



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA CLAUDIA TERKELLI DE ASSIS

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO EM CULTURA 3D DE CÉLULAS HepG2/C3A

Londrina – Paraná
2024

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MARIA CLAUDIA TERKELLI DE ASSIS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E
DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO
EM CULTURA 3D DE CÉLULAS HepG2/C3A**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mario Sérgio Mantovani

**Londrina – Paraná
2024**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Assis, Maria Claudia Terkelli .

Avaliação do efeito antiproliferativo e dos mecanismos de ação do ácido ursólico em cultura 3D de células HepG2/C3A / Maria Claudia Terkelli Assis. - Londrina, 2024.
53 f. : il.

Orientador: Mario Sergio Mantovani.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Fitoquímicos - TCC. 2. Antiproliferação - TCC. 3. Esferoides - TCC. 4. Células tumorais - TCC. I. Mantovani, Mario Sergio . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

MARIA CLAUDIA TERKELLI DE ASSIS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E
DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO
EM CULTURA 3D DE CÉLULAS HEPG2/C3A**

Monografia apresentada ao Curso de
Graduação em Ciência Biológicas da
Universidade Estadual de Londrina como um
dos requisitos à obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mario Sérgio Mantovani
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Me. Luan Vitor Alves de Lima
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dra. Simone Cristine Semprebon
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 9 de maio de 2024

Dedico este trabalho a minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

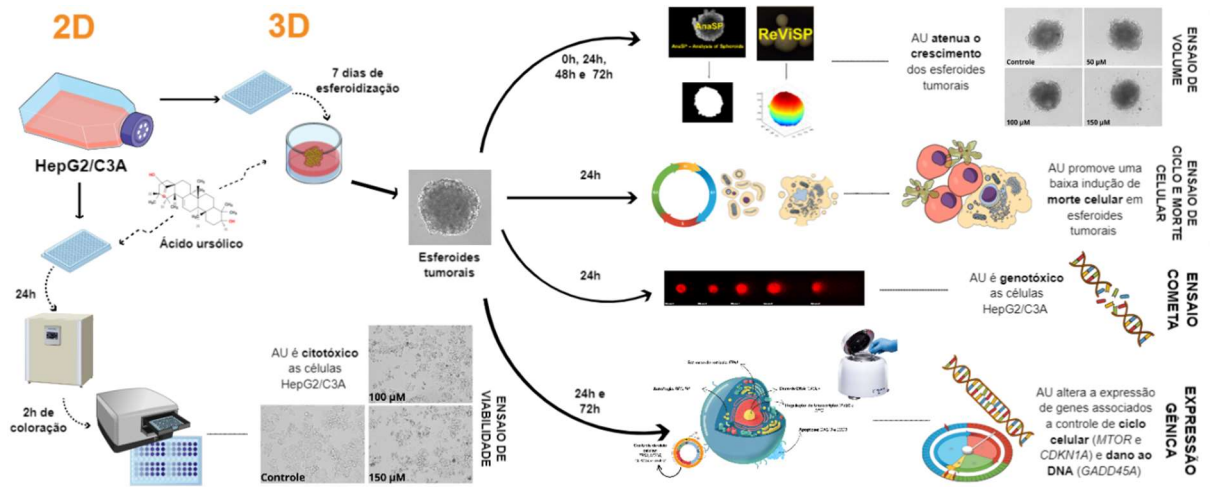
Agradeço ao meu orientador, professor Mário, um ser humano admirável, inteligente e zeloso, do qual estimo muito, por ter me acolhido no seu laboratório em 2019 e a partir disso me permitir diversas experiências, sempre dividindo conhecimentos muito valiosos, dos quais levarei por toda a vida em meu coração. Agradeço também aos meus amigos de laboratório, Liana, Luan e Matheus, por cada momento compartilhado dentro e fora do nosso ambiente de trabalho, por todo suporte prestado durante cada experimentação, análise e por todo apoio. Vocês, junto ao professor Mário, foram peças fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho e para minha vida acadêmica. Nenhuma palavra aqui escrita será suficiente para expressar a imensa gratidão que tenho por todos vocês.

Agradeço a minha família, em especial a minha vó Leonice, que já não está mais aqui presente, mas que se orgulharia muito, e a minha mãe Maria por ser uma mulher forte, por ter cuidado e zelado por duas filhas sozinha, garantido sempre que nada nos faltasse e que ambas tivessem a oportunidade de ter uma formação.

Agradeço ao meu namorado Lucas, por sempre acreditar no meu potencial, até mesmo quando eu não pude fazer isso, por me dar todo suporte emocional, me apoiar em cada passo dado, vibrar a cada conquista e por ser uma pessoa incrível e atenciosa, que demonstra todo seu amor a cada dia que passamos juntos.

Agradeço a minha professora Camila, uma pessoa muito especial, por quem tenho um carinho muito grande e um vínculo inexplicável. Obrigada por todo o apoio, por chorar comigo quando necessário e por vibrar quando meu nome estava na lista dos classificados. Por fim, agradeço a UEL e as instituições de fomento FINEP, CNPq, CAPES e Fundação Araucária, que prestaram todo o suporte financeiro e estrutural para esse trabalho.

RESUMO GRÁFICO: Ação do Ácido Ursólico em esferoides tumorais de HepG2/C3A



TERKELLI DE ASSIS, Maria Claudia. **Avaliação do Efeito Antiproliferativo e dos Mecanismos de Ação do Ácido Ursólico em Cultura 3D de Células HepG2/C3A.** 2024. 53. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2024.

RESUMO

A procura por compostos naturais e de fontes vegetais, como os fitoquímicos, que apresentem propriedades farmacológicas importantes tem se tornado alvo de estudos para a produção de novos fármacos. Como exemplo tem-se o ácido ursólico (AU), um triterpenóide pentacíclico de ação promissora, com potenciais antiproliferativos, extraído da casca e folhas de plantas como as macieiras. Diante disso, este trabalho analisou os efeitos antiproliferativos e os mecanismos de ação do AU em cultura 3D de células HepG2/C3A (hepatocarcinoma humano), através da formação de esferoides tumorais. As avaliações foram realizadas de acordo com a citotoxicidade do AU, pelo ensaio de resazurina em sistema 2D. A partir desses dados, avaliamos a sua influência sobre o volume médio esferoidal, sua indução de alterações no ciclo celular e morte celular, por meio da citometria de fluxo, a sua genotoxicidade, vista pelo ensaio cometa, e a influência na expressão de mRNA de genes relacionados a ciclo e morte celular. A análise estatística foi feita através de ANOVA-one way com post-hoc de Dunnett e ANOVA-two way com post-hoc de Tukey. Os dados mostraram que em 24 horas de tratamento o AU é citotóxico nas concentrações de 100 μM e de 150 μM ; atenua o crescimento dos esferoides, sendo o volume dos tratados menores que os do grupo controle; induz morte celular nas concentrações de 50 μM e 100 μM ; é genotóxico; e induz super expressão dos genes *GADD45A* (8,8x), *MTOR* (2,38x) e inibição de *CDKN1A* (2x). Conclui-se que o AU possui ações antiproliferativas, promovendo alterações na expressão de genes associados ao controle de ciclo celular e dano de DNA, tendo este trabalho contribuído para o entendimento sobre o modo de ação desse fitoquímico para seu propósito terapêutico.

Palavras-chave: Esferoides tumorais. Citotoxicidade. Genotoxicidade.

TERKELLI DE ASSIS, Maria Claudia. **Evaluation of the Antiproliferative Effect and Mechanisms of Action of Ursolic Acid in 3D Culture of HepG2/C3A Cells.** 2024.

53. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2024.

ABSTRACT

The search for natural compounds from plant sources, such as phytochemicals, with important pharmacological properties has become a focus of studies for the development of new drugs. One example is ursolic acid (UA), a promising pentacyclic triterpenoid with potential antiproliferative effects, extracted from the bark and leaves of plants like apple trees. Considering this, this study analyzed the antiproliferative effects and mechanisms of action of UA on 3D cultures of HepG2/C3A cells (human hepatocellular carcinoma), using tumor spheroid formation. Evaluations were conducted based on UA cytotoxicity using the resazurin assay in a 2D system. Using this data, we assessed its influence on spheroid volume, its induction of cell cycle alterations and cell death via flow cytometry, its genotoxicity observed through the comet assay, and its influence on mRNA expression of genes related to cell cycle and cell death. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test and two-way ANOVA with Tukey's post hoc test. The results showed that after 24 hours of treatment, UA was cytotoxic at concentrations of 100 μ M and 150 μ M; it attenuated spheroid growth, with treated volumes smaller than those of the control group; induced cell death at concentrations of 50 μ M and 100 μ M; exhibited genotoxicity; and induced overexpression of genes GADD45A (8.8x) and MTOR (2.38x) while inhibiting CDKN1A (2x). It was concluded that UA possesses antiproliferative actions, causing changes in gene expression associated with cell cycle control and DNA damage, contributing to understanding the mode of action of this phytochemical for therapeutic purposes.

Keywords: Tumor spheroids. Cytotoxicity. Genotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do ácido ursólico.....	16
Figura 2 – Estrutura química das três classes dos triterpenóides pentacíclicos.....	16
Figura 3 – Propriedades do ácido ursólico	17
Figura 4 – Diferença de respiração celular entre as células heterogêneas de um tumor homotípico	20
Figura 5 – Classificação dos cometas de acordo com o comprimento da cauda	27
Figura 6 – Genes utilizados para a avaliação da expressão de mRNA	29
Figura 7 – Análise de citotoxicidade em células HepG2/C3A após 24h de tratamento com ácido ursólico.....	30
Figura 8 – Ácido ursólico (AU) atenua o crescimento dos esferoides tumorais.....	32
Figura 9 – Análise de ciclo celular por citometria de fluxo.....	33
Figura 10 – Análise de morte celular por citometria de fluxo.....	34
Figura 11 – Análise de genotoxicidade em 24h de tratamento com ácido ursólico em esferoides tumorais de células HepG2/C3A.....	34
Figura 12 – Ácido ursólico promove alterações na expressão relativa de genes em 24 e 72 h de tratamento	36

SUMÁRIO

	Pág.
1	INTRODUÇÃO.....12
2	REVISÃO DE LITERATURA14
2.1	Câncer..... 14
2.2	Fitoquímicos.....15
2.3	Ácido Ursólico.....15
2.4	Cultura Celular.....17
2.4.1	Cultura bidimensional (2D).....17
2.4.1.1	Cultura tridimensional (3D).....18
2.5	Células HepG2/C3A.....20
3	OBJETIVOS..... 22
3.1	Objetivos Gerais.....22
3.2	Objetivos Específicos.....22
4	MATERIAL E MÉTODOS23
4.1	Agentes Químicos.....23
4.2	Linhagem Celular e Condições de Cultura.....23
4.3	Ensaio de Citotoxicidade..... 23
4.4	Ensaio de Cultura 3D..... 24
4.5	Ensaio de Volume..... 25
4.6	Ciclo Celular e Morte por Citometria de Fluxo..... 25
4.7	Ensaio Cometa..... 26
4.8	RT-qPCR..... 27
4.9	Análise Estatística..... 29
5	RESULTADOS 30
5.1	Ácido Ursólico Promoveu a Redução da Viabilidade Celular..... 30

5.2	Ácido Ursólico Atenuou o Crescimento do Volume Médio (mm ³) dos esferoides.	31
5.3	Ácido Ursólico não promove alteração de ciclo celular em esferoides HepG2/C3A.	33
5.4	Ácido Ursólico promove uma leve indução de morte celular em esferoides de células HepG2/C3A.	33
5.5	Ácido Ursólico é genotóxico em esferoides HepG2/C3A.	34
5.6	Ácido Ursólico promove alterações na expressão relativa de genes em esferoides HepG2/C3A.	35
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICES	48
	APÊNDICE A – Citotoxicidade do AU.	48
	APÊNDICE B – Volume médio (mm ³) dos esferoides tumorais.	48
	APÊNDICE C – Ciclo Celular: Percentual Relativo.	48
	APÊNDICE D – Morte Celular: Percentual Relativo.	49
	APÊNDICE E – Histogramas do Ciclo Celular.	49
	APÊNDICE F – Distribuição de Morte Celular.	50
	APÊNDICE G – Valores de Score, Número de Cometas e Nucleoides.	50
	APÊNDICE H – Expressão Gênica em 24h.	51
	APÊNDICE I – Expressão Gênica em 72h.	51
	APÊNDICE J – Primers utilizado para RT-qPCR.	52

1 INTRODUÇÃO

Durante a terapia do câncer, uma das problemáticas que se relacionam aos quimioterápicos convencionais é a resistência adquirida por esses medicamentos. Essa resistência é dada quando as células cancerosas, inicialmente sensíveis a uma determinada substância, não respondem de maneira eficiente a ela, o que acaba comprometendo a efetividade do tratamento. Com isso, aumenta-se o interesse pela busca de novos fármacos que apresentem propriedades terapêuticas e que possam ser utilizados como uma alternativa. Como exemplo, tem-se os fitoquímicos, compostos naturais derivados de fontes vegetais.

Os fitoquímicos são metabólitos secundários, ou seja, são substâncias que não atuam sobre as funções primárias do vegetal, como o crescimento e a reprodução, mas que estão relacionados a proteção desses organismos contra fatores externos, como a predação. Além disso, são substâncias bastante notáveis, pois apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais.

O ácido ursólico (AU) é um fitoquímico classificado como um triterpenoide pentacíclico que tem como sua unidade funcional o isopreno, o que confere ao composto uma baixa solubilidade em água, estando presente nas estruturas externas da planta, como as folhas e as cascas dos frutos. Esse fitoquímico apresenta propriedades terapêuticas, sendo mais seletivo às células cancerosas.

Um fator determinante para a compreensão dos mecanismos de ação desses compostos é a escolha de modelos *in vitro* que se assemelhem às condições biológicas. Para a análise de respostas em células cancerosas, a formação de esferoides tumorais, através da cultura celular tridimensional (3D), acaba sendo uma boa alternativa, considerando que esse modelo promove condições mais realistas ao microambiente tumoral. Dentre estas estão a comunicação celular, que ocorre de forma multidirecional junto à formação da matriz extracelular e o desenvolvimento de um gradiente de dissipação de nutrientes e O₂ que resulta em uma heterogeneidade celular.

