



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA**



JÚLIA MARTINS

**EFEITOS BIOLÓGICOS DO TRITERPENO LUPEOL EM LINHAGENS
TUMORAIS DE BEXIGA**

OURO PRETO

2025

JÚLIA MARTINS

**EFEITOS BIOLÓGICOS DO TRITERPENO LUPEOL EM LINHAGENS
TUMORAIS DE BEXIGA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em
Farmácia pela Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Glenda Nicioli da Silva

OURO PRETO

2025



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMÁCIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Júlia Martins

Efeitos biológicos do triterpeno lupeol em linhagens tumorais de bexiga

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de farmacêutico generalista

Aprovada em 30 de setembro de 2025

Membros da banca

[PhD] - Glenda Nicioli da Silva - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)

[PhD] - Luiz Fernando de Medeiros Teixeira - (Universidade Federal de Ouro Preto)

[PhD] - Renata Tupinambá Branquinho - (Universidade Federal de Ouro Preto)

[Glenda Nicioli da Silva], orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 30/09/2025



Documento assinado eletronicamente por **Glenda Nicioli da Silva, VICE-DIRETOR(A) DA ESCOLA DE FARMÁCIA**, em 30/09/2025, às 09:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0986577** e o código CRC **F127D92B**.

AGRADECIMENTOS ACADÊMICOS

Agradeço à Universidade Federal de Ouro Preto pela excelência do ensino público e gratuito. À Pró-reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Inovação, pelo apoio fundamental por meio da bolsa de iniciação científica. Minha gratidão à Escola de Farmácia, seus professores, técnicos e colaboradores pelo acolhimento, ensino e suporte durante toda a graduação. Um agradecimento especial ao André e ao Raphael, cujo bom humor e conversas diárias foram um verdadeiro alívio nos dias mais difíceis. E ao Acácio, técnico incansável, sempre 100% disposto a ajudar a mim e a todos os alunos com paciência e dedicação. Vocês tornaram essa jornada muito mais leve e humana.

Aos órgãos de fomento FAPEMIG, CAPES e CNPq, pelo financiamento que tornou esta pesquisa possível. À professora Glenda Nicioli da Silva, só tenho a agradecer pela orientação dedicada, pelo conhecimento compartilhado e pelo incentivo como pesquisadora.

Ao Laboratório de Pesquisas Clínicas da UFOP, pelo espaço e aprendizados que permitiram o desenvolvimento deste trabalho, por ter sido o primeiro ambiente de pesquisa onde pude consolidar meu interesse e adquirir conhecimentos fundamentais para a minha formação. Ao Grupo de Estudos e Pesquisas Toxicogenéticas, Epidemiológicas e Clínicas (G-TEC), pelo valioso conhecimento compartilhado.

Por fim, meu especial agradecimento a Isadora Oliveira Ansaloni Pereira, Kamila de Fátima Anunciação, Lidia Walter de Paula e Silva e Tamiles Caroline Fernandes Pedrosa, pela parceria, troca de conhecimentos e apoio constante no laboratório.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Agradeço primeiramente a Deus, sustento constante em minha caminhada acadêmica e pessoal. Aos meus pais, Mírian e Hélio, por tanto amor e apoio incondicional que transformou este sonho em realidade. A presença de vocês em cada desafio e conquista foi meu alicerce. À minha irmã Alice, companheira de todas as horas, sempre me motivando, trazendo conforto e força.

À família Dutra, pelo acolhimento que amenizou a distância.

Minha gratidão às irmãs de coração, Maria Eduarda e Thamires, laços que o tempo e a distância não enfraqueceram. Ao Luan, por todo apoio e companheirismo, ter você ao meu lado tornou o caminho mais leve. Aos meus amigos Hugo, Iolanda, Manuela, Maria Júlia, Raiane, Sabrina, João Lucas, Aline, Rickson, Tatiane, Amanda, Gustavo, Laura, Maria Laura, Eduardo e Ana Luíza (Egy), minha família ouropretana, que tornaram os dias mais divertidos.

Agradeço também à Liga Acadêmica de Farmácia Industrial e Tecnologia – LAFITec ao Centro Acadêmico Livre de Farmácia - José Badini - CALF-JB e todos os seus membros, que me viram crescer e onde pude deixar parte de meu coração em Ouro Preto e na gloriosa Escola de Farmácia.

RESUMO

O potencial antineoplásico e quimioterapêutico dos fitoquímicos, associados à sua menor toxicidade, menor custo e diversidade química, resultando em ações em diferentes alvos moleculares, têm sido estudados extensivamente nos últimos anos. O câncer de bexiga é o décimo câncer mais comum no mundo, e os tumores com característica músculo-invasiva se associam a um pior prognóstico e maior probabilidade de evolução para doença metastática. A expressiva toxicidade da quimioterapia padrão e a recidiva tumoral para esses casos se mostram como importantes entraves à seu tratamento. Assim, se faz relevante a busca por novas estratégias para o tratamento dos tumores de bexiga. O lupeol, um triterpeno sintetizado naturalmente em várias plantas, dentre elas, frutas, ervas e folhosas presentes na alimentação humana, diminui a proliferação tumoral através de parada no ciclo celular, induz a apoptose e reduz a migração celular e invasividade em tumores pulmonares, hepatocelulares, colorretais, entre outros. Desse modo, esse estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do lupeol em células de tumor de bexiga por meio de ensaios de citotoxicidade, morfologia celular, migração celular, sobrevivência clonogênica e análise *in silico*. Neste estudo foram utilizadas as linhagens celulares de tumor de bexiga de alto grau J82 e UM-UC-3, assim como a linhagem de fibroblastos pulmonares MRC5, para avaliação do índice de seletividade tumoral do composto avaliado. O tratamento resultou em seletividade para as células tumorais, além de redução da viabilidade celular, da capacidade de formação de colônias, da migração celular e da ocorrência de alterações morfológicas sugestivas de morte celular nas linhagens testadas. Portanto, conclui-se que o lupeol causou efeitos antiproliferativos nas linhagens celulares de câncer de bexiga de alto grau, sendo um promissor agente para tratamento tumoral. Novos estudos são necessários para explorar sua possível aplicação terapêutica.

Palavras-chave: lupeol, câncer de bexiga, ação antitumoral, agentes antineoplásicos, composto natural, terpeno.

ABSTRACT

The antineoplastic and chemoprotective potential of phytochemicals, combined with their lower toxicity, reduced cost, and chemical diversity, resulting in actions on different molecular targets, has been extensively studied in recent years. Bladder cancer is the tenth most common cancer worldwide, and muscle-invasive tumors are associated with a worse prognosis and a higher likelihood of progression to metastatic disease. The significant toxicity of standard chemotherapy and tumor recurrence in such cases represent major challenges in treatment. Therefore, the search for new strategies for treating bladder tumors is of great importance. Lupeol, a triterpene naturally synthesized in various plants, including fruits, herbs, and vegetables commonly found in the human diet, has been shown to reduce tumor proliferation through cell cycle arrest, induce apoptosis, and decrease cell migration and invasiveness in lung, hepatocellular, colorectal, and other cancers. Thus, this study aimed to evaluate the effects of the lupeol on bladder tumor cells, by means of cytotoxicity assays, cell morphology, cell migration, clonogenic survival and *in silico* analysis. High-grade bladder tumor cell lines J82 and UM-UC-3 were used, as well as the MRC5 lung fibroblast cell line, to assess the tumor selectivity index of the compound. Treatment showed selectivity for tumor cells, along with a reduction in cell viability, colony-forming ability, cell migration, and the presence of morphological changes suggestive of cell death in the tested cell lines. In conclusion, lupeol exhibited antiproliferative effects on high-grade bladder cancer cell lines, making it a promising agent for cancer treatment. Further studies are needed to explore its potential therapeutic application.

Keywords: lupeol, bladder cancer, antitumor action, antineoplastic agents, natural compound, terpene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bexiga	11
Figura 2 - Estrutura química do composto Lupeol	14
Figura 3 - <i>Dolychandra unguis-cati</i> em flor no jardim botânico Villa Durazzo-Pallavicini, Gênova.....	17
Figura 4 - Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular J82.....	23
Figura 5 - Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular UM-UC-3.....	24
Figura 6 - Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular MRC5	24
Figura 7 - Porcentagem de formação de colônias referente à linhagem J82	25
Figura 8 - Porcentagem de formação de colônias referente à linhagem UM-UC-3	26
Figura 9 – Fotomicrografias do ensaio de cicatrização de feridas linhagem J82	27
Figura 10 – Fotomicrografias do ensaio de cicatrização de feridas linhagem UM-UC-3.....	28
Figura 11 - Fotomicrografias da linhagem J82.....	29
Figura 12 - Fotomicrografias da linhagem UM-UC-3.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise <i>in silico</i> do potencial efeito antitumoral e mecanismos de ação do lupeol utilizando o programa PASS online.	22
--	----

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
1.1	JUSTIFICATIVA.....	15
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	METODOLOGIA	17
3.1	EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO LUPEOL	17
3.2	REAGENTES	17
3.3	LINHAGENS CELULARES	18
3.4	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	18
3.5	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	19
3.6	ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA CLONOGÊNICA.....	20
3.7	ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	20
3.8	MORFOLOGIA CELULAR.....	21
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4	RESULTADOS.....	22
4.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	22
4.2	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	22
4.3	ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA CLONOGÊNICA.....	25
4.4	ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	26
4.5	MORFOLOGIA CELULAR.....	28
5	DISCUSSÃO.....	31
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS.....	36

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O câncer compreende um conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação descontrolada de células anormais, com potencial para invasão tecidual e disseminação metastática, sendo uma das principais causas de morte prematura, abaixo dos 70 anos, em grande parte dos países do mundo (OMS, 2022). O avanço dessa taxa representa uma importante barreira ao aumento da expectativa de vida nos países, e reflete fatores como o envelhecimento da população, aumento de sua exposição a fatores de risco e índices socioeconômicos de cada região. Dados do *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) estimaram a incidência de 19,3 milhões de casos e 10 milhões de mortes por câncer em 2020 (Sung *et al.*, 2021). No Brasil, estima-se a ocorrência de 704 mil novos casos de câncer para o triênio de 2023 a 2025, sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente (220 mil novos casos), seguido por cânceres de mama (74 mil), próstata (72 mil), cólon e reto (46 mil), pulmão (32 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2022).

O câncer de bexiga é o 10º tipo de câncer mais frequente no mundo, com aproximadamente 573 mil novos casos e 213 mil novas mortes no ano de 2020. Sua prevalência é 4 vezes maior em homens que em mulheres, representando o 6º câncer mais frequente e a 9ª causa de morte por câncer em homens (Sung *et al.*, 2021). No Brasil, estimam-se 11.370 novos casos (5,25 casos a cada 100 mil habitantes) no triênio de 2023 a 2025 (INCA, 2022). E o seu desenvolvimento está intimamente ligado a fatores ambientais, como tabagismo, exposição ocupacional a aminas aromáticas, exposição a arsênio presente na água, infecção por *Schistosoma haematobium*, entre outros.

