



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

Stefanie Oliveira de Sousa

**Estudo celular e molecular da *Piper nigrum* em linhagens tumorais
de câncer de cabeça e pescoço**

São José do Rio Preto

2021

Stefanie Oliveira de Sousa

**Estudo celular e molecular da *Piper nigrum* em linhagens tumorais
de câncer de cabeça e pescoço**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências junto ao Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – 2017/02100-3
CAPES – 88882.434449/2019-01

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Cristina
Rodrigues Lisoni

São José do Rio Preto

2021

S725e Sousa, Stefanie Oliveira de
Estudo celular e molecular da Piper nigrum em linhagens tumorais
de câncer de cabeça e pescoço / Stefanie Oliveira de Sousa. -- São
José do Rio Preto, 2021
68 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto
Orientadora: Flávia Cristina Rodrigues Lisoni

1. Câncer. 2. Genética Humana. 3. Fitoterápicos. 4. Piper nigrum. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Stefanie Oliveira de Sousa

**Estudo celular e molecular da *Piper nigrum* em linhagens tumorais
de câncer de cabeça e pescoço**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências junto ao Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – 2017/02100-3
CAPES – 88882.434449/2019-01

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP/(FEIS) – Ilha Solteira
Orientadora

Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino
USP/ FCFRP – Ribeirão Preto

Profa. Dra. Cristiane Damas Gil
UNIFESP/ Departamento de Morfologia e Genética – São Paulo

**São José do Rio Preto
03 de Setembro de 2021**

DEDICATÓRIAS

À minha família, meu pai José, minha mãe Darli e irmão Nilton, por terem estado sempre ao meu lado durante minha formação e caminhada, e por terem me ensinado que acima de tudo o que importa no fim é o amor que depositamos no que realizamos.

À minha companheira e melhor amiga Leticia Yumi, pelo carinho e toda paciência, e por sempre me incentivar a realizar o que amo, que é a Ciência.

*A minha querida orientadora Profa. Dra. Flávia Lisoni, por todos os ensinamentos,
paciência, carinho e atenciosidade ao longo desse projeto.
Pela dedicação e confiança nessa jornada científica.
Por ser exemplo de mulher na ciência,
professora e profissional pesquisadora.*

Muito obrigada!

A Profa. Dra. Sonia Maria Oliani, que como pesquisadora nos acolheu desde o início deste projeto em seu laboratório e confiou no nosso trabalho. Pelo exemplo de pesquisadora que és e pela visão de futuro que tens - nos engajando a continuar sempre acreditando na ciência.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2017/02100-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao programa e aos professores de Pós-graduação em Biociências do IBILCE, por todos os ensinamentos inovadores e suporte durante o percurso do Mestrado.

A todos os funcionários do IBILCE que são parte essencial para que a universidade pública exista como comunidade científica.

À coordenadora do programa de Pós-graduação Prof^a Dr^a Rejane Maira Góes e anteriormente a ela a Prof^a Dr^a Claudia Regina Bonini Domingos, por todo cuidado e dedicação com o programa de Biociências.

Aos professores da Unesp de Ilha Solteira, que fizeram parte da minha formação.

À Profa. Dra. Rosangela da Silva Laurentiz, pelo auxílio durante a elaboração do extrato total da folha da *Piper nigrum* utilizada nesse trabalho.

À Profa. Dra. Claudia Carareto e Profa. Dra. Ana Elizabete, por cederem a estrutura e equipamentos de seus laboratórios.

Ao Prof. Dr. Tiago Henrique, pela disposição em ajudar no desenvolvimento da técnica de PCR quantitativa em tempo real, e pelo conhecimento para soluções dos empecilhos encontrados.

À Profa. Dra. Lucíola Santos Lannes por todo auxílio e esclarecimentos com as dúvidas de estatística. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Jusceli Brogin Moreli pela cientista que és, por todo o conhecimento e experiências compartilhadas no laboratório, que foram muito importantes para meu desenvolvimento. Pela amizade e conversas durante os intervalos de cafés.

Às membras da banca de qualificação e defesa pelo suporte, sugestões e disponibilidade dada a conhecer esse projeto. Muito obrigada!!

À Agatha Cabral pela amizade, auxílio e por todo o suporte através do seu conhecimento com o ensaio de western blott.

Aos meus amigos Mayk Ricardo e Raquel Megid pela amizade, por me acolherem tão bem em São José do Rio Preto, pelos momentos que vivemos juntos sempre cheios de aprendizados, que foi essencial para minha felicidade aqui.

À minha segunda família, Ichikawa, por simplesmente fazerem parte da minha alegria e participarem da minha vida.

