



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Carolina Santucci Queiroga

Piperina: modula a expressão gênica em células de câncer de colo de útero?

São José do Rio Preto
2023

Carolina Santucci Queiroga

Piperina: modula a expressão gênica em células de câncer de colo de útero?

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Flavia Cristina Rodrigues
Lisoni

São José do Rio Preto
2023

Q3p

Queiroga, Carolina Santucci

Piperina: modula a expressão gênica em células de câncer de colo de útero? / Carolina Santucci Queiroga. -- São José do Rio Preto, 2023
28 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientadora: Profa. Dra. Flavia Cristina Rodrigues Lisoni

1. Biologia Molecular. 2. Câncer de colo de útero. 3. Piperina. I.
Título.

Carolina Santucci Queiroga

Piperina: modula a expressão gênica em células de câncer de colo de útero?

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Flavia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Daniela Sampaio Silveira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Claudia Regina Bonini Domingos
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
27 de janeiro de 2023

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Câmpus de São José do Rio Preto, por proporcionar as condições de estudo necessárias para que tudo pudesse acontecer, mesmo com todas as dificuldades financeiras.

À minha orientadora que me acolheu no estágio desde a primeira vez que tive contato, mesmo com todas as dificuldades impostas, sempre foi muito atenciosa e generosa, sou grata pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Aos meus pais por me apoiarem com muito amor e carinho, independente das minhas escolhas. Sou grata aos meus amigos, que fiz durante a graduação, por me apoiaram durante esse caminho e por compreenderem o momento que estava passando, já que também passaram pelo mesmo.

Às minhas companheiras de laboratório, em específico à Juliana, por toda a assistência e paciência durante o período de estágio. Todos os ensinamentos foram essenciais para a minha formação.

RESUMO

O câncer de colo de útero é o quarto tipo de câncer mais frequente e é a quarta causa de morte por câncer em mulheres no mundo, ele é mais comum em países em desenvolvimento que contribui com 70% dos casos. Isso ocorre porque o principal fator envolvido com o desenvolvimento tumoral nas células cervicais é a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) 16 e 18. A infecção por esse vírus leva a incorporação das oncogenes *E5*, *E6* e *E7* nas células cervicais que revoga os principais reguladores da proliferação celular, além de desencadear um processo inflamatório mediado pela ativação da via ciclooxigenase-prostaglandina (*PTGS2-PGE2*). Sabe-se que essas vias inflamatórias atuam sobre o desenvolvimento do processo tumoral e metástase nas células do colo uterino. Os agentes anti-inflamatórios são capazes de inibir a via da ciclooxigenase e a piperina é um desses agentes que possui inúmeras propriedades farmacológicas, sendo que a que mais se destaca é a antitumorigênica, cujo mecanismo de atuação é sob as vias gênicas de regulação do ciclo celular e da apoptose. Em função desses relatos, o presente projeto teve como objetivo geral investigar se a piperina modula a morfologia celular e a expressão dos oncogenes *E6* e do vírus HPV16. Assim, a piperina foi aplicada nas células neoplásicas de colo de útero (SiHa e CasKi, que são infectadas pelo HPV 16) para avaliação da morfologia celular, pela análise em microscopia óptica e para a análise da expressão dos genes *E6* e *E7* do HPV16, por PCR quantitativo. Foi observado que a piperina tem efeito na alteração morfológica das células tumorigênicas SiHa e CaSki, demonstrando intensa vacuolização e condensação citoplasmática nas respectivas células; e que a mesma modula a expressão dos genes *E6* e *E7*, reduzindo a expressão desses genes apenas na linhagem CaSki. Assim, esse fitoterápico pode ser um grande aliado no tratamento coadjuvante na carcinogênese de colo de útero.

Palavras-chave: Cultura de células. CasKi. SiHa. Oncogenes.

ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most common type of cancer and is the fourth leading cause of cancer death in women worldwide, and is most common in developing countries where it accounts for 70% of cases. This is because the main factor involved in tumor development in cervical cells is infection with the human papilloma virus (HPV) 16 and 18. Infection by this virus leads to the incorporation of the oncogenes E5, E6, and E7 in cervical cells that override the main regulators of cell proliferation, in addition to triggering an inflammatory process mediated by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway (PTGS2-PGE2). These inflammatory pathways are known to act on the development of the tumor process and metastasis in cervical cells. The anti-inflammatory agents are able to inhibit the cyclooxygenase pathway and piperine is one of these agents that has numerous pharmacological properties, and the one that stands out the most is the anti-tumorigenic, whose mechanism of action is on the gene pathways of cell cycle regulation and apoptosis. In light of these reports, the present project had as a general objective to investigate whether piperine modulates cell morphology and the expression of E6 and HPV16 oncogenes. Thus, piperine was applied to cervical neoplastic cells (SiHa and CasKi, which are infected by HPV 16) for the evaluation of cell morphology by light microscopy analysis and for the analysis of the expression of E6 and E7 genes of HPV16 by quantitative PCR. It was observed that piperine has an effect on the morphological alteration of SiHa and CaSki tumorigenic cells, showing intense vacuolization and cytoplasmic condensation in the respective cells; and that it modulates the expression of genes E6 and E7, reducing the expression of these genes only in the CaSki lineage. Thus, this phytotherapy may be a great ally in the coadjuvant treatment in cervical carcinogenesis.