O tabagismo é o principal fator de risco evitável para o câncer de bexiga, responsável por, em média, 50% dos casos em homens e 30% em mulheres (Burger *et al.*, 2013; Cumberbatch *et al.*, 2016). Fumantes ativos têm 3,47 vezes mais risco de desenvolver a doença em comparação com não fumantes, enquanto ex-fumantes apresentam risco 2,04 vezes maior, demonstrando que parar de fumar reduz, mas não elimina completamente o perigo (Cumberbatch *et al.*, 2016). A fumaça do tabaco contém substâncias como aminas aromáticas que ao serem metabolizadas no fígado e excretadas na urina, danificam o DNA das células uroteliais (Letasiová *et al.*, 2012), podendo formar adutos, complexos de DNA-carcinógeno, induzindo um erro na replicação do DNA (Stenzl *et al.*, 2017). A exposição a aminas aromáticas não ocorre somente pelo tabaco, mas também por meio de fabricação de tintas e corantes (Carreón *et al.*, 2014) e produção de pesticidas (*International Agency*, 2012). Estudos indicam que cerca de 20% dos casos de carcinoma urotelial apresentam associação com exposição

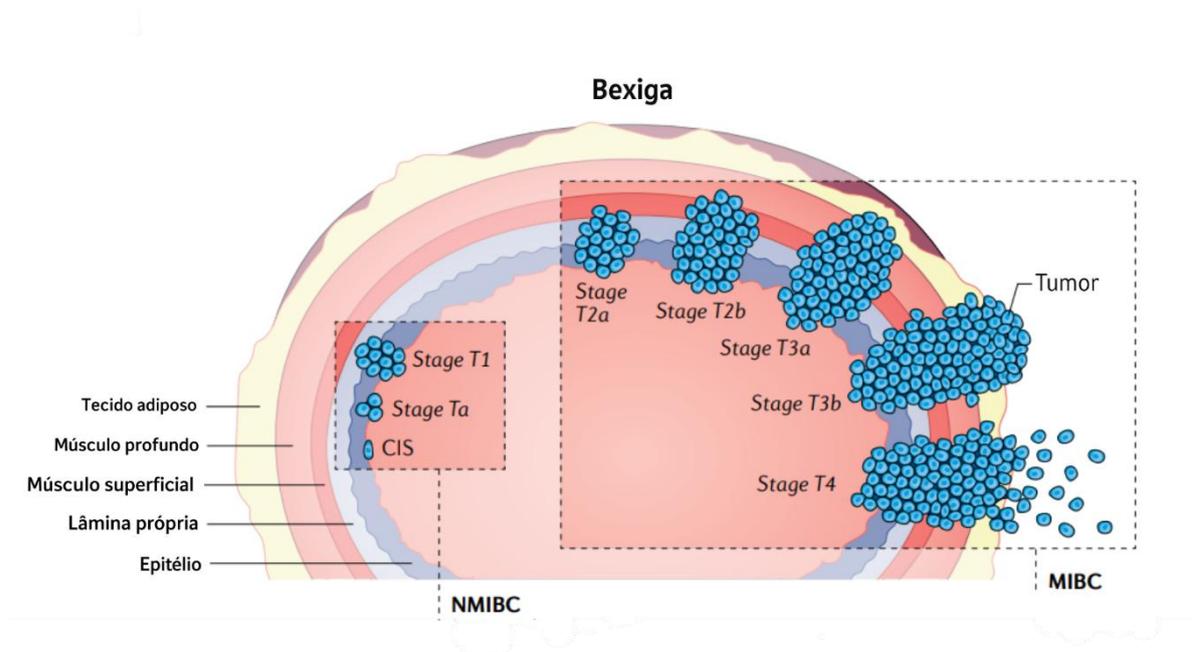
ocupacional, especialmente em trabalhadores de setores industriais envolvidos no manuseio de compostos químicos, como indústrias de pigmentos, derivados de petróleo e metalurgia (Burger *et al.*, 2013). A infecção crônica pelo *Schistosoma haematobium* desempenha um papel significativo na etiologia do câncer de bexiga em diversos países da África Subsaariana, sendo atribuída a ela mais da metade dos casos diagnosticados na região, conforme estimativas do GLOBOCAN 2022. De acordo com a classificação da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 2012), esse parasita é considerado pertencente ao Grupo 1 de agentes carcinogênicos. A patogênese está associada, principalmente, à presença de ovos liberados por vermes adultos do *S. haematobium*, localizados nos plexos venosos da bexiga e de estruturas pélvicas adjacentes, durante sua migração para serem eliminados pela urina, provocando lesões significativas e desencadeando uma resposta inflamatória granulomatosa crônica. Esse processo inflamatório pode evoluir para alterações como fibrose e desenvolvimento de neoplasias na bexiga (Gryseels *et al.*, 2006; Barsoum; Esmat; El-Baz, 2013).

A predisposição genética também constitui um importante fator no desenvolvimento do câncer urotelial. Alterações moleculares em genes reguladores do ciclo celular, como *FGFR3*, *RBI*, *HRAS* e *TP53*, estão diretamente associadas. Esses genes atuam como controladores da proliferação celular, sendo que suas mutações podem levar a mecanismos desregulados de multiplicação celular. Além disso, alterações nos genes do cromossomo 9 e 22 humano são frequentemente associadas ao desenvolvimento de câncer de bexiga (Zhang; Zhang, 2015). A mutação no promotor do gene *TERT* (telomerase reverse transcriptase) é uma alteração genética frequente no câncer de bexiga, presente em 70-80% dos casos, independentemente do estágio ou grau tumoral. Sua detecção na urina, realizada a partir do DNA tumoral proveniente de células neoplásicas do urotélio, mostra potencial para diagnóstico, com sensibilidade moderada (42-62%), porém estudos futuros são necessários para explorar seu papel terapêutico (Allory *et al.*, 2014).

A proteína *p53*, codificada pelo gene *TP53*, é uma das mais frequentemente alteradas em diversos tipos de neoplasias, incluindo o câncer de bexiga (Almeida *et al.* 2000). Esse gene, situado na região 17p13.1, atua como um supressor tumoral, desempenhando funções essenciais no controle do ciclo celular, reparo de danos do DNA e indução de apoptose. (Fett-Conte; Salles, 2002). Estudos clínicos evidenciam que a expressão anormal da *p53* está associada a um pior prognóstico. Em um estudo observou-se que 71% dos pacientes com detecção da proteína mutada evoluíram para doença invasiva, enquanto apenas 22% daqueles sem expressão alterada apresentaram progressão (Hudson *et al.*, 1996).

Aproximadamente 95% dos cânceres de bexiga são classificados histologicamente como tumores uroteliais, originados das células do epitélio que revestem as vias urinárias, que podem ser categorizados em não músculos-invasivos (NMIBC, do inglês “*non-muscle invasive bladder cancer*”), geralmente tumores de menor grau e prognóstico favorável, porém com alta taxa de recorrência, ou músculo-invasivos (MIBC, do inglês “*muscle-invasive bladder cancer*”) com um perfil genético caracterizado por diversidade de mutações e associados a pior prognóstico, podendo evoluir para doença metastática (Dyrskjøt *et al.*, 2023). Entre as formas menos frequentes destacam-se os carcinomas escamosos, adenocarcinomas e os sarcomas (Bogliolo, 2021, p. 603; Messing, 2002). Do ponto de vista morfológico, os tumores uroteliais apresentam duas formas principais de apresentação: lesões papilares, desde lesões benignas, os papilomas, até malignas, os carcinomas, e lesões planas, representadas principalmente pelo carcinoma *in situ* (CIS) (Bogliolo, 2021, p. 604). Para os tumores não músculo-invasivos, o grau é o fator determinante para o prognóstico. Os tumores podem ser classificados como baixo grau, tumores com células diferenciadas e alto grau, tumores com células pouco diferenciadas. (Saginala *et al.*, 2020). Para tumores músculo-invasivos, o principal parâmetro para definição de prognóstico e classificação é o estadiamento, que determina a profundidade da invasão (Figura 1) (Kamat *et al.*, 2016).

Figura 1 - Bexiga



Estadiamento de tumores uroteliais de bexiga. NMIBC: Câncer de bexiga não músculo-invasivo. MIBC: Câncer de bexiga músculo-invasivo. Cis: tumor plano pouco diferenciado e confinado a mucosa; Ta: tumores papilares superficiais confinados ao epitélio T1: Tumor que invade o tecido conjuntivo sub-epitelial, mas não a camada muscular. T2: tumores que invadem a camada muscular superficialmente. T2a: metade interna T2b: metade

externa. T3: tumores com invasão muscular e na camada de tecido perivesical. T3a: de forma microscópica. T3b: de forma macroscópica. T4: tumores que invadem próstata, útero, vagina e/ou intestino. T4a: invade paredes pélvicas e/ou abdominais, próstata, útero ou vagina, T4b: invade parede pélvica ou parede abdominal.

Fonte: adaptado de Tran. L. *et al* 2021; UICC, 2004.

O diagnóstico do carcinoma de bexiga baseia-se principalmente em dois exames fundamentais: a citologia urinária e a cistoscopia, que representam as abordagens iniciais para confirmação diagnóstica e acompanhamento da doença (Hu *et al.*, 2022). Em casos selecionados, é recomendado a realização de exames complementares, como avaliação da função renal e imagem do trato urinário superior, sendo a urografia por tomografia computadorizada (TC) o método de imagem preferencial (Teoh *et al.*, 2020). Pacientes com achados anormais na citologia ou na análise histopatológica devem ser submetidos à ressecção transuretral da bexiga (RTU). Este procedimento não apenas remove a lesão tumoral visível, mas também fornece material para análise histológica, sendo essencial para o diagnóstico definitivo, estadiamento e classificação tumoral. Além disso, permite a avaliação da musculatura adjacente para verificar possível invasão neoplásica (Yin *et al.*, 2016).

As principais abordagens terapêuticas incluem procedimentos cirúrgicos como a ressecção transuretral de bexiga (RTU), para remoção do tumor, e a cistectomia (parcial ou radical), dependendo da extensão da doença (Chang *et al.*, 2016). Nos casos de tumores não músculo-invasivos, a RTU é seguida de imunoterapia intravesical com Bacilo Calmette-Guérin (BCG), que estimula a resposta imune para eliminar células tumorais residuais (Ahmadi *et al.*, 2021; Lenis *et al.*, 2020). Os tumores músculo-invasivos exigem tratamento mais agressivo, frequentemente com cistectomia, devido ao alto risco de progressão para doença metastática (Lobo *et al.*, 2017; Saginala *et al.*, 2020).

Além disso, o tratamento do câncer de bexiga pode envolver outras modalidades terapêuticas, além dos procedimentos cirúrgicos, como radioterapia, imunoterapia (BCG) e quimioterapia. Esta última é geralmente utilizada em casos de câncer músculo-invasivo (MIBC) no esquema de terapia sistêmica neoadjuvante à cistectomia radical. Protocolos quimioterápicos à base de cisplatina representam o tratamento padrão, com esquemas como metotrexato-vimblastina-doxorrubicina-cisplatina (MVAC) ou cisplatina-gemcitabina (CG), demonstrando eficácia no aumento da resposta terapêutica completa e na sobrevida dos pacientes. Entretanto, estes protocolos apresentam alta toxicidade e não são adequados para todos os pacientes, devido aos seus efeitos adversos significativos, como nefrotoxicidade, ototoxicidade e neuropatia periférica, além de critérios restritivos de elegibilidade que excluem indivíduos com função renal reduzida e comorbidades graves, como insuficiência cardíaca, limitando especialmente pacientes idosos (Dyrskjøt *et al.*, 2023; Galsky *et al.*, 2011).

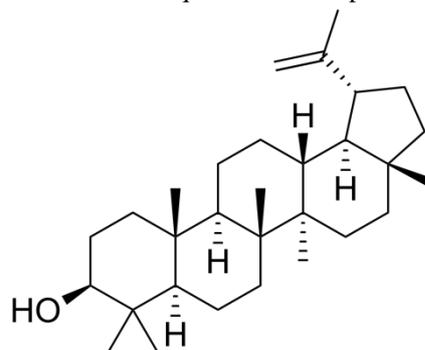
Produtos naturais vêm sendo extensivamente estudados como alternativas antineoplásicas com menor toxicidade sistêmica, menor custo e que contornam a resistência tumoral às quimioterapias, devido à diversidade química de seus fitoquímicos e consequente ação em diferentes alvos. Podem, ainda, ser avaliados como adjuvantes a terapias convencionais, aumentando a sensibilidade das células tumorais a terapias padrão. Segundo um levantamento de 2016, da *Food and Drug Administration* (FDA), os Estados Unidos aprovaram 547 produtos naturais e derivados para uso como medicamentos para diversas patologias, dentre elas, o câncer. Cerca de 50% dos fármacos antitumorais atuais são de origem natural ou semi-sintética, e, dentre os mecanismos de ação antitumoral dos produtos naturais, destacam-se a supressão da proliferação celular, regulação do ciclo celular e de vias de sinalização relacionadas à carcinogênese e progressão tumoral, modulação de genes relacionados ao reparo do DNA, ação antioxidante, entre outros. Essas atividades terapêuticas advêm dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas, como alcalóides, terpenos, compostos fenólicos, etc (Naeem *et al.*, 2022).

