

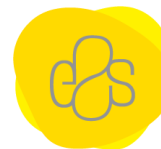


Estudo do papel do ácido betulínico na diferenciação adipocítica e na angiogénese tumoral

Lara Seomara Gomes Azevedo

09/2025





Estudo do papel do ácido betulínico na diferenciação adipocítica e na angiogénese tumoral

Autor

Lara Seomara Gomes Azevedo

Orientadores

Prof. Doutora Sílvia Fernandes, TBIO/RISE-Health, ESS-IPP

Prof. Doutor Ricardo Ferraz, TBIO/RISE-Health, ESS-IPP, LAQV-REQUIMTE

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde – Ramo em Bioquímica Clínica e Metabólica pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.



Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, a Prof. Doutora Sílvia Fernandes, pela sua orientação, disponibilidade, paciência e incentivo ao longo de todas as etapas deste trabalho. Agradeço também ao meu coorientador, Prof. Doutor Ricardo Ferraz, pelas suas contribuições valiosas, disponibilidade demonstrada e pela partilha de conhecimento ao longo da realização deste projeto. Esta foi, sem dúvida, uma experiência muito gratificante tanto a nível pessoal como profissional, que me permitiu desenvolver novas competências, aprender técnicas laboratoriais e experienciar o ambiente de laboratório. Gostaria ainda de agradecer à Prof. Doutora Rosário Martins por me ter acolhido no seu laboratório e por todo o apoio e disponibilidade que demonstrou durante o desenvolvimento do meu projeto.

Quero dedicar um agradecimento à minha colega e amiga de laboratório, Alexandra Fernandes, pela ajuda nas experiências e pela amizade e boa disposição que tornaram os dias de trabalho no laboratório mais leves e motivadores. Agradeço também aos restantes colegas de laboratório, pelo espírito de colaboração e pelo ambiente de entreajuda, que contribuíram para tornar este percurso mais agradável.

Aos meus amigos e colegas de curso, pela amizade, pelas conversas que aliviaram os momentos de maior pressão e pelos jantares que criaram boas memórias a esta etapa do meu percurso. Aos meus melhores amigos, agradeço por estarem sempre presentes, por me animarem nos momentos difíceis e por celebrarem comigo cada pequena conquista.

Um agradecimento especial aos meus pais e à minha irmã, pelo amor incondicional, apoio e compreensão ao longo de todo este percurso académico. Obrigada por acreditarem sempre em mim e por serem a minha maior fonte de força e motivação.



Resumo

O glioblastoma é o tumor maligno mais comum do sistema nervoso central, caracterizando-se por elevada incidência e baixa taxa de sobrevivência. A angiogénese é crucial para a progressão tumoral, enquanto a obesidade surge como um fator de risco, associada a inflamação crónica, que modula, por sua vez, processos como a angiogénese, proliferação celular e a resistência terapêutica. O ácido betulínico (BA) com propriedades anticancerígenas e anti-adipogénicas, é um candidato promissor no contexto do glioblastoma e da obesidade.

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do BA nos processos de viabilidade celular, diferenciação de pré-adipócitos e na angiogénese, utilizando modelos *in vitro*. Assim, avaliou-se o efeito do BA na viabilidade celular da linha celular tumoral U251 e numa linha normal. O efeito do composto na diferenciação adipocítica nas 3T3-L1 foi analisado por microscopia ótica e quantificação após coloração Oil Red O e a angiogénese foi avaliada através do ensaio de formação de tubos em Matrigel.

Os resultados demonstram que o BA reduz significativamente a viabilidade das células U251 de forma dependente da dose, sem afetar a viabilidade das células normais. Observou-se uma diminuição significativa da acumulação de gotículas lipídicas, sugerindo um efeito inibitório na diferenciação adipogénica. Por sua vez, o ensaio de angiogénese, verificou uma redução da formação de redes tubulares em todas as concentrações testadas, sendo o efeito mais marcado a 1 μM .

Em suma, os resultados deste estudo sugerem que o BA possui um perfil promissor como agente terapêutico no glioblastoma, combinando efeitos anti-adipogénicos, anti-angiogénicos e seletividade citotóxica para células tumorais.

Palavras-chave: saúde; glioblastoma; obesidade, ácido betulínico, diferenciação; angiogénese



Abstract

Glioblastoma is the most common malignant tumor of the central nervous system, characterized by high incidence and poor survival. Angiogenesis plays a crucial role in tumor progression, while obesity has emerged as a risk factor associated with chronic inflammation, which in turn modulates processes such as angiogenesis, cell proliferation, and therapy resistance. Betulinic acid (BA), a natural triterpenoid with anticancer and anti-adipogenic properties, is a promising candidate for glioblastoma and obesity.

This study aimed to investigate the effects of BA on viability, preadipocyte differentiation and angiogenesis, using in vitro models. Accordingly, the effect of BA on the viability of the U251 tumor cell line and a normal cell line was evaluated. The compound's effect on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells was evaluated by microscopy and quantified after Oil Red O staining, while angiogenesis was assessed through a Matrigel tube formation assay.

The results show that BA significantly reduced the viability of U251 cells in a dose-dependent manner, without affecting the viability of normal cells. A significant decrease in the accumulation of lipid droplets was observed, suggesting an inhibitory effect on adipogenic differentiation. In the angiogenesis assay, the formation of endothelial tubes was reduced at all tested concentrations with the most pronounced effect observed at 1 μ M.

In conclusion, the results of this study suggest that BA has a promising profile as a therapeutic agent in glioblastoma, combining anti-adipogenic and anti-angiogenic effects with selective cytotoxicity toward cancer cells.

Keywords: Health; glioblastoma; obesity; betulinic acid; differentiation; angiogenesis



Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	O Glioblastoma	1
1.2.	Angiogénese	4
1.3.	A relação entre a obesidade e o glioblastoma	6
1.4.	O ácido betulínico (BA), enquanto agente terapêutico	9
1.5.	Objetivos	13
2.	Materiais e Métodos	14
2.1.	Linhas celulares	14
2.1.1.	Condições de cultura.....	14
2.1.2.	Passagem de Células	14
2.2.	Soluções de Ácido Betulínico (BA)	15
2.3.	Ensaio de MTT	15
2.4.	Diferenciação de 3T3-L1.....	16
2.4.1.	Ensaio de Oil Red O: Coloração e Visualização	16
2.4.2.	Produção de meios condicionados de adipócitos	17
2.4.3.	Análise Metabólica	17
2.5.	Ensaio de Angiogénese	18
2.6.	Análise Estatística	18
3.	Resultados.....	19
3.1.	Viabilidade celular	19
3.2.	Diferenciação das células 3T3-L1.....	21
3.3.	Quantificação da diferenciação dos adipócitos	24
3.4.	Análise e quantificação da formação de tubo endoteliais por Matrigel	25
4.	Discussão	29
5.	Conclusão.....	34
	Referências Bibliográficas.....	35



Lista de abreviaturas

AKT – Proteína Cinase B

BA – Ácido betulínico

Bax – Proteína X associada a Bcl-2 (pró-apoptótica)

Bcl-2 – Proteína 2 da família B-cell lymphoma

bFGF – Fator de crescimento de fibroblastos básico

BHE – barreira hematoencefálica

C/EBP α – Proteína ligadora do CCAAT alfa

CD95-L (Fas-L) – Ligando de CD95 ou Ligando de Fas

CD95 (Fas-R) – Recetor de Fas

DISC – Complexo de sinalização indutor de morte

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DNA – ácido desoxirribonucleico

ECM – Matriz extracelular

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EGFR – Recetor do fator de crescimento epidérmico

EMT – Transição epitelial-mesenquimal

FADD – Proteína de domínio de morte associada a Fas

FBS – Soro fetal bovino

FGF – fator de crescimento de fibroblastos

FGFR – Recetor do fator de crescimento de fibroblastos

HIF-1 α – Fator de transcrição 1- α induzível por hipóxia

IBMX – Isobutilmetilxantina

IDH – Isocitrato desidrogenase

IGF-1 / IGF-2 – Fator de crescimento semelhante à insulina 1 / 2

IGF-1R – Recetor do fator de crescimento semelhante à insulina 1

IGFBP – Proteína de ligação ao IGF

IKK – Cinase inibidora do fator nuclear- κ B

I κ B – Proteína inibidora do NF- κ B

IL-6/17 – Interleucina-6/-17

IMC – Índice de massa corporal



JAK – Janus cinase
JNK – Cinase N-terminal de c-Jun (c-Jun N-terminal Kinase)
LXR α – Recetor X do fígado alfa
MGMT – Metilguanina metiltransferase
MMP – Metaloproteinases de matriz
mTOR – Alvo mecanístico da rapamicina
MTIC – 5-(3-metil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxamida
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NF- κ B – Fator nuclear kappa B
NF1/2 – Neurofibromina 1 e 2
NCS – Soro de bezerro recém-nascido (Newborn Calf Serum)
ObR – Recetor de leptina
p16^{INK4a} – Inibidor da cinase dependente de ciclina 2A
p38/MAPK – Proteína cinase p38 ativada por mitógeno
p53 – Proteína tumoral p53
p70S6K – Proteína cinase ribossomal S6 de 70 kDa
PBS – Solução salina tamponada com fosfato
PI3K – Fosfatidilinositol 3-cinase
PPAR γ – Recetor gama ativado por proliferadores de peroxissoma
PTEN – Fosfatase homóloga à tensina
ROS – Espécies reativas de oxigénio
SNC – Sistema nervoso central
SP – Proteína de especificidade
SREBP-1c – Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c
SRC-1 / SRC-3 – Coativadores do recetor de esteroides 1 / 3
STAT3 – Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TERT – Transcriptase reversa da telomerase
TMZ – Temozolomida
TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa
TP53 – gene supressor tumoral da proteína tumoral p53
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR – Recetor do fator de crescimento endotelial vascular



1. Introdução

1.1. O Glioblastoma

Entre as neoplasias primárias do sistema nervoso central (SNC), o glioblastoma é o tumor maligno mais comum, representando 16% de todas as neoplasias primárias com uma incidência atual de 3,2 por 100 000 pessoas (1). O glioblastoma tende a ser mais incidente em países mais desenvolvidos, nomeadamente Estados Unidos da América, Austrália e Europa do Norte e Ocidental, e a faixa etária predominante para o seu diagnóstico é entre os 55 e 74 anos de idade (2, 3). Além disso, o glioblastoma é mais recorrente nos homens do que nas mulheres (3).

O glioblastoma apresenta um mau prognóstico com uma taxa de sobrevivência média notavelmente baixa (15 a 23 meses), apesar das intervenções terapêuticas atuais, verificando-se que apenas cerca de 30% dos pacientes sobreviveram após um ano, 5% após três e 3% após cinco anos (2, 4). A dificuldade no tratamento eficaz do glioblastoma está associada à sua natureza altamente invasiva e à sua capacidade de recidiva, que desafia as abordagens terapêuticas atuais (5).

Os fatores de risco que levam à transformação maligna do glioblastoma permanecem na sua maioria desconhecidos, mas alguns fatores de risco endógenos e exógenos podem ser associados. Quanto aos fatores endógenos, alguns glioblastomas (1%) podem surgir como consequência de algumas doenças como o síndrome de Li-Fraumeni causado por mutações no gene supressor tumoral da proteína tumoral p53 (TP53), neurofibromatoses tipo I e II causadas por mutações nos genes neurofibromina 1 (NF1) e neurofibromina 2 (NF2) e o síndrome de Turcot causado por mutações no gene de reparação do DNA, polipose adenomatosa do cólon (APC) (6, 7). Em relação aos fatores de risco exógenos, a exposição a agentes cancerígenos ou o tabagismo não foi relatada como possíveis fatores de risco para o glioblastoma (6). No entanto, a exposição à radiação ionizante foi descrita como o fator de risco exógeno mais relevante no glioblastoma (5, 6). No entanto, não há evidências conclusivas que relacione o uso de telemóveis com o desenvolvimento de gliomas, sendo necessários mais estudos para confirmar esta associação (6).

O glioblastoma é considerado um tumor de grau IV (classificação mais agressiva) de acordo com os padrões da Organização Mundial da Saúde e desenvolve-se no cérebro, localizando-se nos hemisférios cerebrais, no tronco encefálico ou no cerebelo (5, 8). Este tipo de cancro apresenta características comuns de malignidade devido ao aumento da atividade mitótica, atipia nuclear, polimorfismo celular, trombose vascular, proliferação microvascular e necrose (2). O glioblastoma apresenta tipicamente crescimento invasivo, alta vascularização e heterogeneidade local, apesar de não estar frequentemente associado à formação de metástases à distância (incidência de 0,4-0,5%)(2, 8, 9).



As metástases do glioblastoma são raras devido à barreira hematoencefálica (BHE), que dificulta a disseminação do tumor (8). Quando há metastização, as células neoplásicas circulam através do líquido cefalorraquidiano ou da corrente sanguínea, podendo atingir os gânglios linfáticos, pulmões, pleura, baço, fígado, ossos, pâncreas e intestino delgado (8).

Os glioblastomas compreendem subtipos primários e secundários, desenvolvidos através de processos genéticos distintos que podem diferir na sua resposta à radio e quimioterapia (10). Os glioblastomas primários, que constituem a maioria dos casos (>90%), surgem *de novo*, em pacientes mais velhos, são de crescimento rápido e resultam da aquisição de várias alterações genéticas (10, 11). Por outro lado, os glioblastomas secundários desenvolvem-se lentamente através da progressão de astrocitomas ou oligodendrogliomas de baixo grau (grau II) ou astrocitoma anaplásico (grau III), em pacientes mais jovens (10). Nos homens, os glioblastomas primários surgem com mais frequência enquanto nas mulheres os mais frequentes são os glioblastomas secundários, sendo a taxa de sobrevivência média dos pacientes com glioblastomas secundários (7,8 meses) significativamente maior que a dos pacientes com glioblastomas primários (4,7 meses) (10).

As células tumorais apresentam elevado índice de proliferação, crescimento e angiogénese anormais devido a alterações genéticas, que são fundamentais para a compreensão do comportamento do tumor. No glioblastoma várias mutações foram identificadas incluindo no isocitrato desidrogenase (IDH), na alfa-talassemia/síndrome de atraso mental ligado ao X (ATRX), no recetor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR), no gene da proteína tumoral p53, no promotor da transcriptase reversa da telomerase (TERT), amplificação do gene do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e perda de heterozigotia do gene da fosfatase homóloga à tensina (PTEN) (5). Além disso, foi evidenciado que os glioblastomas primários e secundários apresentam alterações genéticas distintas. Os glioblastomas primários são caracterizados geneticamente pela perda do cromossoma 10q (70%), mutações de PTEN (25%), amplificação de EGFR (36%) e deleção de p16^{INK4a} (31%) (10). Por outro lado, os glioblastomas secundários são caracterizados por alterações genéticas no TP53 (65%) (10).

A manifestação clínica de um paciente diagnosticado recentemente com glioblastoma é variável, dependendo do local e tamanho do tumor, assim como das áreas do cérebro afetadas (1). Os sintomas mais comuns são o aumento da pressão intracraniana, como cefaleia, e défices neurológicos focais ou progressivos (1). Para o diagnóstico do glioblastoma é indicada a tomografia computadorizada ou ressonância magnética com contraste de gadolínio (2).



Atualmente, o tratamento de glioblastoma centra-se na cirurgia para ressecção total, seguida por uma combinação de radioterapia e quimioterapia com Temozolomida (TMZ), um agente alquilante oral (1).