Embora existam muitos trabalhos que explorem os mecanismos de ação do AU, estes acabam restringindo-se apenas à cultura bidirecional (2D) e as respostas inferidas através dessa metodologia acabam sendo bastante limitadas. Sendo assim, este trabalho buscou promover maiores elucidações sobre os mecanismos de ação

desse composto, através da elaboração de esferoides tumorais, considerando que há uma ausência de trabalhos que os explorem através da cultura 3D.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

Na atualidade, o câncer é tido como uma das principais causas de morte no mundo. Sabendo disso, estima-se o aumento no número de casos e mortes de indivíduos acometidos por essa doença esteja associado ao aumento da população, ao seu envelhecimento e a forma como estas pessoas desenvolvem um estilo de vida (TORRE *et al.*, 2016). Uma das problemáticas que se relaciona a essa doença é que, embora realizar classificação dos tipos de câncer seja algo simples, mensurar a origem da heterogeneidade dos tumores torna-se algo complexo (GILBERTSON, 2011).

Estudos desenvolvidos nas últimas décadas concluíram que células cancerosas são "células remodeladas" que possuem diversas mutações genéticas e epigenéticas, o que confere a estas a capacidade de auto renovação e proliferação, favorecendo o desenvolvimento de tumores (YIN *et al.* 2021). Durante a divisão celular, as células estão suscetíveis a erros que, quando não reparados, se consolidam em mutações ao serem repassados para as células-filhas. Em relação a carcinogênese, é necessário que haja mais de uma mutação crítica, tendo um número estimado de 3 a 7 mutações que superem o reparo ao DNA, a apoptose, e acabem conferindo o desenvolvimento de atividades excessivas, como a proliferação desordenada (GRAHAM; SOTTORIVA, 2017; YIN *et al.*, 2021).

Outra problemática no câncer é a resistência aos medicamentos utilizados para o tratamento, que pode ocorrer de forma inicial ou após várias sessões de administração. Quando há uma proliferação desordenada de células, ocorre um comprometimento na distribuição de nutrientes e oxigênio entre as células de um tecido, devido ao distanciamento de vasos, o que acaba promovendo uma série de consequências. Dentre essas está o favorecimento da heterogeneidade do tumor, gerando regiões de hipóxia e a acidificação do microambiente tumoral (SECOMB *et al.*, 1993; NUNES *et al.*, 2019). Somado a isso, tem-se também a dificuldade que um composto em atingir de forma uniforme todas as células de um tumor sólido e, caso não haja essa uniformidade, as células que são passíveis de regeneração, como as células estaminais tumorais e clonogênicas, acabam comprometendo a eficiência de

um medicamento durante o tratamento. (MINCHINTON; TANNOCK, 2006). Para isso, eleva-se o interesse sobre modelos de experimentação *in vitro* que se assemelhem as condições biológicas de um microambiente tumoral, visando um melhor desempenho para a busca por tratamentos mais efetivos.

2.2 Fitoquímicos

Ao longo do desenvolvimento humano a fitoterapia, a utilização de plantas para o tratamento de doenças, se manteve como um dos principais métodos terapêuticos (CZELUSNIAK *et al.*, 2012). Atualmente, a compreensão do potencial de ação de agentes naturais, como os fitoquímicos, se torna importante, considerando o seu desempenho em múltiplos alvos. Em células cancerosas, substâncias com essa multiplicidade de efeitos podem atuar em diversas vias de sinalização, o que contribui para o aumento da eficácia dos tratamentos (KUMAR *et al.*, 2018; NIWA *et al.*, 2022).

Os fitoquímicos são compostos orgânicos classificados como metabólitos secundários, pois não estão associados ao crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas (MARTEL *et al.*, 2019). São substâncias direcionadas para promover a proteção desses vegetais e podem ser extraídas a partir de diversas estruturas (KUMAR *et al.*, 2023), como os frutos, as sementes e as raízes, tendo a possibilidade de atuar na redução dos riscos de ocorrência de várias doenças (FERREIRA e ABREU, 2007). Há mais de 5 mil compostos identificados, sendo a sua classificação feita de acordo com as suas propriedades funcionais e estruturais (RATHAUR e SR, 2019).

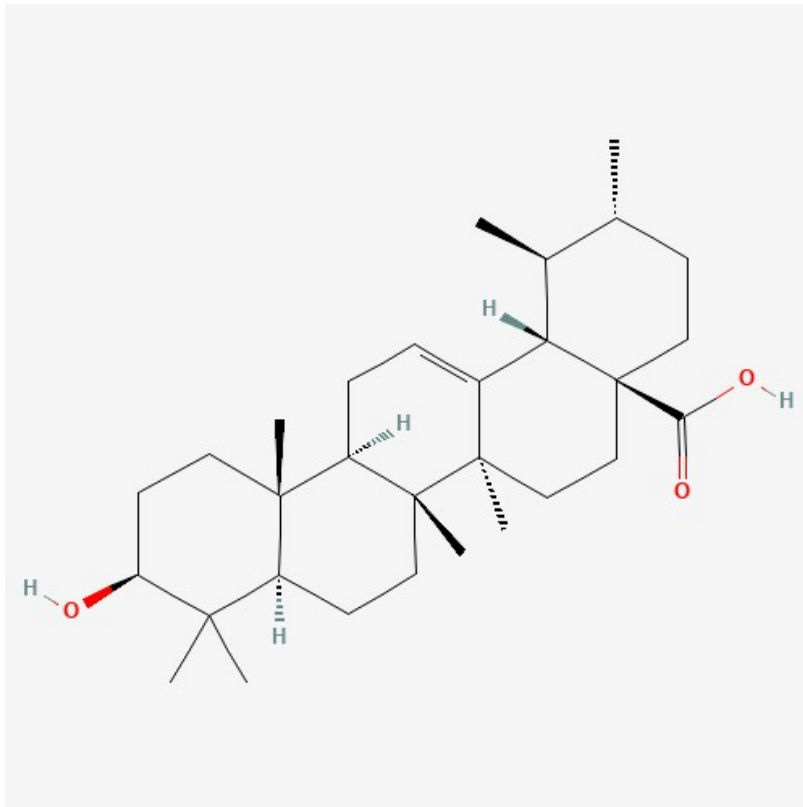
Os fitoquímicos atuam em diversas fases do metabolismo, interferindo direta ou indiretamente na prevenção do câncer, promovendo a redução na proliferação de células cancerosas (GARÓFOLO *et al.*, 2004). Já em relação aos tratamentos convencionais dessa doença, muitos fitoquímicos podem ser mais eficazes e econômicos (JAIN *et al.*, 2021).

2.3 Ácido Ursólico

O ácido ursólico (AU) é um fitoquímico pertencente a classe dos terpenoides, compostos cuja unidade estrutural é dada a partir do isopreno, uma cadeia de cinco carbonos (RATHAUR e SR, 2019). Esse fitoquímico é do tipo triterpenóide

pentacíclico (TP) e a sua fórmula química é tida como $C_{30}H_{48}O_3$, como mostra a Figura 1, tendo um ponto de fusão entre 283-285°C (MLALA *et al.*, 2019).

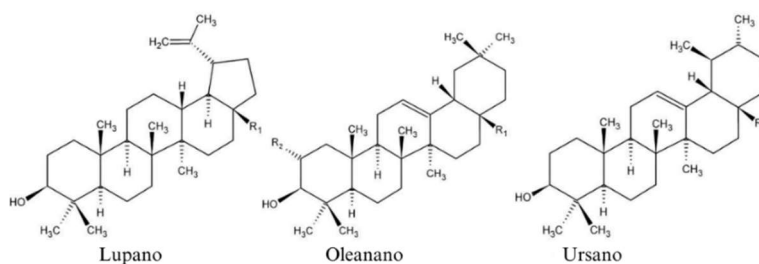
Figura 1 – Estrutura química do ácido ursólico.



Fonte: Pubchem, 2024.

Os TPs podem ser divididos em três classes de bioativos importantes, sendo eles: lupano, oleanano e ursano (JC FURTADO *et al.*, 2017). A ocorrência do AU é dada principalmente em estruturas superficiais das plantas como as cascas e as ceras de folhas e frutos (JAGER *et al.*, 2009), podendo ser isolado de diversas plantas, principalmente as que pertencem a família *Lamiaceae*, como o alecrim, manjerona, lavanda, orégano e tomilho, em frutas, como na casca da maçã, e flores (SEO *et al.*, 2018).

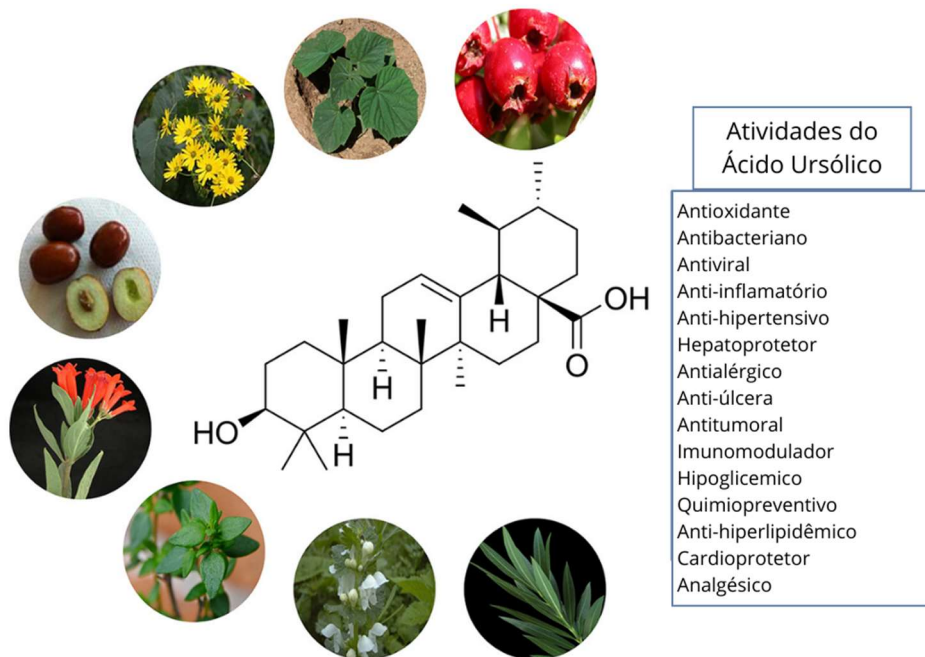
Figura 2 – Estrutura química das três classes dos triterpenóides pentacíclicos.



Fonte: Adaptado de JANGER *et al.*, 2009.

O grande atrativo pelo grupo em que se insere o AU está associado aos seus efeitos promissores, tais como as atividades anticarcinogênicas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antivirais e antimicrobiana (KHWAZA; OYEDEJI; ADERIBIGBE, 2020). É visto também na literatura que compostos dessa classe atuam como agentes multialvos, modulando múltiplos alvos e vias de sinalizações relacionadas a sobrevivência, progressão e resistência do câncer (SALVADOR *et al.*, 2017).

Figura 3 – Propriedades do ácido ursólico.



Fonte: Adaptado de LÓPEZ-HORTAS *et al.*, 2018.

No entanto, em relação as propriedades químicas do AU, tem-se como aspecto negativo a sua baixa solubilidade em água, contrária a uma alta solubilidade em hidróxido de sódio alcoólico e em ácido acético glacial (MLALA *et al.*, 2019). Sabendo que a solubilidade é um fator importante para a eficiência da biodisponibilidade de um composto natural, cresce o interesse pela formulação de derivados do AU que tenham uma maior disponibilidade, mantendo a sua ação terapêutica (CHEN *et al.*, 2015).

2.4 Cultura Celular

2.4.1 Cultura bidimensional (2D)

A experimentação baseada na cultura de células tem se tornado um pilar para a compreensão sobre as ações de novos medicamentos e compostos, em uma tentativa de promover a redução dos testes em animais (EDMONDSON *et al.*, 2014). Criada em 1943 por Earle, a cultura celular em monocamada, também conhecida por cultura bidimensional (2D), se tornou o método mais tradicional para o cultivo de células, sendo um processo relativamente simples e de grandes contribuições para, por exemplo, estudar o potencial proliferativo e a diferenciação de células corporais (SHEN *et al.*, 2021). Embora hoje esse modelo experimental ainda tenha um imenso valor para o conhecimento de diversos mecanismos da biologia celular, há algumas limitações.

As respostas fisiológicas inferidas através da cultura 2D são muito restritas (BAUER *et al.*, 2022), pois acabam apresentando uma dificuldade em mimetizar a complexidade do microambiente biológico do corpo humano, podendo haver discrepâncias entre os resultados obtidos (SHEN *et al.*, 2021). Considerando os tumores sólidos *in vivo*, a interação bidimensional é incapaz de simular as suas condições fisiológicas e a resistência terapêutica (NUNES *et al.*, 2019), encontrada durante os tratamentos. Consequentemente, acaba-se tendo a progressão de medicamentos ineficientes, com uma ineficácia clínica e/ou toxicidades indesejadas, para os estudos *in vivo* e testes pré-clínicos (BRESLIN e O'DRISCOLL, 2013). Considerando isso, buscando a redução dos custos investidos em compostos inviáveis, o ideal seria que a rejeição dessas substâncias ocorra o quanto antes, preferencialmente antes dos testes em animais (EDMONDSON *et al.*, 2014).

2.4.1.1 Cultura tridimensional (3D)

Para uma situação mais próxima ao microambiente tumoral, sugere-se então a formação de sistemas de cultura celular tridimensional (3D), como os esferoides tumorais, que em relação ao 2D, se assemelham de modo mais realista ao microambiente biológico real e ao *in vivo*, considerando o comportamento e as respostas celulares (EDMONDSON *et al.*, 2014).

Esses esferoides podem ser classificados como homotípicos, quando formados por um único tipo de célula (monocultura), ou heterotípicos, quando formados por células tumorais e estromais (cocultura) (COSTA *et al.*, 2016). A partir disso tem-se também a evolução dos modelos de cultura 3D, que visam promover a diferenciação

celular, buscando a formação de estruturas tridimensionais com funções organotípicas ainda mais similares ao *in vivo* (HAYDEN e HARBELL, 2021).

A mimetização trazida pelo 3D é dada por fatores como: a interação célula-célula que é mais reforçada e os receptores e as proteínas de adesão se distribuem homogeneamente por toda a superfície de membrana, diferente do 2D em que essa interação é polarizada devido a distribuição dessas proteínas que se concentram na superfície ventral da célula, onde há contato com a superfície do frasco de cultura (KNIGHT e PRZYBORSKI, 2015), e pela formação da matriz extracelular (MEC). Assim como nos tumores sólidos nos ensaios *in vivo*, as células que compõem os esferoides tumorais são capazes de depositar proteínas que constituem essa MEC como, por exemplo, o colágeno e os proteoglicanos (COSTA *et al.*, 2016).

Considerando sua ação de suporte estrutural, em tumores a funcionalidade da MEC ocorre de forma anormal, tendo um aumento na deposição das proteínas que as constituem e, somado a interação célula-célula, aumenta-se a densidade dos tumores, criando uma barreira física que acaba limitando a difusão de substâncias, nutrientes e oxigênio (NUNES *et al.*, 2019), gerando um gradiente de difusão junto ao acúmulo de resíduos metabólicos e alterações no perfil de proliferação das células (MEHTA *et al.*, 2012).