Os terpenóides são a maior classe de produtos naturais e possuem ampla gama de ações farmacológicas. São formados por uma unidade estrutural básica denominada isopreno (C₅H₈), e categorizados em subclasses (mono-, sesqui-, di-, tri- ou tetraterpenos) de acordo com o número de unidades isoprênicas em sua estrutura. Os quimioterápicos derivados do taxol, uma família de diterpenos isolada de plantas do gênero *Taxus*, são drogas importantes no tratamento de diversos tipos de câncer. O paclitaxel, (quimioterápico de primeira escolha para o tratamento de câncer de mama, pulmão e ovário), assim como docetaxel e cabazitaxel, são exemplos de fármacos derivados do taxol com relevância farmacológica e comercial (Naeem *et al.*, 2022; Reinhard *et al.*, 2010; Mosca *et al.*, 2020). Triterpenos (C₁₀) são, em sua maioria, compostos policíclicos encontrados em folhas, casca do caule, frutos e raízes de plantas, sendo também produzidos por fungos. Esses compostos se apresentam como compostos antitumorais multifuncionais, e vários deles, como os ácido gadotérico, nimbolide, ácido betulínico e diosgenina foram avaliados quanto a suas atividades antitumorais e anti-inflamatórias, tendo como alvo inúmeras vias de sinalização e controlando a sobrevivência celular e progressão tumoral (Gill *et al.*, 2016).

O triterpeno lupeol (Figura 2) é sintetizado naturalmente em várias plantas, dentre elas frutas, ervas e folhosas presentes na alimentação humana, como pepino (*Cucumis sativus*), melão (*Cucumis melo*), abóbora (*Cucurbita pepo*), chá-da-Índia (*Camellia sinensis*), entre outras. Esse composto tem se destacado por suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias,

hipoglicemiantes, protetivas contra doenças cardiovasculares, hepáticas, renais, neurodegenerativas, ósseas, doenças de pele e, principalmente, por suas atividades antineoplásicas e quimioprotetoras demonstradas em estudos *in vivo* e *in vitro*. O lupeol demonstrou atividades antiproliferativas relacionadas à parada no ciclo celular em modelos de câncer gástrico, hepatocelular, oral e retinoblastoma. Em um estudo utilizando células de retinoblastoma (Y-79 e WERI-Rb-1), o lupeol reduziu a viabilidade das células de forma dose-dependente, com maior sensibilidade na linhagem WERI-Rb-1 (Che, Wu e Yu 2022, p. 208). Além disso, em câncer colorretal, cervical, hepatocelular, pulmonar, oral, pancreático, osteosarcoma e retinoblastoma, o lupeol levou à indução de apoptose por mecanismos de aumento dos níveis de ROS, ativação de *p53*, modulação dos níveis de caspases, inibição da via de sinalização Akt/PKB, supressão da atividade de EGFR/STAT3 e via miRNAs. No caso específico do retinoblastoma, o lupeol induziu apoptose, aumentando a expressão de Bax e diminuindo Bcl-2. Além disso, esse composto diminuiu a migração celular e invasividade tumoral em modelos de câncer de vesícula biliar, tumor colorretal e osteosarcoma, atuando em vias de sinalização como EGFR/MMP-9 e na remodelação do citoesqueleto. Estudos demonstram, ainda, a capacidade do lupeol em aumentar a sensibilidade de células tumorais à quimioterapia e radioterapia (Saleem *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2021; Sohag *et al.*, 2022; Che, Wu e Yu 2022, p. 208). No contexto do câncer de próstata, o lupeol demonstrou capacidade potencializar a ação da enzalutamida, um inibidor não esteroide do receptor de andrógeno, aprovado para tratamento de câncer de próstata. Através de abordagens *in silico* e *in vitro*, foi demonstrado que o lupeol quimiossensibiliza células resistentes por modular a expressão de proteínas oncogênicas como B-catenina, c-FLIP e c-MYC sensibilizando os efeitos da enzalutamida (Maurya *et al.*, 2022). Esta propriedade de reverter a resistência medicamentosa posiciona o lupeol como um valioso coadjuvante terapêutico.

Figura 2 - Estrutura química do composto Lupeol



Fonte: Adaptado de Sallem, M. (2009)

Apesar de suas importantes propriedades antineoplásicas, apenas um estudo avaliou as atividades do lupeol no câncer de bexiga induzido em ratos Wistar, demonstrando seu potencial em induzir a apoptose celular pela modulação da expressão de Bax, caspase-3, caspase-9 e inibição da expressão de Bcl-2 e PCNA (Prabhu *et al.*, 2016). Desse modo, faz-se necessário um maior entendimento das ações biológicas desse composto em tumores de bexiga.

1.1 JUSTIFICATIVA

O câncer de bexiga é o décimo mais comum no mundo, e o tratamento ainda representa um grande desafio devido à alta toxicidade da quimioterapia convencional, que contribui para as altas taxas de recorrência da doença. Entre as alternativas em investigação, destacam-se os terpenóides, a maior classe de produtos naturais, conhecidos por sua ampla gama de atividades farmacológicas. Dessa classe derivam fármacos importantes, como o paclitaxel, amplamente utilizado na oncologia. O lupeol, um triterpeno presente em diversas espécies vegetais, tem demonstrado efeitos antitumorais relevantes, incluindo a inibição de proliferação celular, a indução de apoptose e a redução do potencial metastático em diferentes tipos de câncer. No entanto, seu papel no câncer de bexiga permanece pouco explorado, havendo até o momento apenas um estudo *in vivo* em modelo com ratos Wistar. Diante desse cenário, este projeto busca elucidar de forma mais abrangente o potencial do lupeol no câncer de bexiga de alto grau, avaliando seu índice de seletividade, citotoxicidade, ação anti-migratória e a capacidade reprodutiva celular. Assim, pretende-se reforçar seu valor como candidato promissor ao desenvolvimento de novas terapias quimioterápicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente projeto foi avaliar o potencial antineoplásico do triterpeno lupeol sobre linhagens celulares de tumor de bexiga.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in silico* as atividades antiproliferativas e mecanismos de ação do lupeol;
- Investigar a citotoxicidade e seletividade do lupeol sobre células J82 e UM-UC-3 de tumor de bexiga de alto grau;
- Estudar os efeitos do lupeol sobre a capacidade reprodutiva celular, refletida na formação de clones celulares;
- Analisar os efeitos do lupeol sobre a migração celular;
- Avaliar os efeitos do lupeol sobre a morfologia celular.

3 METODOLOGIA

3.1 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO LUPEOL

O composto lupeol foi extraído a partir das partes aéreas de *Dolichandra unguis-cati* (Figura 3) família *Bignoniaceae* e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão. O material vegetal foi seco a 40°C em estufa ventilada, triturado e submetido à extração com etanol. O extrato bruto foi particionado sequencialmente com n-hexano, clorofórmio e acetato de etila. A fração clorofórmica foi concentrada em rotaevaporador e obteve 3,8 g. Em seguida foi purificada por cromatografia em coluna de sílica gel, resultando em 18 frações que foram analisadas com cromatografia em camada delgada (CCD). Na fração 6, observou a formação de um precipitado, que foi recristalizado em mistura de solventes, obtendo após filtração e secagem, 87 mg de lupeol na forma de um sólido branco. A identificação foi confirmada por análises de espectro de ressonância magnética nuclear RMN de ^1H e ^{13}C . O composto foi dissolvido em DMSO a uma concentração de 10 mg/mL. As concentrações de tratamento foram definidas de modo que a concentração final de DMSO no meio de cultura durante diferentes tratamentos não excedesse 2%. O DMSO também foi adicionado às culturas controles.

Figura 3 - *Dolichandra unguis-cati* em flor no jardim botânico Villa Durazzo-Pallavicini, Gênova



Fonte: Hectonichus, 2012, CC BY-SA 3.0.

3.2 REAGENTES

O meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o meio de cultura branco (DMEM sem vermelho de fenol), a penicilina G, a estreptomicina, a cisplatina e a tripsina/EDTA foram adquiridas da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). A anfotericina B foi

adquirida da Cristália (Itapira, Brasil). O soro fetal bovino foi obtido da Cultilab Ltda. (Campinas, Brasil). Os solventes dimetilsulfóxido (DMSO), hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol foram adquiridos da Synth (Brasil). O kit Cell Proliferation II (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida - XTT) foi adquirido da Roche Diagnostics (Mannheim, Alemanha).

3.3 LINHAGENS CELULARES

Para conduzir o trabalho, foram utilizadas 2 linhagens celulares de carcinoma urotelial de bexiga de alto grau adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil. A linhagem J82 é derivada de tumor de alto grau com três mutações pontuais no gene *TP53*, sendo duas no éxon 8 (códono 271 Glu (GAG) → Lis (AAG); códono 274 Val (GTT) → Phe (TTT) e uma no éxon 9 (códono 320 Lys (AAG) → Asn (AAC)). A linhagem UM-UC-3 é derivada de tumor de alto grau, músculo-invasivo, com uma mutação pontual em *TP53* (éxon 4, códono 113: Phe (TTG) → Cys (TCG)) (Pandey *et al.*, 2018; Rieger, *et al.*, 1995).

A linhagem MRC5, de fibroblastos pulmonares humanos, foi utilizada para avaliar a seletividade do composto para as linhagens tumorais. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino e 100 U/mL de penicilina G, 100 U/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B, e mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Para todos os experimentos foram realizados em triplicata, a quantidade semeada de células foi de 1x10⁵ células/ por poço em placas de semeadura de células.

3.4 ANÁLISE *IN SILICO*

A avaliação *in silico* computacional do lupeol foi realizada utilizando o programa *Prediction Activity Spectrum of Substances* (PASS). Este *software online* (www.way2drug.com/PassOnline/) analisa a estrutura molecular para prever possíveis atividades biológicas de compostos orgânicos no organismo humano, servindo como ferramenta preliminar antes da realização de ensaios experimentais. O PASS fornece resultados expressos em termos de probabilidade de atividade (Pa) e inatividade (Pi) para mecanismos específicos. No presente estudo, foram avaliados 4 efeitos antitumorais e 6 mecanismos de ação relacionados à atividade antitumoral. A análise foi baseada na diferença entre Pa e Pi, com

classificação estabelecida em três níveis: Pa-Pi < 0,2 (baixo potencial); Pa-Pi entre 0,2 e 0,5 (potencial moderado); e Pa-Pi \geq 0,5 (alto potencial) (Seibert *et al.* 2019).

3.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para a avaliação da citotoxicidade foi utilizado o *Cell Proliferation Kit II XTT* (*Cell Proliferation Kit II, ROCHE Diagnostics, Mannheim, Alemanha*). Esse kit baseia-se na clivagem do sal amarelo tetrazolium XTT pelas células metabolicamente ativas (células viáveis), formando um corante formazam alaranjado. A absorbância do corante foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. A média das absorbâncias dos grupos tratados, dividida pela média das absorbâncias dos controles, determinou a porcentagem de células viáveis. O teste de citotoxicidade foi utilizado para determinar as concentrações e o tempo de tratamento para os experimentos subsequentes, bem como para o cálculo do índice de seletividade do composto para as linhagens tumorais. Nesse sentido, as concentrações foram de 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M e foram selecionadas com base em estudos do grupo e da literatura (Aratanechemuge, Yue *et al.* 2004). As células não tratadas foram utilizadas como controle.