A TMZ atravessa a BHE e sofre hidrólise espontânea, formando o monometil triazeno 5-(3-metil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxamida (MTIC) (12). Este, por sua vez, é convertido no seu respetivo catião, que tem como função adicionar um grupo metil às purinas e pirimidinas no DNA na posição N7 da guanina (70%) e N3 da adenina (9%) (12). Estas metilações causam danos celulares, paragem do ciclo celular na fase G2/M e apoptose (12). A resposta à terapia com TMZ depende da metilação do promotor da metilguanina metiltransferase (MGMT), tendo sido mostrado por Hegi *et al.* que pacientes com MGMT metilado respondem melhor à terapia com alquilantes e têm melhor prognóstico (13, 14).

Apesar de ser a principal forma utilizada no tratamento do glioblastoma, cerca de metade dos pacientes não respondem a TMZ ou desenvolvem resistência após o tratamento, o que contribui para uma sobrevida média de apenas 15 meses (5, 15). O tratamento do glioblastoma é dificultado pela heterogeneidade intratumoral, que favorece a seleção de subpopulações resistentes, localização protegida do tumor que dificulta a passagem dos agentes terapêuticos e, pelo seu microambiente imunossupressor que favorece a evasão imunológica limitando a eficácia das imunoterapias em desenvolvimento (16). Logo, a identificação de novas abordagens para o tratamento de glioblastoma é urgente.

Outra característica marcante do glioblastoma é a elevada taxa de recidiva, apresentando um tempo médio de recorrência de aproximadamente 6,2 meses (17). Além disso, os tumores recorrentes tendem a apresentar menor sensibilidade à terapia e, atualmente, ainda não existe um tratamento padrão para o glioblastoma recorrente (18). No entanto, existe algumas opções de tratamento para glioblastoma recorrente, que incluem ressecção cirúrgica adicional, reirradiação, quimioterapia como a reintrodução de TMZ, terapia anti-angiogénica, terapia por campo elétrico alternado e ensaios clínicos (19).

A compreensão dos *hallmarks* que impulsionam o início, manutenção e progresso do glioblastoma é crucial para ultrapassar a sua complexidade intrínseca e para o desenvolvimento de terapias mais eficazes (20). Foram identificados 7 *hallmarks* no glioblastoma: 1) vantagens seletivas de crescimento e proliferação; 2) resposta alterada ao *stress*; 3) angiogénese; 4) invasão tecidual e metástase; 5) alteração metabólica; 6) modulação imunológica; 7) Promoção do microambiente tumoral (20). Neste projeto focar-nos-emos na angiogénese.



1.2. Angiogénese

Em condições normais ou patológicas, a formação de novos vasos sanguíneos ocorre a partir de vasos sanguíneos já existentes, um processo que é denominado angiogénese, e que é fundamental para a progressão tumoral (21, 22). Este processo é composto por células endoteliais, fatores de crescimento solúveis, enzimas proteolíticas, proteínas de adesão e componentes da matriz extracelular (ECM) (21). Como o glioblastoma é altamente vascularizado o grau de angiogénese pode estar relacionado com o prognóstico (23).

O microambiente tumoral do glioblastoma é caracterizado por condições hipóxicas (ausência de oxigénio) e necróticas (morte de células ou tecidos), que podem estimular a angiogénese (23). A redução da disponibilidade de oxigénio desencadeia a ativação do fator de transcrição $1-\alpha$ induzível por hipóxia (HIF- 1α), que controla a expressão de componentes da matriz, fatores de crescimento, moléculas de adesão e proteínas metabólicas (21). Em condições de hipóxia, as células tumorais alteram o equilíbrio entre os fatores pró-angiogénicos e anti-angiogénicos, estimulando a secreção de fatores pró-angiogénicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), TGF- β e, angiotensina-1, o que promove a neovascularização (21, 24).

Numa fase tardia da tumorigénese, o crescimento torna-se tão excessivo que supera a capacidade dos vasos suprirem as necessidades metabólicas, permitindo que a hipóxia estimule a angiogénese, induzindo a transcrição do VEGF através de HIF- 1α (22). A ligação do VEGF aos recetores de tirosina-cinase envolve três domínios estruturais: um domínio extracelular para a ligação do VEGF, um domínio transmembranar e um domínio intracelular com atividade de tirosina-cinase (25). Ao se ligar ao domínio extracelular do recetor, o VEGF ativa a enzima tirosina-cinase no domínio intracelular, que fosforila os resíduos de tirosina e ativa várias vias de sinalização (25).

A angiogénese começa com a secreção dos fatores pró-angiogénicos por parte das células tumorais para o meio extracelular que levam à ativação da proliferação das células endoteliais (26). Posteriormente, as enzimas proteolíticas degradam a ECM, permitindo que as células endoteliais ativadas se desloquem guiadas pelo gradiente quimiotático e se organizem em tubos endoteliais, estruturas semelhantes a vasos (24). Por fim, para a formação de novos vasos sanguíneos, ocorre a mobilização de perícitos e células musculares lisas (24). Na Figura 1 está representado o processo da angiogénese. As células tumorais secretam o VEGF, que se difunde e se liga ao recetor VEGFR2 das células endoteliais. Essa ativação promove a degradação da ECM por enzimas proteolíticas, permitindo que células endoteliais adquiram um fenótipo migratório e avancem em direção ao tumor. À medida que

avançam, essas células se organizam para formar estruturas tubulares, que darão origem a novos vasos sanguíneos funcionais

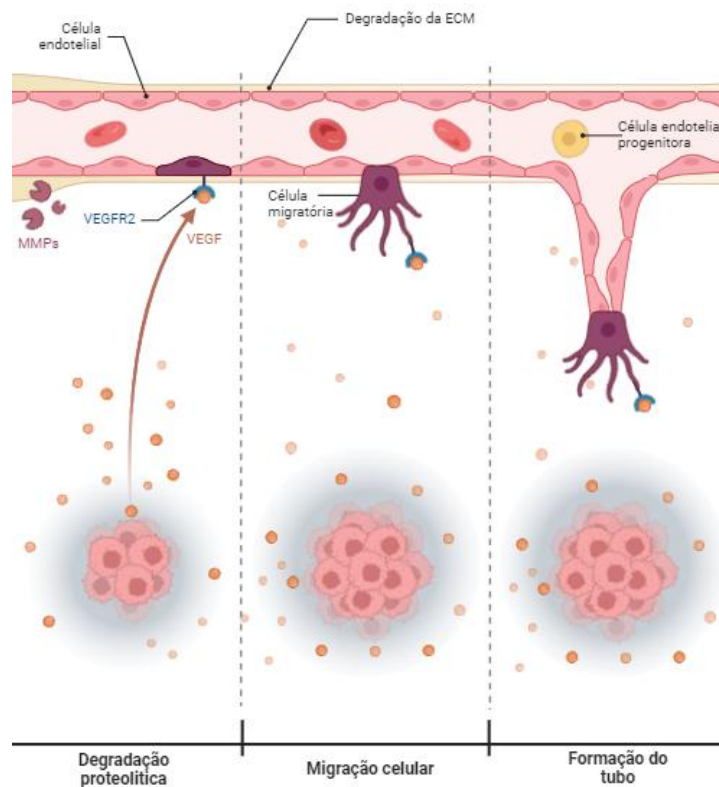


Figura 1. Processo de angiogênese, evidenciando o papel de VEGF para a formação do vaso sanguíneo, criado em Biorender.com

As células-tronco tumorais em hipóxia diferenciam-se em células progenitoras endoteliais que, dão origem a novos vasos sanguíneos, imaturos e anormais (21). A elevada permeabilidade desses vasos ao plasma e às proteínas plasmáticas provoca edema e coagulação extravascular, levando à alteração do fluxo sanguíneo o que compromete a distribuição de nutrientes e oxigênio, culminando em regiões necróticas dentro do tumor (21, 24). Em condições hipóxicas, a isquemia ativa o HIF-1 α , desencadeando a formação de novos vasos sanguíneos (24). Consequentemente, essa vasculatura desorganizada do tumor facilita a invasão e a evasão ao sistema imunológico, e, por sua vez, a resistência à terapia (21).

Por essa razão, tratamentos antiangiogênicos têm sido essenciais no tratamento do glioblastoma, permitindo a normalização da vasculatura, inibição a sua proliferação e a redução da permeabilidade dos vasos e do edema causado pelo tumor (27). Sendo o VEGF um importante regulador da angiogênese,



fármacos anti-VEGF têm sido bastante utilizados no tratamento do glioblastoma, que inibem tanto o VEGF como o seu recetor, VEGFR (25). O *bevacizumab* é um anticorpo monoclonal e foi o primeiro fármaco anti-VEGF aprovado pela *Food and Drug Administration* americana (26). Este fármaco inibe a formação de vasos dependentes de VEGF e a permeabilidade vascular, permitindo prolongar a sobrevivência de pacientes com glioblastoma recentemente diagnosticado e recorrente (28).

No entanto, no contexto do glioblastoma, pode surgir resistência às terapias anti-angiogénicas, verificando-se que as células endoteliais microvasculares tornam o tumor resistente tanto à quimioterapia como às terapias anti-angiogénicas, o que contribui para a sua recorrência (27). Além disso, devido à complexidade da rede reguladora da angiogénese, a inibição de uma única via de sinalização pode ser compensada por outras (26). Por exemplo, a angiogénese e a progressão tumoral podem ainda ser promovidos por VEGF-C e VEGF-D, mesmo quando VEGF-A é inibido (26). Logo, estudos adicionais têm de ser realizados para que se possa encontrar novas abordagens terapêuticas para melhorar o tratamento da angiogénese tumoral.

1.3. A relação entre a obesidade e o glioblastoma

A obesidade corresponde a um estado de acúmulo excessivo de gordura corporal, sendo classificada por um índice de massa corporal (IMC) superior a 30 Kg/m² (29). Mais de 890 milhões de adultos no mundo já apresentam obesidade, e as projeções indicam que esse número poderá atingir cerca de 1,02 bilhão em 2030 (30). A obesidade é mais prevalente em países mais desenvolvidos, mas a sua incidência tem aumentado em países em desenvolvimento (31).

Além de estar associada a diversos problemas graves de saúde como hipertensão, diabetes mellitus tipo II, hiperlipidemia e doenças cardiovasculares e respiratórias, a obesidade é um fator de risco significativo para vários tipos de cancro (32, 33). De facto, foi demonstrado que a obesidade causa aproximadamente 20% de todos os casos de cancro, embora o impacto da obesidade no risco de desenvolvimento de cancro varie entre diferentes tipos de tecidos (34).

A relação entre a obesidade e o glioblastoma é uma área emergente de investigação na comunidade científica. Embora esta associação ainda não seja totalmente compreendida, alguns estudos sugerem que a obesidade pode estar correlacionada com um pior prognóstico em pacientes com gliomas e a uma menor sobrevivência global em pacientes com glioblastoma (35, 36). Além disso, evidências indicam que o excesso de peso corporal influencia o desenvolvimento do glioblastoma, verificando-se que um IMC elevado aos 18 anos está associado a uma maior incidência de desenvolver a doença em idade adulta (37). Por outro lado, no estudo de Chambless *et al.* não foi observado que um IMC elevado



afetou as taxas de sobrevivência global, o que evidencia que mais estudos sobre a relação da obesidade com o glioblastoma são necessários para uma melhor compreensão desta relação (38).

A obesidade desempenha um papel significativo na progressão do glioblastoma, principalmente através da indução de um ambiente inflamatório. A produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alfa ($TNF-\alpha$), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-17 (IL-17), está relacionada com a resistência à insulina e favorecem a angiogénese e a invasão celular do glioblastoma (35, 39). Além disso, essas citocinas aumentam a produção de proteína C-reativa e amiloide sérico A, ambas associadas à progressão tumoral (40). A inflamação crónica de baixo grau ativa células inflamatórias, cuja secreção de mediadores inflamatórios contribui para a proliferação, angiogénese e capacidade invasiva das células do glioblastoma (41). Adicionalmente, a ativação da via de sinalização cinase c-Jun N-terminal (JNK), particularmente a JNK3, pelo excesso de interleucinas, promove o crescimento tumoral no glioblastoma (35).

Paralelamente, a obesidade promove a hiperinsulinemia, caracterizada pelo aumento dos níveis de insulina devido à produção excessiva de insulina pelas células β do pâncreas e a resistência à insulina (42). Esse aumento promove a produção do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) no fígado, acompanhado por níveis reduzidos de proteínas de ligação ao IGF (IGFBP), o que leva a um excesso de IGF-1 e IGF-2 circulantes (42). Esses fatores ativam o recetor de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1R), estimulando vias proliferativas e anti-apoptóticas nos tecidos tumorais (43).

Outro mecanismo relevante envolve a via fosfatidilinositol 3-cinase/proteína cinase B (PI3K/AKT), um dos principais eixos moleculares envolvidos na progressão do glioblastoma. A ativação dessa via, impulsionada pelo aumento da insulina e IGF-1, que ocorre na obesidade, favorece a proliferação e migração celular no glioblastoma (44, 45). No glioblastoma, há também um aumento da expressão de IGFBP-2, proteína que está intimamente ligada à ativação da via PI3K/AKT, que modula a sinalização do IGF/IGFR e interage com fatores-chave como o fator nuclear κB ($NF-\kappa B$) e a integrina $\alpha 5\beta 1$, promovendo a invasão, proliferação e resistência à apoptose (44, 46). Adicionalmente, o aumento da insulina na obesidade pode impactar indiretamente a expressão de IGFBP-2 ao modular os níveis de PTEN, um supressor tumoral que regula negativamente a via PI3K/AKT (46). No glioblastoma, existe uma relação inversa entre PTEN e IGFBP-2 que sugere um ciclo disfuncional, no qual o IGFBP-2 pode suprimir PTEN, intensificando a sinalização oncogénica e agravando a progressão tumoral, por meio de mecanismos que incluem alterações na interação com a ECM, proliferação celular descontrolada e resistência a terapias (46).



O tecido adiposo desempenha um papel crucial na progressão do glioblastoma, em particular pela desregulação das adipocinas, responsáveis pelo armazenamento de energia na forma de triglicéridos em gotículas lipídicas (39). A acumulação de nutrientes, causada pela obesidade, ativa importantes vias de sinalização metabólicas, entre as quais se destacam a JNK, NF- κ B e a proteína cinase R (39). A ativação dessas vias promove um estado inflamatório crónico de baixo grau, uma vez que reduzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias, resultando na remodelação do tecido adiposo e na adiposopatia—um processo caracterizado por disfunções no tecido adiposo e pela disseminação de adipócitos disfuncionais (39, 47). Essas alterações contribuem para o aumento da migração celular, proliferação tumoral e formação de metástases, impulsionados pela secreção de hormonas derivadas do tecido adiposo, fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias (47).

Além disso, a obesidade leva ao aumento da adiposidade, que, por sua vez, leva à progressão tumoral através da secreção desregulada de leptina e adiponectina, duas hormonas com funções opostas (48). Enquanto a adiponectina apresenta propriedades anti-tumorais e diminui na obesidade, a leptina tem efeitos pró-tumorais e os seus níveis aumentam significativamente, levando a uma razão leptina/adiponectina elevada, a qual se relaciona com uma maior agressividade no cancro (48). Tal acontece porque essas adipocinas estimulam respostas inflamatórias e alteram a atividade metabólica das células, participando na promoção de um fenótipo tumoral mais agressivo (49).