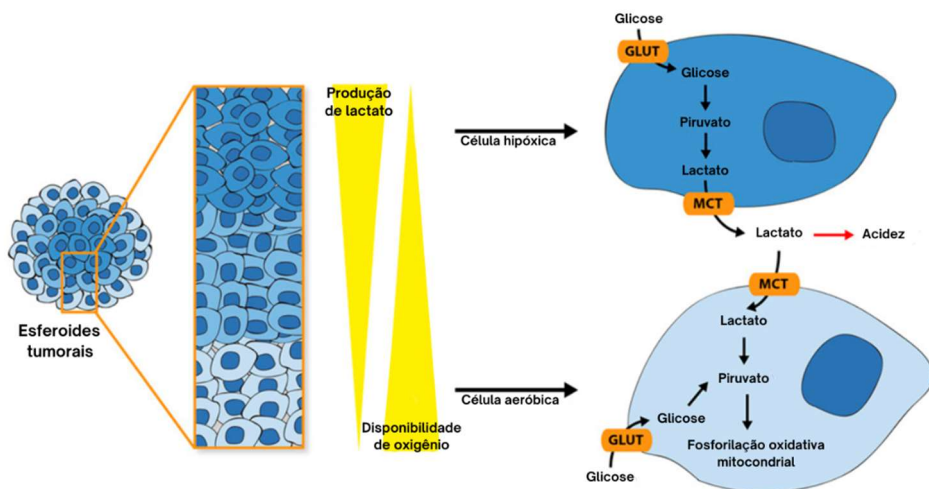
Essas limitações acabam promovendo uma heterogeneidade entre as células de um esferoide tumoral homotípico, que encontram-se em diferentes estágios fenotípicos, funcionais e metabólicos (ZANONI *et al.*, 2020). Sendo assim, em um esferoide é possível encontrar, na região mais externa células com alta capacidade de proliferação, na região intermediária células quiescentes e na região central células em necrose (MEHTA *et al.*, 2012), formando o centro necrótico.

As células que estão na superfície do esferoide possuem uma maior interação com oxigênio e nutrientes, o que justifica o seu alto nível proliferativo, e a medida em que essa estrutura cresce, a difusão dessas substâncias se torna mais difícil. Essa dificuldade ocorre devido ao aumento da distância de difusão, o que inviabiliza a chegada do oxigênio na região central, promovendo a hipóxia, o que acaba influenciando no metabolismo das células (NUNES *et al.*, 2019).

Em condições de hipóxia, as células acabam promovendo alterações em seu metabolismo, se desenvolvendo por meio da glicólise anaeróbica, na qual há a conversão do piruvato em lactato (WARBURG; WIND; NEGELEIN, 1927). O acúmulo do lactato torna o pH interno e externo do esferoide ácido, o que influencia na

resistência da dissipação intracelular de algumas substâncias utilizadas no tratamento, modificando a sua distribuição (WOJTKOWIAK *et al.*, 2011; ZANONI *et al.*, 2020). A eficiência da difusão passiva de moléculas pela membrana celular é dada por sua forma não carregada, assim em condições de baixo pH elas acabam sendo protonadas, diminuindo a sua absorção (TRÉDAN *et al.*, 2007).

Figura 4 – Diferença de respiração celular entre as células heterogêneas de um tumor homotípico. Durante a glicólise anaeróbica, as células convertem o piruvato em lactato. Em contrapartida, durante a glicólise aeróbica, o lactato é convertido em piruvato para dar continuidade a fosforilação oxidativa.



Fonte: Adaptado de NUNES *et al.*, 2019

2.5 Células HepG2/C3A.

As células de hepatocarcinoma humano, a HepG2 e suas derivações, como a HepG2/C3A, são sugeridas para análises toxicológicas, em razão das suas propriedades metabólicas (NIWA *et al.* 2022). A derivação HepG2/C3A tem como característica o seu crescimento inibido por contato, o seu potencial de desenvolvimento em meio de cultura de baixa glicose, uma alta produção de albumina e a síntese de alfafetoproteína e transferrinas (GASKELL *et al.*, 2016). Essa linhagem se assemelha as células primárias do fígado devido as suas funções, como a ação do citocromo P450, proteína responsável por catalisar a biotransformação de xenobióticos, a gliconeogênese e a síntese de glicogênio e ureia (ORELLANA *et al.*, 2004; MOSSOBA *et al.*, 2018).

Modelos 3D a partir da cultura celular de hepatocarcinoma humano expõe

condições ainda mais específicas do fígado como, por exemplo, as vias enzimáticas metabólicas e a morfologia celular, junto as suas propriedades bioquímicas, que se assemelham ao tecido *in vivo* (ŠTAMPAR, *et al.*, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito antiproliferativo e os mecanismos de ação do ácido ursólico em esferoides tumorais de linhagem celular de hepatocarcinoma humano, HepG2/C3A.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar o IC_{50} , concentração inibitória média, do ácido ursólico através do ensaio de citotoxicidade com resazurina em cultura celular 2D (monocamada);

Avaliar a ação do ácido ursólico sobre o volume médio dos esferoides tumorais através dos softwares AnaSP e ReViSP;

Avaliar a ação do ácido ursólico sobre o ciclo celular e a indução de morte celular através da citometria de fluxo;

Avaliar a genotoxicidade do ácido ursólico através do ensaio cometa;

Avaliar a ação do ácido ursólico na expressão de mRNA de genes associados à apoptose, controle do ciclo celular, danos no DNA, estresse de retículo, autofagia e aos de regulação de transcrição através da RT-qPCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Agentes Químicos

O ácido ursólico (AU), ácido-3 β -hidroxi-12-urseno-28-ico, CAS 77-52-1, C₃₀H₄₈O₃, PM=456,70 g.mol⁻¹, foi adquirido da Sigma-Aldrich-Brasil. Fez-se uma solução estoque do AU, dissolvendo-o em DMSO na concentração final de 100mM e o mantendo a -20°C. Já para os ensaios experimentais a doxorubicina (DOX, 2 μ M) e a camptotecina (CAMPTO, 20 μ M) foram utilizadas como controle positivo. O grupo controle de veículo foi preparado com 0,15% de DMSO, sendo esse valor correspondente a concentração de DMSO presente na maior concentração testada do AU.

4.2 Linhagem celular e Condições de cultura

A linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HepG2/C3A), livre de micoplasma, foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo meio DMEM de baixa glicose (Gibco, lote n° 1860611), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, cod: 12657029) e 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco, cod: 152540-062), sendo mantidas em uma atmosfera controlada, em uma estufa úmida, estufa úmida com 5% de injeção de CO₂ em temperatura de 37°C.

4.3 Ensaio de Citotoxicidade

A definição do IC₅₀ foi realizada através do ensaio de resazurina em cultura 2D e só então deu-se a continuidade aos demais experimentos em cultura 3D, sendo as concentrações testadas do AU estimadas a partir da análise de viabilidade. Para o ensaio de citotoxicidade utilizou-se o corante Resazurina, o que possibilitou a avaliação citotóxica do AU nas células, ou seja, a viabilidade celular. Em células viáveis, o corante resazurina é reduzido a resorufina, uma molécula fluorescente, o

que permite a sua interpretação através de dados de espectrofotometria. As células foram semeadas em uma placa de 96 poços em uma concentração de $1,5 \times 10^4$ células/poço em um volume de 100 μL de meio DMEM com SBF. Em seguida, a placa foi levada para a estufa por um período de 24 h para garantir o processo de estabilização. Após isso, foi acrescentado nos poços as soluções de tratamento com o AU (6,25-150 μM) e o controle positivo (DOX, 2 μM), diluídos em meio de cultura, por 24 h, atingindo um volume final de 200 μL /poço. Logo após esse período de tratamento as células foram incubadas com a resazurina a 60 μM , por mais 2 h. Com a adição do corante, a placa foi mantida na estufa de cultura até o momento de sua leitura no espectrofotômetro Glomax® (520 nm de excitação e 580-640 nm de emissão). A viabilidade celular foi estimada através da equação representada abaixo pela Equação 1, em que o valor da fluorescência é representado por A. O cálculo de IC50 foi obtido através do cálculo de regressão não linear.

Equação 1 – Cálculo de viabilidade celular.

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{A_{\text{TRATAMENTO}} - A_{\text{BRANCO}}}{A_{\text{CONTROLE}} - A_{\text{BRANCO}}} \times 100$$

4.4 Ensaio de Cultura 3D

A técnica para a formação dos esferoides foi a de sobreposição líquida descrita por Yuhás *et al.* (1997), que se baseia no crescimento celular tumoral em um meio líquido sobre uma superfície não aderente de agarose. Foi adicionado em placas de 96 poços 50 μL /poço de uma solução estéril de agarose – baixo ponto de fusão (1,5%) dissolvida em meio de cultura DMEM de baixa glicose sem SBF, como descrito na metodologia de Friedrich *et al.*, (2009). Foram semeadas $2,0 \times 10^3$ células em 150 μL /poço de meio de cultura. Logo após, as placas foram centrifugadas a 1000 rpm/5 min e mantidas na estufa por 7 dias, caracterizando o período de esferoidização. O número de células e período de esferoidização foram estabelecidos previamente em um estudo piloto. Após a formação dos esferoides, estes foram tratados com as concentrações de AU em 50, 100 e 150 μM , determinadas pelo ensaio de citotoxicidade, para as avaliações de volume, ciclo celular e morte por citometria de fluxo, dano no DNA pelo ensaio do cometa, marcadores fluorescentes e expressão de mRNA.

4.5 Ensaio de Volume

O volume dos esferoides foi avaliado após os tratamentos com 50, 100 e 150 μM de AU. Para a captura de imagens, fez-se o uso do microscópio EVOS® FL *Auto Cell Imaging System* (Thermo Fisher) com magnificação de 100 vezes. Os registros foram realizados nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h de tratamento. A avaliação do volume foi realizada no software especializado AnaSP e ReViSP (PICCININI, 2015; PICCININI et al., 2015). O experimento ocorreu a partir de 3 repetições experimentais, utilizando 2 esferoides por cada replicata, totalizando 6 esferoides por cada um dos tratamentos.

4.6 Ciclo celular e morte por Citometria de Fluxo

Para o ensaio de ciclo e morte celular, os esferoides foram tratados em 3 concentrações do AU (50, 100 e 150 μM), com a camptotecina 20 μM e com o DMSO, como controle, a 0,15% por um período de 24 h. O experimento foi realizado em duas repetições experimentais, em que para cada uma das replicatas utilizou-se 4 esferoides (*pool*), totalizando 8 esferoides por tratamento. Após o período de tratamento, o *pool* de esferoides passou por processamento, adicionando 150 μL de accutase/amostra. As amostras foram então levadas ao agitador a 1400 rpm por 10 min. Em seguida foram homogeneizadas com micropipetas, tendo por objetivo a obtenção de células únicas. Logo após as células foram ressuspensas em 150 μL de PBS. Para a avaliação do ciclo celular, foi adicionado 100 μL de Citrato/Triton, a 0,1%, junto a 5 μL de Iodeto de Propídio em 100 μL de suspensão celular, para assim se analisar 10.000 eventos/amostra. Já para a avaliação de morte celular, foi utilizado o FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, da BD Pharmingen, adicionando também 10 μL de tampão (10X Annexin V Binding Buffer), 90 μL de água destilada ultrapura (Invitrogen), 2 μL de Iodeto de Propídio (PI) e 2 μL de Anexina V em 100 μL de ressuspensão celular, para pôr fim analisar 2.000 eventos/amostra. A análise foi realizada em citômetro de fluxo Guava easyCyte™ (Merck Millipore), com a utilização do software Cycle cell para o ciclo celular e InCyte para a apoptose.

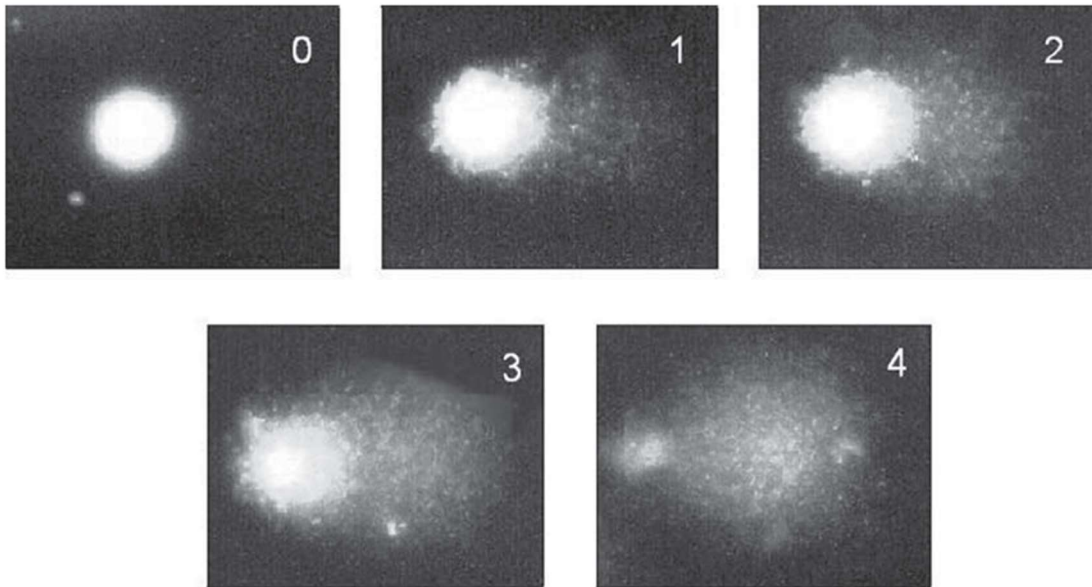
4.7 Ensaio Cometa

Para o ensaio cometa, os esferoides foram tratados com as 3 concentrações de AU (50, 100 e 150 μM), Doxorubicina a 2 μM e, para o controle, 0,15% de DMSO. O experimento ocorreu em três repetições experimentais, sendo utilizado então 5 esferoides/replicata. Após 24 h de tratamento, os esferoides, transferidos para microtubos, foram processados iniciando por centrifugação (6000 rpm, 15s) para a retirada do sobrenadante de meio de cultura. Após isso, foi adicionado 100 μL de accutase/amostra e estas foram levadas para o agitador a 1400 rpm por 10 min, a 37°C. Em seguida, a suspensão celular foi muito bem homogeneizada, a fim de se obter células únicas, e logo após as amostras foram levadas para microcentrífuga 15000 rpm, para a sedimentação, em um spin de 20s. Com isso, após a remoção do sobrenadante, foi adicionado 150 μL de PBS, realizando novamente a homogeneização, ressuspendendo as células. Em microtubos de 500 μL , foi adicionado 40 μL da amostra em 120 μL de agarose com baixo ponto de fusão (0,8%), realizando em seguida uma rápida homogeneização para dispor, em lâminas previamente gelatinizadas com agarose a 1,5%. Logo após, foi adicionado as lamínulas em cada uma das lâminas, agora com as amostras, e estas foram resfriadas a 4°C por 20 min. As células foram adicionadas em solução de lise (NaCl 2,25 M, EDTA 90 mM, Tris-HCl 9 mM, DMSO 10% e TritonX-100 1%) por pelo menos 60 min à 4°C e foram submetidas a condições alcalinas, em uma solução tampão de eletroforese (NaOH 300mM, pH>13) por 20 min no escuro. Após isso a eletroforese foi realizada em um pH 13, a 25 V, 300 mA por 20 min, seguido da neutralização (0,4M Tris, pH 7.5), fixadas com etanol absoluto (PA) e armazenadas a 4°C até a coloração. Para análise utilizou-se 100 μL de solução contendo brometo de etídeo (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e em cada lâmina foram avaliados 100 nucleoides/tratamento através de fotomicrografias obtidas pelo microscópio EVOS® FL *Auto Cell Imaging System* (Thermo Fisher) com 200x de magnificação. A análise foi feita de forma visual, como na Figura 6, de acordo com a classificação 0 a 4 em relação ao comprimento de cauda demonstrado por Collins *et al.*, 2008. O cálculo do índice de dano foi realizado como ilustrado na Equação 2, em que n_{CC1} , n_{CC2} , n_{CC3} e n_{CC4} são, respectivamente, número de cometas de classe 1, classe 2, classe 3 e classe 4.