Aos meus amigos queridos Brenda L., Guilherme N., Luciano S., Thais N., Rodrigo R. Letícia G., Lucas B., Franciele G., Maryanna S., Agradeço a todos vocês, pelas conversas, risadas e por todo o companheirismo.

As minhas amigas Amanda C., Franciele A., Luana Del M., Lara C., Uélida M., Mariana S., por me receberem tão bem aqui e serem uma família para mim em São José do Rio Preto.

Aos meus amigos de jornada acadêmica, Renan B., Marla A., Carla A., Mayanna V., Jullienne G., Camylla G., Igor M., e muitos outros aqui não citados, pela amizade e por cada momento juntos.

A minha amiga Luana C., por todos os momentos repletos de reflexões sobre a biologia do câncer interceptando com os nossos resultados.

A Agatha H., pela nossa amizade e por sempre saber o que dizer nos momentos confusos da vida.

A minha amiga Alessandra S., agradeço pelas conversas e pelo apoio familiar em todos os momentos da minha vida.

Ao meu novo amigo Rubens S. pelos momentos compartilhados na pandemia da Sars-Cov-2 através de mensagens de carinho, conversas e por tornar esse momento menos doloroso.

“Ser forte não significa exercitar os músculos. Significa encontrar seu próprio brilho sem fugir, vivendo ativamente com a natureza selvagem de uma maneira própria. Significa ser capaz de aprender, ser capaz de defender o que sabemos. Significa manter-se e viver”

(Clarissa Pinkola)

RESUMO

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço com acometimento em regiões anatômicas do trato aerodigestivo superior representa o sexto tipo mais comum de câncer no mundo. O seu tratamento inclui cirurgia, terapia por irradiação e quimioterapia, entretanto, estes métodos são altamente invasivos, com um significativo comprometimento funcional. Em função disso, tratamentos fitoterápicos contra o câncer têm despertado interesse científico, e a *Piper nigrum*, uma planta utilizada no tratamento de diversas doenças, tem sido estudada por possuir moléculas bioativas com propriedades farmacológicas anticâncer. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial efeito do extrato total da folha nas células sobre a morfologia, proliferação e migração celular, citotoxicidade, genotoxicidade, apoptose e necrose, ciclo celular, expressão gênica (*PTGS2*, *PTGER3*, *PTGER4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*) e proteica (*PTGS2*, *PTGER4*, *MMP2*), observando como o composto age e como essas alterações participam do processo tumoral. Para isso foram utilizadas duas linhagens de células tumorais (HEp-2 e SCC-25) e células normais orais (fibroblastos), após o tratamento com a *Piper nigrum* em três concentrações (10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL), por 4, 24, 48 e 72 horas. Os resultados evidenciaram que o extrato total da folha de *Piper nigrum* não altera a morfologia celular, mas diminui a proliferação e migração das células, não altera a viabilidade das células normais, e possui efeitos genotóxico, provavelmente por indução de apoptose celular, e ainda modula a expressão de genes e proteínas envolvidas com o processo inflamatório. Dessa maneira, o extrato total da folha de *Piper nigrum* parece apresentar uma sinergia entre seus metabólitos atuando diretamente nas células tumorigênicas por mecanismos relacionados às vias antiproliferativas, apoptóticas e/ou inflamatórias e abrem novas possibilidades de estudos futuros para terapias associadas no câncer de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: Câncer. Cultura de células. Composto Natural. Ciclo celular. Apoptose.

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma with involvement in anatomical regions of the upper aerodigestive tract represents the sixth most common type of cancer in the world. The treatment includes surgery, irradiation therapy and chemotherapy, however, these methods are highly invasive, with significant functional impairment. In function of this, herbal treatments against cancer have aroused scientific interest, and *Piper nigrum*, a plant used in the treatment of various diseases, has been studied for having bioactive molecules with anti-cancer pharmacological properties. Therefore, the present work had as objective to evaluate the potential effect of total leaf extract on cells on morphology, proliferation and migration, cytotoxicity, genotoxicity, apoptosis and necrosis, cell cycle, gene and protein expression, observing how the compound acts and how these changes participate in the tumoral process. For this, two tumorigenic cell lines (HEp-2 and SCC-25) and normal oral cells (Fibroblasts) were used, after treatment with *Piper nigrum* in three concentrations (10 µg / mL, 50 µg / mL and 100 µg / mL), for 4, 24, 48 and 72 hours. The results showed that the total extract of the leaf of *Piper nigrum* does not alter the cell morphology, but decreases the proliferation and migration of the cells, does not alter the viability of normal cells, and has genotoxic effects, probably by inducing cell apoptosis, and it also modulates the expression of genes and proteins involved with the inflammatory process. Thus, the total extract of the leaf of *Piper nigrum* seems to present a synergy between its metabolites acting directly on tumorigenic cells by mechanisms related to antiproliferative, apoptotic and/ or inflammatory pathways and open up new possibilities for future studies for associated therapies in cancer of head and neck.