No contexto do glioblastoma, a leptina exerce um papel ainda mais relevante. A ativação do recetor da leptina (ObR) estimula diretamente a proliferação celular, a sobrevivência e a migração de células tumorais, especificamente as do glioblastoma (50). A ligação da leptina ao ObR promove a sua dimerização e a alteração conformacional de Janus cinase 2 (JAK2), desencadeando a ativação da via Janus cinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (JAK/STAT3) (50). Além disso, a leptina também ativa outras vias de sinalização intracelular, incluindo NF- κ B, proteína cinase ativada por mitogénio p38 (p38-MAPK), JAK/STAT3 e fosfatidilinositol 3-cinase/proteína cinase B/alvo mecanístico da rapamicina/proteína cinase ribossomal S6 de 70 kDa (PI3K/Akt/mTOR/P70S6K), todas envolvidas na proliferação, migração e invasão celular do glioblastoma (45, 50). Adicionalmente, a expressão da leptina/ObR é elevada no glioblastoma, sendo relacionada com o grau histológico do tumor, e verificou-se que uma expressão elevada de ObR conduz a resistência ao TMZ, o que reduz a eficácia do tratamento e leva a progressão tumoral (51, 52). Assim sendo, em diferentes linhagens de glioblastoma, o aumento da expressão de leptina/ObR leva à ativação contínua de STAT3 e Akt, comprometendo a função do supressor do ciclo celular Rb e favorecendo a proliferação celular descontrolada (50).



As mudanças estruturais do tecido adiposo na obesidade incluem a promoção da angiogénese, isto é, o tecido adiposo promove a formação de novos vasos sanguíneos, enquanto as células endoteliais desse tecido induzem a diferenciação de pré-adipócitos (53). Como já foi mencionado, a leptina e o ObR são expressos em linhagens celulares de glioblastoma, o que conduz à formação de tubos endoteliais e à proliferação de células endoteliais, logo a sobreexpressão da leptina induzida pela obesidade pode ser um dos fatores pelos quais a obesidade promove a angiogénese (54). Em conjunto com os fatores pró-angiogénicos VEGF e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), a leptina promove a formação e crescimento dos vasos sanguíneos e a permeabilidade vascular, estimulando a angiogénese (55). De facto, o estudo de Ferla, *et al.* demonstrou que a leptina pode estimular o aumento dos níveis de mRNA de VEGF em células de glioblastoma, promovendo a proliferação de células endoteliais e a formação do tubo endotelial, sendo um dos mecanismos possíveis pelo qual a obesidade estimula a angiogénese (55).

Em suma, a obesidade emerge como um importante fator modulador do microambiente tumoral no glioblastoma, promovendo inflamação crónica, angiogénese, proliferação celular e resistência às terapias através de múltiplas vias moleculares, como a ativação das vias JNK, PI3K/Akt/mTOR e JAK/STAT3. Embora os mecanismos que interligam obesidade e glioblastoma ainda não estejam totalmente elucidados, a crescente evidência científica aponta para a necessidade de explorar estratégias terapêuticas capazes de contrariar estes efeitos pró-tumorais, o que poderá incluir compostos naturais. Assim, compreender o impacto da obesidade na progressão do glioblastoma não só é fundamental para o prognóstico dos doentes, mas também para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes e personalizadas.

1.4. O ácido betulínico, enquanto agente terapêutico

Ao longo do tempo, vários compostos naturais têm sido utilizados para o tratamento de várias doenças, devido às suas múltiplas propriedades biológicas com aplicação médica (56). Estes compostos têm demonstrado potencial no tratamento de doenças oncológicas, podendo também contribuir para superar limitações associadas às terapias convencionais (57).

O ácido betulínico (BA, ácido 3β -hidroxi-lup-20 (29) -en-28-óico) é um triterpenóide pentacíclico de origem vegetal, obtido através da extração de bétulas, síntese química ou biotransformação microbiana (5, 56). O BA apresenta atividades antitumoral, antiinflamatória, antiviral, antimalárica, antibacteriana e antioxidante, o que lhe confere um grande potencial terapêutico (58). Na figura 3 está representada a estrutura química de BA.

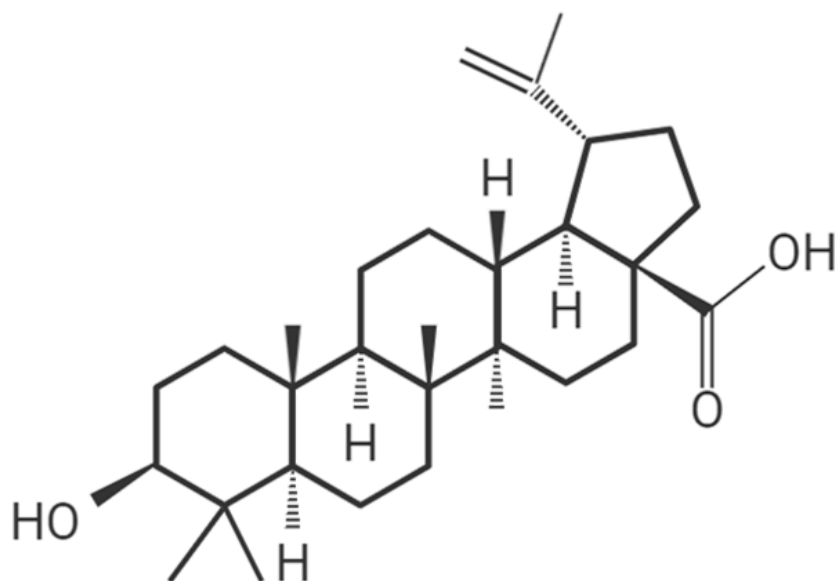


Figura 2. Estrutura química do ácido betulínico (BA).

A maior vantagem do BA é que apresenta elevada citotoxicidade para diversas células tumorais humanas, enquanto a sua ação é menos pronunciada em células normais (59). Alguns estudos realizados com BA revelam que este inibe a proliferação de várias linhas celulares tumorais (60). Um aspeto particularmente importante do BA é a sua capacidade para atravessar a BHE, o que reforça um avanço frente à limitação central das terapias destinadas a doenças neurológicas, como é o caso do glioblastoma (5).

O BA é capaz de ativar a via mitocondrial da apoptose em células tumorais o que evidencia o seu efeito citotóxico (56). A apoptose consiste numa série de reações que culminam com a morte de células danificadas, sendo dividida em duas vias: a via extrínseca (ou via do recetor de morte) e a via intrínseca (ou via mitocondrial) (61).

A via extrínseca começa com a ligação do ligando CD95-L (FasL) ao seu respetivos recetor CD95 (FasR), desencadeia a formação do complexo de sinalização indutor de morte (DISC), mediado pela proteína de domínio de morte associado a Fas (FADD) (62). Esse complexo ativa as caspases iniciadoras, como a caspase-8 ou caspase-10, as quais, promovem a ativação de caspases efetoras, responsáveis pela degradação de componentes intracelulares e pela morte celular (62, 63).

A via intrínseca é desencadeada por danos no DNA e depende do equilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas como a proteína X associada a Bcl-2 (Bax) e anti-apoptóticas como proteína 2 da família B-cell lymphoma (Bcl-2) (62). Sob condições de stress celular, Bax inibe Bcl-2 promovendo a



permeabilização de membrana externa mitocondrial e a secreção do citocromo c para o citosol (62). Esse interage com o fator de ativação da protease da apoptose 1, formando um complexo chamado apoptossoma, que recruta e ativa caspases iniciadores (caspase-9), iniciando uma cascata de caspases culminando na ativação da caspase-3 e na execução da morte celular (63).

Em diversos tipos de cancro, a ativação da via NF- κ B está associada a alterações epigenéticas, transição epitelial-mesenquimal (EMT), angiogénese, metástases, resistência a fármacos e imunossupressão (58, 64). A fosforilação das proteínas inibidoras do NF- κ B (I κ B) é mediada pela atividade da cinase inibidora do fator nuclear- κ B (IKK), que promove a degradação proteossomal de I κ B (58, 65). Com essa degradação, os dímeros de NF- κ B são secretados e translocam para o núcleo, onde a subunidade p65 liga-se a sequências específicas de DNA e regula positivamente genes-alvo envolvidos na proliferação e sinalização anti-apoptótica (58). O BA induz a apoptose ao reduzir os níveis nucleares de NF- κ B/p65, diminuindo a atividade de IKK e impedindo a fosforilação de I κ B na serina 32/36 e a sua degradação (60). Assim, a inibição da via NF- κ B pelo BA contribui para a indução da apoptose e supressão da proliferação celular (64). Além disso, o BA também interfere na sinalização da via STAT3, que regula processos como a diferenciação, proliferação, invasão e angiogénese em diversos tumores (5).

O BA estimula a produção de ROS e a reduz o potencial da membrana mitocondrial (58). O aumento da produção de ROS pode induzir stress oxidativo na mitocôndria, resultando em danos em componentes celulares como o DNA, proteínas ou lípidos (66). O BA regula, ainda, o crescimento de células tumorais através da inibição de fatores de transcrição da família da proteína de especificidade (Sp) que resulta na diminuição da transcrição das ciclinas e levando à paragem do ciclo celular (58).

Quanto ao efeito do BA na angiogénese foi demonstrado que esse composto exerce respostas anti-angiogénicas. Sob condições de hipoxia, o BA diminuiu os níveis de VEGF e de HIF-1 α , resultando na diminuição da formação de novos vasos (67). A inibição da expressão de VEGF pelo BA ocorre por meio da ativação da degradação seletiva dependente do proteossoma dos fatores de transcrição da família Sp (Sp1, Sp3 e Sp4) (56). Adicionalmente, em hipoxia, o BA interfere com a via de sinalização STAT3/HIF-1 α /VEGF, inibindo a ativação de STAT3 e bloqueando a ligação de STAT3 e HIF-1 α ao promotor do VEGF (67).

O BA também demonstrou efeitos terapêuticos como composto contra a obesidade. Quando testado em ratinhos obesos, o tratamento com BA levou à redução dos níveis totais de colesterol e triglicédeos, promovendo a diminuição do peso corporal, do acúmulo de gordura abdominal, da glicemia e dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicédeos (68, 69). Além disso, o BA também conduz à



diminuição da acumulação de lipídios e da lipogénese, o que destaca a sua importância na regulação do metabolismo lipídico (69). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que o BA exerce um efeito anti-adipogénico, reduzindo de forma dose-dependente a acumulação de gotículas lipídicas e o tamanho celular, através da diminuição da expressão dos fatores nucleares recetor gama ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR γ) e recetor X do fígado alfa (LXR α), bem como pela modulação de co-ativadores nucleares como coativadores do recetor de esteroides 1 (SRC-1) e coativadores do recetor de esteroides 3 (SRC-3), o que evidencia o seu potencial na regulação molecular da adipogénese e do metabolismo lipídico (70). Como o efeito do BA na obesidade ainda não está completamente elucidado, são necessários estudos adicionais para compreender melhor seus mecanismos de ação e seu potencial terapêutico.

No caso específico do glioblastoma, foi relatado que o BA aumenta a sensibilidade das células tumorais à quimioterapia e radioterapia, potencializando os efeitos dessas terapias e, quando usado em combinação com o TMZ, intensifica o efeito citotóxico de forma sinérgica (5). Além disso, o BA é capaz de inibir a viabilidade de células do glioblastoma através da indução da apoptose bem como suprimir os níveis intracelulares de NF- κ B e a sua translocação, o que sugere que a apoptose mediada pelo BA está associada com a inibição da ativação de NF- κ B (71).

Algumas investigações já foram realizadas para analisar o efeito do BA no glioblastoma. Por exemplo, no estudo de Lo *et al.* verificou-se que o BA atua de forma seletiva contra células tumorais cerebrais, reduzindo significativamente a viabilidade de diversas linhagens de células de glioblastoma, incluindo células resistentes à TMZ, sem causar citotoxicidade relevante em astrócitos normais (72). Além disso, Jeremias *et al.* demonstraram que o BA induziu apoptose em 90% das células primárias de glioblastoma multiforme, um efeito consideravelmente superior ao observado com as estratégias terapêuticas convencionais (73). Adicionalmente, Rzeski *et al.* observaram que o BA apresenta um efeito antiproliferativo significativo em culturas primárias de glioblastoma multiforme, além de induzir a redução da expressão do gene Bcl-2 e aumentar a expressão de Bax, alterando a razão Bax/Bcl-2 e promovendo apoptose (74). Assim sendo, estes dados reforçam o potencial do BA como uma estratégia terapêutica promissora no tratamento do glioblastoma, sugerindo que poderá constituir uma alternativa ou complemento valioso às terapias atualmente disponíveis.

Apesar dos avanços significativos na compreensão do glioblastoma e das suas terapias disponíveis, existem ainda grandes desafios clínicos, como a resistência terapêutica e a recorrência tumoral. Assim, é necessária a investigação adicional e dirigida a compostos naturais com potencial para ser incluídos em abordagens terapêuticas que visem melhorar os resultados clínicos do glioblastoma.



Dada a agressividade e a elevada taxa de recidiva do glioblastoma, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, que visem a inibição da angiogénese e invasão é imperativa. O BA destaca-se como um composto promissor, com capacidade de atravessar a BHE e induzir apoptose seletiva em células tumorais, além de inibir a angiogénese e a invasão tumoral. Portanto, investigações adicionais sobre os mecanismos moleculares subjacentes à ação do BA são essenciais para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, visando melhorar os resultados clínicos e a qualidade de vida dos pacientes com glioblastoma.

1.5. Objetivos

O objetivo deste projeto consiste em avaliar e quantificar os efeitos do BA, utilizando modelos *in vitro*, nos processos de diferenciação de pré-adipócitos e angiogénese. Deste modo, o estudo visa elucidar os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos anti-angiogénicos e anti-adipogénicos do BA, contribuindo para explorar o seu potencial na terapêutica do glioblastoma num contexto de obesidade.



2. Materias e Métodos

2.1. Linhas celulares

Neste estudo, foram utilizadas duas linhas celulares: de U251MG (glioblastoma humano), e 3T3-L1 (pré-adipócitos derivados de fibroblastos embrionários de ratinho). As células foram gentilmente cedidas pela Professora Doutora Sara Granja (ICV/3Bs, Universidade do Minho) e 3T3-L1 foram usados como linha celular normal nos ensaios realizados. As bEnd.3 (células endoteliais derivadas de cérebro de ratinho) foram adquiridas à ATCC.

2.1.1. Condições de cultura

As células foram mantidas em meio de *Eagle modificado por Dulbecco* (DMEM, VWR™, USA), com alta concentração de glucose (4,5 g/L), L-glutamina e piruvato de sódio. Dois stocks de soluções de DMEM com 10% e 20% de soro fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich™, Alemanha) e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina, PAN™ Biotech, Alemanha) foram preparados em condições assépticas.

As linhagens celulares foram armazenadas a -80°C e suspensas em meio DMEM sem soro para centrifugação a 800 RPM durante 5 minutos a 4°C (Eppendorf, Alemanha; 5430R). Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, o pellet ressuscitado em 5 mL de meio DMEM com 20% de FBS e as células cultivadas em frascos de cultura T75 (Thermo Fisher Scientific, EUA). As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO_2 (PHCbi, MCO-170AICD-PE) e 24 horas depois, o meio foi trocado para meio DMEM com 10% de FBS.

