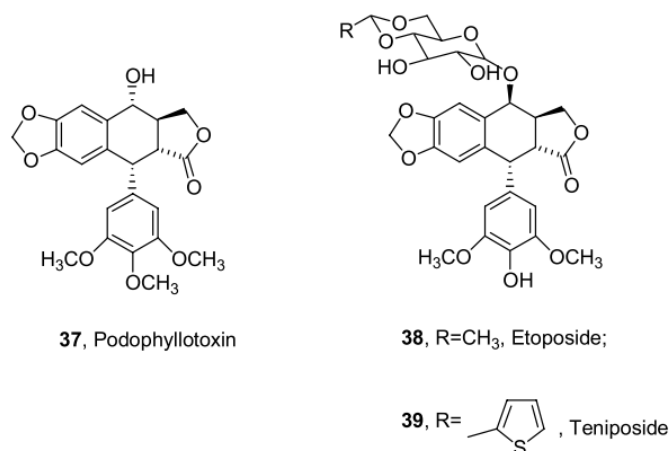


Figura 4. Estrutura química da podofilotoxina e dos derivados etopósido e tenipósido

3.1.4 CAMPTOTECINA E DERIVADOS SEMI-SINTÉTICOS

Isolada pela primeira vez da “árvore da alegria” chinesa *Camptotheca acuminata* Decne., a camptotecina surge como um alcalóide com capacidade de inibir a topoisomerase I danificando o DNA e, assim, provocar a morte celular. No sentido de ultrapassar aspetos limitantes como a fraca solubilidade aquosa e a toxicidade severa, novos análogos foram sintetizados e aprovados na prática clínica sendo os mais conhecidos o topotecano e o irinotecano, cujas estruturas se apresentam de seguida (Fig. 5) (KHAZIR *et al.*, 2014; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

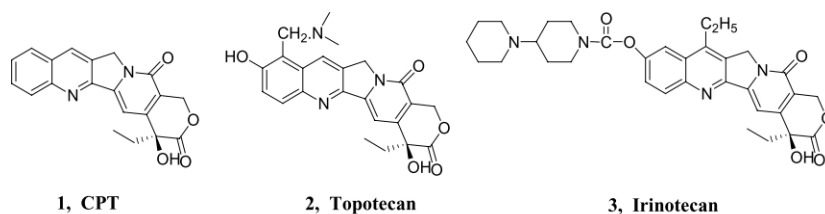


Figura 5. Estrutura química da camptotecina e análogos topotecano e irinotecano.

O topotecano é utilizado na terapêutica do cancro do ovário e no cancro do pulmão de células pequenas, enquanto o irinotecano (CPT-11) vê

a sua ação recair sobre os cancros cólon-retais (SHAH *et al.*, 2013). Importa ainda assim referir que, pelo fato de em alguns tipos de cancro os níveis da enzima topoisomerase I surgirem aumentados, tornou-se pertinente o estudo destes compostos capazes de conseguir a sua inibição (BURKE, 1997).

Sob investigação encontram-se as camptotecinas solúveis em água, cuja administração é realizada via intravenosa e as insolúveis, administradas oralmente no Homem (GIOVANELLA *et al.*, 2002). A título de exemplo, um derivado da camptotecina insolúvel em água - o

rubitecano, desenvolvido pela companhia SuperGen, encontra-se em estudos de fase III com promissora atividade no combate ao cancro de pâncreas (KHAZIR *et al.*, 2014).

Mais recentemente, emergiram interessantes pró-fármacos fundamentados na nanotecnologia farmacêutica, como o composto CRLX-101 (Fig.6), resultado da conjugação da camptotecina com o co-polímero ciclodextrina-polietilenoglicol (CD-PEG). Esta nova formulação revelou melhorias importantes não somente na solubilidade, toxicidade e farmacocinética como também benefícios bastante significativos do ponto de vista da eficácia do tratamento. Capaz de facilitar a localização do tecido-alvo, aumentar a deposição intracelular do composto, manter as concentrações do mesmo acima do limiar terapêutico e ainda prolongar a atividade do fármaco, CRLX-101 apresenta-se como promissor agente na área da oncologia com estudos de fase II a ser planejados (YOUNG *et al.*, 2011).