Equação 2 – Cálculo de índice de dano no DNA.

$$\text{Índice de dano} = [(n_{CC}) + 2 \times (n_{CC2}) + 3 \times (n_{CC3}) + 4 \times (n_{CC4})]$$

Figura 5 – Classificação dos cometas de acordo com o comprimento da cauda.



Fonte: COLLINS *et al.*, 2008.

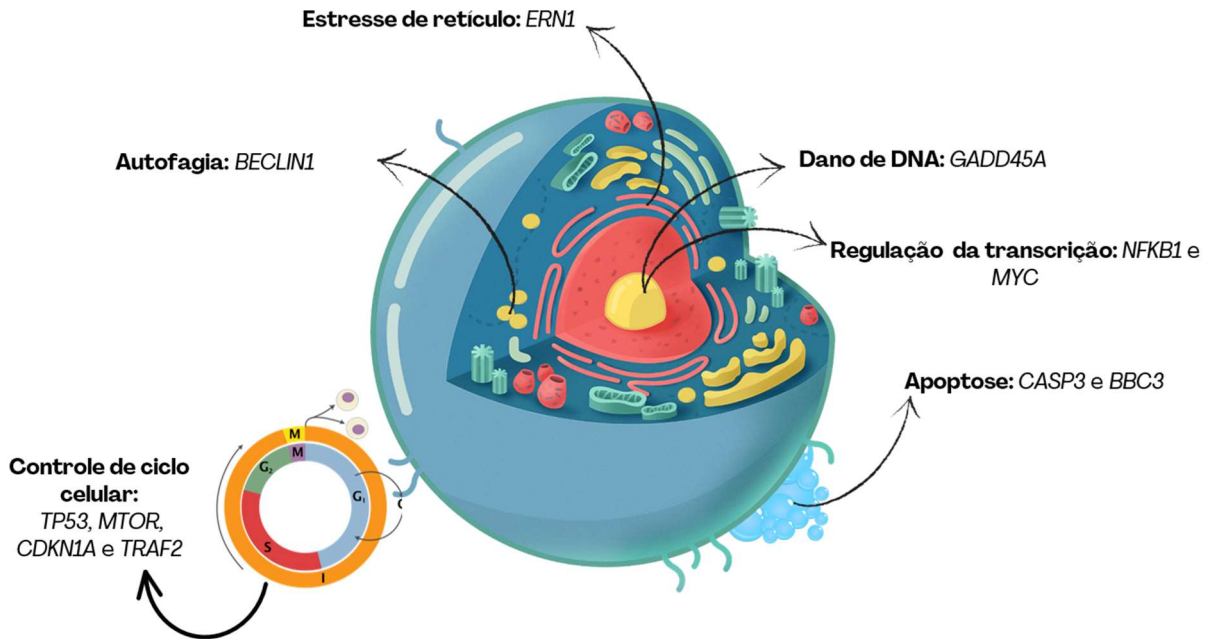
4.8 RT-qPCR

Para avaliação da expressão de mRNA, em 24 h foi utilizado um *pool* de 32 esferoides de cada tratamento, ocorrendo apenas em uma repetição experimental. Já para a expressão em 72 h utilizou-se um *pool* de 12 esferoides/grupo para a extração de mRNA, sendo esse ensaio realizado em três repetições experimentais. O mini kit RNeasy (Qiagen, USA) foi utilizado para o isolamento do RNA total de acordo com as recomendações do fabricante. A avaliação da integridade do RNA ocorreu por meio de eletroforese em gel de agarose (1%) e as concentrações e a pureza (A260/A280) foram verificadas no Biodrop μ Lite (Biochrom, USA). A síntese do cDNA foi realizada em tubo de reação contendo 500 ng do RNA em 12,4 mL de H₂O DEPC, 1 μ L de Oligo dT (10 pmol/mL, Invitrogen – Life Technologies) e 2 μ L de dNTPs (2,5 mM, Invitrogen – Life Technologies). Essa solução permaneceu por 15 min a temperatura de 60 °C e, logo após, foi inserida em gelo para choque térmico. Após isso foi adicionado aos tubos de reação 4 μ L de 5x First Strand Buffer (250 mM Tris-HCL (pH

8,3), 375 mM KCl e 15 mM MgCl₂, Invitrogen – Life Technologies), 0,1 µL de RNA out e 0,5 µL da enzima transcriptase reversa (M-MLV, Invitrogen – Life Technologies), os quais foram mantidos a 37°C por 2 min, 50°C por 45 min e 70°C por 15 min. O termociclador T100™ Thermal Cycler BIO-RAD foi utilizado para síntese do cDNA. Essa síntese foi realizada em triplicatas e seus produtos foram incorporados para formação de uma única amostra. A quantificação do cDNA foi realizada e a verificação da sua pureza (A260/A280) ocorreu através do Biodrop µLite (Biochrom). A diluição do cDNA em uma proporção de 1:5 em 24 h e 1:10 em 72 h (cDNA/ H₂O DEPC), a qual foi utilizada para qRT-PCR.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador Roche – LightCycler® Nano nas condições de 95°C por 5 min e 35 ciclos de 95°C por 20 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s. Para a solução de reação da PCR em tempo real foi utilizado 5 µL de PowerTrack™ SYBR Green Master Mix para qPCR (Thermo Fisher cat. No. A46012), 0,5 µL de cada primer iniciador (*forward e reverse*) e 5 µL da solução de cDNA. Foram avaliados genes associados à apoptose, o *CASP3* (Caspase 3) e o *BBC3* (BCL2 binding component 3); a controle do ciclo celular, o *TP53* (Tumor Protein P53), *MTOR* (Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase), *CDKN1A* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A) e o *TRAF2* (TNF Receptor Associated Factor 2); danos no DNA o *GADD45A* (Growth Arrest and DNA Damage Inducible Alpha); estresse de retículo , *ERN1* (Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1); autofagia, *BECN1*, (*BECLIN1*); e os genes reguladores de transcrição, *NFKB1* (Nuclear Factor Kappa B Subunit 1) e *MYC* (*MYC* Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor), como representado na Figura 7. Para os genes de referência foram utilizados *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) e *ACTB* (Actin Beta).

Figura 6 – Genes utilizados para a avaliação da expressão relativa de mRNA.



Fonte: O próprio autor.

4.9 Análise Estatística

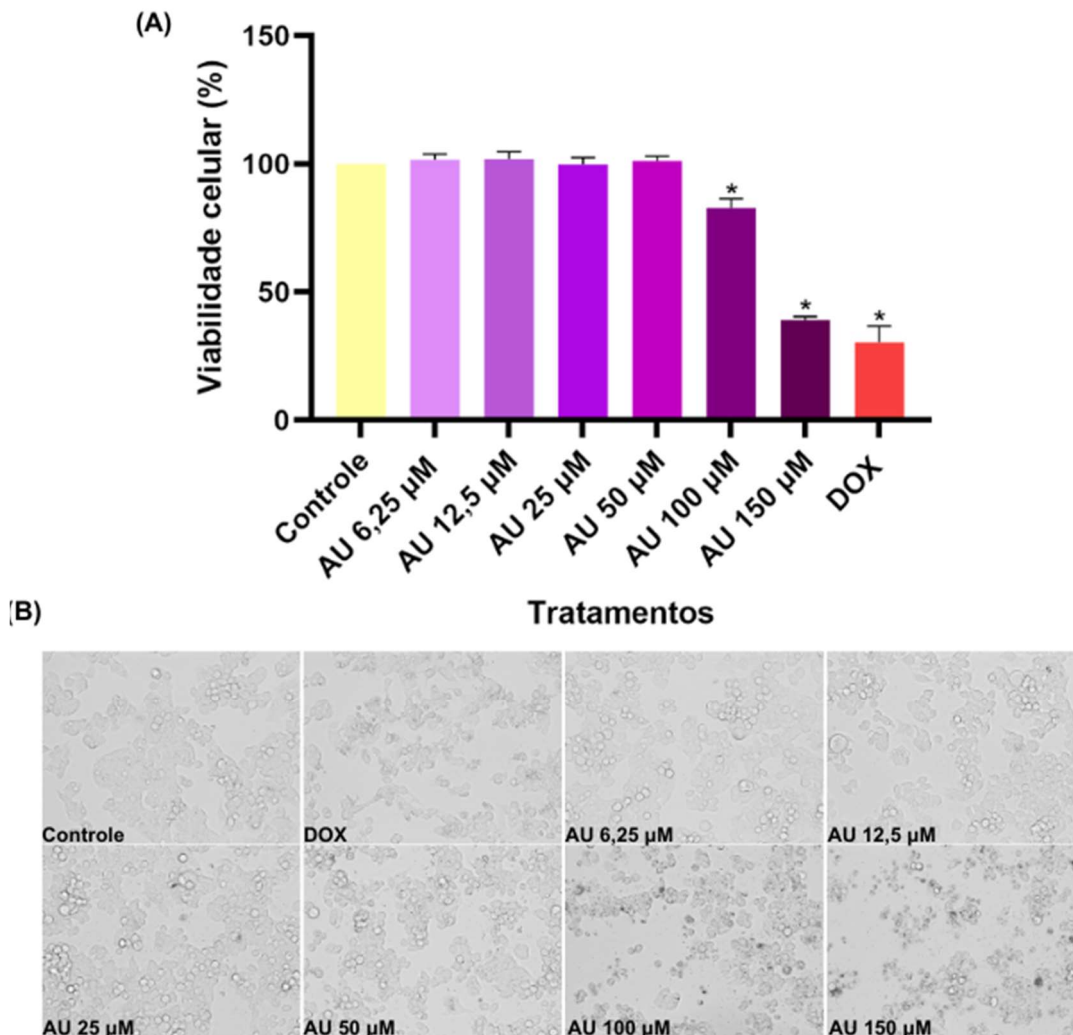
Os dados numéricos foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para a verificação da normalidade. Dados paramétricos dos ensaios de citotoxicidade foram submetidos à análise de variância (one-way ANOVA) e teste post-hoc de Dunnett. Para o ensaio de cultura 3D, os dados foram submetidos à análise de variância (two-way ANOVA de medidas repetidas) e teste post-hoc Tukey de múltiplas comparações. Foi utilizado o software GraphPad Prism® 9.0 (GraphPad Software, Inc.) e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, com nível de significância de 5%. Para a análise de expressão gênica relativa, foi utilizado o método *Pairwise Fixed Reallocation Randomization Test* inserido no programa Rest 2009 (PFAFFL *et al.*, 2002) e considerados como significativas as expressões com fold-change ≥ 2 e $\leq 0,5$, tendo o p-valor $\leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Ácido Ursólico promoveu a redução da viabilidade celular

Após 24 h de tratamento, constatou-se que o AU foi citotóxico para a linhagem HepG2/C3A nas concentrações de 100 e 150 μM , promovendo uma redução em sua viabilidade, como demonstra a Figura 7A. O IC₅₀, calculado por regressão não linear, foi de 137,2 μM . Já as concentrações de 6,25, 12,5, 25 e 50 μM não promoveram citotoxicidade significativas. Na Figura 7A tem-se as fotomicrografias das células HepG2/C3A após o período de tratamento onde é possível visualizar a redução da viabilidade celular nos tratamentos com as concentrações de 100 e 150 μM do AU, corroborando com a análise estatística.

Figura 7 – Análise de citotoxicidade em células HepG2/C3A após 24 h de tratamento com o ácido ursólico. (A) Gráfico percentual de viabilidade celular da linhagem HepG2/C3A após 24 h de tratamento com o AU. Para o controle e o controle positivo utilizou-se, respectivamente, DMSO a 0,15% e doxorubicina a 2 μM . Os dados foram apresentados por média \pm desvio padrão das três replicatas realizadas, sendo os valores estatisticamente significativos (*) os que apresentaram p-valor $\leq 0,05$. **(B)** Células HepG2/C3A após 24 h de tratamento com o AU em suas respectivas concentrações.



5.2 Ácido Ursólico atenuou o crescimento do volume médio (mm³) dos esferoides

As análises do volume médio esferoidal (mm³) foram realizadas sob as mudanças observadas após 24, 48 e 72 h de tratamento com o AU em relação ao tempo de 0 h dentro do mesmo grupo (Figura 8).