Para o congelamento das células, 950 μL de células suspensas em DMEM com 20% de FBS e 50 μL de dimetilsulfóxido (DMSO; Fisher Chemical, Reino Unido) foram adicionados a tubos criogénicos e armazenadas a -80°C .

2.1.2. Passagem de células

A divisão das células foi realizada quando o frasco de cultura atingiu a confluência (>80% da superfície adesiva do recipiente de cultura coberta por células). Deste modo, o meio antigo foi removido, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas com 2 mL de solução de tripsina-EDTA por aproximadamente 5 minutos. Após a incubação, 8 mL de meio foi adicionado às células de modo a interromper a ação da tripsina. De seguida, as células foram aspiradas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, a 20°C . Posteriormente, o meio antigo foi descartado e as células foram ressuscitadas em meio apropriado (DMEM com 10% de FBS). Da mistura, 20 μL da



suspensão celular foi misturada com 20 μL de corante Azul de Tripiano, e 10 μL foram transferidos para a Câmara de Neubauer para contagem das células. Por fim, de acordo com a concentração final de células determinada, um volume definido da suspensão foi adicionado ao volume necessário de meio, transferido para o frasco de cultura ou placa de ensaio, e incubado a 37°C e 5% de CO_2 , ou adicionado a frascos criogénicos para congelamento de células.

2.2. Soluções de Ácido Betulínico (BA)

A solução stock de BA (Sigma-Aldrich®, EUA) foi preparada na concentração 1mM em 50 mL de DMSO e foi filtrada numa câmara de fluxo laminar através de um filtro de 0,22 μm .

Numa câmara de fluxo laminar, foram preparadas as soluções correspondentes aos tratamentos a realizar, num volume de 30 mL cada. Devido à instabilidade da solução aquosa de BA, tornou-se necessário que todas as soluções fossem realizadas 100 vezes mais concentradas do que as concentrações usadas para os ensaios (1, 2.5, 10 e 20 μM) e preparadas por diluição da solução stock com DMSO previamente filtrado (75). Uma vez que o DMSO é tóxico para as células em cultura, os ensaios foram feitos de forma a garantir uma concentração final de DMSO de 1%. Assim, soluções de DMEM com BA 10 vezes mais concentrada são preparadas de forma extemporânea nas concentrações 1, 2.5, 10 e 20 μM , diluindo as soluções 10 vezes mais concentradas em DMEM sem soro, para garantir uma concentração de 1% de DMSO na solução final, devido à sua toxicidade celular.

2.3. Ensaio de MTT

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Para este ensaio, 100 μL de uma suspensão celular a uma concentração de 1×10^5 células/mL foram adicionados a uma placa de 96 poços (TPP, Techno Plastic Products AG, Suíça) que foi incubada durante 24 horas a 37 °C e 5% de CO_2 . Após esse período de tempo, o meio de cultura foi substituído por soluções de BA (preparadas em meio DMEM sem soro), nas concentrações de 1, 2.5, 10 e 20 μM . Uma solução de DMEM com 50% de DMSO e 1% de DMSO, e DMEM apenas foram usadas como controlo positivo, controlo negativo (C) e branco, respetivamente, para o ensaio em questão. As células foram então incubadas a 37 °C, com 5% de CO_2 , durante 24 e 48 horas. Após o tratamento, 20 μL de solução de MTT (1 mg/mL) foi adicionado a cada poço, e as placas foram reincubadas durante 2 horas e 30 minutos para permitir a formação de cristais de formazan. Os cristais foram então dissolvidos com 150 μL de DMSO e a absorvância de cada poço foi medida a 570 nm



(Thermo Scientific™, EUA; Multiskan SkyHigh). Os ensaios foram realizados com quatro réplicas de cada tratamento. Foram realizadas quatro experiências independentes.

2.4. Diferenciação de 3T3-L1

Para o descongelamento, as células 3T3-L1 foram transferidas diretamente para um frasco de cultura contendo meio DMEM suplementado com 10% de Newborn Calf Serum (NCS) e incubadas a 37 °C, com 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio foi substituído, e as células foram mantidas em cultura, com troca de meio a cada 2 dias.

Os pré-adipócitos 3T3-L1 foram cultivados e deixados crescer até atingirem a confluência, em placas de 24 e 6 poços. No dia 0, a diferenciação foi iniciada com a adição de uma mistura hormonal composta por 10 µg/mL de insulina (PAN-Biotech, Alemanha), 1 µM de dexametasona (Sigma-Aldrich®, EUA) e 0,25 mM de isobutilmetilxantina (IBMX, BIOSYNTH s.r.o., Eslováquia). Três dias depois (dia 3), o meio de diferenciação foi substituído por meio de manutenção, meio completo suplementado apenas com 10 µg/mL de insulina. O processo de diferenciação ficou completo no dia 6, controlado pela visualização de gotículas lipídicas localizadas a nível intracelular. Poços de controlo sem diferenciação são usados para comparar e confirmar o processo de diferenciação.

O processo de diferenciação com e sem tratamento com BA foi realizado em 4 ensaios independentes, para as concentrações de 1, 2.5 e 10 µM do composto. O grupo C refere-se ao grupo de controlo, que corresponde ao grupo não tratado.

2.4.1. Ensaio de Oil Red O: Coloração e Visualização

A acumulação de lípidos nos adipócitos foi visualizada e confirmada usando a coloração de *Oil Red O*. As células 3T3-L1 foram lavadas duas vezes com PBS e, em seguida, fixadas com formol a 10%, neutro-tamponado, durante 30 min à temperatura ambiente. Depois de fixadas, as células foram lavadas com água destilada e incubadas em isopropanol a 60% (Sigma-Aldrich®, 67-63-0) durante 5 minutos e coradas com a solução trabalho de *Oil Red O* (Sigma-Aldrich®, 01391-500 mL) durante 10 minutos. Após novas lavagens em água destilada para remoção do excesso de corante, as células foram contrastadas com Hematoxilina de Gill. Por fim, o excesso de corante nuclear foi removido em água destilada. As células foram observadas ao microscópio ótico (Invitrogen™ EVOS™ XL Core Imaging System), evidenciando-se as gotículas lipídicas a vermelho e os núcleos a azul. Foram realizados 3 ensaios independentes. Foram capturadas imagens das células a 10x, 20x e 40x, num total de 6-8 campos por



condição de tratamento. A quantificação das gotículas lipídicas foi realizada usando o software Fiji (ImageJ, versão 2.14.0/1.54f, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Em primeiro lugar, foi aplicada a ferramenta *Colour Deconvolution* para otimizar a segmentação das gotículas coradas com *Oil Red O*. Posteriormente, foi utilizada a macro de ImageJ descrita por Kaczmarek *et al.* (2024), a qual permitiu a análise automática do número e da área das gotículas lipídicas (76).

2.4.2. Produção de meios condicionados de adipócitos

Subsequente à diferenciação das 3T3-L1 foi realizada a produção de meios condicionados de adipócitos. Assim, no dia 6 de diferenciação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas em DMEM sem soro. Após 24 horas, o meio foi recolhido das culturas de adipócitos, centrifugado a 3000 g durante 5 minutos, e o sobrenadante (meio condicionado de adipócitos maduros) foi armazenado a -80°C para ensaios subsequentes. Foram realizados quatro ensaios independentes.

2.4.3. Análise Metabólica

Os meios condicionados de adipócitos maduros foram recolhidos e centrifugado a 3000 g durante 5 minutos, e 50 μL do sobrenadante foi adicionado a eppendorfs cap-lock contendo 450 μL metanol (HPLC grade) previamente arrefecido em gelo seco. Os eppendorfs foram imediatamente imersos em gelo seco e armazenados a -80°C para posterior análise metabólica baseada em Plataforma de Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massa em Tandem (LC-MS/MS).

Para análise metabólica do conteúdo intracelular, as células cultivadas em placas de 6 poços foram preparadas da seguinte forma: o meio de cultura foi cuidadosamente removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. De seguida, adicionou-se 1 mL de metanol a 80% (grade HPLC), previamente mantido a -80°C e conservado em gelo seco, a cada poço. A placa foi imediatamente colocada sobre gelo seco e incubada durante 10 minutos, sendo previamente selada com papel aderente para evitar evaporação do solvente. Após a incubação, o conteúdo de cada poço foi homogeneizado por pipetagem repetida e transferido para eppendorfs cap-lock de 1,5 mL. As amostras foram centrifugadas a 2.000 $\times\text{g}$ durante 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para novos eppendorfs cap-lock de 1,5 mL, mantendo sempre em gelo seco. Por fim, os eppendorfs foram imediatamente armazenadas a -80°C até posterior análise metabólica.



2.5. Ensaio de Angiogénese

O ensaio de formação de tubos endoteliais em Matrigel foi utilizado para analisar a angiogénese *in vitro*. Para o revestimento da placa com membrana basal, foi usada uma placa de 24 poços em que cada poço foi preenchido com 125 μ L de Matrigel previamente descongelado a 4 °C. Todo o material se encontrava previamente arrefecido a 4 °C, e a pipetagem foi feita cuidadosamente garantindo a uniformidade da distribuição do gel no fundo da placa. De seguida, a placa foi incubada a 37 °C, 5% CO₂ durante 30 minutos.

Paralelamente, procedeu-se à preparação das células endoteliais, bEnd.3. Inicialmente, o meio de cultura foi removido do frasco e as células bEnd.3 foram lavadas com PBS estéril. De seguida, adicionou-se solução de tripsina-EDTA ao frasco de cultura com incubação a 37°C, 5% CO₂ durante 3-5 minutos. De seguida, adicionou-se 9 mL de meio para neutralizar a tripsina e a suspensão celular foi transferida para um tubo de falcon de 15mL, que foi centrifugado a 1500 rpm, durante 5 minutos. O pellet obtido foi ressuscitado em 4 mL de meio, e procedeu-se à contagem de células.

Para o ensaio, as 50 000 células endoteliais foram diluídas em meio não suplementado e expostas a diferentes concentrações de BA: 1, 2.5 e 10 μ M, o grupo C refere-se ao grupo de controlo, que não contém BA. Em seguida, as células foram semeadas sobre o Matrigel gelificado, adicionando-se 450 μ L da suspensão celular por poço. A placa foi incubada a 37 °C, com 5% de CO₂, durante 4 a 6 horas, permitindo a formação de estruturas tubulares. O ensaio foi apenas realizado uma vez.

Foram capturadas imagens das células a 10x, 20x e 40x, num total de 3-4 campos por condição de tratamento. A análise das imagens foi realizada no software Fiji (ImageJ, versão 2.14.0/1.54f, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Inicialmente, os tubos foram marcados a vermelho. De seguida, no Fiji, realizou-se a separação dos canais, selecionando o canal vermelho. Posteriormente, recorreu-se à ferramenta, *Analyze Particles*, através da qual foi obtido o comprimento dos tubos.

2.6. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi efetuada através do software GraphPad Prism (versão 10.1.2, San Diego, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para avaliar a normalidade dos dados, foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. De acordo com os resultados, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis ou o One-way ANOVA para comparação das médias entre os grupos de tratamento, considerando um nível de significância (alfa) de 0,05.



3. Resultados

3.1. Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi analisada através do ensaio de MTT, utilizando diferentes concentrações de BA: 1, 2.5, 10 e 20 μM . O tratamento das células foi realizado durante 24 e 48 horas, e a resposta celular foi avaliada em comparação com o grupo de controlo. Os resultados são apresentados nos gráficos das Figuras 3 e 4.

A partir do gráfico da Figura 3, verifica-se que, após 24h de tratamento, a viabilidade celular diminuiu em ambas as linhagens celulares. No entanto, os resultados da viabilidade das células 3T3-L1 não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo de controlo ($p > 0.05$). Por outro lado, as células U251 apresentaram uma maior sensibilidade ao composto, observando-se uma redução significativa na viabilidade celular nas doses de 2.5 μM , 10 μM e 20 μM , quando comparado ao controlo (C) ($*p < 0.05$). Na dose de 1 μM , observou-se uma tendência para a significância estatística com um $p = 0.0691$, comparativamente ao grupo de controlo (C). As células U251 tratadas com 20 μM de BA mostraram uma redução significativa na viabilidade celular, sendo este efeito mais pronunciado em comparação com as células 3T3-L1 tratadas com a mesma dose de BA.

Através do gráfico da Figura 4, verifica-se após 48 horas de tratamento com BA a viabilidade celular das células U251 manteve-se inferior à das 3T3-L1 para todas as concentrações de BA avaliadas. A viabilidade das células 3T3-L1 não apresentou variações significativas em relação ao grupo de controlo (C) para todas as concentrações testadas ($p > 0.05$). No entanto, as células U251 apresentaram uma redução significativa da viabilidade apenas na concentração de 10 μM ($*p < 0.05$), em comparação com o grupo de controlo (C). Tendo em conta os resultados obtidos, as doses de BA 1, 2.5 e 10 μM foram selecionadas para realizar os ensaios seguintes por estarem acima do IC50 do composto, para ambas as linhagens celulares.

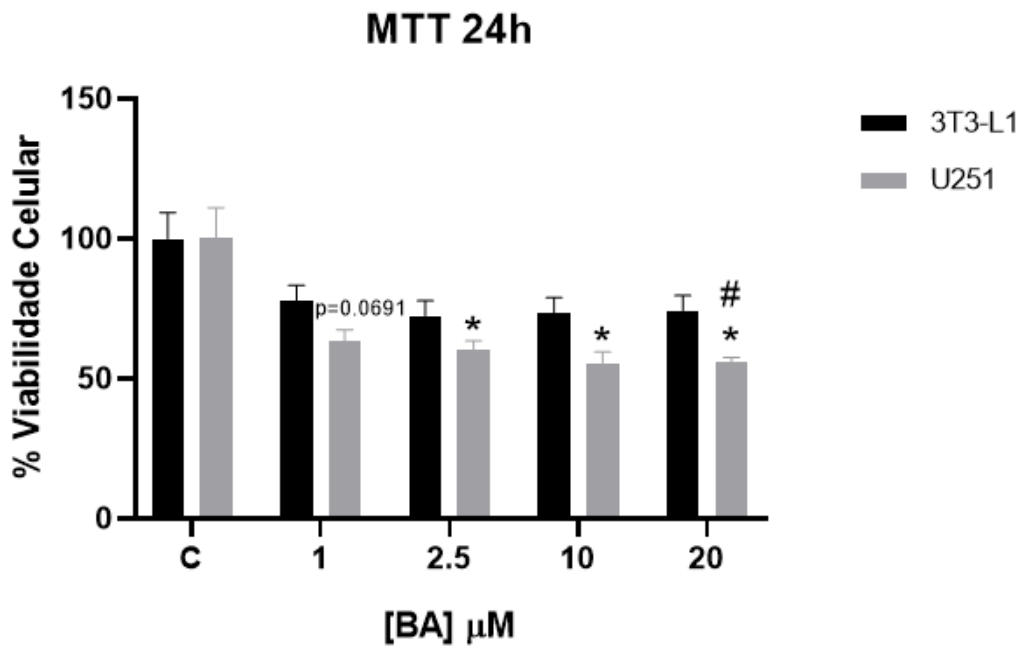


Figura 3. Efeitos citotóxicos do BA na viabilidade celular das células 3T3-L1 e U251, determinados pelo ensaio de MTT. As células foram tratadas com várias concentrações (1 μM – 20 μM) de BA durante 24 horas. Os resultados são apresentados sobre a forma de média \pm desvio padrão de quatro experiências independentes. (* $p < 0,05$ em comparação com o grupo de Controlo; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo não tumoral (3T3-L1)).