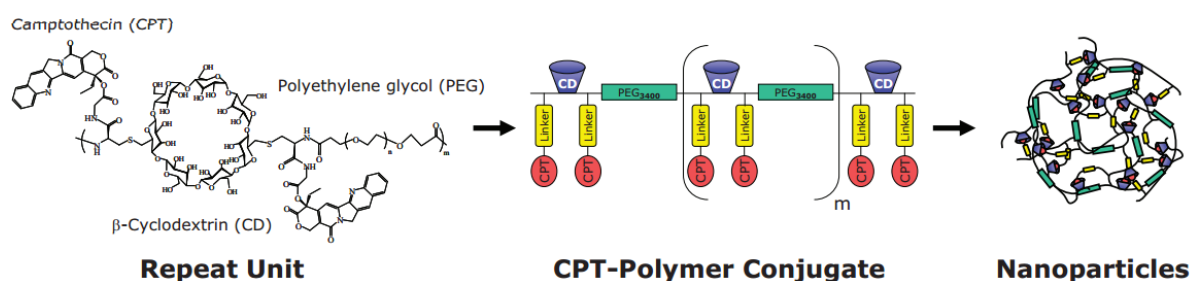


Figura 6. Diagrama esquemático do composto CRLX-101 (YOUNG *et al.*, 2011)..

4. Ácido Betulínico e Derivados

4.1 Origem e isolamento do composto

O ácido betulínico é um triterpeno pentacíclico (cuja estrutura química está representada na Figura 7), amplamente distribuído e conhecido do reino vegetal, que pode ser encontrado em muitas plantas, frutos e vegetais, embora em pequenas quantidades. Contudo, em maiores quantidades podemos extraí-lo da camada mais externa da casca de *Betula alba* L. ou da casca de eucalipto, por exemplo. *Betula spp* são ricas, além de ácido betulínico, em betulina, um precursor interessante da síntese do ácido betulínico, via oxidação química ou enzimática (CICHEWICZ *et al.*, 2004; CSUK *et al.*, 2006).

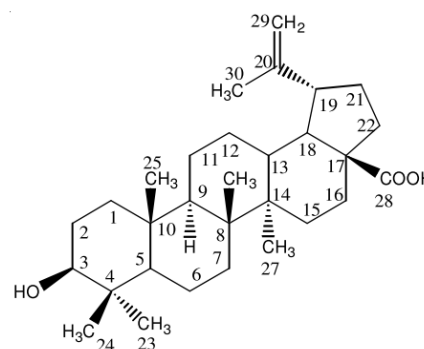


Figura 7. Estrutura química do ácido betulínico

Na *Figura 8*, a seguir apresentada, descrevem-se cinco métodos de obter o ácido tendo a betulina como ponto de partida das reações químicas.