Keywords: Cancer. Cell culture. Natural compound. Cell cycle. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gravura da <i>Piper nigrum</i> evidenciando suas folhas.....	19
Fluxograma 1 – Ciclooxigenase 2 e mediadores inflamatórios.....	21
Fluxograma 2 – Sequência experimental do projeto.....	29
Figura 2 – Esquema exemplificando o ensaio de migração <i>transwell</i>	32
Figura 3 – Fluorescência dos núcleos corados com <i>GelRed</i> evidenciando os danos avaliados pelo ensaio Cometa	34
Figura 4 – Morfologia das células controle e após o tratamento com a <i>Piper nigrum</i>	40
Figura 5 – Ensaio de proliferação celular com o extrato total da <i>Piper nigrum</i> nas diferentes condições analisadas.....	42
Figura 6 – Ensaio de viabilidade e citotoxicidade nas linhagens HEP-2, SCC-25 e fibroblastos	43
Figura 7 – Ensaio de Migração celular <i>Transwell</i> controle e após o tratamento com o extrato total.....	45
Figura 8 – Índice de danos obtidos pelo ensaio de genotoxicidade para as linhagens HEP-2 e SCC-25.....	46
Figura 9 – Efeito do tratamento com o extrato total da folha de <i>Piper nigrum</i> sobre a viabilidade, apoptose, apoptose tardia e necrose.....	47
Figura 10 – <i>DotPlots</i> obtidos da citometria de fluxo.....	47
Figura 11 – Análise da progressão do ciclo celular após o tratamento com o extrato total da folha de <i>Piper nigrum</i>	48
Figura 12 – Histogramas representativos da progressão do ciclo celular para as linhagens tumorigênicas tratadas.....	48
Figura 13 – Expressão dos genes da via ciclooxigenase-2 por Real-Time PCR.....	49
Figura 14 – Expressão de PTGS2, PTGER4 e MMP2 por western Blott.....	50
Figura 15 – Resumo gráfico do potencial modulatório da folha de <i>P.nigrum</i> em CECp.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores de cadeia (primers) utilizados na PCR quantitativa.....	35
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: porcentagem
[]: concentração
≤: menor ou igual
Anexina V: proteína Anexina 5
ATCC: banco americano de linhagens celulares
cDNA: DNA complementar
CECP: carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço
CO₂: gás carbônico
PTGS2: ciclooxigenase -2
Ct: cycle threshold
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
ECM: Matriz extracelular
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
FAMERP: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G2: fase G2 ou Intérfase
M: fase Mitose
h: horas
H₂O: água
HEp-2: linhagem de carcinoma epidermoide de laringe
HPV: Papilomavírus humano
IBILCE: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
IC₅₀: metade da concentração inibitória máxima
ID: índice de dano
INCA: Instituto Nacional do Câncer
LL: células viáveis
LMP: agarose de baixo ponto de fusão
LR: células em apoptose inicial
M: molar
mA: miliampère
Meio MEM e DMEM: mistura de sais enriquecida com aminoácidos, vitaminas e compostos essenciais para crescimento celular
min: minutos
mL: mililitro
C: milimolar
MMP2: matriz metaloproteinase 2
MMP9: matriz metaloproteinase 9
MTS:(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium)
NaCl: cloreto de sódio
NaOH: hidróxido de sódio
nm: nanômetro
NMP: agarose de ponto de fusão normal
nº: número
NF-κB: fator nuclear kappa B