As células foram semeadas, em triplicata para cada grupo, em placas de 24 poços e tratadas com as diferentes concentrações dos compostos por 24h e 48h após o cultivo. Imediatamente após os tratamentos com o composto, as células foram lavadas com solução de Hanks (composição: 0,4 g de KCl, 0,06 g de Na₂HPO₄, 0,35 g de NaHCO₃, 1 g de glicose e 8 g de NaCl em 1000 mL de H₂O), adicionou-se o meio de cultura branco (DMEM sem vermelho de fenol) e foram incubadas com o kit XTT por aproximadamente 1h, procedendo-se à leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. A absorbância foi utilizada para traçar a curva de viabilidade celular, pois é proporcional ao número de células viáveis.

Para a avaliação do índice de seletividade, foi construída uma curva padrão com os dados de concentração do composto *versus* porcentagem de células viáveis, cuja equação resultou no IC₅₀ do composto para cada linhagem. O índice de seletividade (IS) foi obtido dividindo-se a IC₅₀ da MRC5 pela IC₅₀ nas linhagens tumorais. Um valor de IS acima de 2 indica seletividade do composto para as linhagens tumorais (Badisa *et al.*, 2009).

3.6 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA CLONOGÊNICA

Para avaliar os efeitos na capacidade de formação de clones com o tratamento com o lupeol, foi realizado o ensaio de sobrevivência clonogênica, células semeadas em placas de 24 poços foram tratadas com as concentrações de 100 μM , 150 μM e 200 μM pelo tempo de 24h, definidas pelo ensaio de citotoxicidade. O grupo não tratado foi utilizado como controle. Após o tempo de tratamento, as células foram submetidas a lavagem com solução de Hanks, recolhidas e semeadas novamente em placas de 12 poços na densidade de 1×10^3 células por poço e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 por 7-10 dias (até o poço do controle de células não tratadas atingir confluência máxima).

Após esse tempo, o meio foi removido, as células foram lavadas com solução de Hanks e fixadas com solução de formaldeído 4% por 20 minutos, hidratadas com metanol 100% por 20 minutos, e coradas com solução de cristal violeta 0,5% dissolvido em metanol 25%. Em seguida, os poços foram lavados com água deionizada e aguardado o tempo de secagem em temperatura ambiente. O corante foi posteriormente solubilizado em ácido acético 33%, e o conteúdo das placas foi transferido para uma placa de 96 poços, que foi levada para leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm (HUANG et al., 2018). O teste foi realizado em triplicata e a porcentagem de colônias formadas foi obtida dividindo-se a média das absorbâncias obtidas dos grupos tratados pela absorbância obtida do grupo controle (Pereira et al., 2022).

3.7 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Para avaliar a capacidade do composto em afetar a migração celular, foi utilizado o ensaio de cicatrização de feridas. Após 24h do plaqueamento das células em placas de 24 poços, foi feita uma raspagem da monocamada de células com o auxílio de uma ponteira de 200 μL esterilizada, para criar uma ferida na monocamada (LIMA et al., 2020). As células foram lavadas, fotografadas e posteriormente tratadas com as concentrações 100 μM , 150 μM e 200 μM pelo tempo de 24h e 48h. O grupo não tratado foi utilizado como controle. A migração celular através da fenda formada foi fotografada nos tempos de 0h, 24h e 48h através do software *Moti Connect*, em microscópio óptico com luz invertida em um aumento de 40x. A quantificação de motilidade celular foi realizada usando o *software ImageJ®*, medindo-se a

distância entre a frente invasora das células em 3 campos selecionados aleatoriamente, e os valores encontrados foram comparados com os resultados no tempo 0.

3.8 MORFOLOGIA CELULAR

Para a avaliação das alterações na morfologia celular, células plaqueadas em placas de 24 poços foram tratadas com as concentrações 100 μM , 150 μM e 200 μM , definidas pelo ensaio de citotoxicidade e pelo tempo de 24h. As células não tratadas foram utilizadas como controle. Após o tratamento, as células foram observadas em microscópio invertido com contraste de fase e fotografadas por meio do *software Moti Connect* no aumento de 200x (DA SILVA et al., 2012).

No ensaio de citotoxicidade (XTT), morfologia celular e sobrevivência clonogênica, a cisplatina foi utilizada como controle comparativo positivo, uma vez que é o tratamento padrão para o câncer de bexiga. A escolha desse fármaco como referência permitiu avaliar a eficácia e o potencial terapêutico do novo composto testado, comparando seus efeitos com um tratamento já utilizado na prática clínica. A concentração da solução estoque de cisplatina utilizada nos testes foi de 500 mM e a concentração final nos poços de tratamento foi de 10 μM .

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, sobrevivência clonogênica e migração foram submetidos à análise estatística utilizando o método de análise de variância (ANOVA). Para comparações múltiplas entre os grupos, foi aplicado o teste de Tukey como pós-teste. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando apresentaram valores de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram conduzidas por meio do *software GraphPad Prism®* versão 6.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE *IN SILICO*

A avaliação computacional do lupeol revelou diversas propriedades farmacológicas e vias de atuação molecular. Esta abordagem *in silico* permitiu uma triagem inicial das propriedades farmacológicas do lupeol, identificando seus potenciais mecanismos de ação antitumoral e fornecendo uma base para as etapas experimentais subsequentes do estudo. Os efeitos mais relevantes associados à possível ação antineoplásicas foram escolhidos e exibidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Análise *in silico* do potencial efeito antitumoral e mecanismos de ação do lupeol utilizando o programa PASS online.

Atividade biológica	Valor de Pa-Pi
Antineoplásico	0,946
Quimiopreventivo	0,788
Antimetastático	0,645
Anticarcinogênico	0,491
Mecanismo de ação	
Estimulante da caspase 3	0,976
Agonista apoptose	0,878
Estimulante da caspase 8	0,864
Antagonista da integridade da membrana	0,538
Inibidor de DNA ligase (ATP)	0,492
Inibidor de expressão de JAK2	0,485

Fonte: autoria própria

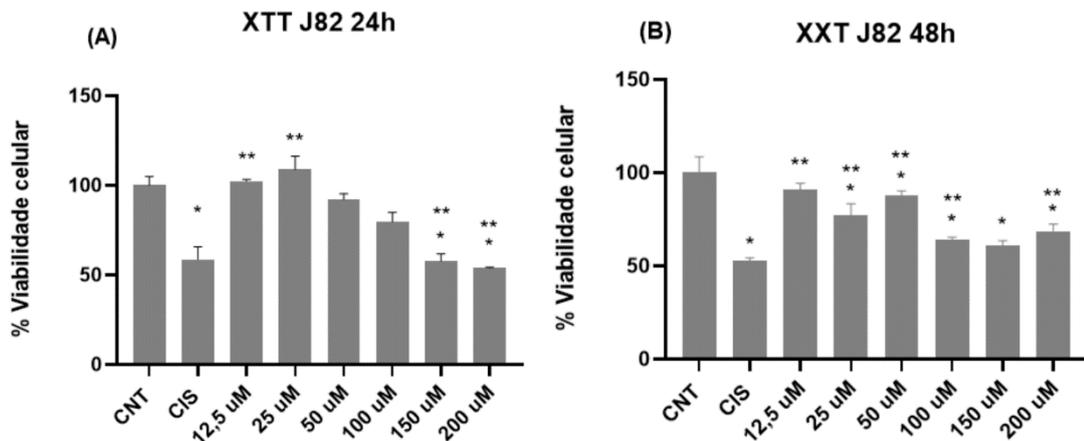
4.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A linhagem celular de carcinoma urotelial de bexiga de alto grau J82 foi tratada com as concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M de lupeol. Após o tempo de tratamento de 24h, as concentrações de 100 μ M, 150 μ M e 200 μ M causaram diminuição na viabilidade celular em relação ao grupo controle não tratado (CNT) de 20-46,2%. Após o tempo

de 48h, as concentrações de 100 μ M, 150 μ M e 200 μ M causaram diminuição da viabilidade celular de 32-36%, resultados demonstrados na figura 4A e figura 4B.

O valor da concentração inibitória correspondente a 50% de efeito (IC_{50}) foi de = 94,43 μ M (intervalo de confiança de 70,07 a 193,5 μ M). Com base nesses resultados, foram utilizadas as concentrações de 100 μ M, 150 μ M e 200 μ M nos experimentos posteriores, as quais abrangem e excedem o valor obtido para o IC_{50} .

Figura 4 - Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular J82



Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular J82 derivada do carcinoma de bexiga após 24h (A), 48h (B) de tratamento, respectivamente, com lupeol. * $p < 0,05$ comparado com o CNT e ** $p < 0,05$ comparado com a cisplatina.

CNT: controle não tratado.

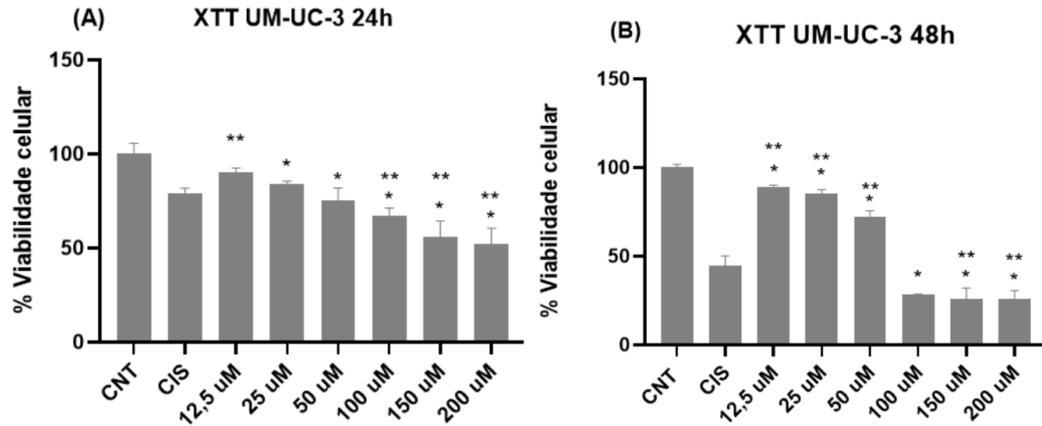
CIS: cisplatina.

Fonte: autoria própria.

A linhagem celular de carcinoma urotelial de bexiga de alto grau UM-UC-3 foi tratada com as concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M de lupeol. Após o tempo de tratamento de 24h, as concentrações de 100 μ M, 150 μ M e 200 μ M demonstraram diminuição na viabilidade celular em relação ao grupo controle não tratado (CNT) de 33-47,7% (figura A). Após o tempo de 48h, as concentrações de 100 μ M, 150 μ M e 200 μ M levaram a uma diminuição da viabilidade celular de 71,5-75% (figura B).

Para a linhagem UM-UC-3, o IC_{50} para o tempo de 24h foi acima de 200 μ M. Foi definido então o tempo de 24h para padronização experimental, a fim de garantir uniformidade metodológica e permitir comparação direta com os resultados da linhagem J82. No ensaio de 48h, embora essas mesmas concentrações tenham citotoxicidade maior que 50%, observou-se citotoxicidade excessiva (redução drástica na viabilidade), o que poderia comprometer a interpretação dos resultados nos ensaios subsequentes.

Figura 5 - Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular UM-UC-3



Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular UM-UC-3, derivada do carcinoma de bexiga, após 24h (A) 48h (B) de tratamento com o lupeol. * $p < 0,05$ comparado com o CNT e ** $p < 0,05$ comparado com a cisplatina.