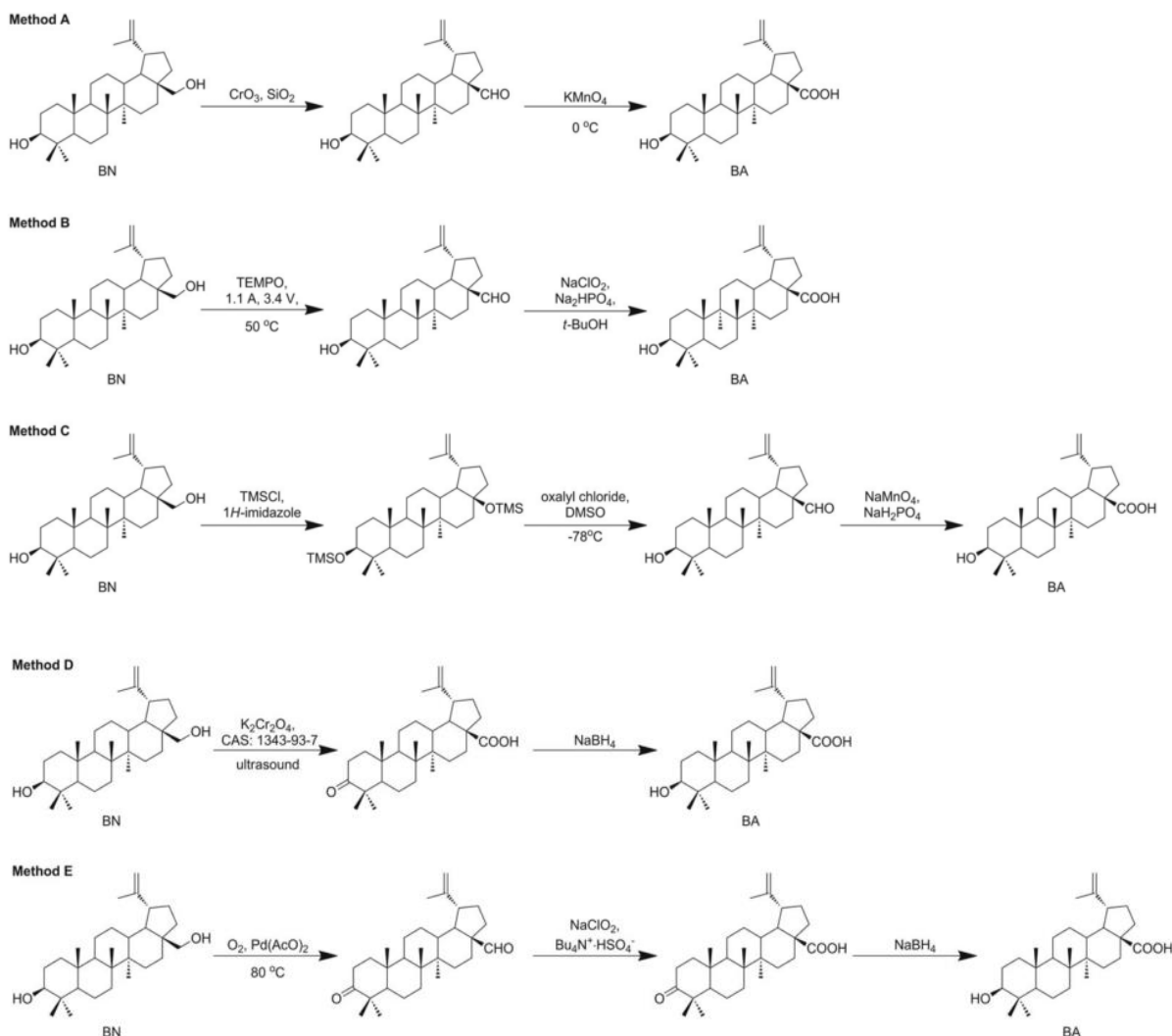


Figura 8. Vias de Síntese do Ácido Betulínico (BA) a partir da Betulina (BN) (Adaptado de ZHANG *et al.*, 2015)

Método A – Iniciado por *Pichette et al.* em 2004, com um rendimento de 54%. A etapa principal do processo é a oxidação altamente seletiva do H do C-28, com recurso ao ácido crómico (CrO_3) adsorvido num suporte sólido de dióxido de sílica (SiO_2).

Método B – Estabelecida em 2006, consiste numa reação eletroquímica de dois passos mediada por TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidini-1-óxido). Mais tarde, *Csuk et al.* melhoraram este método transformando-o numa reação de uma só etapa e que se considera o método mais simples de síntese química do ácido betulínico.

Método C – Desenvolvido por *Barthel et al* em 2003, com um rendimento de cerca de 64%, recorre ao composto TMSCI (cloreto de trimetilsilano) na proteção dos H de C-3 e de C-28 antes da oxidação do H em C-28.

Método D – Tira partido do uso de ultrassons (20Hz) quando a betulina é dispersa em acetona antes da mistura com uma solução de 12- heteropoliácido estrutura de Keggin. Esta via sintética melhorada apresenta um rendimento de 92%.

Método E – Reação de 3 passos desenvolvida em 2013 que evita o uso de reagentes carcinogénicos com o CrO₃ usando o oxigénio atmosférico na oxidação catalítica da betulina em ácido betulínico. Apresenta-se assim um método vantajoso também por ser eficaz e economicamente viável.

4.2 Interesse terapêutico do ácido betulínico

O valor do ácido betulínico reside na multiplicidade de interessantes ações terapêuticas já demonstradas, nomeadamente a anti-inflamatória, antivírica, antibacteriana, antimalárica, imunomoduladora, antiangiogénica, hepatoprotetora e antidepressiva (*CSUK et al.*, 2006; *MACHADO et al.*, 2013). Recentemente, foi demonstrada a capacidade do mesmo inibir a neoglicogénese hepática e, assim sendo, a sua utilidade na prevenção e tratamento da hiperglicémia (*KIM et al.*, 2014).