OMS: Organização Mundial da Saúde
PBS: tampão fosfato salino
PCR: reação em cadeia da polimerase
PE: fitocoeritrina
PGE2: prostaglandina E receptor 2
pH: potencial hidrogeniônico
PS: fosfolípídeo fosfatidilserina
PTGER1: receptor de prostaglandina E1 (subtipo EP1)
PTGER2: receptor de prostaglandina E2 (subtipo EP2)
PTGER3: receptor de prostaglandina E3 (subtipo EP3)
PTGER4: receptor de prostaglandina E4 (subtipo EP4)
P53: proteína tumoral com peso de 53kDa
P21: proteína inibidora de ciclo celular com peso de 21kDa
RNA: ácido ribonucleico
rpm: rotação por minuto
RT: transcriptase reversa
seg: segundo
SCC-25: linhagem de carcinoma epidermoide de língua
SP: São Paulo
TIMP1: Inibidor de tecido de metaloproteinase 1
TIMP2: inibidor de tecido de metaloproteinase 2
TIMP3: inibidor de tecido de metaloproteinase 3
TIMP4: inibidor de tecido de metaloproteinase 4
UL: células em necrose
UNESP: Universidade Estadual Paulista
UNICAMP: Universidade de Campinas
UR: células em apoptose tardia
V: volts
 Δ : delta
 μ g: microgramas
 μ L: microlitros
 μ M: micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2.OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Linhagens celulares	27
3.2 Extrato total da folha de <i>P.nigrum</i> e DMSO.....	27
3.3 Cultivo e análise da morfologia celular	28
3.4 Índice de proliferação celular.....	29
3.5 Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular	30
3.6 Ensaio de migração celular <i>transwell</i>	31
3.7 Ensaio de genotoxicidade (cometa).....	32
3.8 Avaliação de Apoptose e Ciclo celular por Citometria.....	34
3.9 Análise de PCR quantitativo em tempo real.....	35
3.9.1 Genes alvos.....	35
3.9.2 PCR quantitativo em tempo real.....	36
3.10 Expressão de proteínas pelo ensaio de western blott.....	37
3.11 Análises estatística.....	38
4. RESULTADOS	39
4.1 A morfologia das células não sofrem modificações	40
4.2 O extrato total da folha de <i>P.nigrum</i> diminui a proliferação celular nas linhagens HEP-2, SCC-25 e Fibroblasto oral.....	41
4.3 O extrato total da folha não altera a viabilidade celular das células normais ao longo do tempo.....	42
4.4 O extrato total da folha diminui a migração das células HEP-2, SCC-25 e fibroblastos.....	44
4.5 A genotoxicidade da <i>Piper nigrum</i> nas linhagens tumorigênicas.....	45
4.6 O extrato total da folha induziu a morte celular nas linhagens tumorigênicas.....	46
4.7 As células tratadas sofreram parada do ciclo celular em G0/G1 e G2/M.....	47
4.8 O extrato total da folha modulou a via inflamatória da ciclooxigenase-2.....	48
4.9 O extrato total da folha modulou a expressão de proteínas envolvidas com o processo inflamatório.....	49
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) compreende tumores localizados na região da cabeça e pescoço, excluindo os cerebrais. Esse carcinoma pode afetar laringe, cavidade bucal e nasal, lábios, seios nasais ou paranasais, língua e glândulas salivares (SIEMIANOWICZ *et al.*, 2018) e a maioria é do tipo histológico espinocelular. Sendo classificado como o sexto tipo mais comum de tumores malignos no mundo (TRIBIUS *et al.*, 2019), esses tumores vêm sendo cada vez mais relatados, apresentando mais de 650.000 novos casos e 330.000 mortes a cada ano no mundo (BRAY *et al.*, 2018), com estimativas para o ano de 2021 no Brasil de 11.200 novos casos em homens e 4.010 em mulheres, considerando apenas os tumores de cavidade oral e 6.470 novos casos em homens e 1.180 em mulheres, tumores que acometem a laringe (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA, 2021).

Os principais fatores de risco para o CECP são o consumo de bebidas alcoólicas, infecção por HPV, sendo este um fator de indução na inflamação do câncer de cabeça e pescoço (SPEIGHT *et al.*, 2018; CARLSON e KADEMANI, 2020). Além desses, o uso recorrente do tabaco junto com o consumo de álcool aumentam consideravelmente o risco de desenvolvimento dessa neoplasia (REUTHER; BRENNAN, 2014; DHULL *et al.*, 2018), e também são considerados fatores externos que podem promover a inflamação crônica, dando suporte ao desenvolvimento tumoral (COMEN; BOWMAN; KLEPPE, 2018). Um estudo recente mostrou que na população brasileira cerca de mais de 80% dos indivíduos com câncer de cabeça e pescoço usavam ou ainda usam tabaco e álcool respectivamente (GOMES *et al.*, 2020). Além disso, em países de alta renda, estudos indicaram que de um terço a dois quintos dos novos casos de câncer poderiam ser evitados eliminando ou reduzindo a exposição a esses fatores conhecidos como estilo de vida (BRAY *et al.*, 2018).

Considerando os prejuízos causados pelo câncer, o seu tratamento inclui cirurgia, terapia por irradiação e quimioterapia (INCA, 2021), sendo a radioterapia com intenção curativa o padrão de tratamento para pacientes com CECP em muitas instituições onde ajudaram a melhorar o prognóstico e a qualidade de vida de diversos pacientes (BETTS *et al.*, 2018), mas, embora a medicina moderna tenha contribuído para o tratamento de cânceres, esses tipos ainda são considerados tratamentos altamente invasivos.

Cada vez mais, um maior número de plantas medicinais tem seu valor terapêutico estudado com o auxílio da ciência e da tecnologia e com isso o uso de compostos naturais, conhecidos como metabólitos secundários, tem contribuído para

a saúde nos avanços dos tratamentos de terapia anticâncer (GEZICI; ŞEKEROĞLU, 2019). O uso dessas plantas já vem sendo desenvolvido como uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade, para tratamentos como cura e prevenção de doenças.