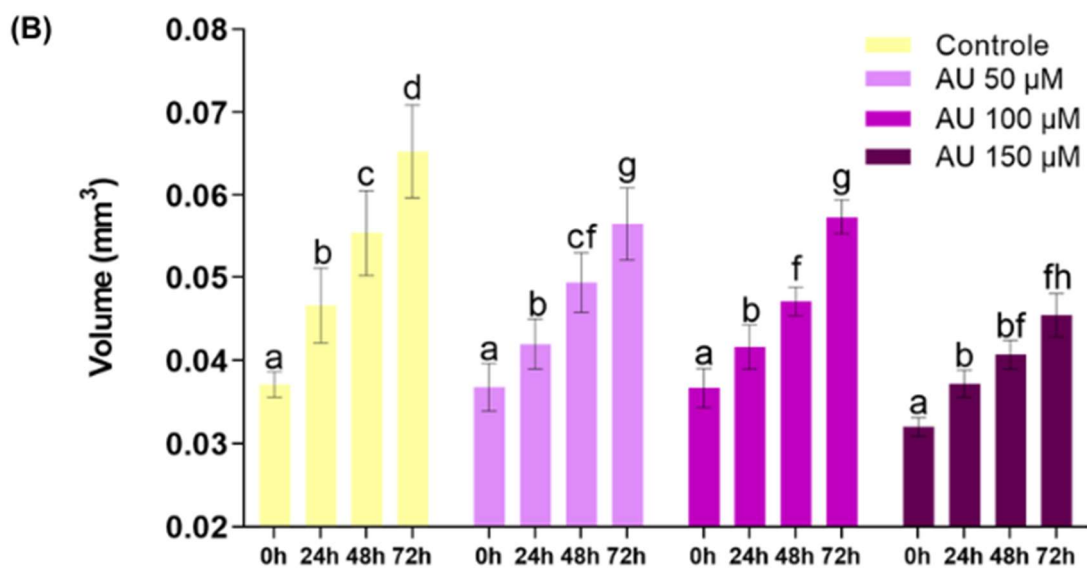
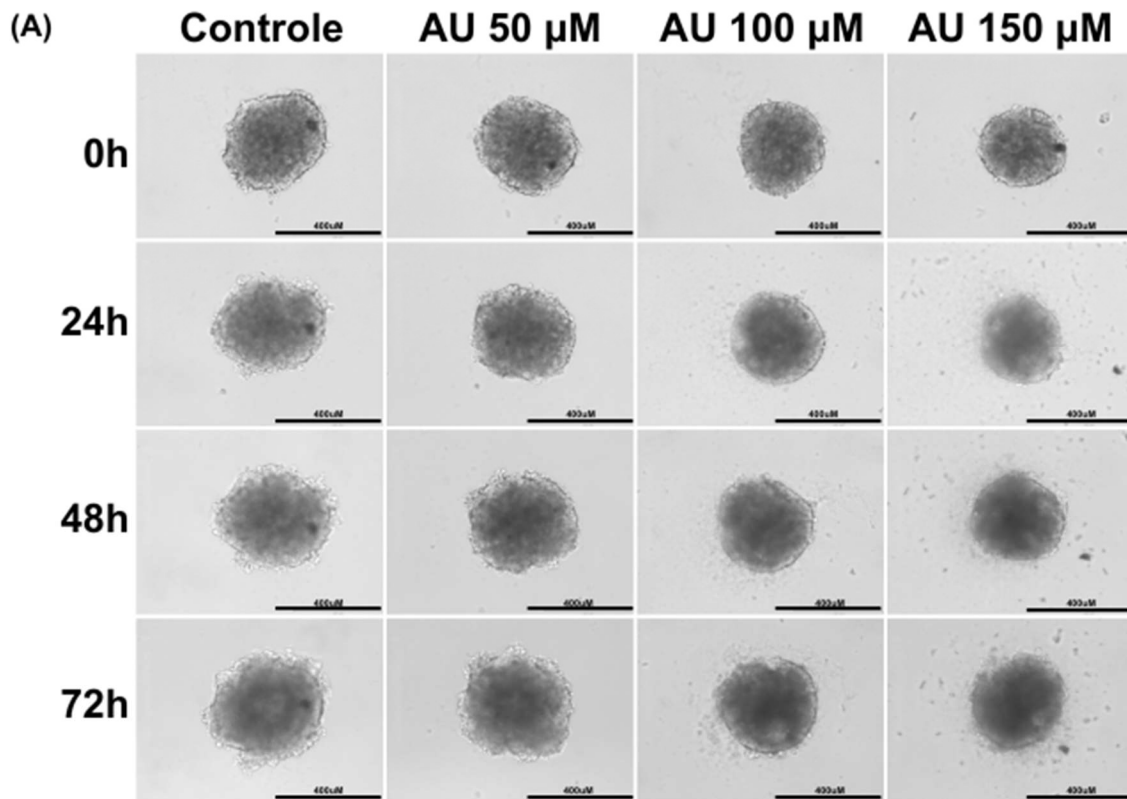
No grupo controle foi observado um aumento ($p \leq 0,05$) de 25,50%, 49,15%, 75,78%, respectivamente aos tempos de 24, 48 e 72 h de tratamento em relação ao tempo 0 h ($0,0371 \pm 0,0037$ mm³). Já para os tratamentos com AU, após 24h teve-se um aumento de 14,05%, 10,92% e 16,20% ($p \leq 0,05$) nas concentrações de 50 μ M ($0,04197 \pm 0,007326$ mm³), 100 μ M ($0,04162 \pm 0,006380$ mm³) e 150 μ M ($0,03722 \pm 0,004002$ mm³), respectivamente, em relação ao tempo 0 h. Após 48 h teve-se um aumento de 34,15%, 25,53% e 27,13% ($p \leq 0,05$) nas concentrações de 50 μ M ($0,04937 \pm 0,008856$), 100 μ M ($0,04710 \pm 0,004244$ mm³) e 150 μ M ($0,04072 \pm 0,004180$ mm³), respectivamente, em relação ao tempo 0 h. Por fim, em 72h de tratamento com AU houve um aumento de 53,53%, 53,91% e 41,89% ($p \leq 0,05$) nas concentrações de 50 μ M ($0,0565 \pm 0,0107$ mm³), 100 μ M ($0,0577 \pm 0,0054$ mm³) e 150 μ M ($0,0454 \pm 0,0064$ mm³), respectivamente, em relação ao tempo 0 h.

Comparando todos os tratamentos no tempo de 24 h, observou-se que os grupos tratados em 50 μ M ($0,04197 \pm 0,007326$ mm³), 100 μ M ($0,04162 \pm 0,006380$ mm³) e 150 μ M ($0,03722 \pm 0,004002$ mm³) apresentaram uma redução no volume médio ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle ($0,04660 \pm 0,01099$ mm³) de, respectivamente, 9,94%, 10,69% e 20,12%. Em comparação de grupos em 48 h, observou-se que os tratamentos de 50 μ M ($0,04937 \pm 0,008856$ mm³), 100 μ M ($0,04710 \pm 0,004244$ mm³) e 150 μ M ($0,04072 \pm 0,004180$ mm³) tiveram uma redução no volume médio ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle ($0,05538 \pm 0,01262$ mm³) de, respectivamente 10,85%, 14,95% e 26,47%. Por fim, comparando os grupos no tempo de 72 h foi observado que os grupos tratados com AU em 50 μ M ($0,0565 \pm 0,011$ mm³), 100 μ M ($0,0577 \pm 0,0054$ mm³) e 150 μ M ($0,0454 \pm 0,0063$ mm³), apresentaram volumes menores ($p \leq 0,05$) que o grupo controle ($0,0652 \pm 0,014$ mm³) em, respectivamente, 13,43%, 11,52% e 30,36% demonstrando, assim, que o AU interfere na taxa de crescimento dos esferoides.

A Figura 8A expõe fotomicrografias dos esferoides tumorais no controle e sob o tratamento com o AU a 50, 100 e 150 μ M em todos os períodos de análise. É possível observar que em todos os períodos os esferoides tratados com AU a 50 μ M mantiveram um comportamento semelhante ao grupo controle. No entanto, observando os

esferoides tratados com 100 μM e 150 μM do AU, percebe-se uma redução no crescimento em relação ao controle, sendo essa mais efetiva na maior concentração.

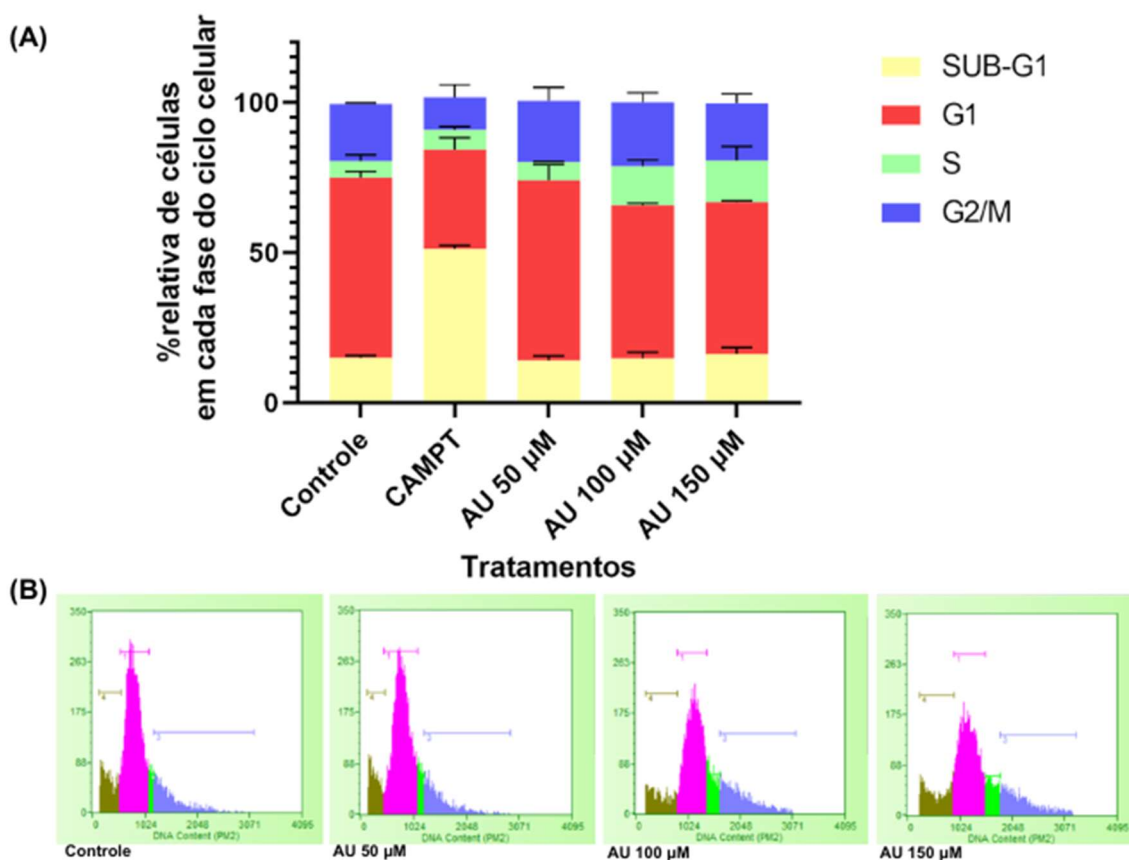
Figura 8 – Ácido ursólico (AU) atenua o crescimento dos esferoides tumorais. (A) Fotomicrografias de esferoides no tempo 0h, 24h, 48h e 72h, na escala de 400 micrometros. (B) Gráfico de análise do volume médio dos esferoides de células HepG2/C3A no tempo 0 a 72 h de tratamento com o AU. Os dados foram submetidos a análise de variância de medidas repetidas (two- way ANOVA) e foram expressos em média \pm desvio padrão, sendo estatisticamente significativos (*) os que apresentaram p-valor $\leq 0,05$. Como controle tem-se o DMSO a 0,15%.



5.3 Ácido ursólico não promove alteração de ciclo celular em esferoides HepG2/C3A

Em 24 h de tratamento, o AU nas concentrações de 50, 100 e 150 μM não alteraram o ciclo celular das células HepG2/C3A em esferoides tumorais, como mostra a Figura 9A.

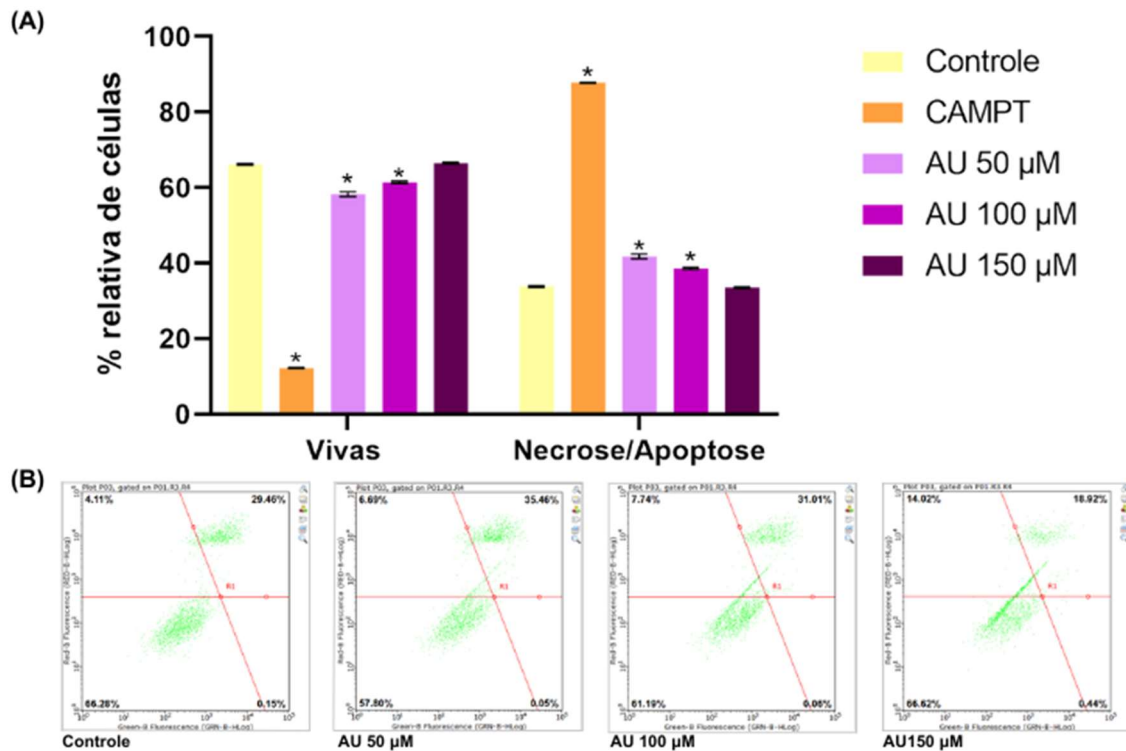
Figura 9 - Análise de ciclo celular por citometria de fluxo. (A) Gráfico percentual relativo de células em cada uma das fases do ciclo celular (SubG1, G0/G1, S, G2/M) após 24h de tratamento com o AU. Os dados foram submetidos a análise de variância (one-way ANOVA) e foram apresentados por média \pm desvio padrão, sendo estatisticamente significativos (*) os que apresentaram p-valor $\leq 0,05$. **(B)** Histogramas referente a distribuição de células HepG2/C3A obtidas a partir dos esferoides tumorais tratados.



5.4 Ácido ursólico promove uma leve indução de morte celular em esferoides de células HepG2/C3A

Através da avaliação de morte celular por citometria de fluxo, verificou-se que, após 24 h de tratamento, o AU exerceu uma baixa indução de morte celular em esferoides tumorais de células HepG2/C3A apenas nos tratamentos com 50 e 100 μM de, respectivamente, 41,74% e 38,61%, como mostra a Figura 10A.