Keywords: Cell culture. CasKi. SiHa. Oncogenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Piperina altera morfologia celular	22
Figura 2 – Piperina reduz a expressão de oncogenes do HPV16 nas células CaSki	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – *Primers* utilizados na PCR em tempo real

20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Tissue Cell Culture</i>
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E1	Oncoproteína do HPV E1
E2	Oncoproteína do HPV E2
E5	Oncoproteína do HPV E5
E6	Oncoproteína do HPV E6
E7	Oncoproteína do HPV E7
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ERK	Quinases reguladas por sinais extracelulares
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Vírus do Papiloma Humano
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases de matriz
MEM	Meio de cultura - Minimum Essential Medium (Eagle)
MMP-3	Metaloproteinase de matriz 3
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
MMP-13	Metaloproteinase de matriz 13
p53	Proteína de tumor
PG	Via da prostaglandina
PTGS1	Ciclooxigenase 1
PTGS2	Ciclooxigenase 2
PTGS2-PGE2	Via ciclooxigenase-prostaglandina
PTGS2-PGE2-PTGER	Ciclooxigenase-2- prostaglandina E2
pRb	Proteína do retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
TLR-9	Toll-like receptor-9

LISTA DE SÍMBOLOS

μM	Micromolar
μL	Microlitro
ng	Nanograma
nM	Nanomolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Materiais	19
3.2	Métodos	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	Piperina causa modificação na morfologia celular	21
4.2	Piperina modula os oncogenes <i>E6</i> e <i>E7</i>	22
5	CONCLUSÕES	25
	REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

Carcinomas são derivados de crescimentos celulares anormais que perdem habilidades em cessar seu desenvolvimento, prejudicando os mecanismos básicos de controle celular em tecidos ou órgãos do corpo humano (YIN *et al.*, 2021). Cada vez que uma célula se divide durante o processo de divisão celular, erros ocorrem na replicação do DNA introduzindo novas mutações nos genomas das células-filhas, o que leva ao desenvolvimento de tumores responsáveis por liberar controles inibidores do ciclo celular ou bloquear a apoptose (GRAHAM, 2017). O câncer pode ser detectado incidentalmente por exames básicos de rotina em laboratórios, sendo que deve atingir o tamanho de 1 centímetro, ou ser composto por 1 milhão de células, antes de ser detectado (ROY, 2016).

O câncer é a causa de, aproximadamente, 90 mil mortes e 12 mil novos casos no mundo, a cada ano. Tal mortalidade consequente da doença advém principalmente da exposição a certos fatores de risco: ambientais (tabagismo, hábitos alimentares, peso corporal, exposição a substâncias químicas etc.), assim como fatores genéticos (predisposição genética, por exemplo). Segundo a Organização Mundial de Saúde, no planeta, existem mais mortes ocasionadas pelo câncer do que devido às doenças cardiovasculares, em que 35% delas derivam de fatores de risco envolvendo estilo de vida do paciente, como hábitos de fumar, ingestão de álcool, infecções, parasitas, exposição exacerbada à luz ultravioleta, entre outros aspectos (LEWANDOWSKA, 2019).

O câncer de colo de útero, também denominado câncer cervical, representa uma alta porcentagem mundial de mortes por cânceres que atingem mulheres, sendo essa, aproximadamente, de 8%. Esta doença é classificada como o quarto câncer mais frequentemente diagnosticado, causado pelo papiloma vírus humano (HPV) (FERNANDES *et al.* 2022). Cerca de nove em cada dez óbitos, por câncer do colo do útero, ocorrem em regiões menos desenvolvidas, onde o risco de morte, em decorrência deste câncer antes dos 75 anos, é três vezes maior (FERLAY *et al.* 2014). Isso ocorre porque a maioria dos casos de câncer cervical são causados por infecção persistente com genótipos carcinogênicos do HPV (SUNG *et al.*, 2021). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (Inca), no Brasil, em 2023, são esperados 17.010 casos novos, o que representa uma taxa ajustada de incidência de 13,25 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2022).

Existem mais de 200 tipos de HPV, em que cerca de 40 infectam o trato genital e, 20 destes estão associados ao câncer de colo do útero, variando apenas em seu tropismo tecidual, nas associações com diferentes lesões e no seu potencial oncogênico, o que permite que sejam

classificados em baixo risco, provavelmente de alto risco (médio risco) e de alto risco (BRINGHENTI, 2010). Caso estabeleça uma infecção persistente com genótipos de alto risco, como o HPV 16 e 18, estará altamente associado ao desenvolvimento do câncer cervical. Ambos os subtipos são responsáveis por 70 a 75% do desenvolvimento deste câncer (FERNANDES *et al.*, 2022).