Desde 1995 que *PISHA et al.* reportaram o ácido betulínico como altamente promissor enquanto agente antineoplásico, após a indução da apoptose em linhas celulares de melanoma quer *in vitro* quer *in vivo*. Mais tarde, esta atividade do composto e derivados foi confirmada como efetiva em outras linhas celulares com diferentes origens tais como mama, cólon, pulmão, pâncreas, ovário, neuroblastoma ou osteossarcoma (*LASZCZYK*, 2009; *ZHANG et al.*, 2015). O mecanismo de ação antitumoral deste fitocomposto prende-se com a capacidade do mesmo induzir a morte celular apoptótica pela via mitocondrial, o que abordarei adiante mais em pormenor.

Adquire, contudo, ainda mais relevância o interesse terapêutico deste composto quando se percebe que existe uma dada resistência das células não cancerígenas à sua ação (*FULDA*, 2008). Conseguiu-se induzir a morte de células primárias de neuroblastomas e meduloblastomas, não se observando citotoxicidade nas restantes células neuronais dos murinos, o que permite também inferir acerca da seletividade do composto para o alvo tumoral (*GHEORGHEOSU et al.*, 2014).

Todavia, este composto apresenta algumas limitações, nomeadamente no que diz respeito à fraca solubilidade do mesmo e dos seus derivados, o que restringe a sua aplicação permitindo apenas o seu uso tópico. Como forma de contornar esta problemática, novas formas de administração, como lipossomas ou nano-emulsões têm sido apresentadas, bem como modificações em C-3, C-20 e C-28 (CSUK, 2014).

4.3 Mecanismos de atuação na neoplasia

O ácido betulínico demonstrou modular a expressão de proteínas da família Bcl-2, que inclui proteínas quer anti-apoptóticas quer pró-apoptóticas, bem como exibiu a capacidade de iniciar a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS). Estes dois acontecimentos, apesar de ser complexo e dependente do tipo de célula nas proteínas Bcl-2, conduzem a alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial. A permeabilização das membranas interna e externa da mitocôndria, induzida desta forma, permite a saída de fatores solúveis potencialmente tóxicos como o citocromo C, a proteína Smac ou o fator indutor da apoptose (AIF). Estes fatores atuam na ativação das caspases responsáveis pela morte celular. Por outro lado, o composto demonstrou não necessitar da presença de P-53 (proteína envolvida na apoptose de células anormais ou danificadas e, portanto, das mais estudadas envolvidas na supressão tumoral) e cuja inativação, estratégia comum em muitos tumores, permite a sua contínua proliferação. Uma outra vantagem revelou-se em células resistentes à apoptose via recetor CD95 (Faz recetor) que, apesar de indutor de apoptose, uma vez adquirida resistência da célula tumoral a esta via apoptótica, a sua estimulação adquire a função oposta estimulando a invasão e crescimento tumorais. O ácido betulínico veio solucionar algumas formas de resistência do cancro a alguns fármacos aumentando a sua atratividade para a prática clínica (FRIDMAN *et al.*, 2003; FULDA, 2009; PETER *et al.*, 2015). Além desta via apoptótica capaz de perturbar o tumor, o ácido betulínico demonstrou inibir a aminopeptidase N, uma enzima envolvida na regulação da angiogénese e que se encontra sobreexpressa em muitas formas de cancro. Revelou ainda a capacidade de bloqueio da atividade catalítica da topoisomerase I, impedindo a sua interação com o DNA (FULDA, 2009).

Dado o potencial do ácido betulínico como agente quimioterápico acima descrito, muitas alterações estruturais foram realizadas no sentido de otimizar a terapêutica e avaliar a citotoxicidade dos diferentes derivados, mediante realização de estudos da relação estrutura-atividade (REA). As principais conclusões revelaram como indispensáveis na ação citotóxica: o grupo carboxilo em C-28 e o esqueleto formado pelos três anéis A, B e C podendo, este

último, direcionar o *design* de novos agentes antineoplásicos. Por sua vez, a citotoxicidade foi melhorada na presença de um substituinte halogéneo em C-2, bem como a aparente substituição por um grupo éster em C-3 (MUKHERJEE *et al.*, 2006).