Estudos mostraram que plantas do gênero *Piper* contêm uma variedade de constituintes químicos, como piperolides, propenilfenóis, amidos, neolignanas, lignanas, flavonoides, terpenos e esteroides. (GUTIERREZ *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2011).

Desse modo, algumas plantas têm despertado interesse científico, entre elas a *Piper nigrum* L., conhecida popularmente como pimenta do reino ou preta, é uma das espécies mais conhecidas da família Piperaceae, sendo uma das mais antigas plantas com flores que crescem em regiões tropicais (SCOTT *et al.*, 2007). Essa pimenta também tem uma participação central no mercado global econômico e a sua importância medicinal é devido a sua fonte de moléculas bioativas com propriedades farmacológicas que sustentam seu potencial anticâncer em diferentes linhagens de células e modelos animais (TAKOOREE *et al.*, 2019; TURRINI; SESTILI; FIMOGNARI, 2020). Assim, existe um grande interesse no estudo da biologia dessa planta medicinal pela comunidade científica atualmente.

A *Piper nigrum* é utilizada na medicina oriental e na medicina popular pelos índios no tratamento de muitas doenças como inflamação, febre, asma e câncer. A cultura tradicional de tribos indígenas, no Brasil, associa a *P. nigrum* no tratamento de respostas inflamatórias (GRINEVICIUS *et al.*, 2016), e também possui inúmeras atividades farmacológicas, como anti-inflamatória (NGO *et al.*, 2017), antimicrobiano (NIKOLIĆ, *et al.*, 2015), anti-hipertensivo (AZIZ; MEHMOOD; GILANI, 2013) antioxidante (TU *et al.*, 2015), neuroprotetora (HRITCU *et al.*, 2015) e antitumorigênica (SRIWIRIYAJAN *et al.*, 2017).

No fruto foram isolados dois compostos ativos da *P. nigrum*, (-) - kusunokinina e piperlonguminina, que apresentaram efeito citotóxico contra células de câncer de mama e colorretal. Além disso, induziram a apoptose celular, dirigiram as células para a fase G2/M, diminuíram a topoisomerase II e aumentaram a atividade da p53 e p21 (SRIWIRIYAJAN *et al.* 2017). O extrato do fruto da *P. nigrum* apresentou uma estratégia promissora para o controle da inflamação na barreira epitelial no tratamento da rinite alérgica em modelos de camundongos (BUI *et al.*, 2020) e alcaloides do fruto exibiram atividade anti-inflamatória em macrófagos de murinos inibindo a ativação da

via NF- κ B, que está relacionada com a resposta celular a estímulos na regulação inflamatória (PEI *et al.*, 2020)

Segundo Turrini, Sestili e Fimognari (2020), extratos de partes constituintes da planta de *P. nigrum* podem oferecer uma sinergia interessante de seus constituintes bioativos únicos, alcançando atividade anticancerígena por mecanismos complementares. Os efeitos farmacológicos dos fitoquímicos e extratos da folha de *P. nigrum* foram explorados por um grupo de pesquisa do Japão, no qual extraíram três lignanas da folha de *P. nigrum*, sendo elas (–)-cubebina, (–)-3,4-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxicoquina e (–)-3-desmetoxicubebina (MATSUDA *et al.*, 2004; HIRATA *et al.*, 2007a; HIRATA *et al.*, 2007b; HIRATA *et al.*, 2008). Essas lignanas mostraram ação positiva na melanogênese (MATSUDA *et al.*, 2004) induzida pela expressão da tirosinase mediada pela ativação de p38MAPK (HIRATA *et al.*, 2007a) na inibição da atividade da testosterona 5 α -redutase atuando na atividade antiandrogênica (HIRATA *et al.*, 2007b) e na ação antialérgica comprovada pela inibição da liberação de histamina (HIRATA *et al.*, 2008).

Figura 1 – Gravura da *Piper nigrum* evidenciando suas folhas



Fonte: Elaborado pela autora

Outro metabólito é a piperina (1-piperilpiperidina) um alcaloide considerado o principal composto derivado do fruto, sementes e raízes da *P. nigrum*, ele possui além

da atividade anti-inflamatória outras propriedades farmacológicas e bioquímicas. Foi relatado a ação desse alcaloide na inibição da proliferação, migração, apreensão do ciclo celular, indução da morte de células cancerosas, modulação da angiogênese e degradação da matriz extracelular (ZADOROZHNA; TATARANNI; MANGIERI, 2019). Embora a piperina seja o principal constituinte ativo da pimenta do reino e a mais caracterizada em seus múltiplos mecanismos de ação contra o desenvolvimento do câncer, outros constituintes, como piperlongumine, pellitorine e kusunokinina, têm revelado conter propriedades anticancerígenas notáveis similarmente (TURRINI; SESTILI; FIMOGNARI, 2020). Existem relatos também de lignanas com efeitos colaterais, como a podofilotoxina, presente na espécie *Podophyllum*, que apresenta atividade anticâncer e atualmente vem sendo desenvolvido melhores derivados com propriedades farmacológicas (LIU *et al.*, 2015), incluindo etoposídeo e tenoposídeo que são utilizados clinicamente em linfoma de Hodgkin, leucemia aguda e câncer de pulmão (YOU, 2005).