O HPV é um vírus sexualmente transmissível que possui predileção por tecidos de revestimentos (pele e mucosas) e provocam na região infectada alterações localizadas que resultam no aparecimento de lesões decorrentes do crescimento celular irregular. Felizmente, existem estratégias de prevenção contra a doença: a vacinação é altamente recomendada para qualquer pessoa entre 9 a 14 anos. A implantação de programas de testagem e o manejo apropriado de lesões pré-invasivas também são estratégias eficazes que devem ser utilizadas (FERNANDES *et al.*, 2022). O câncer de colo de útero também está relacionado a outras infecções sexualmente transmissíveis (HIV e *Chlamydia trachomati*), alto número de gravidez e uso prolongado de contraceptivos orais (BUSKWOFIE *et al.*, 2020).

O vírus em questão é organizado em três diferentes regiões: região precoce (E), região tardia (L) e região reguladora (URR). Os genes *L1* e *L2* codificam as proteínas do capsídeo viral, e os genes E codificam as proteínas envolvidas na replicação viral e na transformação celular. Os genes *E1* e *E2* estão envolvidos na replicação viral. Os genes *E5*, *E6* e *E7* codificam proteínas responsáveis pela transformação celular. O HPV é produto de oncoproteínas denominadas *E6* e *E7*, capazes de alterar o comportamento das células de colo do útero por meio de sua expressão contínua, em consequência de sua interação com proteínas reguladoras do ciclo celular: p53 e Proteína do Retinoblastoma (pRB). Tais proteínas determinam o desbloqueio do ciclo celular e instabilidade genética, levando ao câncer por impedirem a apoptose e causar imortalização celular. Portanto, as oncoproteínas *E6/E7* são consideradas marcadores precoces do câncer de colo de útero. (BRINGHENTI, 2010)

Dentre as linhagens celulares de câncer de colo de útero que possuem o HPV, duas delas merecem destaque: as linhagens celulares de carcinoma epitelial de colo de útero SiHa e CaSKi, que foram avaliadas nessa pesquisa. A SiHa é infectada pelo HPV 16 (ROSA *et al.*, 2019) e a linhagem CaSKi é infectada pelo HPV 16 e 18 (YEE *et al.*, 1985). Os tipos histológicos mais comuns do câncer de colo de útero são o escamoso e o adenocarcinoma, representando 70% e 25%, respectivamente, na qual a SiHa e CaSKi são escamosas (SMALL *et al.*, 2017).

A resposta inflamatória surge como mecanismo de proteção contra estímulos agressivos, incluindo uma variedade de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas,

que dão origem à inflamação. Os mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, agem localmente de forma a restringir as consequências e a extensão do dano tecidual, mas, caso o estímulo persista, a inflamação torna-se crônica (VOLTARELLI, 1994). A inflamação crônica, ou persistente, decorrente de agentes infecciosos ou lesões por exposição a agentes nocivos, está altamente ligada ao desenvolvimento do câncer humano, em uma porcentagem de cerca de 20%. O câncer cervical serve como exemplo, uma vez que a inflamação crônica após infecção persistente por HPV contribui para a gênese e progressão tumoral, através da indução de mutações gênicas (SINGH *et al.*, 2019; YE *et al.*, 2020).

A relação entre a estimulação da via da inflamação e a indução do câncer tem sido considerada por muitos anos. A inflamação crônica, após danos nos tecidos, pode contribuir à transformação e proliferação celular (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). A proliferação celular, por si só, não é capaz de desenvolver tumores cancerígenos. Acredita-se que a via da prostaglandina (PG) seja a principal causa da inflamação induzida por HPV *E5*, *E6* e *E7*, devido a regulação positiva da expressão de ciclooxigenase *PTGS2* e prostaglandina *E2* (*PGE2*) seguido pela ativação da via ciclooxigenase-prostaglandina (*PTGS2-PGE2*) (HEMMAT; BAGHI, 2018). Acredita-se que a via transdutora de sinais dos receptores da ciclooxigenase-2- prostaglandina *E2* (*PTGS2-PGE2-PTGERS*) é a via central envolvida na inflamação crônica associada a transformações oncológicas nas carcinogêneses ginecológicas (YE *et al.*, 2020).

Existem três classes gênicas responsáveis pelo processo tumoral: oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo. Os oncogenes envolvem uma sequência de transformações celulares, como mutações gênicas, amplificações, deleções e translocações em genes que codificam proteínas associadas ao ciclo celular, apoptose e proliferação celular (SCHMIDT, 2015). Dentre esses oncogenes, podemos ressaltar as oncoproteínas *E6* e *E7*, que interferem no controle do ciclo celular resultando em uma proliferação celular descontrolada, sendo que a oncoproteína *E6* interfere nos mecanismos de apoptose e reparo do DNA, e a oncoproteína *E7* age na proteína supressora tumoral pRb (retinoblastoma *protein*), também resultando em distúrbios do controle do ciclo celular (KARIN *et al.*, 2018).

Os agentes anti-inflamatórios são capazes de inibir a via da ciclooxigenase *PTGS1* e *PTGS2* do metabolismo do ácido araquidônico, que produz prostaglandinas. Esses agentes inibem inicialmente a enzima ciclooxigenase, que está envolvida na síntese da prostaglandina (TASLEEM *et al.*, 2014). Dessa maneira podemos apontar a piperina como um agente anti-inflamatório, sendo um produto natural que atua inibindo *PGE2*, *MMP-3* e *MMP-13*, por meio da supressão do gene *PTGS2* (YING *et al.*, 2013). As MMPs são proteínas proteolíticas

que degradam a matriz extracelular (MEC), contribuindo para a metástase, angiogênese, reparo tecidual e processos inflamatórios. Sendo assim, a piperina se apresenta como um agente promissor no que diz respeito ao combate do processo inflamatório.