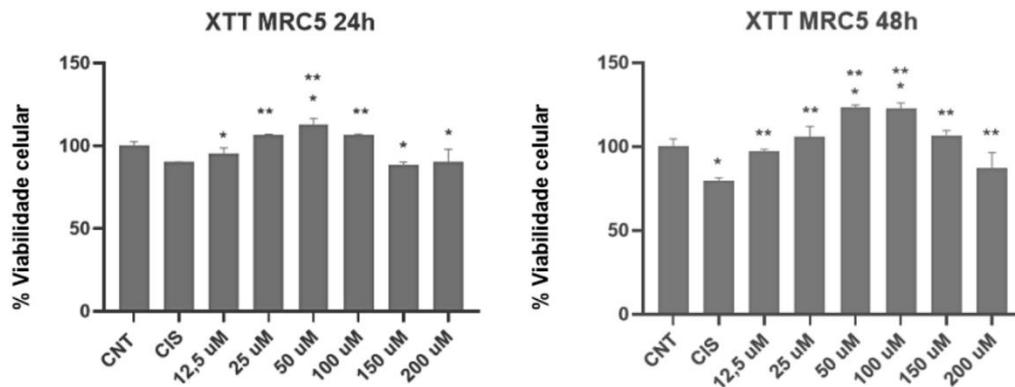
CNT: controle não tratado.

CIS: cisplatina.

Fonte: autoria própria.

A linhagem celular de fibroblastos pulmonares humanos MRC5 foi utilizada como modelo não tumoral para avaliar a seletividade do lupeol e foi tratada com concentrações de 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM de lupeol. Após os tempos de tratamento, de 24h e 48h, as concentrações não levaram a morte significativa em comparação com ao grupo controle não tratado (CNT) como é possível observar na figura 6A e figura 6B. Além disso, em algumas concentrações, foi possível observar um aumento na viabilidade dessas células em relação ao controle não tratado (Figura 6A: concentrações de 25 μM e 50 μM ; Figura 6B: concentrações de 50 μM , 100 μM , 150 μM), sugerindo um possível efeito citoprotetor ou estimulante da proliferação.

Figura 6 - Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular MRC5



Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular MRC5, derivada de fibroblastos pulmonares humanos, após 24h (A) 48h (B) de tratamento com o lupeol. * $p < 0,05$ comparado com o CNT e ** $p < 0,05$ comparado com a cisplatina.

CNT: controle não tratado.

CIS: cisplatina.

Fonte: autoria própria.

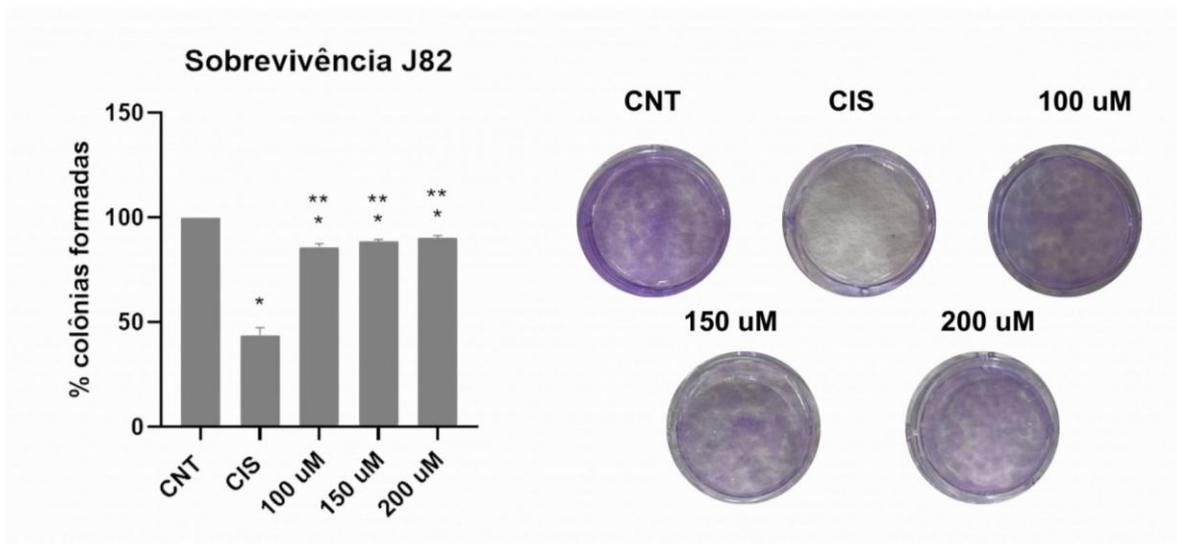
Para a linhagem J82 o IS foi de 2,11. Para a UM-UC-3, apesar do IS não ter sido definido em virtude das concentrações testadas (a maior concentração testada causou cerca de 50% de morte celular), o composto também se mostrou seletivo, já que após a linhagem normal ser tratada com 200 μ M, ainda havia cerca de 90% de viabilidade celular. Além disso, pela análise dos gráficos, é possível perceber que o lupeol reduziu significativamente a viabilidade e capacidade proliferativa das linhagens tumorais (J82/UM-UC-3) e teve efeito nas células MRC5 neutro ou até benéfico, reforçando o potencial do composto como agente seletivo contra células do câncer de bexiga.

4.3 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA CLONOGÊNICA

As linhagens J82 e UM-UC-3 foram tratadas com concentrações de 100 μ M, 150 μ M e 200 μ M por 24h, definidas pelo ensaio de citotoxicidade. Após o tratamento com o lupeol foi possível perceber diminuição da formação de clones em ambas as linhagens quando comparadas com o controle não tratado (CNT). Os resultados estão apresentados nas figuras 7 e 8.

Na linhagem celular J82 (Figura 7), o tratamento com as concentrações reduziu a formação de clones de forma significativa quando comparadas ao controle não tratado.

Figura 7 - Porcentagem de formação de colônias referente à linhagem J82



Porcentagem de formação de colônias referente à linhagem J82, derivada de carcinoma de bexiga, após 24h de tratamento com lupeol e imagens dos poços da linhagem J82 após a fixação das células e coloração com corante cristal violeta. * $p < 0,05$ comparado com o CNT e ** $p < 0,05$ comparado com a cisplatina.

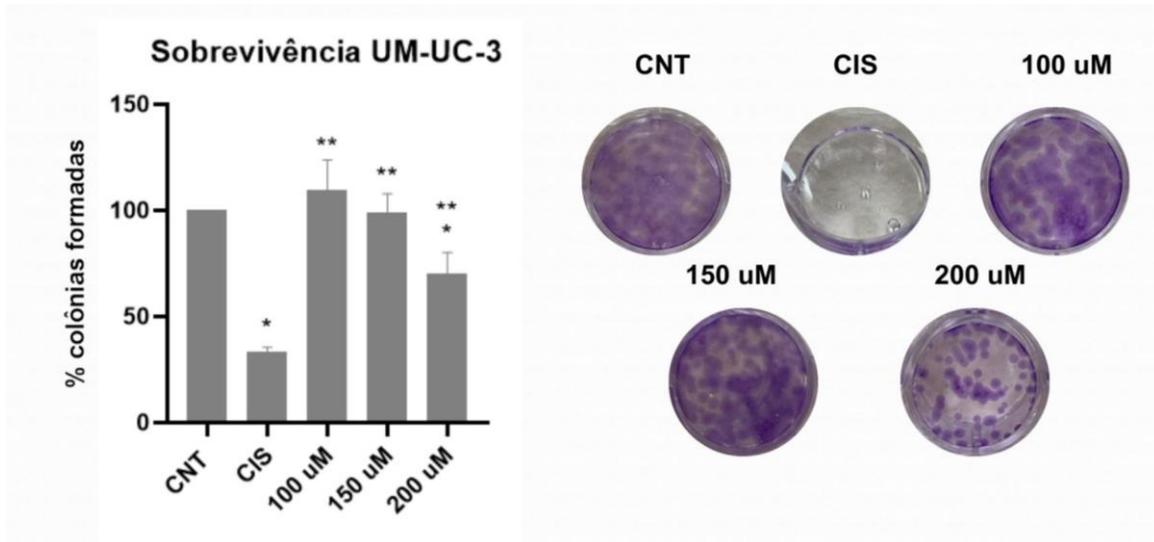
CNT: controle não tratado.

CIS: cisplatina.

Fonte: autoria própria.

Na linhagem celular UM-UC-3 (Figura 8), o tratamento com a concentração de 200 μM reduziu de forma significativa a formação de clones quando comparadas ao controle não tratado.

Figura 8 - Porcentagem de formação de colônias referente à linhagem UM-UC-3



Porcentagem de formação de colônias referente à linhagem UM-UC-3, derivada de carcinoma de bexiga, após 24h de tratamento com lupeol e imagens dos poços da linhagem UM-UC-3 após a fixação das células e coloração com corante cristal violeta. * $p < 0,05$ comparado com o CNT e ** $p < 0,05$ comparado com a cisplatina.

CNT: controle não tratado.

CIS: cisplatina.

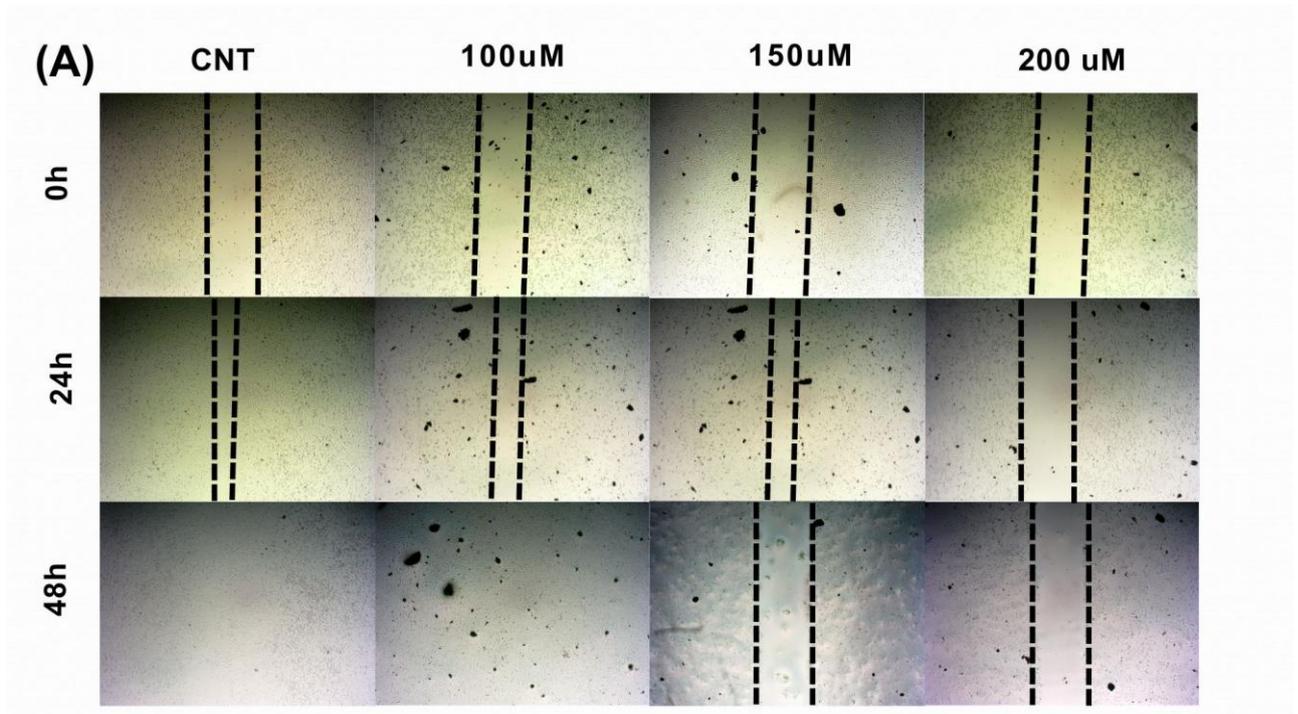
Fonte: autoria própria.