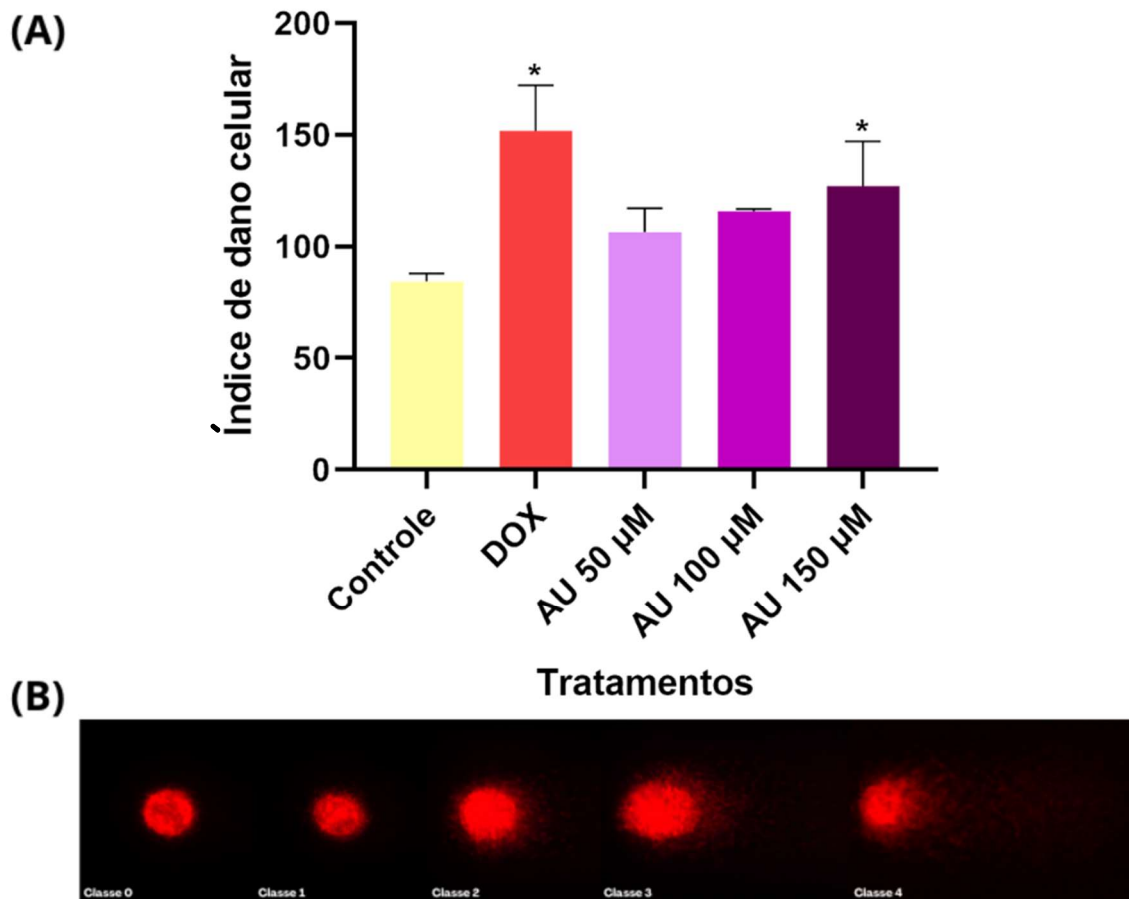
Figura 10 – Análise de morte celular por citometria de fluxo. (A) Gráfico do percentual relativo de células vivas e de morte celular após 24 h de tratamento com o AU. Os dados foram submetidos a análise de variância (one-way ANOVA) e foram apresentados por média \pm desvio padrão, sendo estatisticamente significativos (*) os que apresentaram p-valor $\leq 0,05$. **(B)** Distribuição das células HepG2/C3A obtidas a partir dos esferoides tumorais. Para o controle e o controle positivo utilizou-se, respectivamente, o DMSO a 0,15% a camptotecina 20 μM .



5.5 Ácido ursólico é genotóxico em esferoides HepG2/C3A

Através do ensaio cometa, constatou-se que o AU, após 24 h de tratamento, foi genotóxico, induzindo danos no DNA das células dos esferoides tumorais da linhagem HepG2/C3A, tendo uma diferença estatisticamente significativa na concentração de 150 μM , em relação ao controle, como mostra na Figura 11A.

Figura 11 – Análise de genotoxicidade em 24 h de tratamento com ácido ursólico em esferoides tumorais de células HepG2/C3A. (A) Gráfico de índice de dano, referente a cada um dos tratamentos do AU (50, 100 e 150 μM) e os controles, sendo o controle positivo a doxorrubicina a 2 μM . Os dados foram submetidos a análise de variância (one-way ANOVA), representados através da média aritmética e desvio padrão dos índices de dano, obtidos através de três replicatas, sendo estatisticamente significativos (*) os que apresentaram $p\text{-valor} \leq 0,05$. **(B)** Classificação dos nucleoides de acordo com o comprimento de cauda gerado pelos fragmentos de DNA. * significativo.



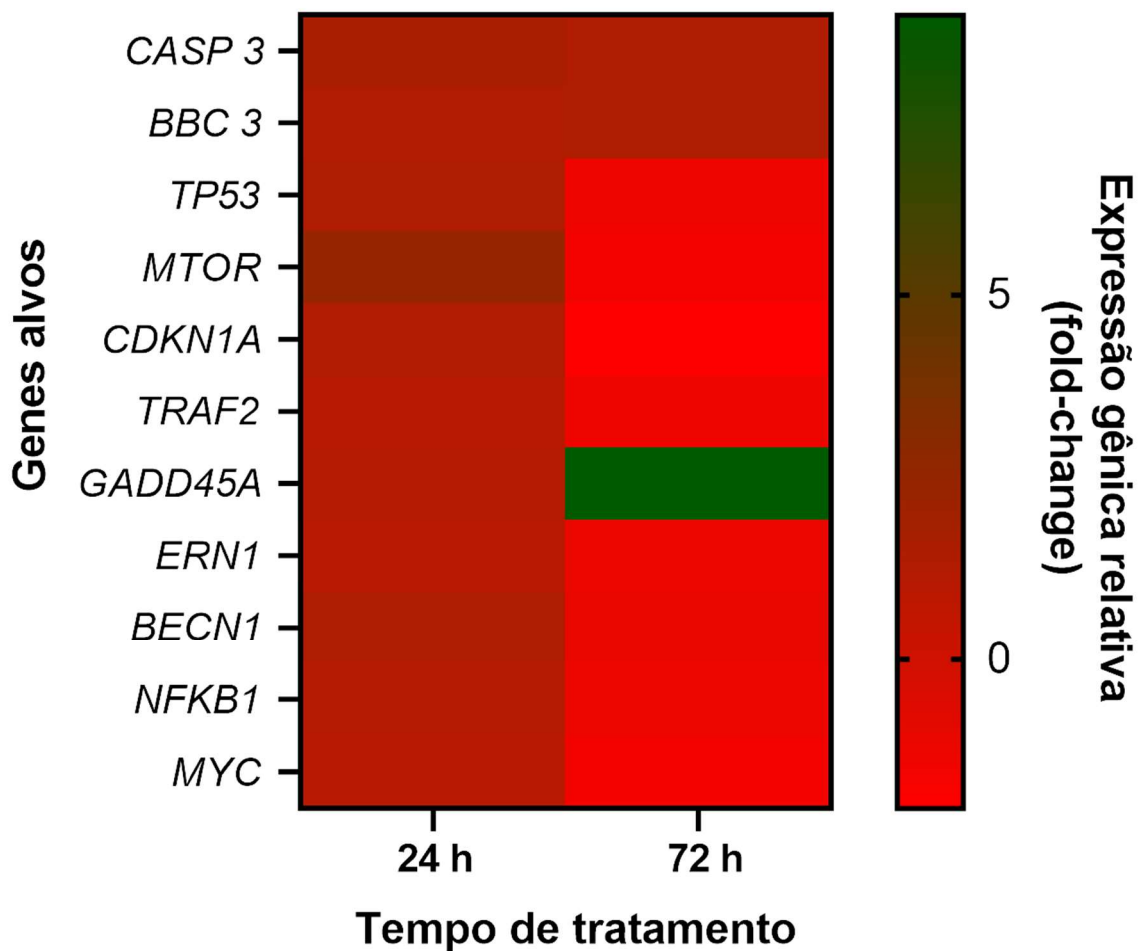
5.6 Ácido Ursólico promove alterações na expressão relativa de genes em esferoides HepG2/C3A

Após 24 h de tratamento com o AU teve-se um aumento significativo na expressão relativa do gene associado a controle de ciclo celular, o *MTOR*, de 2,38x nas células HepG2/C3A, como demonstra a Figura 12. Nesse período não houve alterações significativas na expressão relativa dos demais genes associados a apoptose (*CASP3* e *BBC3*), controle de ciclo celular (*TP53*, *CDKN1A* e *TRAF2*), estresse de retículo (*ERN1*), autofagia (*BECN1*), danos no DNA (*GADD45A*) e genes reguladores de transcrição (*NFKB1* e *MYC*).

Já após 72 h de tratamento, teve-se um aumento significativo na expressão relativa do gene associado a danos de DNA, o *GADD45A*, de 8,8x junto a uma

diminuição significativa na expressão relativa do gene associado ao controle de ciclo celular, o *CDKN1A*, de 2x, como mostra a Figura 12. Não houveram alterações significativas na expressão relativa dos demais genes associados a apoptose (*CASP3* e *BBC3*), controle de ciclo celular (*TP53*, *MTOR* e *TRAF2*), estresse de retículo (*ERN1*), autofagia (*BECN1*) e genes reguladores de transcrição (*NFKB1* e *MYC*).

Figura 12 – Ácido ursólico promove alterações na expressão relativa de genes em 24 e 72 h de tratamento. Expressão relativa dos genes após 24 h de tratamento, em que há aumento na expressão do gene *MTOR* (2,3x), e após 72 h de tratamento, em que há uma superexpressão do gene *GADD45A* (8,8x) e uma inibição do gene *CDKN1A* (2x). Os dados foram submetidos a análise *Pairwise 1 Fixed Reallocation Randomization Test.*, sendo estatisticamente significativos os que apresentaram valores de fold-change ≥ 2 e $\leq 0,5$, tendo o p-valor $\leq 0,05$.



6 DISCUSSÃO

O AU tem sido estudado devido as suas propriedades antiproliferativas, apoptóticas e antitumorais em células cancerosas (MLALA *et al.*, 2019). Durante as análises de citotoxicidade, foi observado que, em células de linhagem HepG2/C3A, o AU foi citotóxico nas concentrações de 100 μM e 150 μM , influenciando na viabilidade celular, tendo um IC50 calculado de 137,2 μM . Acredita-se que a aplicabilidade desse composto se torne limitada em razão da sua baixa solubilidade em água, o que acaba interferindo na sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, na sua ação terapêutica (HUANG *et al.*, 2016). De acordo com Yuan *et al.* (2015), em linhagem celular A549 (adenocarcinoma pulmonar), após 24 h de tratamento, o AU foi citotóxico nas concentrações de 50 μM , 75 μM e 100 μM , promovendo uma redução na viabilidade de, respectivamente, 40%, 22% e 13%, em relação ao controle. Na avaliação em 24 h na linhagem HepG2/C3A a redução foi para 82,79% em 100 μM e 39,12% em 150 μM . Essa variabilidade de resposta pode estar vinculada a diferença entre as duas linhagens celulares. As células HepG2/C3A, por serem células de metabolismo (NIWA, *et al.*, 2022), apresentam uma maior seletividade na metabolização de substâncias, tornando-as mais tolerantes, o que pode justificar essa menor sensibilidade ao AU em relação as células A549.

Já no 3D, em relação ao volume médio esferoidal, foi observado que, após 24, 48 e 72 h de tratamento, o AU atenuou significativamente o crescimento dos esferoides, quando comparado ao controle, o que demonstra a sua ação antiproliferativa. Ao avaliar o efeito da diosgenina, um fitoquímico do tipo aglicona ou sapogenina esteroidal, em esferoides tumorais de células HepG2/C3A, foi observado um aumento no volume dessas estruturas, o qual pode se relacionar à degradação celular induzida pelo tratamento (DA SILVA *et al.*, 2022), sendo uma possível demonstração do potencial promissor dos fitoquímicos na terapia do câncer. Além disso, Wozniak *et al.* (2015) relatam que o AU é capaz de promover a modulação de processos celulares nas células cancerosas, acionando vias que as direcionam para a morte celular, além de suprimir rotas que estimulem a proliferação, crescimento e a migração do câncer.

Embora tenha-se observado que, após 24 h de tratamento, o AU não promova alterações no ciclo celular das células HepG2/C3A, segundo WENG *et al.* (2014), nas células GBC-SD e SGC-996, linhagens de carcinoma de vesícula biliar, o AU promoveu parada de ciclo celular na fase S após 48 h de tratamento, tendo um

aumento na porcentagem celular da linhagem GBC-SD de 36,84% (50 μM) e 51,12% (60 μM), em relação ao controle, e de 30,52% (50 μM) e 41,63% (70 μM) da linhagem SGC-996. Essa diferença pode estar associada ao modelo 3D onde o gradiente de difusão do composto é um fator de interferência no modo de ação quando comparado ao modelo 2D, no qual as células em modo plano são incapazes de representar uma resistência terapêutica por não simularem as características de tumores sólidos semelhante ao *in vivo* (NUNES *et al.*, 2019).

MAHMOUDI *et al.* (2015), observaram através da citometria de fluxo que as células de melanoma humano, a linhagem Me4405, após 24 h de tratamento com AU a 30 μM tiveram um aumento de células positivas para anexina V de 41,7%. Já neste trabalho viu-se, após 24 h de tratamento, que apenas as concentrações de 50 μM e 100 μM induziram morte celular na linhagem HepG2/C3A de, respectivamente, 41,74% e 38,61%, contudo no controle ela foi de 33,86%. Sugere-se que a atenuação dessa morte se dá através do método de cultura escolhido, onde o 3D apresenta uma maior resistência na difusão de substâncias (NUNES *et al.*, 2019), tornando necessário a análise em tempos maiores para obtenção de efeitos significativos.