Recentemente, a medicina integrativa vem ganhando cada vez mais atenção por meio da validação científica de medicamentos à base de propriedades herbais. A Piperina (1-piperoilpiperidina) é um alcalóide considerado o principal metabólito derivado do fruto da *Piper nigrum* (pimenta do reino) e da *Piper longum* (pimenta longa), que possui, além da atividade anti-inflamatória, outras propriedades farmacológicas e bioquímicas, sendo elas: imunomoduladoras, anti-oxidantes, anti-asmáticas, anti-úlceras, anti-amebianas e anti-cancerígenas (N. B. KONDAPALLI *et al.*, 2022). Nas últimas décadas, os fitomedicamentos demonstraram um papel fundamental na descoberta de medicamentos, onde 50% deles, aprovados pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA), são de origem natural (NEWMAN *et al.*, 2012).

A propriedade antitumorigênica da piperina foi evidenciada em função da indução da parada do ciclo celular, aumento da autofagia e apoptose, bem como desequilíbrio redox da homeostase. Além disso, piperina inibe a angiogênese e a degradação da matriz extracelular (MEC), afeta direta e indiretamente a sobrevivência das células tumorais e extingue os processos de invasão e metástase, sem efeitos tóxicos significativos nas células normais (SUNILA; KUTTAN, 2004; KUMAR *et al.*, 2011; PAARAKH *et al.*, 2015).

Quanto ao câncer de colo de útero, é pouco relatado o efeito da piperina, entretanto, quando a linhagem celular de carcinoma epitelial de colo de útero (SiHa) é exposta à piperina ocorre a inibição do crescimento de células com um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), além da condensação nuclear e cicatrização da ferida tardiamente. Ademais, a piperina estimula a morte celular por apoptose pela perda de MMP, fragmentação de DNA, ativação da caspase-3 e inibição do crescimento celular devido a parada de fase G2/M e acúmulo em G1 (JAFRI *et al.*, 2019).

Podemos verificar que os estudos sobre a piperina se baseiam no envolvimento de vias genéticas relacionadas com o ciclo celular e apoptose, porém, a via inflamatória ainda não foi investigada, mesmo sabendo-se que a infecção por HPV 16 é uma das principais causas do câncer de colo de útero. Sendo assim, criamos a hipótese que o efeito antitumorigênico da piperina em câncer de colo de útero pode ser modulado pelas vias inflamatórias da ciclooxigenase prostaglandina, bem como pelos oncogenes do HPV. Dessa forma, a piperina seria influente na morfologia das células tumorigênicas modulando a

expressão dos genes *E6* e *E7*, sendo um grande aliado do futuro do fitoterápico como tratamento coadjuvante na carcinogênese de colo de útero.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Em função da importância da atividade antitumoral da piperina, foi proposto o presente trabalho, o qual teve como objetivo geral avaliar o seu potencial efeito na morfologia celular e na modulação da expressão dos genes *E6* e *E7* do HPV 16, observando como esse fitoterápico age e como essas alterações podem participar do processo tumoral.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar alterações morfológicas em linhagens celulares de SiHa e CaSki, por microscopia óptica;
- b) Analisar as alterações na modulação da expressão dos genes *E6* e *E7* em linhagens celulares de SiHa e CaSki, por meio do PCR quantitativo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A. Linhagens celulares

Foram utilizadas duas linhagens tumorigênicas da *American Tissue Cell Culture* (ATCC): ambas carcinoma epidermoide de colo de útero, SiHa e CasKi, porém SiHa infectada pelo HPV 16 e Caski pelo HPV 16 e HPV 18.

B. Piperina

Foi utilizado o composto piperina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na concentração de 150 μ M, diluídas em DMSO (ZHANG *et al.*, 2015; FOFARIA; KIM; SRIVASTAVA, 2014), por 24 horas. Por meio de estudos preliminares do grupo, pelo ensaio de proliferação e viabilidade celular, foi visto que tal concentração e tempo de exposição são determinantes para que a piperina aja de forma significativa na célula. Assim, com base em estatísticas, essas duas condições são melhores quando comparadas às circunstâncias da célula. A piperina deve estar diluída em concentrações menores do que 1% em DMSO, pois este é tóxico em altas concentrações (CARDOSO *et al.*, 2022).

3.2 Métodos

A. Cultivo celular

As linhagens celulares SiHa e CasKi foram semeadas em MEM, suplementadas com 10% de soro bovino, 10mM aminoácidos não essenciais, 100mM piruvato de sódio, 1x antibiótico/antimicótico. Essas células foram mantidas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas, até se fixarem no substrato. Após esse período, o meio foi trocado a cada dois ou três dias, ou até se tornar confluyente. As células serão avaliadas diariamente em microscópio invertido e, quando a densidade celular se mostrar alta, o material foi submetido à tripsinização e subdividido em três réplicas. Para todos os experimentos foi realizada a sincronização celular, pelo privamento de soro fetal bovino por 24 horas.