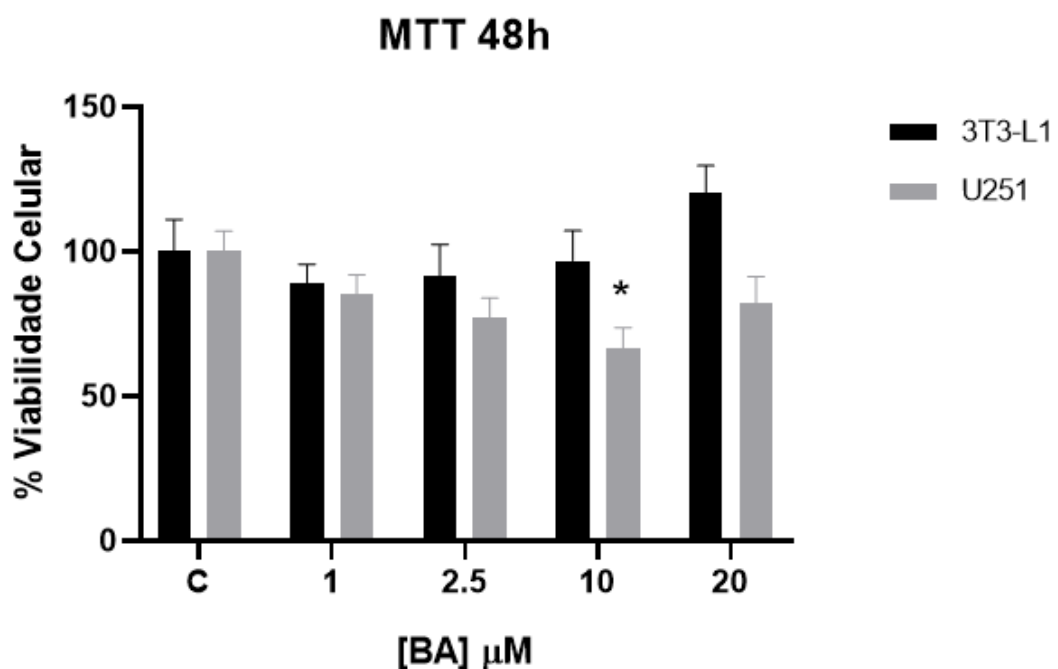


Figura 4. Efeitos citotóxicos do BA na viabilidade celular das células 3T3-L1 e U251, determinados pelo ensaio de MTT. As células foram tratadas com várias concentrações (1 μM – 20 μM) de BA durante 48 horas. Os resultados são apresentados sobre a forma de média \pm desvio padrão de quatro experiências independentes. (* $p < 0,05$ em comparação com o grupo de Controlo).

3.2. Diferenciação das células 3T3-L1

A diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 foi monitorizada por microscopia ótica, durante os 7 dias de duração do ensaio (Figura 5). As imagens obtidas permitiram observar alterações morfológicas características da adipogénese ao longo do tempo.

No grupo de controlo sem estímulo de diferenciação, verifica-se que as células mantiveram uma morfologia fibroblástica típica ao longo de todo o ensaio (dias 0, 3 e 6), sem evidência de acumulação lipídica ou alterações morfológicas indicativas de diferenciação.

Em contraste, no grupo de controlo com estímulo de diferenciação, foram observadas alterações morfológicas progressivas e compatíveis com a diferenciação em adipócitos maduros. No dia 3, as células apresentavam morfologia mais arredondada e no dia 6, observou-se a presença evidente de gotículas lipídicas intracelulares de diferentes tamanhos, predominantemente organizadas em torno do núcleo, indicando um fenótipo de adipócitos 3T3-L1 maduros. No fim do ensaio, verificou-se que cerca de 60% das células apresentavam um fenótipo de adipócito maduro.

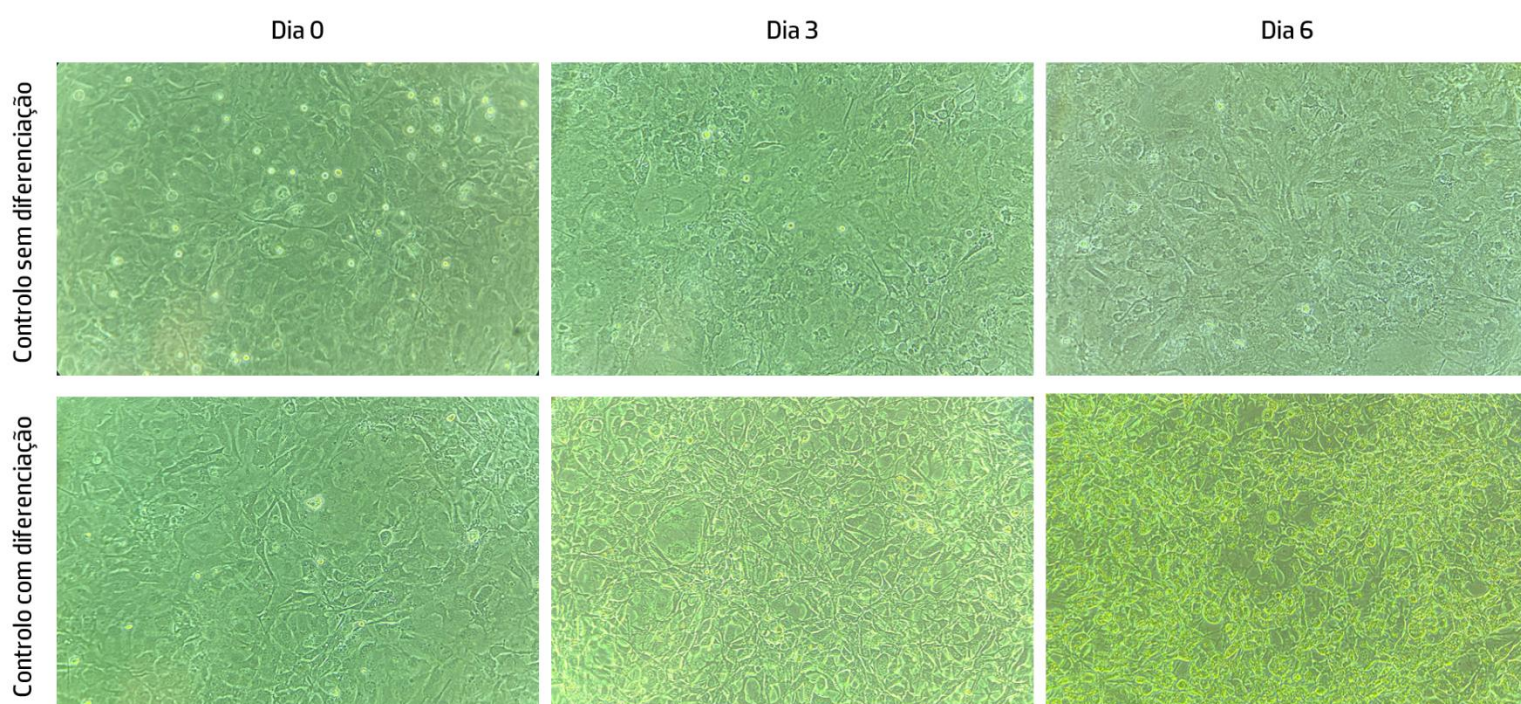


Figura 5. Morfologia das células 3T3-L1 durante o processo de diferenciação adipogénica. As imagens mostram as células em três momentos distintos: dia 0 (início da diferenciação), dia 3 (após tratamento com a mistura hormonal) e dia 6 (após manutenção com insulina). Imagens obtidas por microscopia ótica na ampliação de 20x.

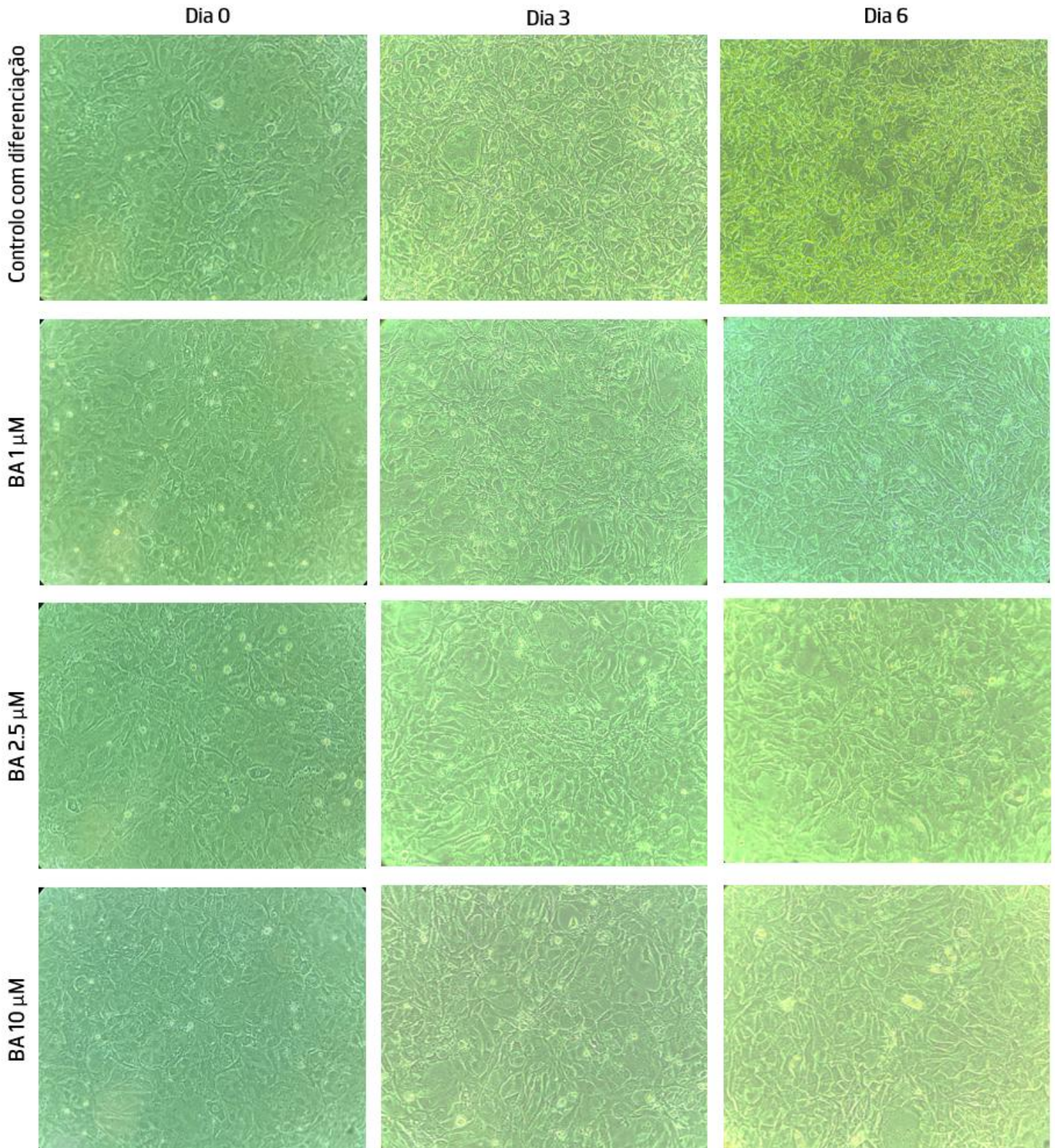


Figura 6. Efeito do BA na diferenciação de células 3T3-L1 ao longo do tempo. As células foram tratadas com diferentes concentrações de BA (1 μ M, 2.5 μ M e 10 μ M) e acompanhadas nos dias 0, 3 e 6 de indução da diferenciação adipogénica. Imagens obtidas por microscopia ótica com ampliação de 20x.



Além disso, os pré-adipócitos 3T3-L1 foram ainda tratados com diferentes concentrações de BA: 1 μM , 2.5 μM e 10 μM , permitindo avaliar o seu possível efeito na diferenciação adipogénica. A progressão da diferenciação foi acompanhada por microscopia ótica (Figura 6).

A partir do dia 3, começaram a observar-se alterações morfológicas compatíveis com o início da diferenciação, nomeadamente alterações na forma das células e o início do arredondamento celular. Estas alterações tornaram-se mais evidentes no dia 6, com a presença clara de gotículas lipídicas intracelulares em todas as doses testadas. No entanto, a partir das imagens obtidas é possível verificar-se que a acumulação de gotículas lipídicas tende a diminuir com o aumento da concentração do BA, o que pode ser indicativo do potencial efeito anti-adipogénico do composto nas células 3T3-L1, de forma dependente da dose e do tempo de exposição.

De modo a confirmar a acumulação de gotículas lipídicas durante a diferenciação adipogénica, as células 3T3-L1 foram submetidas a coloração com *Oil Red O* no final do ensaio (dia 7). A coloração permitiu identificar gotículas lipídicas intracelulares (vermelho) e núcleos celulares (azul), permitindo uma análise qualitativa do grau de diferenciação adipocitária entre os diferentes grupos experimentais (Figura 7).

O grupo controlo com estímulo de diferenciação apresentou intensa coloração vermelha, com grande número de células contendo múltiplas gotículas lipídicas, distribuídas de forma característica no citoplasma, compatível com um fenótipo de adipócitos maduros. Este resultado está de acordo com as observações morfológicas obtidas previamente por microscopia ótica.

Nos grupos tratados com BA, observou-se uma redução progressiva na intensidade da coloração com *Oil Red O*, à medida que a concentração do composto aumentava. Em 1 μM de BA, ainda se verificou presença visível de gotículas lipídicas em número considerável, embora inferior ao controlo. Já nos grupos tratados com 2.5 μM e 10 μM , a coloração foi visivelmente mais ténue, com menor número e tamanho de gotículas lipídicas, sugerindo uma inibição parcial da diferenciação adipogénica nestas condições (de acordo com a Figura 7).

Estes resultados reforçam os dados morfológicos anteriormente observados e indicam que BA poderá exercer um efeito inibitório sobre a acumulação lipídica durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1, de forma dependente da dose.