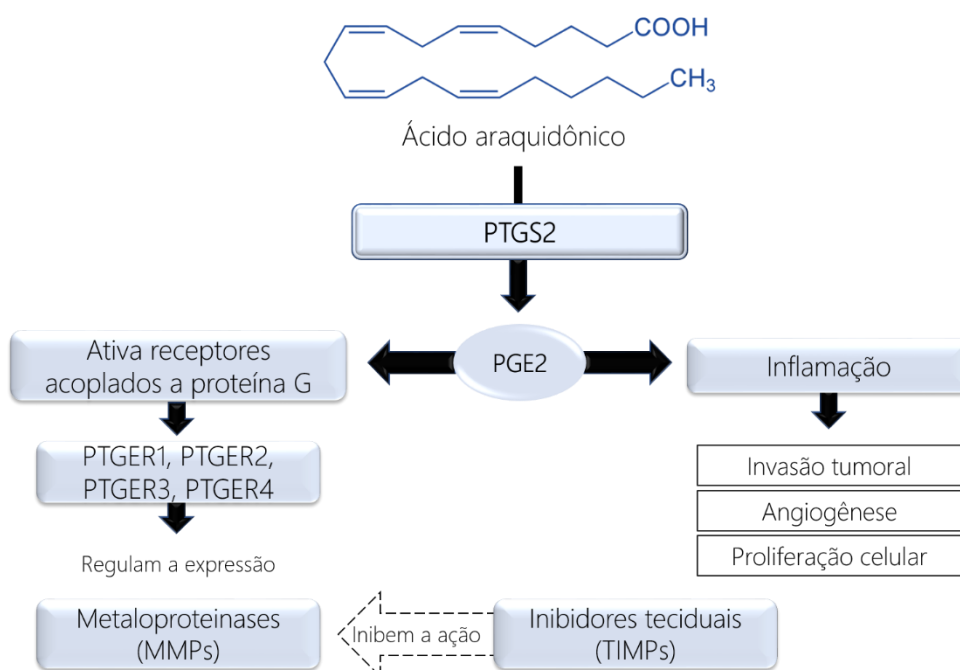
O CECP também está relacionado com angiogênese e processos inflamatórios, sendo a inflamação uma característica marcante no desenvolvimento e progressão do câncer, estando associada a várias etapas da tumorigênese como transformação celular, promoção, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase (SINGH *et al.*, 2019).

Cascatas gênicas estão sendo estudadas e relacionadas a esses processos inflamatórios, onde esses genes codificam proteínas, enzimas e receptores que estão diretamente envolvidos no processo tumorigênico. O gene *PTGS2* codifica a enzima ciclo-oxigenase 2 (PTGS2) que é responsável pela síntese de mediadores inflamatórios a partir de dois passos catalíticos: Primeiro, adiciona oxigênio ao ácido araquidônico para que a prostaglandina instável G2 (PGG2) seja formada; segundo, reduz o PGG2 à prostaglandina H2 (PGH2), que então é convertida, via sintetizadores específicos, como a prostaglandina E2 (PGE2), que está superexpressa em muitos tipos de carcinomas, como no câncer de cabeça e pescoço. A PTGS2 é ativada em resposta a estímulos inflamatórios, promovendo o desenvolvimento e a progressão dos cânceres e mediando seu efeito por vários mecanismos, como induzindo a proliferação celular, angiogênese e inibição da apoptose (MENDES *et al.*, 2009; FREJBORG; SALO; SALEM, 2020).

A Prostaglandina E2 (PGE2) é mediadora de muitas funções biológicas, onde promove a inflamação e vasodilatação local com recrutamento e ativação de células

inflamatórias. O PGE2 pode ser produzido por todos os tipos de células, e desencadear uma série de respostas celulares através da ligação com seus receptores (PTGER1, PTGER2, PTGER3 e PTGER4). Alguns dados da literatura sugerem que a expressão de seus receptores possui papel prognóstico no câncer de cabeça e pescoço (ABRAHAO *et al.*, 2010).