B. Análise da morfologia celular pela microscopia óptica

Foi utilizado o corante azul de tripan para observar se a célula estava viável. O crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente em microscópio invertido (Olympus

CKX41) e fotografadas (5 fotos por campo nas diferentes objetivas de 4, 10 e 40 vezes), quando a densidade celular se mostrou alta (entre 70 e 80%). O material foi submetido à tripsinização e subdividido em réplicas.

C. Extração de RNAs e confecção do cDNA

O RNA total das amostras foi extraído usando o reagente TRIzol e tratado com DNase. A síntese do cDNA foi realizada usando o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme descrito pelo fabricante.

D. PCR quantitativo

As reações para os oncogenes virais *E6* e *E7* foram realizadas em termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), no Laboratório de Biomarcadores e Bioinformática Médica, na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, SP. Todas as reações foram preparadas em triplicata, incluindo o controle endógeno GAPDH, que foi utilizado como normalizador, e processados em volume final de 20uL contendo 200 ng de cDNA, SYBR® Green PCR Master Mix e 100nM de cada primer, segundo protocolo da Applied Biosystems. Finalmente, os valores de expressão gênica obtidos nas análises foram novamente normalizados pelo resultado da quantificação da amostra controle, escolhida como calibrador de todas as amostras. Foi utilizado o método de Pfaffl, 2001 para os cálculos de análise comparativa.

Tabela 1. *Primers* utilizados na PCR em tempo real

Oligonucleotídeos	Sequência
<i>HPV16-E6</i> anti-sense	5' CTACGTGTTCTTGATGATCTG 3'
<i>HPV16-E6</i> sense	5' CTTACCACAGTTATGCACAGAG 3'
<i>HPV16-E7</i> anti-sense	5' TGCCCATTAACAGGTCTTCC 3'
<i>HPV16-E7</i> sense	5' ACAAGCAGAACCGGACAGAG 3'
<i>GAPDH</i> anti-sense	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3
<i>GAPDH</i> sente	5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Piperina causa modificação na morfologia celular

A piperina tem sido associada à redução do desenvolvimento de diversos tipos de câncer, uma vez que previne ou retarda os danos às células e aos tecidos, inibindo as reações de oxidação, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, causadas por radicais livres. Dito isso, outros estudos envolvendo câncer indicam que a piperina é capaz de induzir células cancerígenas de cólon e de melanoma, por exemplo, à apoptose e ao bloqueio do ciclo celular, podendo corroborar com os resultados do presente estudo (SCHMIDT, 2015).

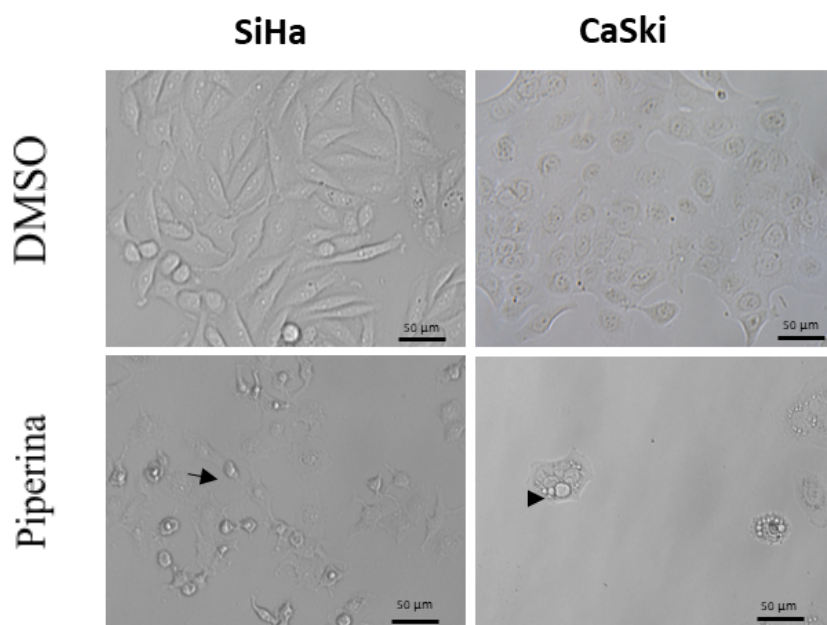
De acordo com os resultados, foi evidenciado que a piperina alterou a morfologia de todas as linhagens celulares estudadas. A linhagem celular CaSki, de origem de neoplasia de cérvix uterina humana metastática, com propriedade aderente, possui morfologia semelhante a célula epitelial (BRIANEZI *et al.*, 2021). A linhagem celular SiHa, de origem de neoplasia de cérvix uterina escamosa humana, também possui morfologia semelhante à célula epitelial (CANALI, 2013). Os tecidos epiteliais apresentam características básicas semelhantes como células poliédricas e justapostas (coesão), com pouca ou nenhuma matriz extracelular (MEC), avascularizados e nutridos por lâmina basal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Na figura 1, nota-se que as células SiHa, quando aderidas, possuem morfologia alongada e fina, enquanto a linhagem celular CaSki se apresenta mais arredondada. Na linhagem celular SiHa, as células que anteriormente apresentavam aspecto fusiforme, se tornaram arredondadas e amorfas (sem forma), por conta da retirada do contorno celular, ocasionado provavelmente pela ruptura da membrana plasmática (apontado pela seta pequena). Na linhagem CaSki, por sua vez, foi observado formação de vesículas intracelulares (apontado pela ponta de seta) após tratamento com piperina.