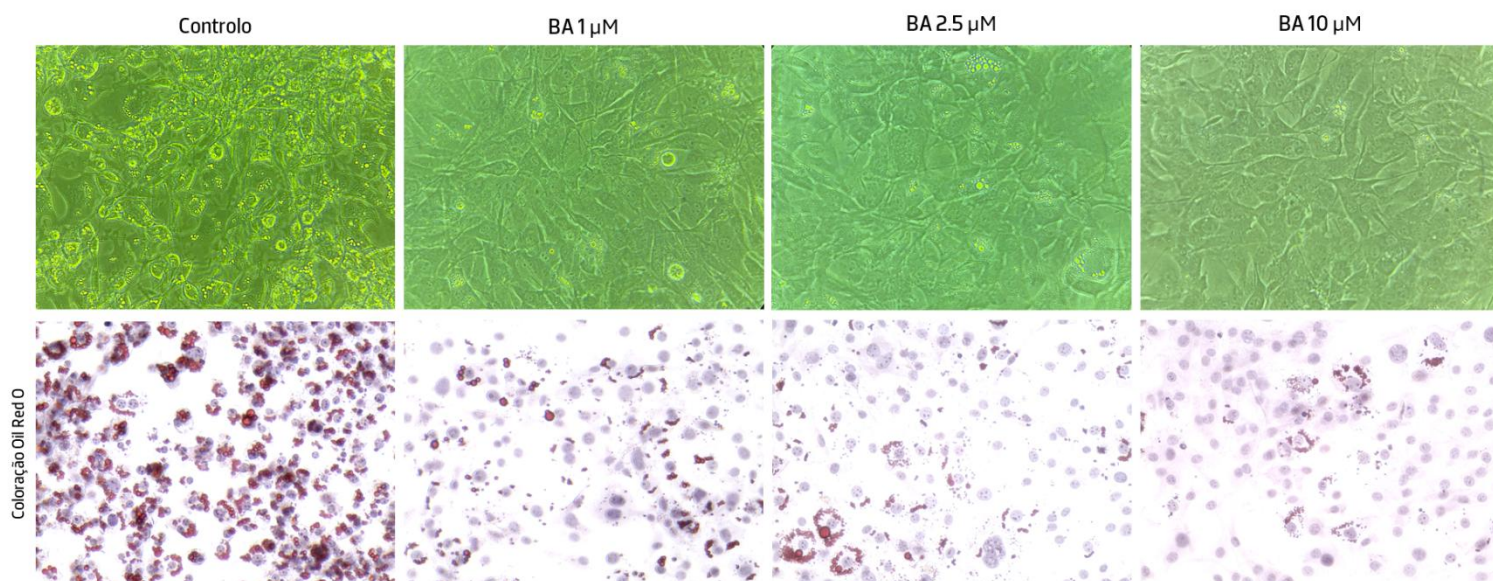


Figura 7. Avaliação da diferenciação adipogénica de células 3T3-L1 tratadas com BA, antes e após coloração com Oil Red O. As imagens superiores mostram a representação microscópica da morfologia celular antes da coloração, enquanto as imagens inferiores representam os mesmos grupos após coloração com *Oil Red O*, utilizada para evidenciar a acumulação de gotículas lipídicas intracelulares. Ampliação: 40x.

3.3. Quantificação da diferenciação dos adipócitos

Para complementar a análise qualitativa da diferenciação adipogénica das células 3T3-L1, procedeu-se à quantificação do número e da área das gotículas lipídicas intracelulares a partir das imagens obtidas com coloração por *Oil Red O*, recorrendo ao software Fiji (Figura 8).

No grupo de controlo com diferenciação, verificou-se uma elevada acumulação lipídica, traduzida por um número e área de gotículas lipídicas superiores em relação aos grupos tratados com BA. O tratamento com BA resultou numa diminuição dose-dependente do número e da área das gotículas lipídicas em relação ao controlo diferenciado. O número de gotículas foi o parâmetro mais afetado, reduzindo-se para cerca de 20–30% dos valores de controlo em todas as concentrações testadas. A análise da área das gotículas apresentou uma redução menos pronunciada, variando entre 30–50% face ao controlo.

Nas diferentes concentrações de BA observou-se uma redução do número e da área das gotículas lipídicas em comparação com o grupo de controlo diferenciado. Embora as reduções tenham sido consistentes em todas as doses, o efeito foi mais pronunciado na concentração de 10 μM , onde tanto o número como a área das gotículas atingiram valores próximos de 20–30% do controlo. Apesar de não terem alcançado significância estatística, os resultados obtidos para 10 μM apresentaram uma tendência

para a significância, com valores de p de 0,0545 para o número de gotículas lipídicas e de 0,0667 para a área.

Em suma, estes resultados indicam que a presença de BA compromete a acumulação lipídica durante a diferenciação adipogénica em células 3T3-L1. O efeito inibitório é mais evidente na formação de novas gotículas lipídicas (número), embora também se observe uma redução na sua dimensão (área), de forma dependente da dose.

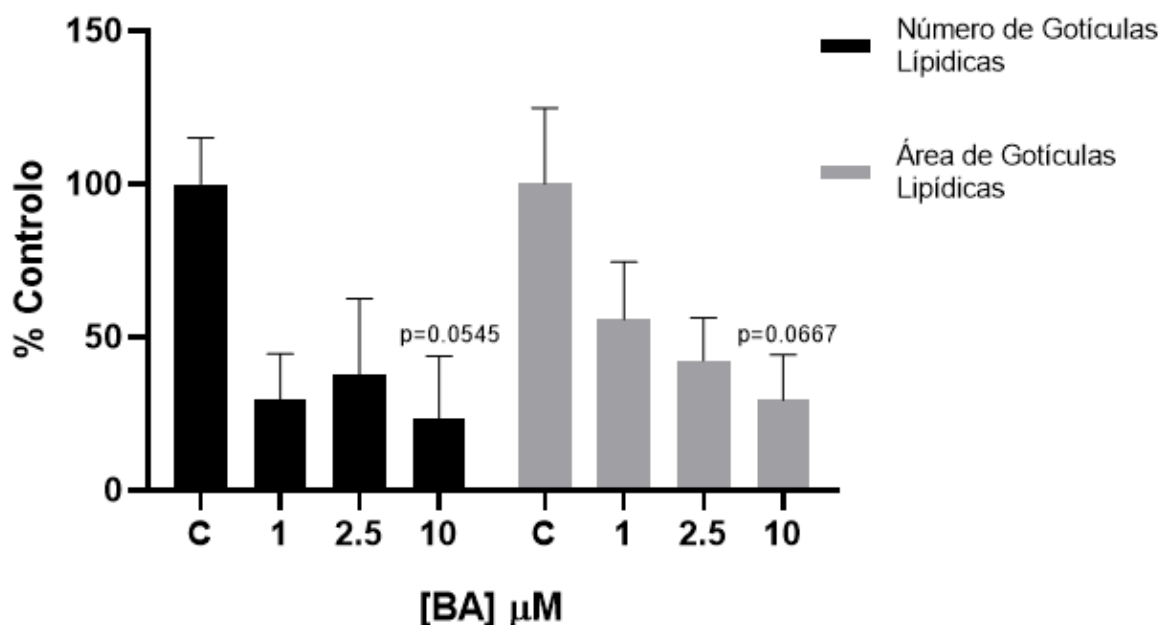


Figura 8. Quantificação do número (A) e da área (B) das gotículas lipídicas em células 3T3-L1 após 7 dias de diferenciação. As células foram tratadas com diferentes concentrações de BA (1, 2.5 e 10 μM) e comparadas com o grupo controlo diferenciado (C). A análise foi realizada a partir das imagens coradas com Oil Red O utilizando o software ImageJ. Os valores representam a média \pm SEM de três ensaios independentes.

3.4. Análise e quantificação da formação de tubos endoteliais por Matrigel

A angiogénese *in vitro* foi avaliada através do ensaio de formação de tubos endoteliais em Matrigel, permitindo observar alterações morfológicas dependentes da concentração de BA nas células endoteliais, bEnd.3. Este ensaio foi realizado uma única vez, tendo sido capturadas imagens de 3 a 4 áreas diferentes de cada poço para análise, sendo, portanto, resultados preliminares (Figura 9).

No grupo de controlo, as células bEnd.3 formaram uma rede tubular bem organizada, caracterizada por múltiplos segmentos longos e nós bem definidos, com elevado número de ramificações, o que é característico da angiogénese normal.

Na concentração de BA de 1 μM , observou-se uma redução acentuada na complexidade da rede tubular, com menor número de ramificações e descontinuidade de tubos, comparativamente com o grupo de controlo. A concentração de 2.5 μM também levou a uma diminuição da formação de tubos, com presença de segmentos tubulares mais curtos e menos interligados, em grau semelhante ou superior ao observado a 1 μM . Por fim, manteve-se a redução da formação de tubos, observando-se redes menos densas e pouco organizadas em relação ao controlo.

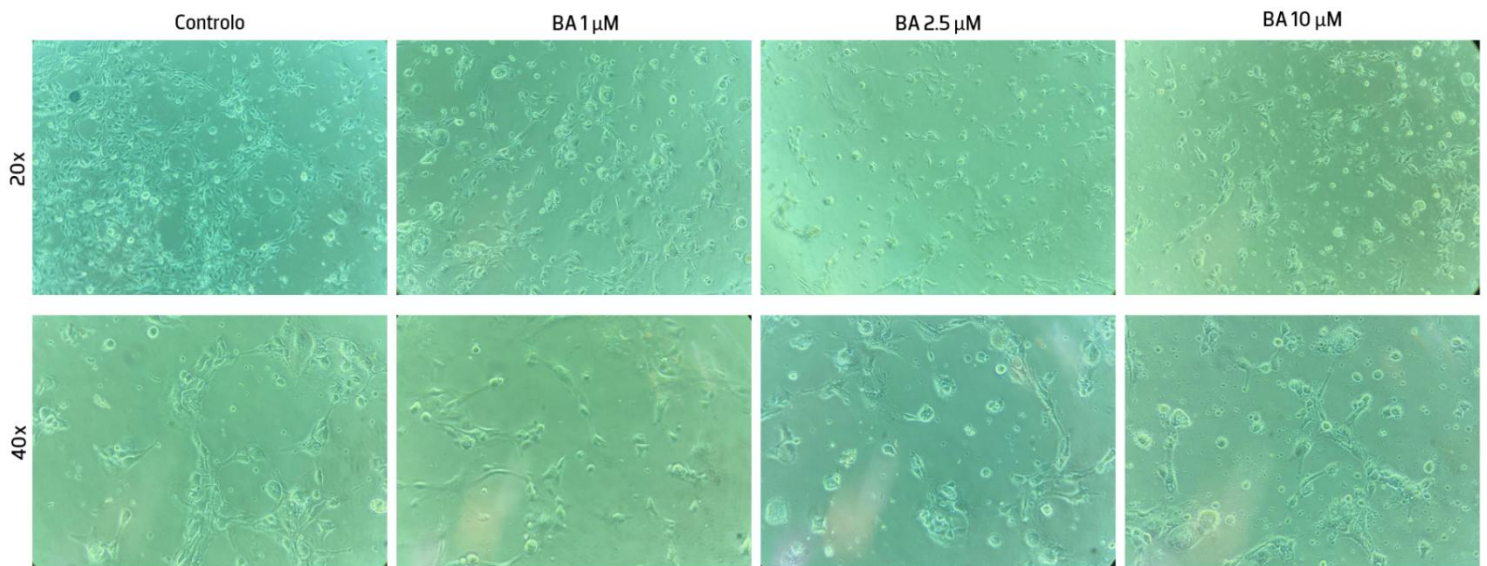


Figura 9. Avaliação qualitativa da angiogénese *in vitro*. Imagens representativas de células endoteliais expostas a diferentes concentrações de BA: controlo, 1 μM , 2.5 μM e 10 μM , observadas na ampliação de 20 \times e 40 \times .

Para confirmar as observações morfológicas, o comprimento dos tubos foi medido através do software Fiji, após marcação manual das estruturas (**Figura 10**).

A quantificação do comprimento dos tubos confirmou o observado microscopicamente, demonstrando uma redução estatisticamente significativa da formação de tubos endoteliais na concentração de BA de 1 μM ($p < 0,05$). Já, as concentrações de 2.5 μM e 10 μM mostraram apenas uma tendência para diminuição do comprimento dos tubos, sem atingir significância estatística, comparativamente com o grupo de controlo (**Figura 11**).

Assim sendo, os resultados indicam que a BA inibe a capacidade angiogénica das células endoteliais em todas as concentrações testadas, sendo o efeito mais marcado a 1 μM .

Controlo

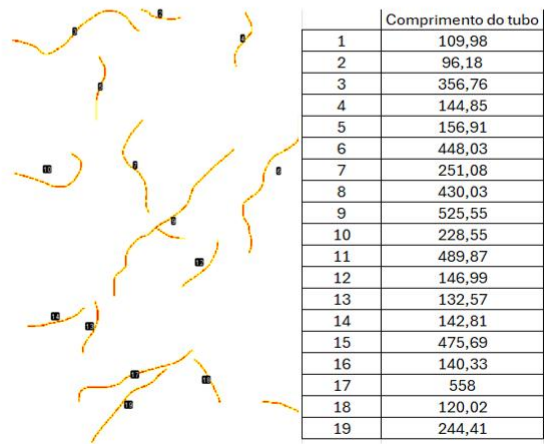
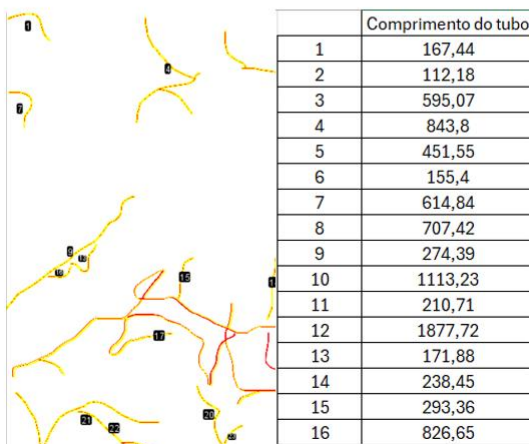
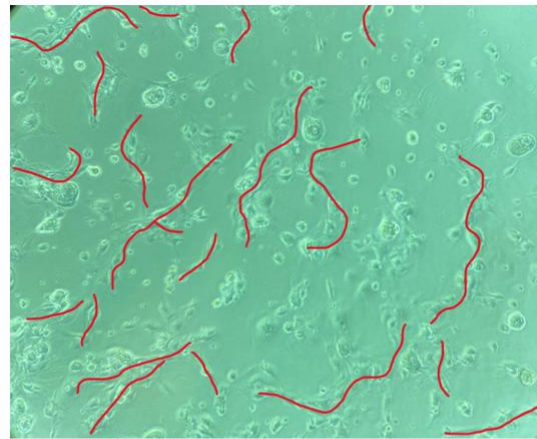
BA1 μM 

Figura 10. Análise da formação de tubos no ensaio de angiogénese. Na linha superior encontram-se as imagens originais com marcação manual dos tubos (a vermelho). Na linha inferior apresenta-se a segmentação obtida pelo software *Fiji*, após análise automática, com identificação dos tubos e a tabela fornecida pelo *Fiji* com o comprimento dos tubos, em pixels.

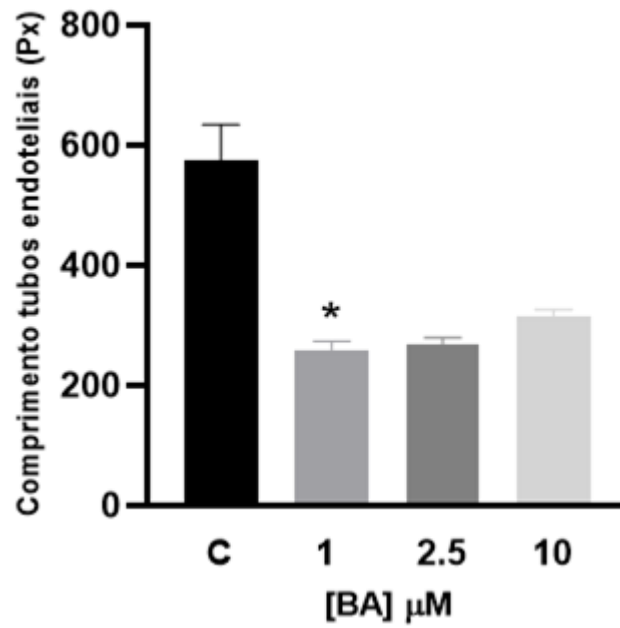


Figura 11. Comprimento dos tubos endoteliais, medido em pixels (Px), obtido após tratamento com diferentes concentrações de BA. A avaliação reportou-se a apenas um ensaio, em que foram capturadas imagens de 3 a 4 áreas diferentes de cada poço. Os resultados são apresentados sobre a forma de média \pm desvio padrão de uma experiência independente. (* $p < 0,05$ em comparação com o grupo de Controlo).