4.4 Estratégias promissoras

Um novo derivado bem tolerado, o **NVX-207**, apresentou atividade apoptótica e solubilidade bastante melhoradas face ao ácido betulínico em estudos *in vivo* em caninos que apresentavam tumores resistentes aos fármacos convencionais. Por intermédio da clivagem das caspases 9, 3 e 7 e da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), este derivado ativa a via intrínseca da apoptose e, de forma muito mais rápida que o composto inicial, pois em apenas 7-10h foram visíveis os efeitos do NVX-207. A Figura 9 ilustra as respostas clínicas bastante favoráveis e facilmente visíveis após injeção intratumoral deste derivado promissor com alta citotoxicidade, seletividade e com a solubilidade adequada para administração clínica (CSUK, 2014; WILLMANN *et al.*, 2009).



Figura 9. Resposta do tumor em pacientes caninos após injeção intratumoral de NVX-207. À esquerda as lesões tumorais antes e à direita após o tratamento. (Adaptado de WILLMANN *et al.*, 2009)

No sentido de solucionar ainda o problema da fraca biodisponibilidade e solubilidade do ácido betulínico, utilizou-se uma γ - **ciclodextrina** (Octakis- [6 - desoxi - 6- (2 - sulfanil ácido etanossulfónico)] - γ -ciclodextrina) altamente solúvel em água para complexar com o fitocomposto. Após testada a capacidade anti-proliferativa deste complexo *in vitro*, estudos em modelo animal mostraram ação na redução no peso e volume do melanoma induzido no murino em teste. Tal facto pode ser indicador da capacidade do complexo melhorar a ação antitumoral do ácido betulínico aumentando o tempo de sobrevivência. Além disso, o ácido betulínico tem capacidades protetoras da pele podendo ser um candidato ao tratamento de melanomas *in vivo* (SOICA *et al.*, 2014).

CONCLUSÃO

Considerando as estatísticas relativas aos novos casos de cancro, revela-se essencial dar continuidade aos esforços desenvolvidos pela comunidade científica na investigação desta patologia e de todos os mecanismos subjacentes.

Desde sempre, e de modo especial no tratamento de várias doenças, as plantas assumem um papel importante devido à diversidade de compostos que contém, com potencial terapêutico comprovado.

O ácido betulínico constitui-se um desses fitocompostos uma vez que revela uma série de ações farmacológicas promissoras do ponto de vista clínico, tendo já permitido obter derivados úteis na quimioterapia, com estudos de citotoxicidade e seletividade tumorais bastante favoráveis. Características diferenciadoras, como a capacidade deste fitocomposto contornar alguns mecanismos de resistência do cancro, vêm reforçar o seu interesse nesta área.

A realização de novos estudos científicos, capazes de tornar perceptíveis os mecanismos de resistência das células cancerígenas aos agentes antineoplásicos, permitirá a definição de novos alvos terapêuticos passíveis de uso numa quimioterapia mais seletiva e eficaz. A utilização melhorada de fitocompostos surge, neste sentido, como aliada no combate à doença neoplásica.

BIBLIOGRAFIA

- ANAND, P., AJAIKUMAR B. K., CHITRA S., KUZHUVELIL B. H., SHEEJA T. T., OIKI S. L., BOKYUNG, S., BHARAT, B. A., «Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes», *Pharmaceutical Research*, 25 (2008), 2097–2116
- BURKE, T. G., «Book Reviews», *Journal of Natural Products*, 60 (1997), 325–33
- CICHEWICZ, R. H., SAMIR A. K., «Chemistry, Biological Activity, and Chemotherapeutic Potential of Betulinic Acid for the Prevention and Treatment of Cancer and HIV Infection», *Medicinal Research Reviews*, 24 (2004), 90–114
- CRAGG, G. M., e DAVID J. N., «Plants as a source of anti-cancer agents», *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (2005), 72–79
- CSUK, R., «Betulinic acid and its derivatives: a patent review (2008-2013).», *Expert opinion on therapeutic patents*, 24 (2014), 913–23
- CSUK, R., KIANGA S., RENATE, S., «A practical synthesis of betulinic acid», *Tetrahedron Letters*, 47 (2006), 8769–70
- DANAEI, G., STEPHEN, V. H., ALAN D. L., CHRISTOPHER J. L. M., MAJID E., «Causes of cancer in the world: Comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors», *Lancet*, 366 (2005), 1784–93
- DARWICHE, N., SARA E., HALA G., «Cell cycle modulatory and apoptotic effects of plant-derived anticancer drugs in clinical use or development.», *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2 (2007), 361–79
- DESAI, A. G., GHULAM N. Q., RAMESH K. G., MAHMOUD E., JASWANT, S. AJIT K. S., YASHBIR, S. B., TANEJA, S. C. BHAT, H. K., «Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention», 10 (2013), 54–56
- DUMONTET, C., JORDAN, M. A. «Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics», *Nature*, 9 (2010)
- ESCUIN, D., KLEIN, E. R., GIANNAKAKOU, P., «Both microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs inhibit hypoxia-inducible factor-1 α accumulation and activity by disrupting microtubule function», *Cancer Research*, 65 (2005), 9021–28
- FRIDMAN, J. S., LOWE, S. W. «Control of apoptosis by p53.», *Oncogene*, 22 (2003), 9030–40