Dessa forma, foi observada intensa vacuolização e condensação citoplasmática, além de invaginações na membrana plasmática, o que constitui características marcantes da ativação do processo apoptótico (CANALI, 2013). Somado a isso, a Figura 1 ainda mostra as principais alterações morfológicas identificadas na linhagem SiHa, como uma intensa retração citoplasmática quando as células são submetidas ao tratamento com a piperina. Enquanto nas células CaSki foi possível observar uma retenção progressiva do citoplasma e vacuolização das células quando comparadas às células controle. Em suma, podemos inferir que a piperina altera a morfologia celular das linhagens SiHa e CaSki levando à formação de vacúolos que

tendem a uma morte celular programada, o que seria vantajoso para a redução do processo tumoral.

Figura 1 - Piperina altera morfologia celular.



Subtítulo: Fotomicrografia da morfologia das linhagens celulares SiHa e CaSki após 24h de tratamento com DMSO (controle) e piperina [150μM]. Seta mostrando rompimento da membrana e ponta de seta mostrando as vesículas intracelulares. Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022.

Outros autores realizaram pesquisas sobre modificação da morfologia celular quando células leucêmicas foram tratadas com piperina, indicando que o fitoterápico causa mudanças significativas em K562, Lucena-1, e ainda mais marcantes em células FEPS. Tais linhagens celulares resistentes, de leucemia, sofreram um aumento na formação de vacúolos em seu citoplasma, em comparação com as demais, corroborando com os resultados do presente estudo (QUARTI *et al.*, 2021).

4.2 Piperina modula as oncogenes *E6* e *E7*

Como mencionado anteriormente, os HPV oncogênicos são caracterizados pela associação do desenvolvimento do câncer cervical com a perda do ciclo reprodutivo do HPV. Tal evento está ligado ao aumento da expressão dos genes *E6* e *E7* que se estende mais amplamente na espessura do epitélio, da profundidade para a superfície, com diminuição simultânea da expressão daqueles genes importantes nos estágios finais da infecção, fato que impossibilita que o ciclo produtivo se complete. É justamente esta perda da capacidade de

completar o ciclo que caracteriza uma infecção viral transformante e tumoral (CARVALHO, 2010).

É provável ainda que as proteínas E6 e E7 causem a perda da integridade dos cromossomos em nível numérico através de múltiplas vias, que inclui a desregulação da expressão gênica e mitótica. Além de seu papel na desregulação do ciclo celular e do controle da apoptose, descrito anteriormente, as proteínas E6 e E7 têm um papel importante na evasão da resposta imune (CARVALHO, 2010). Estudos demonstraram que as proteínas E6 e E7 podem interferir na resposta imune inata contra o HPV, na medida em que inibem a expressão de um receptor transmembrana presente na superfície da mucosa envolvido no reconhecimento do vírus, o Toll-like receptor-9 (TLR-9) (CARVALHO, 2010).

Além disso, Aumeeruddy e Mahomoodally (2019), evidenciaram a eficácia da piperina e outros fitoterápicos em pacientes em tratamento de câncer de mama, através da redução da expressão de *MMP-9* e *MMP-1*, indução da apoptose pela ativação da via caspase-3 e inibição da expressão do gene *HER2*. Os autores concluem que os achados *in vitro* e *in vivo* estabelecem um futuro promissor para terapias combinadas usando os compostos bioativos da piperina, que são precedentes para conduzir testes antes de ser descoberta a cura do câncer de mama (AUMEERUDDY; MAHOMOODALLY, 2019).

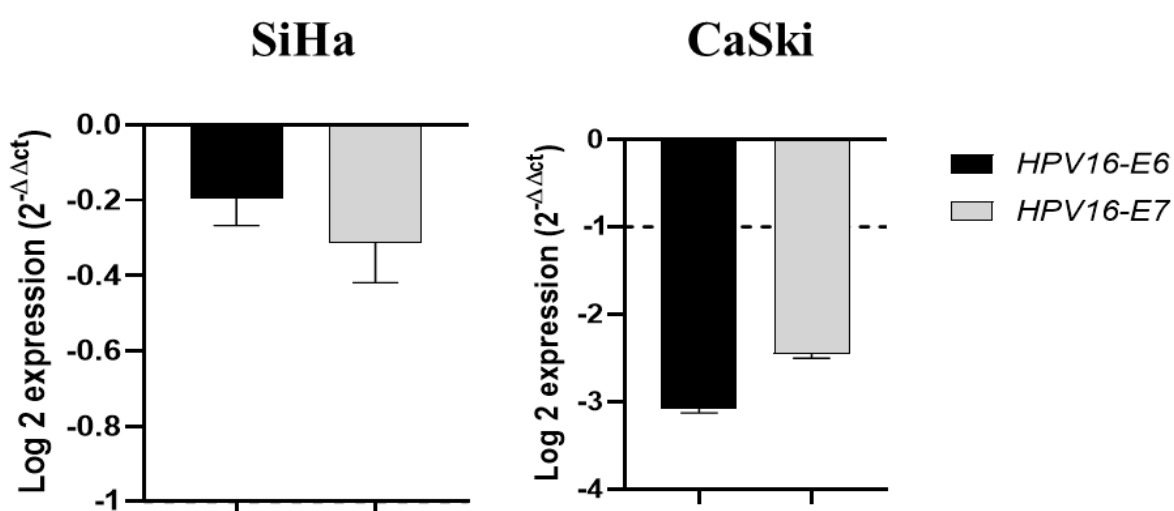
Outros autores citam a piperina como grande aliado da quimioprevenção (uso de certas substâncias para ajudar a diminuir o risco de desenvolvimento do câncer ou impedir que o mesmo retorne), sendo alguns de seus mecanismos de ação: ativação da apoptose, inibição da proliferação celular, modulação do stress e autofagia da ER, inibição da angiogênese e sensibilização de tumores à radioterapia e quimioterapia. Os mecanismos de ação da piperina mencionados anteriormente revelam que o fitoterápico pode contribuir significativamente para quimioprevenção do câncer (RATHER; BHAGAT, 2018).