Fluxograma 1: Ciclo-oxygenase 2 e mediadores inflamatórios



Fonte: Elaborado pela autora

A regulação da expressão de metaloproteinases (MMPs) está implicada em diversos processos fisiológicos, incluindo o câncer. As MMPs são enzimas proteolíticas dependentes de zinco, que desempenham um papel de múltiplas funções na remodelação tecidual, através da desmontagem das junções intercelulares e a degradação da maioria dos componentes da matriz extracelular (ECM) incluindo colágeno, elastina, proteoglicanos e fibronectina. Inúmeros estudos revelaram que a matriz extracelular é a principal estrutura de “suporte” dos tecidos e que pode estar envolvida na supressão da proliferação e migração celular. As mudanças mediadas por essas enzimas extracelulares têm um impacto desfavorável durante o processo tumoral, influenciando as funções celulares como a proliferação, migração, angiogênese, apoptose celular e resposta imune que se relacionam na progressão do

tumor e invasão. Em resumo, a atividade proteolítica permite que a célula cancerígena invada um vaso sanguíneo próximo e depois extravase para invadir um tecido distante, sendo assim importante na invasão de tecidos subjacentes ao tumor e na metástase de células cancerígenas (CUI; HU; KHALIL, 2017).

Várias das MMPs possuem expressão elevada em câncer de cabeça e pescoço, incluindo MMP-2, MMP-8, MMP-9 e MMP-13 (YOSHIZAKI *et al.*, 2001; FRANCHI *et al.*, 2002; MOILANEN *et al.*, 2002; CANEVARI; ROGATTO, 2004). A MMP-2 e MMP-9 são ambas gelatinases, que possuem a capacidade de degradar o colágeno do tipo IV, o principal componente da membrana basal, sendo importantes para a progressão do câncer, invasão e metástase (LARONHA; CALDEIRA, 2020). Estudos recentes mostraram que as células tumorais de CEPC podem expressar vários MMPs, e em quantidades variadas, isso devido ao estágio metastático do câncer, local do tumor primário e tipo de tecido do qual o tumor se originou ou diferenças genômicas entre os pacientes. As atividades de MMP-2 e MMP-9 foram elevadas em células de carcinoma epidermoide de língua (SCC25) em comparação com a mucosa bucal normal. Onde a expressão de MMP-2 foi maior em células cancerosas metastáticas do que em não-metastáticas, afirmando para a hipótese de que a expressão de MMP-2 e MMP9 se correlacionam com crescimento tumoral mais agressivo e seu pior prognóstico em CEPC (WERNER; RATHCKE; MANDIC, 2002; BATES *et al.*, 2018).

As proteínas que naturalmente inibem a atividade das MMPs são as codificadas pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010), sendo quatro diferentes tipos importantes (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4) que desempenham um papel crucial no processo de controle de ativação e função das atividades das MMPs, que em tecidos tumorais é alterado em favor da proteólise (BREW; NAGASE, 2010).

Stanciu e colaboradores (2017) sugeriram que o desequilíbrio entre MMP-9 e TIMP-1 podem desempenhar um papel importante na progressão metastática através de vias linfáticas em CEPC. O estudo mostrou que as alterações na concentração de TIMP1 e TIMP2 circulantes em amostras de soro de pacientes, podem representar biomarcadores adequados para diagnóstico precoce e detecção de progressão e disseminação da doença em pacientes com CEPC. Além disso, em pacientes com carcinoma papilar da tireoide houve um aumento na expressão de TIMP-1 no tecido

tumoral em metástase, sendo considerada sua expressão, um fator diagnóstico no desenvolvimento de metástases nesse tipo de carcinoma (BUMBER *et al.*, 2020).

Pietruszewska e colaboradores (2016), sugeriram uma associação entre as expressões de MMP2 e TIMP2 em CECp, onde essas proteínas foram mais elevadas em pacientes com metástase linfáticas do que em relação ao grupo sem metástase, o que sugere que a avaliação de marcadores moleculares que participam da via de ativação de MMP-2 tem um grande impacto durante a metástase de carcinomas de laringe (BODNAR *et al.*, 2014), além de ter tido uma maior expressão do TIMP-1 nos tecidos neoplásicos do que naqueles normais adjacentes ao tumor (MA *et al.*, 2015).

Podemos verificar que os estudos com a *Piper nigrum* tem apresentado a ação bem relatada dos compostos bioativos de suas diferentes partes, como caule e raiz, que apresentam potencial atividade anticâncer. Porém pouco se tem conhecimento sobre os efeitos farmacológicos dos fitoquímicos presentes no extrato total da folha de *P. nigrum*, e como esses se relacionam na atividade anticâncer. Portanto o projeto avaliou alterações em decorrência da ação do extrato total da folha de *Piper nigrum* explorando o potencial antitumorigênico modulado pelas vias antiproliferativas, apoptóticas e/ou inflamatórias e também sua ação seletiva nas células tumorais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar atividade antitumoral do extrato da folha da *Piper nigrum* nas células neoplásicas de cabeça e pescoço e normais, observando o mecanismo de ação do fitoterápico no processo tumoral.