4. Discussão

O glioblastoma, o tipo mais comum e agressivo de tumor cerebral primário, continua a representar um desafio terapêutico devido à sua elevada taxa de recidiva e à eficácia limitada das abordagens terapêuticas atualmente disponíveis. O BA, um composto natural, tem demonstrado atividades anticancerígenas em várias neoplasias, além de efeitos anti-adipogénicos. A sua capacidade de atravessar a BHE reforça o seu potencial como candidato promissor para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra o glioblastoma (5). O presente estudo teve como objetivo avaliar as propriedades anti-tumorais do BA, nomeadamente os seus efeitos sobre a viabilidade em células de glioblastoma, a angiogénese, bem como sobre a diferenciação de pré-adipócitos.

Neste estudo, observou-se que o BA reduziu a viabilidade celular de forma dependente da concentração nas células de glioblastoma U251, não tendo sido observadas alterações significativas nas células normais, os pré-adipócitos 3T3-L1, em nenhuma das doses testadas. Estes resultados sugerem que o BA exerce um efeito citotóxico seletivo sobre células tumorais, não afetando significativamente a viabilidade das células normais, característica altamente desejável no contexto terapêutico. Após 24 horas de tratamento, verificou-se uma diminuição significativa da viabilidade nas concentrações de BA de 2.5 μM , 10 μM e 20 μM , sendo o efeito mais pronunciado na concentração de 20 μM , o que demonstra uma relação dose-resposta clara. Apesar da concentração de 1 μM não ter atingido resultados estatisticamente significativos, observou-se uma tendência da redução da viabilidade das células U251, próxima da significância estatística. Após 48h de tratamento, o perfil manteve-se semelhante verificando-se que as células U251 apresentaram menor viabilidade do que as células 3T3-L1 em todas as concentrações de BA testadas. No entanto, apenas a concentração de 10 μM de BA obteve resultados estatisticamente significativos, o que pode significar que os efeitos citotóxicos da BA dependem não só da dose, mas também da duração da exposição. A diminuição da viabilidade observada nas células U251 poderá dever-se à indução de apoptose mediada pela via intrínseca (77). É possível que o BA atue através da modulação negativa de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, e da ativação de caspases, promovendo assim a morte celular programada de forma seletiva em células tumorais (71).

Estes resultados estão de acordo com o observado por Yaozu *et al.*, que demonstraram que o BA reduz significativamente a viabilidade de células de glioblastoma humano U87MG e A172 de forma dependente da concentração e do tempo de exposição, enquanto as células normais (astrócitos primários) não foram afetadas mesmo em doses elevadas, reforçando o perfil de seletividade do composto para células tumorais, tal como no presente estudo (71). Esses autores também verificaram que o efeito citotóxico seletivo do BA envolve a supressão da via NF- κ B, a redução de proteínas anti-



apoptóticas como Bcl-2, survivina e XIAP, e a ativação de caspases-9 e -3, sugerindo que a indução de apoptose nas células tumorais ocorre através da via intrínseca mitocondrial, sem afetar células normais. O mesmo efeito seletivo foi observado noutros estudos científicos (15, 72). Além disso, estudos anteriores indicam que o BA não afeta a viabilidade dos pré-adipócitos 3T3-L1 até concentrações relativamente altas (até cerca de 220 μM), apresentando percentagens de inibição inferiores a 35% e um IC50 elevado (192 μM) (70, 78). Esses dados reforçam que a ausência de citotoxicidade observada nas células 3T3-L1 no presente estudo, com concentrações entre 1 e 20 μM , é consistente com o perfil do composto, considerado seguro, em células normais. Em conjunto, estes dados da literatura confirmam que o BA apresenta citotoxicidade seletiva para células tumorais, com reduzido impacto nas células normais, o que reforça o seu potencial como composto terapêutico seguro.

O processo de diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 foi acompanhado ao longo de sete dias por microscopia ótica, que permitiu observar as alterações morfológicas características do processo de adipogénese. No grupo controlo sem diferenciação, as células mantiveram uma morfologia fibroblástica típica durante todo o ensaio, sem evidências de acumulação lipídica, confirmando a ausência de diferenciação espontânea. Pelo contrário, no grupo de controlo com estímulo de diferenciação, foram observadas alterações morfológicas progressivas, com aumento do arredondamento celular e formação de gotículas lipídicas intracelulares evidentes, atingindo cerca de 60% de células diferenciadas no final do ensaio. Nos grupos tratados com BA, verificou-se uma redução visível da acumulação de gotículas lipídicas, proporcional ao aumento da concentração do composto, sugerindo que o BA exerce um efeito anti-adipogénico dependente da concentração do composto.

A análise quantitativa confirmou estas observações, mostrando que o grupo controlo com diferenciação apresentou maior número e área de gotículas lipídicas comparativamente aos grupos tratados com BA. Nos grupos tratados com BA, verificou-se a diminuição progressiva no número (20–30%) e na área das gotículas lipídicas (30–50%), em relação ao controlo diferenciado, com reduções mais pronunciadas no número de gotículas do que na área total. Apesar de não ter sido atingido significado estatístico, o efeito mais acentuado foi observado na concentração de 10 μM de BA, onde tanto o número como a área das gotículas atingiram valores próximos de 20–30% face ao controlo, o que pode indicar que a exposição ao BA pode estar associada a um efeito inibitório na diferenciação adipogénica. Estes resultados poderão significar que a exposição ao BA pode exercer um efeito inibitório sobre a diferenciação adipogénica, possivelmente por interferir na expressão de fatores de transcrição chave envolvidos na acumulação lipídica e na maturação dos adipócitos (79).



Os resultados deste estudo corroboram dados publicados anteriormente. Estudos prévios verificaram que a exposição ao BA em concentrações entre 5 e 20 μ M resultou na diminuição da formação total de gotículas lipídicas, com um aumento do número de pequenas gotículas, diminuição do tamanho total das mesmas e diminuição do conteúdo lipídico (28–45%), evidenciando que o efeito anti-adipogénico do BA depende do processo de diferenciação (80, 81). Essa redução observada pode estar relacionada com o efeito do BA sobre a expressão de genes-chave da adipogénese, incluindo *Adipoq*, *Pparg2*, *Cfd* e *Fabp4*, bem como *SREBP-1c*, *C/EBP α* e *PPAR γ* e marcadores de adipócitos diferenciados como *GLUT4*, *PLIN* e *CDF*, sugerindo que a inibição da acumulação de lípidos envolve a modulação direta da regulação génica durante este processo (80, 82). Por fim, Mohsen *et al.* demonstraram efeitos dependentes da dose sobre a acumulação de lípidos em pré-adipócitos 3T3-L1, com uma maior redução na concentração de 10 μ M (70). Portanto, esses dados confirmam que o BA exerce um efeito inibitório dependente da dose sobre a diferenciação adipogénica em 3T3-L1.

Além da modulação génica da adipogénese, Senamontree *et al.* demonstraram que o tratamento de células hMSCs com BA reduz a secreção de adipocinas, nomeadamente adiponectina e leptina durante a diferenciação adipogénica (81). Da mesma forma, em modelos in vivo com diabetes, o tratamento com BA reduziu os níveis plasmáticos da leptina e aumentou os níveis plasmáticos da adiponectina (83). A alteração na secreção dessas adipocinas pode afetar a invasão tumoral: a leptina está associada à indução da expressão de várias metaloproteinases de matriz (MMP), incluindo MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-13 e MMP-14, promovendo a degradação da matriz extracelular e favorecendo a migração e invasão das células tumorais, enquanto a adiponectina pode reduzir a expressão de MMP-2 e MMP-9 em alguns tumores, diminuindo a capacidade invasiva (54). Assim, ao aumentar a adiponectina e reduzir a leptina, o BA cria um microambiente menos favorável à remodelação da matriz extracelular e à invasão tumoral, bem como reforça o seu efeito antitumoral e anti-angiogénico, o que forma uma conexão entre a modulação de adipocinas à supressão da progressão e invasão tumoral.

No que diz respeito à angiogénese e ao efeito anti-angiogénico do composto, foi realizado o ensaio de formação de tubos endoteliais em Matrigel. Observou-se que, no grupo controlo, as células bEnd.3 formaram uma rede tubular organizada, com algumas ramificações e segmentos longos, o que é característico de uma angiogénese normal. Por outro lado, nos grupos tratados com BA verificou-se uma menor organização da rede tubular, com redução do número de ramificações e formação de segmentos mais curtos, sugerindo o comprometimento da capacidade angiogénica.

A análise quantitativa confirmou estas observações, verificando-se uma tendência para a diminuição do comprimento dos tubos endoteliais em todas as concentrações de BA testadas. Contudo,



apenas a concentração de 1 μM de BA resultou numa redução estatisticamente significativa do comprimento dos tubos endoteliais relativamente ao controlo. Estes resultados sugerem que o efeito inibitório do BA sobre a angiogénese pode não seguir uma relação linear dependente da dose, podendo envolver mecanismos compensatórios ou efeitos citotóxicos subtis em concentrações mais elevadas que comprometam a viabilidade ou a organização celular. Apesar de preliminares, os dados obtidos reforçam o potencial antiangiogénico do BA. Uma possível explicação para este efeito pode ser a inibição de mediadores pró-angiogénicos, como VEGF e HIF-1 α , e da via de sinalização STAT3/HIF-1 α /VEGF, o que resultaria na formação de redes tubulares menos organizadas e comprometendo a angiogénese (67, 84).

Os resultados obtidos neste estudo, que evidenciaram o efeito inibitório do BA na angiogénese *in vitro*, estão de acordo com a literatura. Kwon *et al.* demonstraram que o BA inibe de forma dependente da dose a formação de tubos endoteliais induzida por bFGF nas células endoteliais (BAECs), com efeito observado a partir de 2 μM , sem comprometer a viabilidade celular até 10 μM (85). Mukherjee *et al.* observaram um efeito semelhante em células endoteliais ECV304, verificando que o BA inibe a formação de estruturas tubulares em Matrigel, embora de forma menos intensa do que os seus derivados (86). Além disso, investigações recentes com HUVECs mostraram que o BA, isoladamente ou em formulação micelar (Soluplus-BA), inibe a formação de tubos em Matrigel, efeito acompanhado pela diminuição da expressão de HIF-1 e VEGF (87). Shin *et al.* também relataram que o BA reduz a formação de tubos em HUVECs induzida por VEGF em condições de hipóxia, confirmando o seu efeito antiangiogénico *in vitro* (88). Estudos adicionais demonstraram que o BA diminui a atividade de STAT3 e suprimiu a ligação de STAT3 e HIF-1 α ao promotor de VEGF em células tumorais sob hipóxia, levando à diminuição significativa da produção de VEGF e sugerindo que a inibição da via STAT3/HIF-1 α /VEGF contribui para o efeito antiangiogénico do composto (88, 89). Estudos preliminares do nosso centro de investigação confirmam o efeito inibitório do BA na expressão da STAT3 em células U251. Estudos adicionais são necessário para correlacionar inequivocamente o papel da STAT3 na angiogénese em células de glioblastoma tratadas com BA. Ainda assim, os dados obtidos neste trabalho corroboram os resultados descritos na literatura e reforça que o papel do BA exerce na inibição da angiogénese *in vitro* em diferentes modelos celulares, independentemente das condições experimentais ou formulações utilizadas, sugerindo que a potencial aplicação do BA em estratégias terapêuticas antiangiogénicas.

Apesar dos resultados promissores, este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. O ensaio de angiogénese forneceu apenas resultados preliminares, tornando indispensável a realização de estudos adicionais, idealmente com a utilização de meios condicionados de



glioblastoma ou tratamento com um indutor de angiogénese (ex: VEGF). A escassez de tempo também impediu a utilização de meios condicionados de adipócitos no ensaio da angiogénese, conforme inicialmente planeado, o que teria permitido avaliar o efeito do BA na angiogénese sob um estado de obesidade. Colmatar estas lacunas em trabalhos futuros permitirá obter uma compreensão mais completa do potencial terapêutico do BA. Em curso ficou também a análise do perfil metabolómico das células tumorais U251 nos meios condicionados produzidos, através da análise por HPLC. A identificação e quantificação dos elementos segregados com e sem tratamento com BA contribuirá para clarificar o mecanismo de ação mais provável do composto num contexto de obesidade. Este é, sem dúvida, o próximo passo na investigação que continua.

Num futuro próximo é fundamental aprofundar o estudo dos mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos observados, através da análise da expressão de genes e proteínas envolvidos na apoptose, adipogénese ou angiogénese. Adicionalmente, a realização de ensaios complementares *in vitro*, utilizando outros modelos celulares, e de estudos *in vivo* seria essencial para confirmar os efeitos observados em modelos mais representativos, bem como avaliar a biodisponibilidade e o perfil toxicológico do BA.



5. Conclusão

Este projeto teve como objetivo estudar os efeitos do BA nos processos de diferenciação de pré-adipócitos, e produzir meios condicionados que contribuam para o estudo da angiogénese observada em células de glioblastoma humano. Os resultados obtidos demonstraram que o BA apresenta um efeito citotóxico seletivo sobre as células de glioblastoma U251, reduzindo significativamente a sua viabilidade de forma dependente da dose, sem comprometer a viabilidade das células normais, o que reforça o seu potencial como composto anti-tumoral. Além disso, o BA revelou-se capaz de inibir significativamente o processo de diferenciação de células 3T3-L1 em adipócitos, evidenciado pela diminuição do número e área de gotículas lipídicas formadas. No ensaio de angiogénese *in vitro*, verificou-se ainda uma redução do comprimento das redes tubulares formadas pelas células endoteliais após tratamento com BA, reforçando o seu potencial antiangiogénico.

Este projeto contribui para aprofundar o conhecimento científico atual acerca dos efeitos biológicos do BA em diferentes contextos fisiopatológicos. Em suma, os dados obtidos permitem reforçar o seu potencial terapêutico, sugerindo-o como um candidato promissor para o desenvolvimento de novas abordagens antitumorais, especialmente em situações em que a obesidade possa ser um fator de risco para o cancro.