4.4 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Após 24h de tratamento com o lupeol foi observado que nas concentrações de 100 μM , 150 μM e 200 μM ocorreu a inibição da migração celular em ambas as linhagens celulares e foi observado o fechamento da fenda em ambas as linhagens celulares no grupo controle não tratado (CNT).

Na linhagem celular J82 (Figura 9 A e B) foi observada a redução na migração celular em todos os grupos tratados, além disso, após 24h, também foi observada morte celular significativa nos poços de 150 μM e 200 μM .

Figura 9 – Fotomicrografias do ensaio de cicatrização de feridas linhagem J82



(A) Fotomicrografias das fendas formadas na monocamada celular da linhagem J82 no tempo 0h, 24h e 48h de tratamento com o lupeol no ensaio de migração celular.

(B) Porcentagem de migração celular nos tempos de tratamento 24h e 48h. * $p < 0,05$ comparado ao CNT.

CNT: controle não tratado

0h: Tempo 0h, no qual foi realizado o tratamento e a arranhadura nos poços.

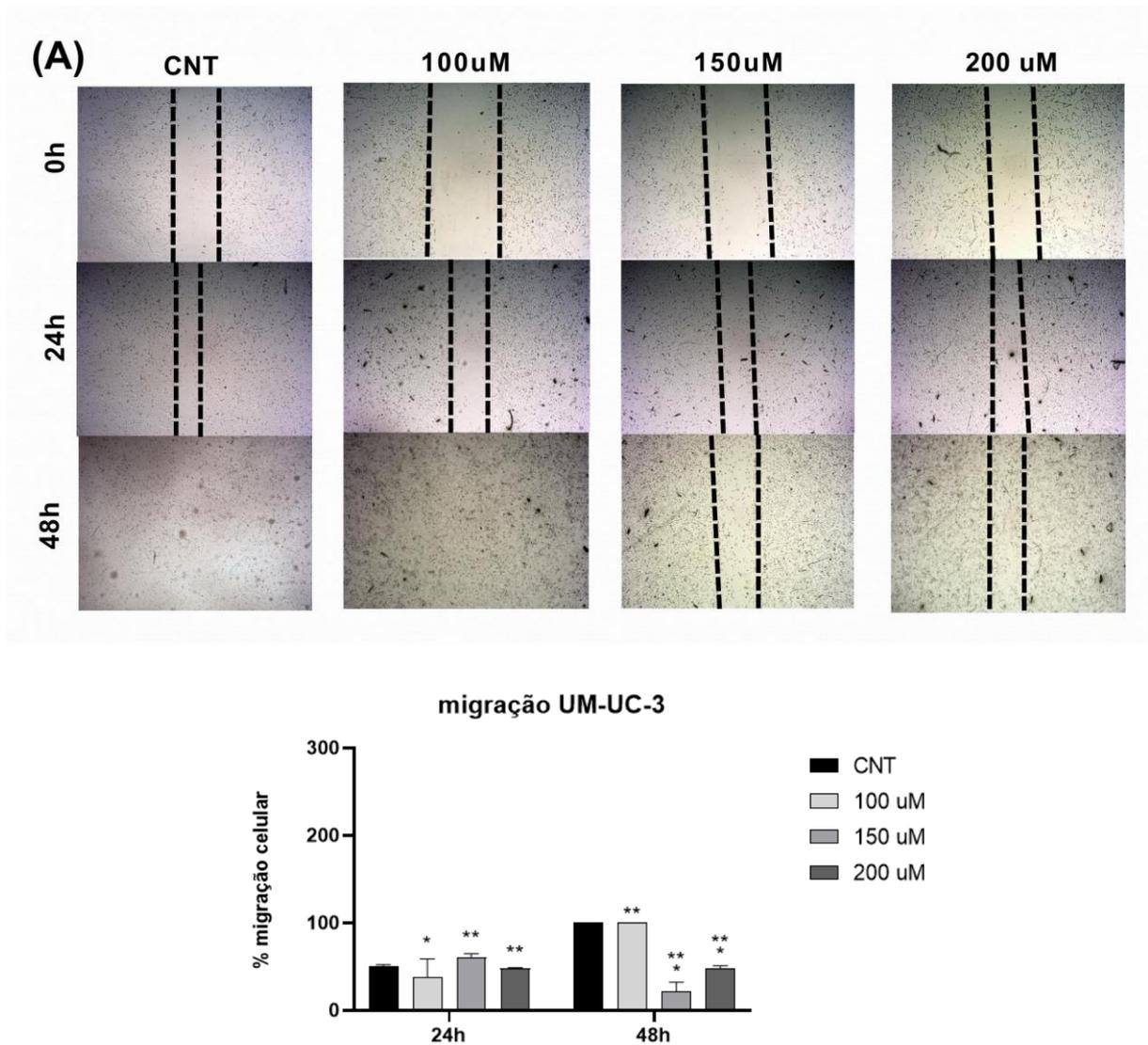
24h: 24h após o tratamento.

48h: 48h após o tratamento.

Fonte: autoria própria.

Na linhagem celular UM-UC-3 (Figura 10 A e B) foi observada a redução na migração celular em todos os grupos tratados e em todos os tempos avaliados, 24h e 48h, quando comparados com o controle.

Figura 10 – Fotomicrografias do ensaio de cicatrização de feridas da linhagem UM-UC-3



(A) Fotomicrografias das fendas formadas na monocamada celular da linhagem UM-UC-3 no tempo 0h, 24h e 48h de tratamento com o lupeol no ensaio de migração celular com a linhagem UM-UC-3. * $p < 0,05$ comparado ao CNT.

(B) Porcentagem de migração celular nos tempos de tratamento de 24h e 48h.

CNT: controle não tratado.

0h: Tempo 0h, no qual foi realizado o tratamento e a arranhadura nos poços.

24h: 24h após o tratamento.

48h: 48h após o tratamento.

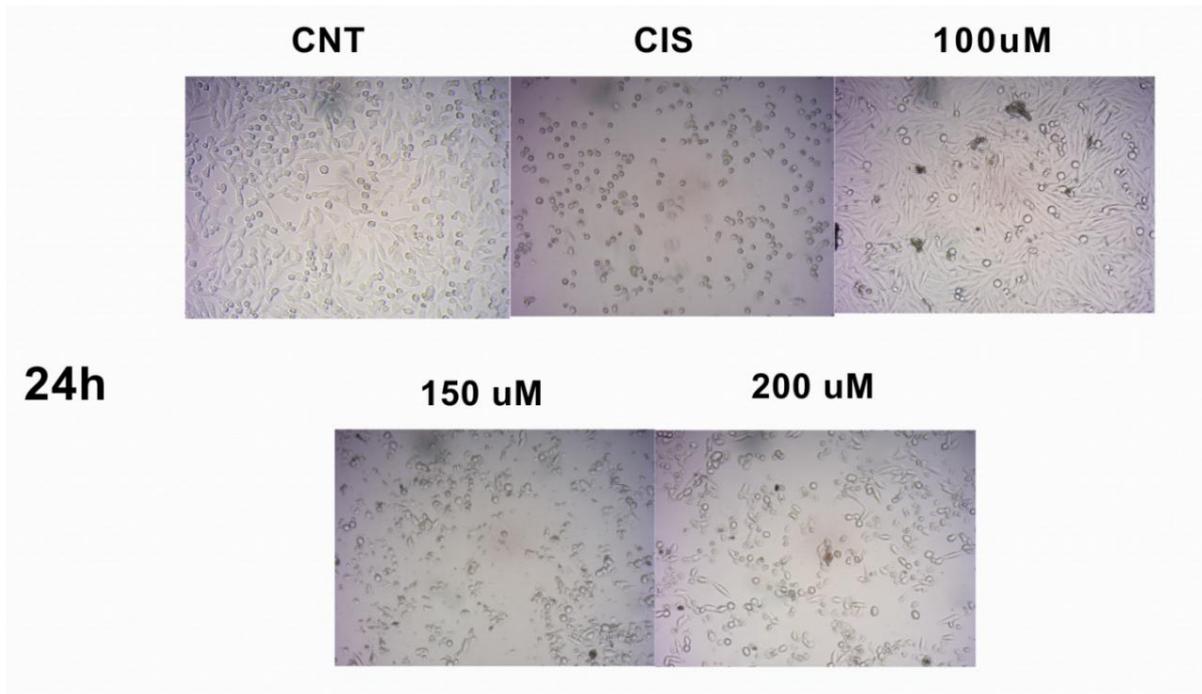
Fonte: autoria própria.

4.5 MORFOLOGIA CELULAR

O tratamento com o lupeol reduziu significativamente a densidade celular de maneira dose-dependente em ambas as linhagens celulares, J82 (Figura 11) e UM-UC-3 (Figura 12).

Também foi possível observar que o tratamento levou a alterações celulares como aparecimento de extensões, células arredondadas e morte celular.

Figura 11 - Fotomicrografias da linhagem J82



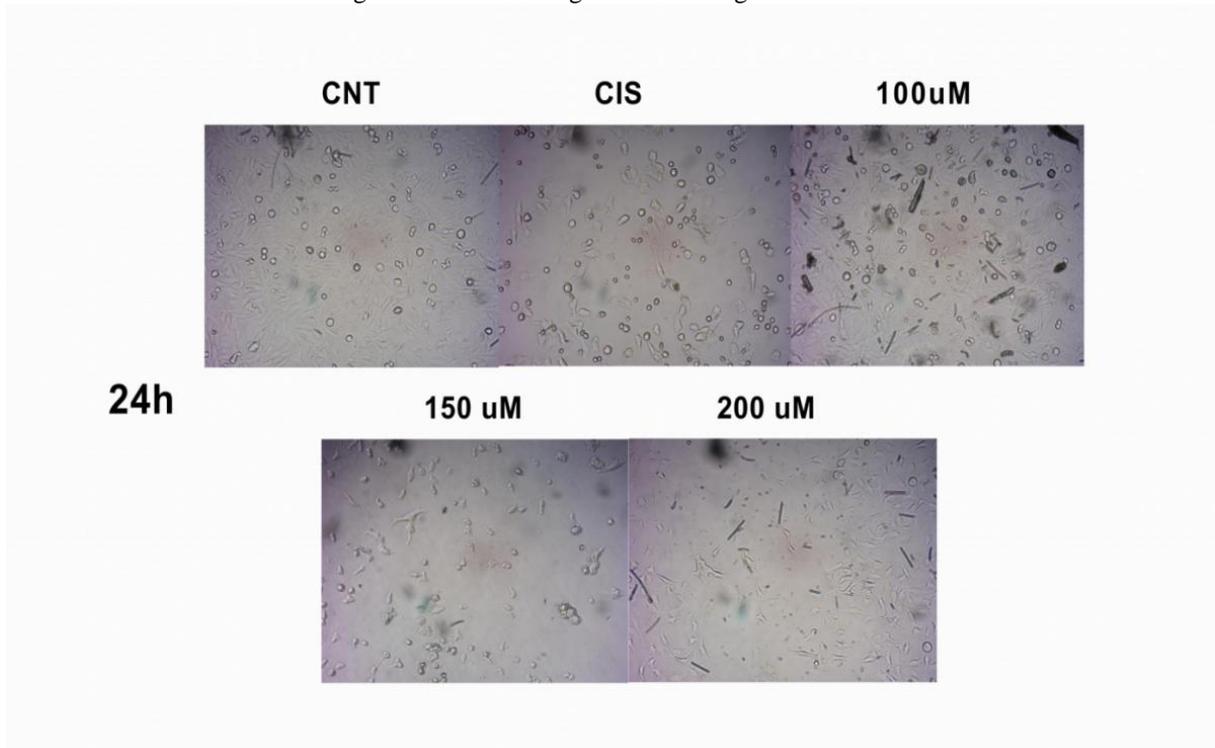
Fotomicrografias da linhagem J82 derivada do carcinoma de bexiga, após 24h de tratamento com lupeol.