Demonstrado pelo ensaio do cometa, após 24 h de tratamento, o AU foi genotóxico para os esferoides da linhagem HepG2/C3A na concentração de 150 μM . Avaliando esse parâmetro em células HepG2 também por esse ensaio, Ramos *et al.* (2008) observaram que, sem a indução de dano por t-BHP (hidroperóxido de terc - butila), a maior concentração do AU utilizada para o tratamento dessas células (25 μM) não foi genotóxica. Em contrapartida, Lin *et al.*, (2019) notaram que, em células de linhagem Ca922 (carcinoma espinocelular da cavidade oral), quando tratadas por 2 h com AU nas concentrações de 10 μM e 15 μM , apresentaram um aumento na quebra das fitas do DNA. Através deste trabalho, o desenvolvimento de esferoides tumorais com a linhagem HepG2/C3A se mostrou funcional para a detecção de danos genotóxicos produzidos pelo AU. A escolha celular acaba sendo um ponto crucial para a determinação da genotoxicidade de um composto (KIRKLAND *et al.*, 2007). Sabendo disso, nos últimos anos teve-se a incorporação de células derivadas de hepatocarcinoma humano, como a HepG2, em ensaios de genotoxicidade de rotina *in vitro*, devido a sua conservação de atividades enzimáticas específicas na metabolização de substâncias genotóxicas (SHAH *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018; ŠTAMPAR *et al.*, 2021).

Ainda que a maioria dos estudos encontrados na literatura relatem que o AU promove a inibição das vias do gene *MTOR* (OU *et al.*, 2014; MENG *et al.*, 2015; SHEN *et al.*, 2023), avaliando a expressão relativa dos genes em 24 h de tratamento com 150 μ M do AU, observou-se um aumento significativo na expressão do gene *mTOR* (2,3x). Sabe-se que esse gene é responsável pela produção da proteína mTOR, uma serina-treonina quinase, que em interação com outras proteínas forma dois diferentes complexos proteicos mTOR 1 (mTORC1) e mTOR 2 (mTORC2) (LAPLANTE e SABATINI, 2012). O conjunto dessas proteínas está intimamente relacionado a regulação da síntese proteica e lipídios, o que influencia nos fatores de crescimento, na divisão e na sobrevivência das células (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006; T BABCOCK e A QUILLIAM, 2011; OU *et al.*, 2014). Com isso, sugere-se que o aumento na expressão relativa do gene *MTOR* em 24 h, se dá em uma tentativa das células em sobreviver a concentração do AU utilizada. No entanto, esse aumento não persiste após 72 h de tratamento com a mesma concentração do AU. Durante esse período, o processo antitumoral se acentua, como demonstrado através da análise de volume, em que se tem uma maior atenuação no crescimento dos esferoides tumorais, consolidando a importância de estudos no modelo 3D.

Em relação a expressão relativa após 72 h de tratamento, obteve-se um aumento significativo na expressão do gene *GADD45A* (8,8x) e uma inibição significativa do gene *CDKN1A* (2x). Este último é responsável por codificar a proteína p21, uma peça importante para a progressão do ciclo celular entre as fases G1 e S. De acordo com Gao *et al.* (2019), o *GADD45A* é classificado como um supressor tumoral. Salvador *et al.* (2013) abordam que o *GADD45A* interage com a proteína p21, expressa pelo gene *CDKN1A*, mas a forma dessa interação ainda é uma incógnita. Além disso, eles também demonstram que em queratinócitos o *GADD45A* parece promover uma regulação negativa na expressão do gene *CDKN1A*.

Embora tenha-se observado, através do ensaio cometa, que o AU foi genotóxico as células HepG2/C3A após 24 h de tratamento, durante a expressão relativa de mRNA nesse mesmo período, não se obteve um aumento significativo na expressão do gene *GADD45A*, mas sim no gene *MTOR*. Essa diferença pode se relacionar a percepção e resposta das células ao dano no DNA em que, considerando uma tentativa de sobrevivência, estas acumulando dano. Assim, em 72 h de tratamento, sob um efeito antitumoral, tem-se a necessidade dessas células em

reparar o dano acumulado, resultando em um aumento expressivo do gene *GADD45A*. Associado a isso, propõe-se também que tanto a inibição do *CDKN1A*, quanto a atenuação significativa do volume dos esferoides, estão intimamente relacionadas a essa alta expressão e a genotoxicidade desse fitoquímico.

7 CONCLUSÃO

Considerando o que foi exposto, pode-se concluir que o trabalho promoveu uma nova perspectiva sobre os mecanismos de ação do ácido ursólico em relação à sua atividade antiproliferativa em esferoides tumorais de células HepG2/C3A. Demonstra-se que, perante as condições experimentais, o ácido ursólico é citotóxico, atenua o crescimento dos esferoides tumorais e ocasiona morte celular, ainda que não promova a parada de ciclo durante as fases da divisão. O ácido ursólico também se mostrou genotóxico e alterou a expressão de mRNA dos genes *CDKN1A*, *MTOR* e *GADD45A* envolvidos, respectivamente, em controle de ciclo celular e danos no DNA. Por fim, indica-se que o ácido ursólico seja uma molécula promissora de atuações terapêuticas em humanos, mas questões como a sua baixa solubilidade em água, limita a sua biodisponibilidade no organismo. Assim, como experimentações futuras, sugere-se, além da elaboração dos seus derivados, como já presentes na literatura, o seu encapsulamento, tendo em vista que isso poderá potencializar a sua atuação e, possivelmente, em baixas concentrações.

REFERÊNCIAS

- BAUER, Magdalena et al. Novel 3D-Printed Cell Culture Inserts for Air–Liquid Interface Cell Culture. **Life**, v. 12, n. 8, p. 1216, 2022.
- BRESLIN, Susan; O'DRISCOLL, Lorraine. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 18, n. 5-6, p. 240-249, 2013.
- CHEN, Haijun et al. Evolution in medicinal chemistry of ursolic acid derivatives as anticancer agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 92, p. 648-655, 2015.
- COLLINS, Andrew R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.
- COSTA, Elisabete C. et al. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. **Biotechnology advances**, v. 34, n. 8, p. 1427-1441, 2016.
- CROWLEY, Lisa C. et al. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 11, p. pdb. prot087288, 2016.
- CZELUSNIAK, K. E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando Mikania glomerata Sprengel e Mikania laevigata Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 400-409, 2012.
- DA SILVA, Matheus Felipe et al. Diosgenin increases BBC3 expression in HepG2/C3A cells and alters cell communication in a 3D spheroid model. **Mutation Research/genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 879, p. 503512, 2022.
- EDMONDSON, Rasheena et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and drug development technologies**, v. 12, n. 4, p. 207-218, 2014.
- FERREIRA, Isabel CFR; ABREU, Rui. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, p. 32-39, 2007.
- FRIEDRICH, Juergen et al. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature protocols**, v. 4, n. 3, p. 309-324, 2009.
- GAO, Ming et al. Diverse roles of GADD45 α in stress signaling. **Current Protein and Peptide Science**, v. 10, n. 4, p. 388-394, 2009.
- GARÓFOLO, Adriana et al. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 491-505, 2004.

GASKELL, Harriet et al. Characterization of a functional C3A liver spheroid model. **Toxicology research**, v. 5, n. 4, p. 1053-1065, 2016.

GILBERTSON, Richard J. Mapping cancer origins. **Cell**, v. 145, n. 1, p. 25-29, 2011.
GRAHAM, Trevor A.; SOTTORIVA, Andrea. Measuring cancer evolution from the genome. **The Journal of pathology**, v. 241, n. 2, p. 183-191, 2017.

HAYDEN, Patrick J.; HARBELL, John W. Special review series on 3D organotypic culture models: Introduction and historical perspective. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 57, n. 2, p. 95-103, 2021.

HUANG, Qiuxia et al. Anti-hepatocellular carcinoma activity and mechanism of chemopreventive compounds: ursolic acid derivatives. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 12, p. 3189-3196, 2016.

IQBAL, Javed et al. Ursolic acid a promising candidate in the therapeutics of breast cancer: Current status and future implications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 752-756, 2018.

JAEGER, Rolf; CUNY, Eckehard. Terpenoids with special pharmacological significance: A review. **Natural product communications**, v. 11, n. 9, p. 1934578X1601100946, 2016.

JÄGER, Sebastian et al. Pentacyclic triterpene distribution in various plants—rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2016-2031, 2009.

JAIN, Aayush; MADU, Chikezie O.; LU, Yi. Phytochemicals in Chemoprevention: A Cost-Effective Complementary Approach. **Journal of Cancer**, v. 12, n. 12, p. 3686, 2021.

JC FURTADO, Niege A. et al. Pentacyclic triterpene bioavailability: An overview of in vitro and in vivo studies. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 400, 2017.

KHWAZA, Vuyolwethu; OYEDEJI, Opeoluwa O.; ADERIBIGBE, Blessing A. Ursolic acid-based derivatives as potential anti-cancer agents: An update. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 16, p. 5920, 2020.

KIRKLAND, David et al. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 628, n. 1, p. 31-55, 2007.

KNIGHT, Eleanor; PRZYBORSKI, Stefan. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. **Journal of anatomy**, v. 227, n. 6, p. 746-756, 2015.

KUMAR, Bhupinder et al. Promising targets in anti-cancer drug development: recent updates. **Current medicinal chemistry**, v. 24, n. 42, p. 4729-4752, 2017.

KUMAR, Ashwani et al. Major phytochemicals: Recent advances in health benefits and extraction method. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 887, 2023.

LAPLANTE, Mathieu; SABATINI, David M. mTOR signaling in growth control and disease. **cell**, v. 149, n. 2, p. 274-293, 2012.

LIN, Cheng-Wen et al. Ursolic acid induces apoptosis and autophagy in oral cancer cells. **Environmental toxicology**, v. 34, n. 9, p. 983-991, 2019.

LÓPEZ-HORTAS, Lucía et al. Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A review. **Food Research International**, v. 103, p. 130-149, 2018.

MARTEL, Jan et al. Hormetic effects of phytochemicals on health and longevity. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 30, n. 6, p. 335-346, 2019.

MAHMOUDI, Mahmoud et al. Ursolic acid induced apoptotic cell death following activation of caspases in isolated human melanoma cells. **Cell biology international**, v. 39, n. 2, p. 230-236, 2015.

MENG, Yan et al. Ursolic acid induces apoptosis of prostate cancer cells via the PI3K/Akt/mTOR pathway. **The American journal of Chinese medicine**, v. 43, n. 07, p. 1471-1486, 2015.

MEHTA, Geeta et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. **Journal of controlled release**, v. 164, n. 2, p. 192-204, 2012.

MINCHINTON, Andrew I.; TANNOCK, Ian F. Drug penetration in solid tumours. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 8, p. 583-592, 2006.

MLALA, Sithenkosi et al. Ursolic acid and its derivatives as bioactive agents. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2751, 2019.

MOSSOBA, Miriam E. et al. Diglycolic acid induces HepG2/C3A liver cell toxicity in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 52, p. 87-93, 2018.

NIWA, Andressa Megumi et al. Salinomycin induces cell cycle arrest and apoptosis and modulates hepatic cytochrome P450 mRNA expression in HepG2/C3a cells. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 32, n. 5, p. 341-351, 2022.

NUNES, Ana S. et al. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. **Biotechnology and bioengineering**, v. 116, n. 1, p. 206-226, 2019.

ORELLANA, Myriam; GUAJARDO, Viviana. Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases. **Revista médica de Chile**, v. 132, n. 1, p. 85-94, 2004.

OU, Xiang et al. Ursolic acid inhibits leucine-stimulated mTORC1 signaling by

suppressing mTOR localization to lysosome. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95393, 2014.

PFAFFL, Michael W.; HORGAN, Graham W.; DEMPFLER, Leo. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36-e36, 2002.

PICCININI, Filippo. AnaSP: a software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids. *Computer methods and programs in **biomedicine***, v. 119, n. 1, p. 43-52, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2015.02.006>

PICCININI, Filippo et al. Cancer multicellular spheroids: volume assessment from a single 2D projection. *Computer methods and programs in **biomedicine***, v. 118, n. 2, p. 95-106, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2014.12.003>

QUAIL, Daniela F.; JOYCE, Johanna A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423-1437, 2013.

RANJAN, Alok et al. Role of phytochemicals in cancer prevention. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 20, p. 4981, 2019.

RAMOS, Alice A. et al. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. **Toxicology Letters**, v. 177, n. 1, p. 66-73, 2008.

RATHAUR, Pooja; SR, Kaid J. Metabolism and pharmacokinetics of phytochemicals in the human body. **Current drug metabolism**, v. 20, n. 14, p. 1085-1102, 2019.

SALVADOR, Jorge AR et al. Oleanane-, ursane-, and quinone methide friedelane-type triterpenoid derivatives: Recent advances in cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 95-130, 2017.

SECOMB, T. W. et al. Analysis of oxygen transport to tumor tissue by microvascular networks. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 25, n. 3, p. 481-489, 1993.

SEO, Dae Yun et al. Ursolic acid in health and disease. **The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, v. 22, n. 3, p. 235, 2018.

SHAH, Ume-Kulsoom et al. A three-dimensional in vitro HepG2 cells liver spheroid model for genotoxicity studies. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 825, p. 51-58, 2018.

SHEN, Honglin et al. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture and future development. **Micromachines**, v. 12, n. 1, p. 96, 2021.

SHEN, Jingjing et al. Ursolic acid promotes autophagy by inhibiting akt/mTOR and TNF- α /TNFR1 signaling pathways to alleviate pyroptosis and necroptosis in mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. **Inflammation**, v. 46, n. 5, p.

1749-1763, 2023.

ŠTAMPAR, Martina et al. Hepatocellular carcinoma (HepG2/C3A) cell-based 3D model for genotoxicity testing of chemicals. **Science of the Total Environment**, v. 755, p. 143255, 2021.

T BABCOCK, Justin; A QUILLIAM, Lawrence. Rheb/mTOR activation and regulation in cancer: novel treatment strategies beyond rapamycin. **Current drug targets**, v. 12, n. 8, p. 1223-1231, 2011.

TORRE, Lindsey A. et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 25, n. 1, p. 16-27, 2016.

TRÉDAN, Olivier et al. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 19, p. 1441-1454, 2007.

WARBURG, Otto; WIND, Franz; NEGELEIN, Erwin. The metabolism of tumors in the body. **The Journal of general physiology**, v. 8, n. 6, p. 519, 1927.

WENG, Hao et al. Ursolic acid induces cell cycle arrest and apoptosis of gallbladder carcinoma cells. **Cancer cell international**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2014.

WOJTKOWIAK, Jonathan W. et al. Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. **Molecular pharmaceuticals**, v. 8, n. 6, p. 2032-2038, 2011.

WOŹNIAK, Łukasz; SKĄPSKA, Sylwia; MARSZAŁEK, Krystian. Ursolic acid—a pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 20614-20641, 2015.

WULLSCHLEGER, Stephan; LOEWITH, Robbie; HALL, Michael N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471-484, 2006.

YANG, Lu et al. Ursolic acid induces doxorubicin-resistant HepG2 cell death via the release of apoptosis-inducing factor. **Cancer Letters**, v. 298, n. 1, p. 128-138, 2010.