Referências Bibliográficas

1. Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs*. 2016;20(5 Suppl):S2-8.
2. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C. Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;67(2):139-52.
3. Tan AC, Ashley DM, López GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(4):299-312.
4. Shergalis A, Bankhead A, Luesakul U, Muangsin N, Neamati N. Current challenges and opportunities in treating glioblastoma. *Pharmacological reviews*. 2018;70(3):412-45.
5. Fernandes S, Vieira M, Prudêncio C, Ferraz R. Betulinic Acid for Glioblastoma Treatment: Reality, Challenges and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(4):2108.
6. Wirsching H-G, Weller M. Glioblastoma. In: Moliterno Gunel J, Piepmeier JM, Baehring JM, editors. *Malignant Brain Tumors : State-of-the-Art Treatment*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 265-88.
7. Ohgaki H, Kim Y-H, Steinbach JP. Nervous system tumors associated with familial tumor syndromes. *Current opinion in neurology*. 2010;23(6):583-91.
8. Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. Glioblastoma multiforme—an overview. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*. 2014;18(5):307-12.
9. Cunha M, Maldaun MVC. Metastasis from glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2019;65(3):424-33.
10. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology*. 2007;170(5):1445-53.
11. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(4):764-72.
12. Rodríguez-Camacho A, Flores-Vázquez JG, Moscardini-Martelli J, Torres-Ríos JA, Olmos-Guzmán A, Ortiz-Arce CS, et al. Glioblastoma treatment: state-of-the-art and future perspectives. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(13):7207.
13. Mrugala MM. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. *Discovery medicine*. 2013;15(83):221-30.
14. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997-1003.
15. Li Y, Wang Y, Gao L, Tan Y, Cai J, Ye Z, et al. Betulinic acid self-assembled nanoparticles for effective treatment of glioblastoma. *J Nanobiotechnology*. 2022;20(1):39.
16. Janjua TI, Rewatkar P, Ahmed-Cox A, Saeed I, Mansfeld FM, Kulshreshtha R, et al. Frontiers in the treatment of glioblastoma: Past, present and emerging. *Advanced drug delivery reviews*. 2021;171:108-38.
17. Zheng X, Tang Q, Ren L, Liu J, Li W, Fu W, et al. A narrative review of research progress on drug therapies for glioblastoma multiforme. *Annals of translational medicine*. 2021;9(11).
18. Campos B, Olsen LR, Urup T, Poulsen HS. A comprehensive profile of recurrent glioblastoma. *Oncogene*. 2016;35(45):5819-25.
19. Nam JY, De Groot JF. Treatment of glioblastoma. *Journal of oncology practice*. 2017;13(10):629-38.
20. Torrisi F, Alberghina C, D'Aprile S, Pavone AM, Longhitano L, Giallongo S, et al. The Hallmarks of Glioblastoma: Heterogeneity, Intercellular Crosstalk and Molecular Signature of Invasiveness and Progression. *Biomedicines*. 2022;10(4).
21. Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Mol Neurobiol*. 2020;57(5):2461-78.



22. Mosteiro A, Pedrosa L, Ferrés A, Diao D, Sierra À, González JJ. The vascular microenvironment in glioblastoma: a comprehensive review. *Biomedicines*. 2022;10(6):1285.
23. Tatla AS, Justin AW, Watts C, Markaki AE. A vascularized tumoroid model for human glioblastoma angiogenesis. *Scientific reports*. 2021;11(1):19550.
24. Balandeh E, Mohammadshafie K, Mahmoudi Y, Hossein Pourhanifeh M, Rajabi A, Bahabadi ZR, et al. Roles of non-coding RNAs and angiogenesis in glioblastoma. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021;9:716462.
25. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)–key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455–67.
26. Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Zhang S, Gong Z, et al. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):204.
27. Zhang M, Ye G, Li J, Wang Y. Recent advance in molecular angiogenesis in glioblastoma: the challenge and hope for anti-angiogenic therapy. *Brain tumor pathology*. 2015;32:229–36.
28. Das S, Marsden PA. Angiogenesis in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(16):1561–3.
29. Phillips CM. Metabolically healthy obesity: definitions, determinants and clinical implications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2013;14:219–27.
30. Lingvay I, Cohen RV, Roux CWL, Sumithran P. Obesity in adults. *Lancet*. 2024;404(10456):972–87.
31. Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Kapczuk P, Fabiańska M, Gutowska I, et al. Epidemiology of anthropometric factors in glioblastoma multiforme—Literature review. *Brain sciences*. 2021;11(1):116.
32. Jiang SZ, Lu W, Zong XF, Ruan HY, Liu Y. Obesity and hypertension. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016;12(4):2395–9.
33. Organization WH. Overweight and obesity. 2020.
34. De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J Obes*. 2013;2013:291546.
35. Alarcón S, Niechi I, Toledo F, Sobrevia L, Quezada C. Glioma progression in diabetes. *Mol Aspects Med*. 2019;66:62–70.
36. Siegel EM, Nabors LB, Thompson RC, Olson JJ, Browning JE, Madden MH, et al. Prediagnostic body weight and survival in high grade glioma. *J Neurooncol*. 2013;114(1):79–84.
37. Moore SC, Rajaraman P, Dubrow R, Darefsky AS, Koebnick C, Hollenbeck A, et al. Height, body mass index, and physical activity in relation to glioma risk. *Cancer Res*. 2009;69(21):8349–55.
38. Chambless LB, Parker SL, Hassam-Malani L, McGirt MJ, Thompson RC. Type 2 diabetes mellitus and obesity are independent risk factors for poor outcome in patients with high-grade glioma. *J Neurooncol*. 2012;106(2):383–9.
39. Sachdeva P, Ghosh S, Ghosh S, Han S, Banerjee J, Bhaskar R, et al. Childhood obesity: A potential key factor in the development of glioblastoma multiforme. *Life*. 2022;12(10):1673.
40. Friedenreich CM, Ryder-Burbidge C, McNeil J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol Oncol*. 2021;15(3):790–800.
41. Sowers JL, Johnson KM, Conrad C, Patterson JT, Sowers LC. The role of inflammation in brain cancer. *Inflammation and Cancer*. 2014:75–105.
42. Poloz Y, Stambolic V. Obesity and cancer, a case for insulin signaling. *Cell death & disease*. 2015;6(12):e2037–e.
43. Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism*. 2019;92:121–35.
44. Tirrò E, Massimino M, Romano C, Martorana F, Pennisi MS, Stella S, et al. Prognostic and Therapeutic Roles of the Insulin Growth Factor System in Glioblastoma. *Front Oncol*. 2020;10:612385.



45. Barzegar Behrooz A, Talaie Z, Jusheghani F, Łos MJ, Klonisch T, Ghavami S. Wnt and PI3K/Akt/mTOR survival pathways as therapeutic targets in glioblastoma. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(3):1353.
46. Fukushima T, Kataoka H. Roles of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in glioblastoma. *Anticancer research*. 2007;27(6A):3685-92.
47. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster M. Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2015;21(1):57-74.
48. Lengyel E, Makowski L, DiGiovanni J, Kolonin MG. Cancer as a matter of fat: the crosstalk between adipose tissue and tumors. *Trends in cancer*. 2018;4(5):374-84.
49. De S, Banerjee S, Dey G, Banerjee S, Kumar SA. Interplay Between Diabetes, Obesity and Glioblastoma Multiforme, and the Role of Nanotechnology in Its Treatment. *Journal of Nanotheranostics*. 2025;6(1):7.
50. Kinfe TM, Stadlbauer A, Bozhkov Y, Kremenevski N, Brandner S, Buchfelder M, et al. The diagnostic and therapeutic role of leptin and its receptor ObR in glioblastoma multiforme. *Cancers*. 2020;12(12):3691.
51. Lawrence JE, Cook NJ, Rovin RA, Winn RJ. Leptin promotes glioblastoma. *Neurology research international*. 2012;2012(1):870807.
52. Panza S, Russo U, Giordano F, Leggio A, Barone I, Bonofiglio D, et al. Leptin and notch signaling cooperate in sustaining glioblastoma multiforme progression. *Biomolecules*. 2020;10(6):886.
53. Almeida J, Costa J, Coelho P, Cea V, Galesio M, Noronha J, et al. Adipocyte proteome and secretome influence inflammatory and hormone pathways in glioma. *Metabolic brain disease*. 2019;34:141-52.
54. Bocian-Jastrzębska A, Malczewska-Herman A, Kos-Kudła B. Role of leptin and adiponectin in carcinogenesis. *Cancers*. 2023;15(17):4250.
55. Ferla R, Bonomi M, Otvos L, Surmacz E. Glioblastoma-derived leptin induces tube formation and growth of endothelial cells: comparison with VEGF effects. *BMC cancer*. 2011;11:1-11.
56. Fulda S. Betulinic acid for cancer treatment and prevention. *International journal of molecular sciences*. 2008;9(6):1096-107.
57. Zhai K, Siddiqui M, Abdellatif B, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Natural compounds in glioblastoma therapy: Preclinical insights, mechanistic pathways, and outlook. *Cancers*. 2021;13(10):2317.
58. Jiang W, Li X, Dong S, Zhou W. Betulinic acid in the treatment of tumour diseases: Application and research progress. *Biomed Pharmacother*. 2021;142:111990.
59. Csuk R. Betulinic acid and its derivatives: A patent review (2008–2013). *Expert opinion on therapeutic patents*. 2014;24(8):913-23.
60. Lou H, Li H, Zhang S, Lu H, Chen Q. A review on preparation of betulinic acid and its biological activities. *Molecules*. 2021;26(18):5583.
61. Nair P, Lu M, Petersen S, Ashkenazi A. Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. *Methods in enzymology*. 544: Elsevier; 2014. p. 99-128.
62. Hordyjewska A, Ostapiuk A, Horecka A, Kurzepa J. Betulin and betulinic acid: Triterpenoids derivatives with a powerful biological potential. *Phytochemistry Reviews*. 2019;18:929-51.
63. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2015;16(6):2129-44.
64. Aswathy M, Vijayan A, Daimary UD, Girisa S, Radhakrishnan KV, Kunnumakkara AB. Betulinic acid: A natural promising anticancer drug, current situation, and future perspectives. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2022;36(12):e23206.
65. Shankar E, Zhang A, Franco D, Gupta S. Betulinic Acid-Mediated Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells Involves p53 and Nuclear Factor-Kappa B (NF-κB) Pathways. *Molecules*. 2017;22(2):264.



66. Holze C, Michaudel C, Mackowiak C, Haas DA, Benda C, Hubel P, et al. Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway. *Nature immunology*. 2018;19(2):130-40.
67. Zhang DM, Xu HG, Wang L, Li YJ, Sun PH, Wu XM, et al. Betulinic acid and its derivatives as potential antitumor agents. *Medicinal research reviews*. 2015;35(6):1127-55.
68. Kim K-D, Jung H-Y, Ryu H, Kim B, Jeon J, Yoo H, et al. Betulinic acid inhibits high-fat diet-induced obesity and improves energy balance by activating AMPK. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2019;29(4):409-20.
69. Bildziukevich U, Özdemir Z, Wimmer Z. Recent achievements in medicinal and supramolecular chemistry of betulinic acid and its derivatives. *Molecules*. 2019;24(19):3546.
70. Mohsen GA, Abu-Taweel GM, Rajagopal R, Sun-Ju K, Kim HJ, Kim YO, et al. Betulinic acid lowers lipid accumulation in adipocytes through enhanced NCoA1-PPAR γ interaction. *J Infect Public Health*. 2019;12(5):726-32.
71. Yaozu Z, Liu Y, Zhao H, Peng P, Tingbao Z, Jincan C. Betulinic acid inhibits glioma cell viability by downregulation of NF- κ B and enhancement of apoptosis. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2020;19(12):2545-51.
72. Lo W-L, Hsu T-I, Yang W-B, Kao T-J, Wu M-H, Huang Y-N, et al. Betulinic acid-mediated tuning of PERK/CHOP signaling by Sp1 inhibition as a novel therapeutic strategy for glioblastoma. *Cancers*. 2020;12(4):981.
73. Jeremias I, Steiner H-H, Benner A, Debatin K-M, Herold-Mende C. Cell death induction by betulinic acid, ceramide and TRAIL in primary glioblastoma multiforme cells. *Acta Neurochirurgica*. 2004;146:721-9.
74. Rzeski W, Stepulak A, Szymański M, Sifringer M, Kaczor J, Wejksza K, et al. Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2006;374:11-20.
75. Sigma-Aldrich. Betulinic acid \geq 98% (HPLC) Safety Data Sheet 2025 [Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/sds/aldrich/855057?userType=anonymous>].
76. Kaczmarek I, Suchý T, Strnadová M, Thor D. Qualitative and quantitative analysis of lipid droplets in mature 3T3-L1 adipocytes using oil red O. *STAR protocols*. 2024;5(2):102977.
77. Fulda S, Kroemer G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. *Drug discovery today*. 2009;14(17-18):885-90.
78. TAHER ASMS, ZAKARIA ZA. An in vitro Adipogenic Potential and Glucose Uptake Stimulatory Effect of Betulinic Acid and Stigmasterol Isolated from *Tetracera indica* in 3T3-L1 Cell Line. *Sains Malaysiana*. 2023;52(2):501-12.
79. Cheong NDH, Mohamed E, Haron N, Camalxaman SN. Effect of Plant Extracts on Protein Changes During Adipogenesis: A Scoping Review. *Malaysian Journal of Medicine & Health Sciences*. 2023;19(5).
80. Sriboonaied P, Phuangbubpha P, Saetan P, Charoensuksai P, Charoenpanich A. Dual Modulation of Adipogenesis and Apoptosis by PPARG Agonist Rosiglitazone and Antagonist Betulinic Acid in 3T3-L1 Cells. *Biomedicines*. 2025;13(6):1340.
81. Senamontree S, Lakthan T, Charoenpanich P, Chanchao C, Charoenpanich A. Betulinic acid decreases lipid accumulation in adipogenesis-induced human mesenchymal stem cells with upregulation of PGC-1 α and UCP-1 and post-transcriptional downregulation of adiponectin and leptin secretion. *PeerJ*. 2021;9:e12321.
82. Brusotti G, Montanari R, Capelli D, Cattaneo G, Laghezza A, Tortorella P, et al. Betulinic acid is a PPAR γ antagonist that improves glucose uptake, promotes osteogenesis and inhibits adipogenesis. *Scientific reports*. 2017;7(1):5777.
83. Ahangarpour A, Shabani R, Farbood Y. The effect of betulinic acid on leptin, adiponectin, hepatic enzyme levels and lipid profiles in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic mice. *Research in pharmaceutical sciences*. 2018;13(2):142-8.



84. Farooqi AA, Turgambayeva A, Tashenova G, Tulebayeva A, Bazarbayeva A, Kapanova G, et al. Multifunctional roles of betulinic acid in cancer chemoprevention: Spotlight on jak/stat, vegf, egf/egfr, trail/trail-r, akt/mtor and non-coding rnas in the inhibition of carcinogenesis and metastasis. *Molecules*. 2022;28(1):67.
85. Kwon HJ, Shim JS, Kim JH, Cho HY, Yum YN, Kim SH, et al. Betulinic acid inhibits growth factor-induced in vitro angiogenesis via the modulation of mitochondrial function in endothelial cells. *Jpn J Cancer Res*. 2002;93(4):417-25.
86. Mukherjee R, Jaggi M, Rajendran P, Siddiqui MJ, Srivastava SK, Vardhan A, et al. Betulinic acid and its derivatives as anti-angiogenic agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14(9):2181-4.
87. Qi X, Gao C, Yin C, Fan J, Wu X, Guo C. Improved anticancer activity of betulinic acid on breast cancer through a grafted copolymer-based micelles system. *Drug delivery*. 2021;28(1):1962-71.
88. Shin J, Lee H-J, Jung D-B, Jung JH, Lee H-J, Lee E-O, et al. Suppression of STAT3 and HIF-1 alpha mediates anti-angiogenic activity of betulinic acid in hypoxic PC-3 prostate cancer cells. *PloS one*. 2011;6(6):e21492.
89. Pandey MK, Sung B, Aggarwal BB. Betulinic acid suppresses STAT3 activation pathway through induction of protein tyrosine phosphatase SHP-1 in human multiple myeloma cells. *International journal of cancer*. 2010;127(2):282-92.

P.PORTO

ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



M

MESTRADO

BIOQUÍMICA EM SAÚDE