Então, visto que outros estudos também ajudam na fundamentação da nossa hipótese, podemos observar nos gráficos das expressões do mRNA de HPV16-E6 e HPV16-E7 (Figura 2) que a piperina reduziu a expressão significativamente (de 4 a 6 vezes menos) das oncogenes E6 e E7 nas células CaSki, mas não modificou os níveis de expressão nas células SiHa. Portanto, a piperina age de forma benéfica em relação às alterações que podem participar do processo tumoral, diminuindo a progressão tumoral nas células de câncer cervical, o que foi evidenciado por meio da alteração morfológica das linhagens estudadas e da redução da expressão dos genes E6 e E7.

Diante do exposto, há indicações de que a piperina exerce um papel anti tumorigênico eficaz quando manipulada em linhagens de células CaSki, já que possibilitam que haja uma

regressão do carcinoma por meio da redução da expressão dos genes *E6* e *E7* do HPV, visto que estes interferem no controle do ciclo celular resultando em uma proliferação celular descontrolada (KARIN *et al.*, 2018) e, como visto em nossos resultados, na alteração da morfologia nas linhagens estudadas. Dessa forma, diante da necessidade de estudar novos tratamentos para o câncer, a piperina mostra-se um fitoterápico promissor para ser utilizado no tratamento complementar do câncer de colo de útero, mediado por ensaios funcionais necessários, frente às novas tecnologias, visando aplicações clínicas.

Figura 2: Piperina reduz a expressão de oncogenes do HPV16 nas células CaSki



Subtítulo: Gráficos das expressões do mRNA de *HPV16-E6* e *HPV16-E7* que foram analisadas após o tratamento com piperina (150uM), em relação às células SiHa e CaSki sem tratamento. A linha pontilhada ($\geq 1,0$ ou $\leq -1,0$) equivale à diferença da expressão significativa, baseada no logaritmo 2. Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, foi possível aceitar nossa hipótese de que o efeito antitumoral da piperina em câncer de colo de útero altera a morfologia celular e modula a expressão dos genes *E6* e *E7* do HPV 16, nos permitindo chegar às seguintes conclusões:

1. Piperina altera a morfologia celular das linhagens SiHa e CaSki do HPV 16, demonstrando intensa vacuolização e condensação citoplasmática nas respectivas células;
2. Piperina reduz a expressão dos genes *E6* e *E7* do HPV 16 nas células CaSki, mas não modifica os níveis de expressão nas células SiHa.

REFERÊNCIAS

- AUMEERUDDY, M.Z. AND MAHOMOODALLY, M.F., Combating breast cancer using combination therapy with 3 phytochemicals: Piperine, sulforaphane, and thymoquinone. **Cancer**, 125: 1600-1611, 2019.
- BALKWILL F, MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Vol 357, 539-45, 2001.
- BRIANEZI, LARISSA DE SOUZA *et al.* análise por microscopia eletrônica de varredura de esferóides da linhagem celular caski tratados com crisina, 2021.
- BRINGHENTI *et.al.* Cervical Cancer Prevention: association of new techniques of Molecular Biology with the oncotoc cytology in detection of human papilloma virus (hpv). DST - **J bras Doenças Sex Transm** 2010; 22(3): 135-140, 2010.
- BUSKWOFIE, A. A Review of Cervical Cancer: Incidence and Disparities. **J Natl Med**, v. 112, n. 2, 2020.
- CANALI, RAQUEL AGONILHA. Produção de anticorpos monoclonais e análise de suas interações com proteínas do hpv 16. secretaria de estado de são paulo – **instituto butantan programa de aprimoramento profissional em microbiologia e parasitologia**, 2013.
- CARDOSO, LUANA PEREIRA. Efeito antitumorigênico da piperina em câncer de colo de útero modulado pela via cicloxigenase prostaglandina. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2022.
- CARVALHO, MICHELLE GARCIA DISCACCIATI DE. Valor preditivo da avaliação do DNA e da expressão dos genes E6/E7 do papilomavírus humano na evolução da neoplasia intraepitelial cervical de grau 2. Campinas, SP: [s.n.], 2010.
- FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, p. 359–386, 2014.
- FERNANDES A, VIVEROS-CARREÑO D, HOEGL J, ÁVILA M, PAREJA R. Human papillomavirus-independent cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer**. ;32(1):1-7, 2022.
- FOFARIA, N. M.; KIM, S. H.; SRIVASTAVA, S. K. Piperine causes G1 phase cell cycle arrest and apoptosis in melanoma cells through checkpoint kinase-1 activation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014.
- GRAHAM, T.A. AND SOTTORIVA, A. Measuring cancer evolution from the genome. **J. Pathol.**, 241: 183-191, 2017.
- HEMMAT N, EBADI A, BADALZADEH R, MEMAR MY, BAGHI HB. Viral infection and atherosclerosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**: p. 2225-2233, 2018.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em:

<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>. Acesso em: 25 novembro 2022.

JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a ed. rio de janeiro: guanabara koogan, 524p, 2008.

JAFRI, A. *et al.* Induction of apoptosis by piperine in human cervical adenocarcinoma via ROS mediated mitochondrial pathway and caspase-3 activation. **EXCLI J**, v. 18, p. 154-164, 2019.

KARIN HOPPE-SEYLER, FELICITAS BOSSLER, JULIA A. BRAUN, ANJA L. HERRMANN, FELIX HOPPE-SEYLER. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets, **Trends in Microbiology**, Pages 158-168, Volume 26, Issue 2, 2018.

KUMAR, S. *et al.* Overview for Various Aspects of the Health Benefits of *Piper longum* Linn. Fruit. **JAMS Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 4, n. 2, p. 134-140, 2011.

KONDAPALLI NB, HEMALATHA R, UPPALA S, YATHAPU SR, MOHAMMED S, VENKATA SUREKHA M, RAJENDRAN A, BHARADWAJ DK. *Ocimum sanctum*, *Zingiber officinale*, and *Piper nigrum* extracts and their effects on gut microbiota modulations (prebiotic potential), basal inflammatory markers and lipid levels: oral supplementation study in healthy rats. **Pharm Biol**. Dec; 60(1):437-450, 2022.

LEWANDOWSKA AM, RUDZKI M, RUDZKI S, LEWANDOWSKI T, LASKOWSKA B. Environmental risk factors for cancer – review paper. **Ann Agric Environ Med**; 26(1):1-7, 2019.

NEWMAN, D.J., Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years. **J. Nat. Prod.** v. 75, p. 311-335, 2012.

PAARAKH, P. M. *et al.* In vitro cytotoxic and in silico activity of piperine isolated from *Piper nigrum* fruits Linn. **In Silico Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 3-9, 2015.

QUARTI, J.; TORRES, D.N.M.; FERREIRA, E.; VIDAL, R.S.; CASANOVA, F.; CHIARINI, L.B.; FIALHO, E.; RUMJANEK, V.M. Selective Cytotoxicity of Piperine over Multidrug Resistance Leukemic Cells. **Molecules**, 26, 934, 2021.

RATHER RA, BHAGAT M. Cancer Chemoprevention and Piperine: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. **Front Cell Dev Biol**. Feb 15;6:10, 2018.

ROSA, M. N. *et al.* Establishment, molecular and biological characterization of HCB-514: a novel human cervical cancer cell line. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

ROY PS, SAIKIA BJ. Cancer and cure: A critical analysis. **Indian J Cancer**. Jul-Sep;53(3):441-442, 2016.

SCHMIDT, Betina Resveratrol, Curcumina e Piperina: Bioatividade em Células de Adenocarcinoma Mamário Humano MCF-7 / Betina Schmidt – Rio de Janeiro. 105 f.il Tese: Doutorado em Ciências Nutricionais – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2015.

SMALL, W. *et al.* Cervical cancer: A global health crisis. **Cancer**, v. 123, n. 13, p. 2404–2412, 2017.

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

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2, p. 339–346, 2004.

SINGH, N. *et al.* Inflammation and cancer. **Ann Afr Med**, v. 18, n. 3, p. 121–126, 2019.

TASLEEM, F. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 1, p. 461–468, 2014.

VOLTARELLI JC. Febre e inflamação. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1/2, p. 7–48, jan./jun. 1994.

YEE, C. *et al.* Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. **American Journal of Pathology**, v. 119, n. 3, p. 361–366, 1985.

YE, Y. *et al.* COX-2-PGE2-EPs in gynecological cancers. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 301, n. 6, p. 1365–1375, 2020b.

YIN, WEN *et al.* Cancer and stem cells. Regenerative Medicine Research Center, Sichuan University West China Hospital, Sichuan, China; Memphis Institute of Regenerative Medicine, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, TN 38163, USA. **Experimental Biology and Medicine**, 246: 1791–1801, 2021.

YING, X. *et al.* Piperine inhibits IL- β induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocyte. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 293–299, 2013.

ZHANG, J. *et al.* Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/-9 expression. **International Immunopharmacology**, v. 24, n. 1, p. 50–58, 2015.