YANG, Yan et al. Controllable synthesis of ultrathin Co₉S₈ nanosheets as a highly efficient electrocatalyst for overall water splitting. **Electrochimica Acta**, v. 281, p. 198-207, 2018.

YIN, Wen et al. Cancer and stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 246, n. 16, p. 1791-1801, 2021.

YUHAS, John M. et al. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. **Cancer research**, v. 37, n. 10, p. 3639-3643, 1977.

YUAN, Yuan et al. Ursolic acid and oleanolic acid from *Eriobotrya fragrans* inhibited the viability of A549 cells. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 2, p. 1934578X1501000205, 2015.

ZANONI, Michele et al. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. **Journal of hematology & oncology**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2020.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela 1 – Citotoxicidade (%) – 24 h de tratamento com ácido ursólico em células HepG2/C3A. (monocamada).

Tratamentos	Média (%) ± DP
Controle (DMSO 0,15%)	100 ± 0
Ácido Ursólico 6,25 µM	101,7 ± 2,140
Ácido Ursólico 12,5 µM	101,9 ± 2,825
Ácido Ursólico 25 µM	99,85 ± 2,643
Ácido Ursólico 50 µM	101,1 ± 1,851*
Ácido Ursólico 100 µM	82,79 ± 3,688*
Ácido Ursólico 150 µM	39,12 ± 1,261*
DOX 2 µM	30,44 ± 6,247*

APÊNDICE B

Tabela 2 – Volume médio (mm³) – esferoides tratados com 50 µM, 100 µM e 150 µM de ácido ursólico.

Tratamentos	Volume Médio (mm ³) ± D.P.			
	0h	24h	48h	72h
Controle (DMSO 0,15%)	0,03713 ±	0,04660 ±	0,05538 ±	0,06527 ±
	0,003702	0,01099	0,01262	0,01370
Ácido Ursólico 50 µM	0,03680 ±	0,04197 ±	0,04937 ±	0,05650 ±
	0,007014	0,007326	0,008856	0,01073
Ácido Ursólico 100 µM	0,03752 ±	0,04162 ±	0,04710 ±	0,05775 ±
	0,006778	0,006380	0,004244	0,005422
Ácido Ursólico 150 µM	0,03203 ±	0,03722 ±	0,04072 ±	0,04545 ±
	0,002772	0,004002	0,004180	0,006380

APÊNDICE C

Tabela 3 – Ciclo Celular: Média Percentual Relativa de células HepG2/C3A, provenientes a partir da dissociação de esferoides tumorais, em fases do ciclo celular, após 24 h de tratamento com 50 µM, 100 µM e 150 µM de ácido ursólico por citometria de fluxo.

Tratamentos	Avaliação de Ciclo Celular - Citometria de Fluxo			
	Células (%) ± D. P.			
	Sub-G1	G1	S	G2/M
Controle	14,90 ± 0,8485	60,05 ± 2,051	5,500 ± 2,121	19,15 ± 0,2121
Ácido Ursólico 50 µM	14,10 ± 1,556	59,90 ± 5,233	6,150 ± 0,0707	20,50 ± 4,384
Ácido Ursólico 100 µM	14,75 ± 2,051	51,00 ± 0,7071	13,05 ± 2,051	21,30 ± 3,111
Ácido Ursólico 150 µM	16,25 ± 2,192	50,60 ± 0,4243	13,80 ± 4,667	19,10 ± 3,111
Camptotecina 20 µM	51,30 ± 1,131	33,00 ± 3,960	6,550 ± 1,061	10,90 ± 4,243

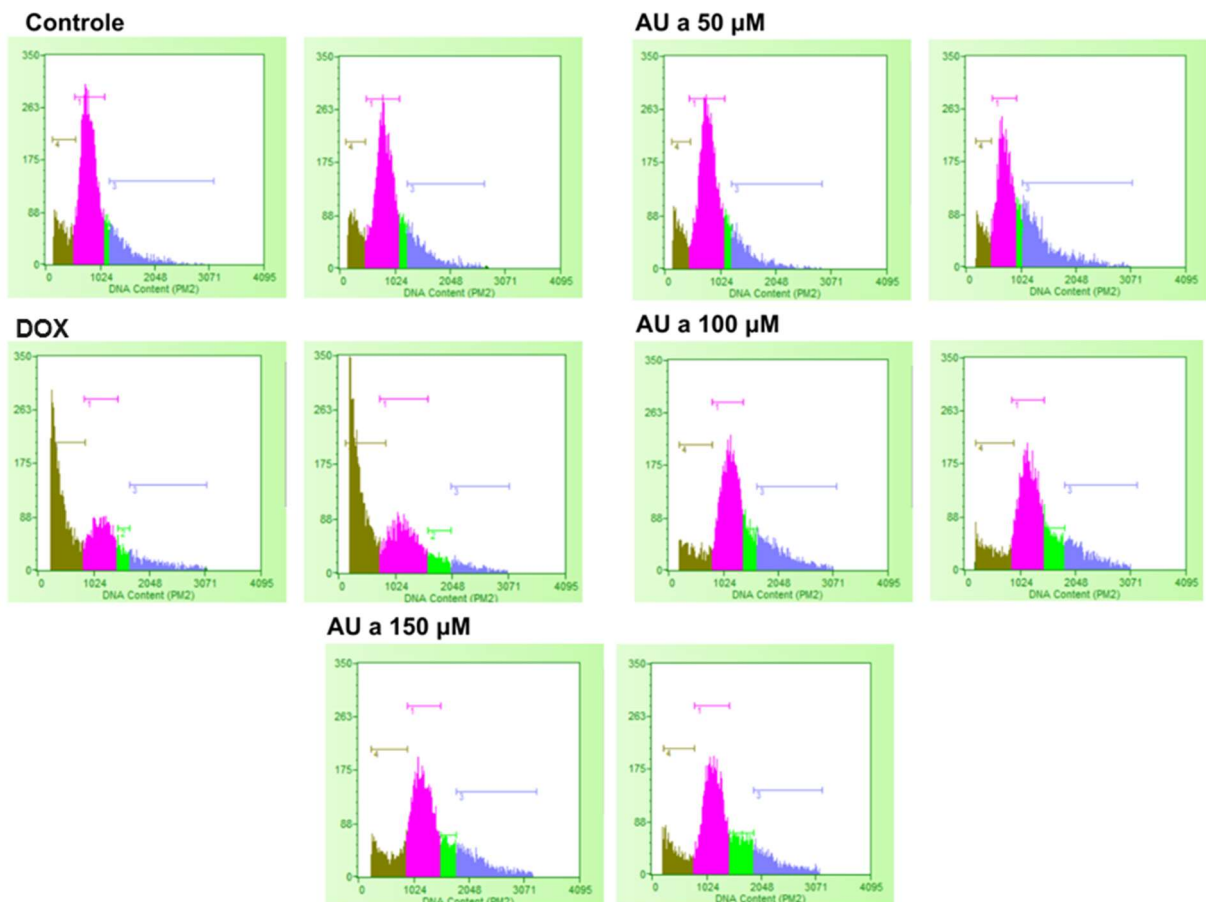
APÊNDICE D

Tabela 4 – Morte Celular: Média Percentual Relativa de células HepG2/C3A, provenientes a partir da dissociação de esferoides tumorais, vivas e mortas por necrose e apoptose após 24 h de tratamento com 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M de ácido ursólico por citometria de fluxo.

Avaliação de Morte Celular - Citometria de Fluxo		
Tratamentos	Células (%) \pm D. P.	
	Vivas	Necrose/Apoptose
Controle	65,99 \pm 0,2687	34,01 \pm 0,2616
Ácido Ursólico 50 μ M	58,08 \pm 0,6859	41,93 \pm 0,6859
Ácido Ursólico 100 μ M	60,91 \pm 0,0000	39,05 \pm 0,04243
Ácido Ursólico 150 μ M	65,89 \pm 0,5940	34,10 \pm 0,5940
Camptotecina 20 μ M	11,74 \pm 0,1556	88,26 \pm 0,1485

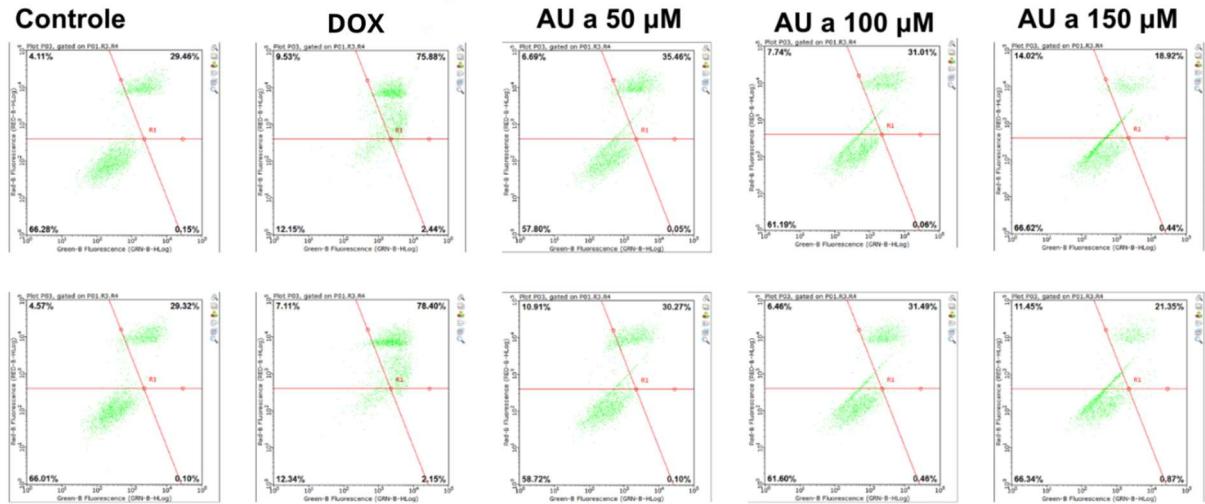
APÊNDICE E

Figura 13 – Ciclo Celular: Histogramas da distribuição de células HepG2/C3A, provenientes de esferoides tumorais, em fases do ciclo celular após 24 h de tratamento com com 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M de ácido ursólico por citometria de fluxo.



APÊNDICE F

Figura 14 – Morte Celular: Distribuição Celular distribuição de células HepG2/C3A, provenientes de esferoides tumorais, coradas com Anexina V e PI após 24 h de tratamento com com 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M de ácido ursólico por citometria de fluxo.



APÊNDICE G

Tabela 5 - Tabela referente aos valores de score, número de cometas e nucleoides de células HepG2/C3A após 24 h de tratamento com AU. Valores representados por (média \pm DP).

Tratamentos	Classes (média)					SCORE
	0	1	2	3	4	
Controle	24.66 \pm 4.04	66.33 \pm 9.07	9.00 \pm 5.57	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	84.33 \pm 3.51
DOX	2.66 \pm 2.31	64.66 \pm 10.07	18.33 \pm 5.13	7.00 \pm 1.00	7.33 \pm 4.62	151.7 \pm 20.65*
AU 50 μM	6.66 \pm 6.03	83.66 \pm 4.62	6.33 \pm 1.53	3.33 \pm 2.08	0.00 \pm 0.00	106.3 \pm 10.69
AU 100 μM	3.66 \pm 2.08	82.00 \pm 4.58	9.33 \pm 3.21	5.00 \pm 1.00	0.00 \pm 0.00	115.7 \pm 1.15
AU 150 μM	6.00 \pm 3.46	74.00 \pm 5.29	10.00 \pm 2.65	7.00 \pm 3.46	3.00 \pm 3.61	127 \pm 20.00*

APÊNDICE H

Tabela 6 – Dados da Expressão Gênica Relativa em 24 h de tratamento com 150 µM de AU obtidos através do Software REST 2009.

Gene	Fold - Change
<i>BBC3</i>	1,25
<i>GADD45A</i>	1,15
<i>CDKN1A</i>	1,23
<i>NFKB1</i>	1,15
<i>MYC</i>	1,01
<i>TP53</i>	1,30
<i>TRAF2</i>	1,10
<i>CASP3</i>	1,58
<i>ERN1</i>	0,91
<i>MTOR</i>	2,38*
<i>BECN1</i>	1,33

APÊNDICE I

Tabela 7 – Dados da Expressão Gênica Relativa em 72h de tratamento com 150 µM de AU obtidos através do Software REST 2009.

Gene	Fold - Change
<i>BBC3</i>	1,40
<i>GADD45A</i>	8,83*
<i>CDKN1A</i>	-2,04*
<i>NFKB1</i>	-1,34
<i>MYC</i>	-1,56
<i>TP53</i>	-1,46
<i>TRAF2</i>	-1,38
<i>CASP3</i>	1,30
<i>ERN1</i>	-1,23
<i>MTOR</i>	-1,58
<i>BECN1</i>	-1,13

APÊNDICE J

Tabela 8 – Primers para a realização da RT-qPCR.

Gene	Foward	Reverse
<i>BBC3</i>	5' GTAAGATACTGTATATGCGCTG 3'	5' TTTTCCACTGTTCCAATCTG 3'
<i>CASP3</i>	5' AAAGCACAACCTGGAATGACATC 3'	5' CGCATCAATTCCACAATTTTC 3'
<i>ERN1</i>	5' ACGGACGTCAAGTTTGATCC 3'	5' TTGGTAGACGCAGACAGTGG 3'
<i>GADD45A</i>	5' TCAGCGCACGATCACTGTC 3'	5' CCAGCAGGCACAACACCAC 3'
<i>CDKN1A</i>	5' CAGCATGACAGATTCTACC 3'	5' CAGGGTATGTACATGAGGAC 3'
<i>MTOR</i>	5' GGAGGAGAAATTTGATCAGG 3'	5' GGGCAACAAATTAAGGATTG 3'
<i>NFKB</i>	5' GCAGCTCTTCTCAAAGCAGCA 3'	5' GCTCAAAGTTCTCCACCAGGG 3'
<i>TRAF2</i>	5' GCCCAAGTTCCCCTTAAC 3'	5' GAATCTGCAAGGGACTCGAC 3'
<i>CMYC</i>	5' TGAGGAACAAGAAGATG 3'	5' ATCCAGACTCTGACCTTTTG 3'
<i>TP53</i>	5' ACCTATGGAACTACTTCCTG 3'	5' ACCATTGTTCAATATCGTCC 3'
<i>BECN1</i>	5' CAGTATCAGAGAATACAGTG 3'	5' TGGAAGGTTGCATTAAGAC 3'
<i>GAPDH</i>	5' GAAGGTGAAGGTCCGAGTC 3'	5' GGAAGATGGTGATGGGATTT 3'
<i>ACTB</i>	5' GACCGACATGGAGAAAATCTG 3'	5' ATGATCTGGGTCATCTTCTC 3'