- FULDA, S, «Betulinic acid: a natural product with anticancer activity», *Molecular nutrition & food research*, 53 (2009), 140–46
- FULDA, S., «Betulinic acid for cancer treatment and prevention», *International Journal of Molecular Sciences*, 9 (2008), 1096–1107
- GALI-MUHTASIB, H., HMADI, R., KARETH, M., TOHME, R. e DARWICHE, N., «Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: Beyond apoptosis», *Apoptosis*, 20 (2015), 1531–62
- GHEORGHEOSU, D., DUICU, O., DEHELEAN, C., SOICA, C., MUNTEAN, D. «Betulinic acid as a potent and complex antitumor phytochemical: a minireview», *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 14 (2014), 936–45
- GIOVANELLA, B. C., STEHLIN, J. C., HINZ, H. R., KOZIELSKI, A. J., HARRIS, N. J., VARDEMAN, D. N. «Preclinical evaluation of the anticancer activity and toxicity of 9-nitro-20(S)-camptothecin (Rubitecan).», *International journal of oncology*, 20 (2002), 81–88
- HAMAYUN, M., KHAN, S. A., SOHN, E. Y. LEE, I., «Folk medicinal knowledge and conservation status of some economically valued medicinal plants of District Swat, Pakistan», *Lyonia*, 11 (2006), 101–13
- HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. «Hallmarks of cancer: The next generation», *Cell*, 144 (2011), 646–74
- KHAZIR, J., MIR, B. A., PILCHER, L., RILEY, D. L. «Role of plants in anticancer drug discovery», *Phytochemistry Letters*, 7 (2014), 173–81
- KIM, S. J., QUAN, H. Y., JEONG, K. J., KIM, G. W., JO, H. K., CHUNG, S. H., «Beneficial effect of betulinic acid on hyperglycemia via suppression of hepatic glucose production», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (2014), 434–42
- LASZCZYK, M. N., «Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy», *Planta Medica*, 75 (2009), 1549–60
- LIU, S, LO, S. N. H., «Design of Low-molecular-weight prodrugs for targeted delivery of anticancer drugs», *3rd International Conference and Exhibition on Pharmaceutics & Novel Drug Delivery Systems*, 4 (2013), 4172
- MACHADO, D. G., CUNHA, M. P., NEIS, V. B., BALEN, G. O., COLLA, A., BETTIO, L. E. B., «Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated

- from *Rosmarinus officinalis* L.», *Food Chemistry*, 136 (2013), 999–1005
- MAMTANI, R., VAUGHN, D. J., «Vinflunine in the treatment of advanced bladder cancer.», *Expert review of anticancer therapy*, 11 (2011), 13–20
- MIELE, E., SPINELLI, G. P., MIELE, E., TOMAO, F., TOMAO, S., «Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane®; ABI-007) in the treatment of breast cancer», *International Journal of Nanomedicine*, 4 (2009), 99–105
- MUKHERJEE, R., KUMAR, V., SRIVASTAVA, S. K., AGARWAL, BURMAN, A. C. «Betulinic acid derivatives as anticancer agents: structure activity relationship», *Anti-Cancer Agents In Medicinal Chemistry*, 6 (2006), 271–79
- National Cancer Institute, «Understanding Chemotherapy», 2008
<<http://www.cancer.gov/publications/patient-education/understandingchemo.pdf>>
- NCI, «Cancer: Types of Treatment», *National Cancer Institute*, 2015
<<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>> [acedido 16 Maio 2016]
- «NCI Dictionary of Cancer Terms», *National Cancer Institute*
<<http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=45587>> [acedido 16 Maio 2016]
- «NCI Dictionary of Cancer Terms», *National Cancer Institute*
<<http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=45815>> [acedido 16 Maio 2016]
- NOSTRO, A., GERMANÒ, M. P., D'ANGELO, V., MARINO, A., CANNATELLI, M. A., GERMANO, M. P., «Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity», *Letters in Applied Microbiology*, 30 (2000), 379–84
- OCHWANG'I, D. O., KIMWELE, C. N., ODUMA, J. A., GATHUMBI, P. K., MBARIA, J. M., KIAMA, S. G., «Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya», *Journal of Ethnopharmacology*, 151 (2014), 1040–55
- PAN, L., CHAI, H., KINGHORN, A. D., «The continuing search for antitumor agents from higher plants», *Phytochemistry Letters*, 3 (2010), 1–8
- PETER, M E, HADJI, A, MURMANN, A. E., BROCKWAY, S., PUTZBACH, W., PATTANAYAK, A. CEPPI, P., «The role of CD95 and CD95 ligand in cancer.», *Cell death and differentiation*, 22 (2015), 549–59

- POWIS, G., KIRKPATRICK, L., «Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target», *Molecular cancer therapeutics*, 3 (2004), 647–54
- RAGUZ, S., YAGU, E., «Resistance to chemotherapy : new treatments and novel insights into an old problem», 2008, 387–91
- REBUCCI, M., MICHIELS, C., «Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy», *Biochemical Pharmacology*, 85 (2013), 1219–26
- SHAH, U., SHAH, R., ACHARYA, S., ACHARYA, N. «Novel anticancer agents from plant sources», *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11 (2013), 16–23
- SHOEB, M., «Anticancer agents from medicinal plants», *Bangladesh J Pharmacol* 2006; 1 (2006), 35–41
- SIEGEL, R., MILLER, K., JEMAL, A. «Cancer statistics , 2015 .», *CA Cancer J Clin*, 65 (2015), 29
- SOICA, C., DANCIU, C. SAVOIU-BALINT, G., BORCAN, F., AMBRUS, R., ZUPKO, I., «Betulinic acid in complex with a gamma-cyclodextrin derivative decreases proliferation and in vivo tumor development of non-metastatic and metastatic BI64A5 cells», *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (2014), 8235–55
- SOLOWEY, E., LICHTENSTEIN, M., SALLON, S., PAAVILAINEN, H., SOLOWEY, E., LORBERBOUM-GALSKI, H., «Evaluating medicinal plants for anticancer activity», *Scientific World Journal*, 2014 (2014)
- SPORN, M. B., LIBY, K. T., «Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty», *Nature Clin. Pract. Oncol.*, 2 (2005), 518–25
- SRIVASTAVA, V., NEGI, A.S., KUMAR, J. K., GUPTA, M. M., KHANUJA, S. P. S., «Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads», *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13 (2005), 5892–5908
- THUN, M. J., DELANCEY, J. O., CENTER, M.M., JEMAL, A., WARD, E. M., «The global burden of cancer: Priorities for prevention», *Carcinogenesis*, 31 (2009), 100–110
- WHO, «National Cancer Control Programmes: Policies and managerial guidelines.», *Health (San Francisco)*, 1 (2002), 1–180
- WILLMANN, M., WACHECK, V., BUCKLEY, J., NAGY, K., THALHAMMER, J., PASCHKE, R., «Characterization of NVX-207, a novel betulinic acid-derived anti-cancer compound», *European Journal of Clinical Investigation*, 39 (2009), 384–94

YOUNG, C., SCHLUEP, T., HWANG, J., ELIASOF, S. «CRLX101 (formerly IT-101)-A Novel Nanopharmaceutical of Camptothecin in Clinical Development», *Current Bioactive Compounds*, 7 (2011), 8–14

ZHANG, D., XU, H., WANG, Y. L. L., SUN, X. W. P., WANG, W. C. G., YE, W., «Betulinic Acid and its Derivatives as Potential Antitumor Agents», *Medicinal Research Reviews*, 35 (2015), 1127–55