CNT: controle não tratado.

CIS: cisplatina.

Fonte: autoria própria.

Figura 12 - Fotomicrografias da linhagem UM-UC-3



Fotomicrografias da linhagem UM-UC-3 derivada do carcinoma de bexiga, após 24h de tratamento com lupeol.

CNT: controle não tratado.

CIS: cisplatina.

Fonte: autoria própria.

5 DISCUSSÃO

Os protocolos quimioterápicos à base de cisplatina, padrão no tratamento do câncer de bexiga, são eficazes na melhora da resposta patológica e sobrevida dos pacientes. No entanto, sua alta toxicidade e limitações para determinados perfis reduzem a aplicabilidade clínica, representando um desafio no manejo da doença (Dyrskjøt *et al.*, 2023).

Um dos principais desafios é a elegibilidade do paciente, uma vez que aproximadamente 30-50% dos indivíduos são considerados inaptos para a terapia com cisplatina devido a comorbidades, restringindo as opções terapêuticas (Gallagher & Milowsky, 2009; Lei; Cheng; Pan, 2011). Além disso, a complexidade da doença frequentemente exige abordagens multimodais, dificultando a padronização do tratamento (Gallagher & Milowsky, 2009). A toxicidade da cisplatina também representa um obstáculo significativo com efeitos adversos, exigindo monitoramento rigoroso para minimizar riscos (Nazari *et al.*, 2024).

Outra lacuna é a ausência de um tratamento de segunda linha estabelecido para pacientes não elegíveis à cisplatina, destacando a necessidade de terapias alternativas e personalizadas (Lei; Cheng; Pan, 2011). Esses fatores evidenciam a urgência de estratégias inovadoras e menos tóxicas para melhorar o manejo do câncer de bexiga.

Produtos naturais são alternativas antitumorais com menor toxicidade sistêmica, menor custo e que contornam a resistência tumoral à quimioterapia. No contexto do câncer de bexiga, destaca-se o composto paclitaxel (Taxol®), derivado da casca da árvore *Taxus brevifolia*, que integra protocolos combinados com cisplatina e gemcitabina para casos invasivos, demonstrando eficácia na melhora da sobrevida global. Além disso, o alcalóide vincristina, extraído da planta *Catharanthus roseus*, é utilizado em esquemas terapêuticos combinados para tratamentos de leucemia e câncer de mama (Xia Y, et. al 2021).

O lupeol faz parte de umas das maiores classes de produtos naturais e possui ampla gama de ações farmacológicas. É encontrado em várias plantas e já foi demonstrado em outros estudos a sua capacidade de diminuir a proliferação tumoral através de parada no ciclo celular, de induzir a apoptose e reduzir a migração celular e invasividade em tumores (Thomas *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2018). Entretanto, apenas um estudo (com modelo *in vivo*, utilizando ratos Wistar) avaliou as atividades apoptóticas do tratamento com lupeol no câncer de bexiga. Neste estudo, os autores observaram um aumento de proteínas pró-apoptóticas (Bax, caspase-3 e caspase-9) e redução de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2), além de ter se mostrando seguro no tratamento de ratos que não tiveram a indução de câncer. Esses resultados sugerem que esses mecanismos podem estar envolvidos na atividade anticarcinogênica do lupeol uma vez que a

modulação dessas vias de sinalização está diretamente relacionada com a indução de apoptose em células tumorais (Prasad *et al.*, 2008).

Nesse estudo, observou-se que o tratamento com diferentes concentrações do composto promoveu redução na viabilidade celular em ambas as linhagens, com efeitos dependentes da dose e do tempo de exposição (Figuras 4 e 5). Esses resultados validam a análise *in silico* (Tabela 1), que prediz que o lupeol apresenta atividade moderada na inibição da DNA ligase, enzima crucial para a formação de ligações fosfodiéster durante a replicação e reparo do DNA (Alberts *et al.*, 2017 p.140). A inibição dessa enzima em células cancerosas compromete tanto a síntese quanto o reparo do material genético, bloqueando a proliferação tumoral (Singh *et al.*, 2014).

Foi observado também que o composto apresentou seletividade para as linhagens tumorais de câncer. Nas linhagens de câncer de bexiga (J82 e UM-UC-3), o tratamento resultou em uma significativa redução da viabilidade celular, porém o mesmo não foi observado na linhagem MRC5. Esses dados corroboram um estudo realizado por He *et al.* (2018), que demonstrou os efeitos antitumorais do lupeol na linhagem A427, de carcinoma pulmonar humano, no qual o lupeol inibiu de forma significativa o crescimento celular de maneira dose-dependente. No entanto, foi observado uma toxicidade significativamente menor na linhagem MRC5.

A análise dos efeitos do tratamento com lupeol na capacidade proliferativa celular foi realizada por meio do ensaio de sobrevivência clonogênica. Esse método avalia os impactos do tratamento a longo prazo, uma vez que apenas células com potencial proliferativo conseguem formar colônias, enquanto aquelas incapazes de proliferar não conseguem se multiplicar (Tannock, Lee, 2001; Brix, 2021). Na linhagem J82, todas as concentrações testadas resultaram em uma redução significativa da proliferação celular. Na linhagem UM-UC-3, esse efeito foi observado especificamente na maior concentração. Esses achados sugerem que o lupeol possui potencial para inibir a proliferação celular.

Na análise *in silico*, o lupeol apresentou significativo potencial antineoplásico, demonstrando capacidade de inibir a proliferação de células tumorais, e esse resultado foi validado através dos ensaios de citotoxicidade e sobrevivência clonogênica.

A migração celular desempenha um papel fundamental no processo de invasão e metástase tumoral, sendo um dos fatores determinantes para a progressão do câncer. Esse fenômeno pode ser avaliado por meio do ensaio de cicatrização das feridas, no qual se observa a capacidade das células de se deslocarem para preencher uma fenda previamente criada em

uma monocamada celular, antes e após o tratamento (Riahi, 2012). A partir dos experimentos realizados foi possível observar a redução na capacidade migratória em ambas as linhagens celulares após o tratamento com lupeol. Além disso, houve um aumento na morte celular em resposta ao tratamento, dependentes da dose e tempo de exposição. Esse resultado está em concordância com o resultado da análise *in silico*, que demonstrou que o lupeol tem um potencial antimetastático elevado.

Esses achados são reforçados pela redução da densidade celular e por alterações morfológicas indicativas de perda de adesão e morte celular. Entre essas alterações, destacaram a presença de células com formatos irregulares, fragmentos celulares (debris) e a diminuição significativa da densidade celular nos grupos tratados de ambas as linhagens. Esses resultados são compatíveis com capacidade do lupeol como antagonista da integridade da membrana. Esse efeito pode estar diretamente relacionado com a capacidade do lupeol de indução de morte celular programada (apoptose), encontrada na análise *in silico*, que demonstrou a capacidade do lupeol em ativar a caspase-8 (iniciadora apoptótica) e a caspase-3 (executora), que ao catalisar clivagens de proteínas levam a morte celular (Bruce *et al.* 2006 p.1058; Prabhu *et al.*, 2016; Grivicich; Regner; Rocha, 2007).

A ativação anormal da via JAK-STAT está intimamente associada com processos oncogênicos como proliferação celular descontrolada, inibição da apoptose e promoção de metástase em diversos tipos de câncer (Grivennikov e Karin, 2010; Wang *et al.*, 2011). Um estudo realizado em células de carcinoma hepatocelular humano foi observado que o tratamento com lupeol foi capaz de suprimir de maneira dependente do tempo a fosforilação constitutiva tanto de JAK2 quanto de STAT3, interrompendo assim a cascata de sinalização (Sivieen *et al.*, 2014). Outro estudo investigou a inibição da via JAK2/STAT3 e o aumento da sensibilidade de células de câncer de pâncreas à radioterapia através do tratamento com lupeol. Os resultados demonstraram que a inibição da via JAK2/STAT3 pode aumentar significativamente a sensibilidade de células de câncer de pâncreas à radioterapia, abrindo perspectivas para a utilização do lupeol como um potencial modulador dessa via de sinalização em abordagens terapêuticas combinadas (Chen *et al.*, 2022).

Apoiando esses resultados, um estudo realizado em células escamosas da cabeça e pescoço (*in vitro*) observou que o lupeol inibiu o crescimento enquanto preservou células normais. Ele atuou principalmente inibindo a via NF-K, essencial para sobrevivência celular e resistência à quimioterapia. O estudo também realizou testes no modelo *in vivo* e foi observado que o lupeol diminuiu o volume do tumor através da indução de apoptose e necrose e não

mostrou sinais de toxicidade, diferentemente do que foi encontrado no tratamento com a cisplatina isolada. Além disso, no tratamento com a cisplatina apenas 3 de 5 ratos não apresentaram metástases e diminuíram os pesos corporais. O estudo concluiu que a terapia combinada com lupeol e menores doses de cisplatina podem ser eficazes para o tratamento e inibição de metástases (Lee, *et al.*, 2007)

No entanto, desafios relacionados à biodisponibilidade do lupeol limitam sua aplicação clínica. Um estudo realizado por Khatal *et al.* quantificou a concentração de lupeol no plasma de ratos e revelou que a biodisponibilidade do lupeol por via oral era inferior a 1%. Esses resultados destacam a necessidade de desenvolver formulações que melhorem tanto a solubilidade quanto a biodisponibilidade do lupeol. Diante dessa limitação, estratégias para otimizar a formulação do lupeol são alvo de investigação. O uso de nanopartículas surge como uma dessas possibilidades, já que sistemas de liberação baseados nessa tecnologia podem melhorar propriedades como biodisponibilidade e farmacocinética. A exploração de tais abordagens é fundamental para viabilizar as aplicações clínicas do lupeol. (Motallebi *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2020).

Dessa maneira, este estudo reforça o potencial do lupeol como candidato promissor para aplicação como agente antitumoral, destacando seus efeitos antiproliferativos e anti-migratórios em linhagens tumorais de bexiga. Esses resultados, ainda que promissores, combinados com a possibilidade da utilização do composto juntamente a terapias convencionais, posicionam o lupeol como uma alternativa promissora para o tratamento do câncer de bexiga, especialmente em casos resistentes ou com limitações aos protocolos atuais. Esses achados necessitam de investigações mais aprofundadas para confirmar os efeitos observados e elucidar os mecanismos de ação envolvidos.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o lupeol apresenta atividade antitumoral em linhagens cancerosas de bexiga. O tratamento com esse composto resultou na redução da viabilidade e proliferação celular, na diminuição da migração celular e em alterações morfológicas indicativas de morte celular em ambas as linhagens avaliadas. Esses achados contribuem para a compreensão do potencial terapêutico do lupeol, sugerindo sua possível aplicação como uma alternativa promissora para o tratamento do câncer de bexiga.

REFERÊNCIAS

AHMADI, H.; DUDDALWAR, V.; DANESHMAND, S. Diagnosis and Staging of Bladder Cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 35, n. 3, p. 531–541, 1 jun. 2021.

ALBERTS, Bruce *et al.* *Biologia molecular da célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. Recurso eletrônico. Tradução de: Ardala Elisa Breda Andrade *et al.* Revisão técnica: Ardala Elisa Breda Andrade, Cristiano Valim Bizarro, Gaby Renard. ISBN 978-85-8271-423-2.

ALMEIDA, S. H. M.; DERROSE, D.; FREITAS, M. A.; LIBONI, M.; DINARDI, R.; MOREIRA, H. Marcadores em Câncer de Bexiga – Importância da Expressão do p53 como Indicador Prognóstico. *Brazilian Journal of Urology*, v. 26, p. 378-384, 2000

ALLORY, Y. *et al.* Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: high frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. *Eur. Urol.* 65, 360–366 (2014).

ARATANEHEMUGE, Yue *et al.* Induction of apoptosis by lupeol isolated from mokumen (*Gossampinus malabarica L. Merr*) in human promyelotic leukemia HL-60 cells. *Oncology reports*, v. 11, n. 2, p. 289-292, 2004.

BADISA, R. B. *et al.* NIH Public Access. [s. l.], v. 29, n. 8, p. 2993–2996, 2010.

BARSOUM, Rashad S.; ESMAT, Gamal; EL-BAZ, Tamer. Human schistosomiasis: clinical perspective. *Journal of advanced research*, v. 4, n. 5, p. 433-444, 2013.

BOYSEN, R. I.; HEARN, M. T. W. 9. 02 High Performance Liquid Chromatographic Separation Methods. [s. l.], 2010.

BRAY, F. *et al.* Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394–424, 12 set. 2018.

BRIX, N. *et al.* Analysis of clonogenic growth in vitro. *Nature Protocols*, v. 16, n. 11, p. 4963–4991, 25 out. 2021.

BRUCE, A. *et al.* *Biologia Molecular da Célula*. 4. ed. New York: Garland, 2006.

BURGER, Maximilian *et al.* Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *European urology*, v. 63, n. 2, p. 234-241, 2013.

CHANG, S. S. *et al.* Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: AUA/SUO Guideline. *Journal of Urology*, v. 196, n. 4, p. 1021–1029, out. 2016.

CASARES, C. *et al.* Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, v. 269, n. 12, p. 2455–2459, 14 maio 2012.

CHE, S.; WU, S.; YU, P. Lupeol induces autophagy and apoptosis with reduced cancer stem-like properties in retinoblastoma via phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin inhibition. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 74, n. 2, p. 208–215, 22 mar. 2021.

CUMBERBATCH, Marcus G. *et al.* The role of tobacco smoke in bladder and kidney carcinogenesis: a comparison of exposures and meta-analysis of incidence and mortality risks. *European urology*, v. 70, n. 3, p. 458-466, 2016.

DYRSKJØT, L. *et al.* Bladder cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, v. 9, n. 1, p. 58, 26 out. 2023.

FERREIRA *et al.* Mechanisms of cisplatin resistance and targeting of cancer stem cells: Adding glycosylation to the equation. *Drug Resistance Updates*, v. 24, p. 34–54, 1 jan. 2016.

FETT-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 24, n. 2, abr. 2002.

GALSKY, M. D. *et al.* A consensus definition of patients with metastatic urothelial carcinoma who are unfit for cisplatin-based chemotherapy. *Lancet Oncol.* 12, 211–214 (2011).

GILL, B. S.; KUMAR, S.; NAVGEET. Triterpenes in cancer: significance and their influence. *Molecular Biology Reports*, v. 43, n. 9, p. 881–896, 25 jun. 2016.

GRIVICICH, Ivana; REGNER, Andréa; ROCHA, Adriana Brondani da. Morte Celular por Apoptose (Apoptosis: Programmed Cell Death). *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007. 25 jan. 2007.

HE, W.; LI, X.; XIA, S. Lupeol triterpene exhibits potent antitumor effects in A427 human lung carcinoma cells via mitochondrial mediated apoptosis, ROS generation, loss of mitochondrial membrane potential and downregulation of m-TOR/PI3Ksol;AKT signalling pathway. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*, v. 23, n. 3, p. 635–640, 2018.

HECTONICHUS. *Dolychandra unguis-cati* at the botanical garden of Villa Durazzo-Pallavicini, Genova Pegli. 10 maio 2012. 1 fotografia. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dolichandra_unguis-cati_-_Flickr_-_Hectonichus.jpg>. Acesso em: 30 jul. 2025.

HU, Xinzi; LI, Guangzhi; WU, Song. Advances in diagnosis and therapy for bladder cancer. *Cancers*, v. 14, n. 13, p. 3181, 2022.

HUANG, Yanjun; ZHOU, Sichun; HE, Caimei; DENG, Jun; TAO, Ting; SU, Qiongli; DARKO, Kwame Oteng; PENG, Mei; YANG, Xiaoping. Phenformin alone or combined with gefitinib inhibits bladder cancer via AMPK and EGFR pathways. *Cancer Communications*, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 50, 27 jul. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1186/s40880-018-0319-7>.

HUDSON, M. A.; HUMPHREY, P. A.; SWANSON, P. E.; WICK, M. R.; VOLLMER, R. T. Use of p53, MIB-1, EGFR, c-erb B-2, bcl-2 as prognostic markers in bladder cancer patients. *Proceedings of the American Urological Association*, v. 155, Suppl. A, p. 615A, 1996.

INCA. Incidência de Câncer no Brasil. [S. l.: s. n.], 2023.

KAMAT, A. M. *et al.* Bladder cancer. *The Lancet*, v. 388, n. 10061, p. 2796–2810, dez. 2016.

KHATAL, L.; H. MORE, Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of Lupeol in plasma and its application to pharmacokinetic study in rats. *Journal of Chromatography B*, 2019. 1121: p. 58-65.

LEE, T. K. *et al.* Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor-kappaB activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Research*, v. 67, n. 18, p. 8800–8809, 15 set. 2007.

LEI, A. Q.; CHENG, L.; PAN, C. Current treatment of metastatic bladder cancer and future directions. *Expert Review of Anticancer Therapy*, v. 11, n. 12, p. 1851–1862, dez. 2011.

LIMA, Ana Paula Braga; ALMEIDA, Tamires Cunha; BARROS, Tatiane Martins Barcelos; ROCHA, Lorrana Cachuite Mendes; GARCIA, Camila Carriao Machado; SILVA, Glenda

Nicioli da. Toxicogenetic and antiproliferative effects of chrysin in urinary bladder cancer cells. *Mutagenesis*, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 361-371, 13 ago. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geaa021>.

LIU, K. *et al.* Lupeol and its derivatives as anticancer and anti-inflammatory agents: Molecular mechanisms and therapeutic efficacy. *Pharmacological Research*, v. 164, p. 105373, fev. 2021.

LIU, Y. *et al.* Development of High-Drug-Loading Nanoparticles. *ChemPlusChem*, v. 85, n. 9, p. 2143–2157, 31 set. 2020.

LOBO, N. *et al.* Landmarks in the treatment of muscle-invasive bladder cancer. *Nature Reviews Urology*, v. 14, n. 9, p. 565–574, 4 jul. 2017.

MAURYA, S. K. *et al.* Role of lupeol in chemosensitizing therapy-resistant prostate cancer cells by targeting MYC, β -catenin and c-FLIP: in silico and in vitro studies. *In Silico Pharmacology*, v. 10, n. 1, 4 set. 2022.

MOTALLEBI, M. *et al.* Naringenin: A potential flavonoid phytochemical for cancer therapy. *Life Sciences*, v. 305, p. 120752, set. 2022.

MOSCA, L. *et al.* Taxanes in cancer treatment: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Drug Resistance Updates*, v. 54, p. 100742, 1 jan. 2021.

NAEEM, A. *et al.* Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives. [S. l.: s. n.], 2022.

NAZARI, N. A. *et al.* Overcoming Cisplatin's Challenges: A Promising Future in Cancer Care; A Comprehensive Review. *International Journal of Medical Toxicology and Forensic Medicine*, v. 13, n. 04, p. 43478–43478, 28 jan. 2024.

PANDEY, S.; BOURN, J.; CEKANOVA, M. Mutations of p53 decrease sensitivity to the anthracycline treatments in bladder cancer cells. *Oncotarget*, v. 9, n. 47, p. 28514–28531, 19 jun. 2018.

PEREIRA, I. O. A. Investigação do papel funcional do lncRNA JHDM1D-AS1 na quimioterapia com gencitabina em células de carcinoma de bexiga. Orientador: Glenda Nicioli da Silva. 2022. 42 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Escola de Farmácia, Ouro Preto, 2022. Disponível em: <<http://www.monografias.ufop.br/handle/35400000/4238>>. Acesso em: 6 nov. 2023.

PRABHU, B.; SIVAKUMAR, A.; SUNDARESAN, S. Diindolylmethane and Lupeol Modulates Apoptosis and Cell Proliferation in N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl) Nitrosamine Initiated and Dimethylarsinic Acid Promoted rat Bladder Carcinogenesis. *Pathology & Oncology Research*, v. 22, n. 4, p. 747–754, 18 abr. 2016.

RIAHI, R. *et al.* Advances in Wound-Healing Assays for Probing Collective Cell Migration. *Journal of Laboratory Automation*, v. 17, n. 1, p. 59–65, fev. 2012.

RIEGER, K. *et al.* Human bladder carcinoma cell lines as indicators of oncogenic change relevant to urothelial neoplastic progression. *British Journal of Cancer*, v. 72, n. 3, p. 683–690, 1 set. 1995.

SALEEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Letters*, v. 285, n. 2, p. 109–115, nov. 2009.

SAGINALA, K. *et al.* Epidemiology of Bladder Cancer. *Medical Sciences*, v. 8, n. 1, p. 15, 13 mar. 2020.

SEIBERT, J. B. *et al.* Nanostructured Systems Improve the Antimicrobial Potential of the Essential Oil from *Cymbopogon densiflorus* Leaves. *Journal of Natural Products*, v. 82, n. 12, p. 3208–3220, 9 dez. 2019.

SILVA, Glenda Nicioli da; CAMARGO, Elaine Aparecida de; SALVADORI, Daisy Maria Favero. Toxicogenomic activity of gemcitabine in two TP53-mutated bladder cancer cell lines: special focus on cell cycle-related genes. *Molecular Biology Reports*, [S.L.], v. 39, n. 12, p. 10373-10382, 9 out. 2012. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11033-012-1916-1>.

SINGH, D. K. *et al.* (2014). Human DNA ligases: a comprehensive new look for cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*, 34(3), 567–595.

SIVEEN, K. *et al.* A regulação negativa do transdutor de sinal e do ativador da cascata de sinalização da transcrição-3 pelo lupeol inibe o crescimento e induz apoptose em células de carcinoma hepatocelular. *Br J Cancer* 111 , 1327–1337 (2014).

SOHAG, A. A. M. *et al.* Molecular pharmacology and therapeutic advances of the pentacyclic triterpene lupeol. *Phytomedicine*, v. 99, p. 154012, maio 2022.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 fev. 2021.

TANNOCK, I. F.; LEE, C. Evidence against apoptosis as a major mechanism for reproductive cell death following treatment of cell lines with anti-cancer drugs. *British Journal of Cancer*, v. 84, n. 1, p. 100–105, 2001.

TEOH, J. Y.-C. et al. Global Trends of Bladder Cancer Incidence and Mortality, and Their Associations with Tobacco Use and Gross Domestic Product Per Capita. *European Urology*, v. 78, n. 6, p. 893–906, dez. 2020.

TRAN, L. et al. Advances in bladder cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 21, n. 2, p. 104–121, 2 dez. 2020.

UICC (União Internacional Contra o Câncer). TNM: classificação de tumores malignos. 6. ed. Tradução de Ana Lúcia Amaral Eisenberg. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254 p. Tradução de: TNM: classification of malignant tumours. ISBN 85-7318-099-4.

XIA, Y. et al. Natural Phytochemicals in Bladder Cancer Prevention and Therapy. *Frontiers in Oncology*, v. 11, 30 abr. 2021.

XU, N.-W. *et al.* Inhibition of JAK2/STAT3 Signaling Pathway Suppresses Proliferation of Burkitt's Lymphoma Raji Cells via Cell Cycle Progression, Apoptosis, and Oxidative Stress by Modulating HSP70. *Medical Science Monitor*, v. 24, p. 6255–6263, 8 set. 2018.

Yin, M., Joshi, M., Meijer, R. P., Glantz, M., Holder, S., Harvey, H. A., Kaag, M., Fransen van de Putte, E. E., Horenblas, S., & Drabick, J. J. (2016). Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis. *The Oncologist*, 21(6), 708–715.