Os seus objetivos específicos compreenderam investigar *in vitro* o efeito do extrato total da folha *P. nigrum* nas células de linhagens de carcinoma epidermoide de laringe (HEp-2), de língua (SCC-25) e de fibroblastos da mucosa oral normal, sobre a morfologia, proliferação e migração celular, a citotoxicidade, a genotoxicidade, a apoptose e necrose celular, o ciclo celular, a expressão gênica (*PTGS2*, *PTGER3*, *PTGER4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*) e proteica (*PTGS2*, *PTGER4*, *MMP2*).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas duas linhagens tumorigênicas e uma linhagem de células normais. As linhagens tumorigênicas são de carcinoma epidermoide de laringe (HEp-2) e de língua (SCC-25), ambas do banco americano de linhagens celulares (ATCC), e foram cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/FAMERP, SP. Já as células normais, são células primárias de fibroblastos da mucosa oral humana, que foram cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Ricardo Coletta, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP). Considerado que essas células possuem um número menor de passagens para serem subcultivadas e as condições referentes ao período atípico no qual vivemos, a pandemia da COVID-19, não foi possível finalizar alguns dos ensaios para os fibroblastos.

3.2 Extrato total da folha de *P.nigrum* e DMSO

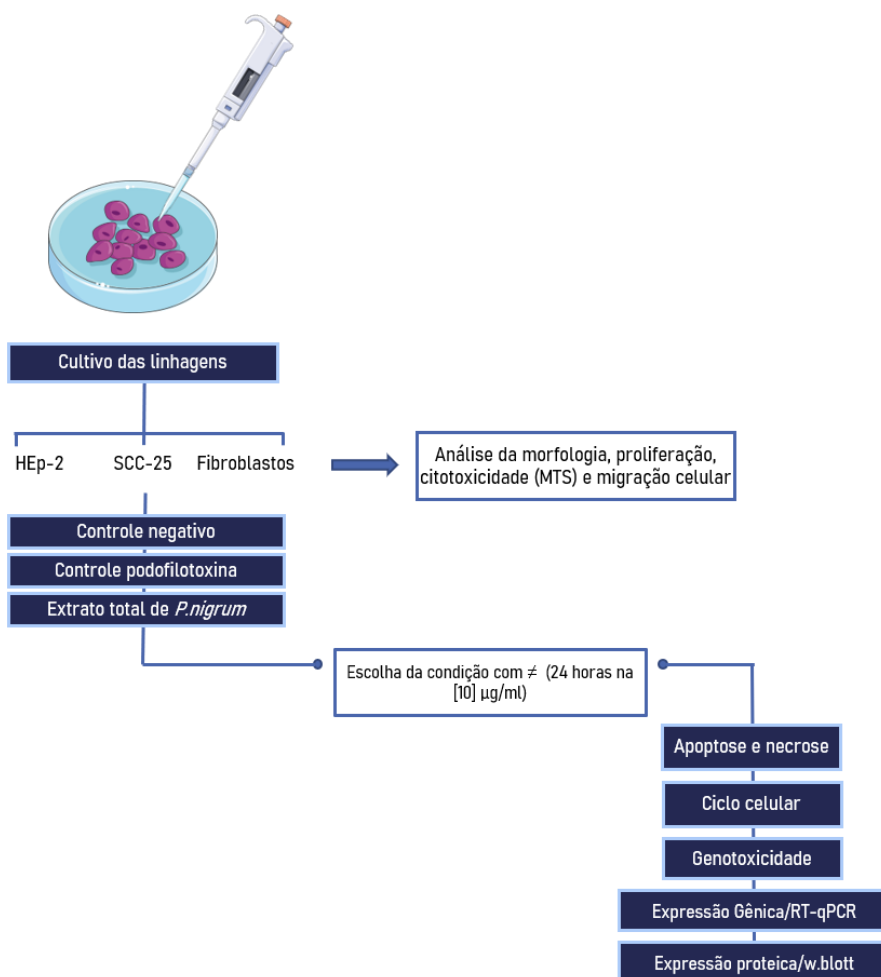
As folhas de *Piper nigrum* foram coletas no município de Palmeira d' Oeste (20°22'18" S 50°49'02 W). Foram separadas 500g para a preparação do extrato total. As folhas foram pesadas e secas em uma estufa de circulação de ar na temperatura de 45°C a 50°C, durante 48 horas. Então, essa amostra foi pulverizada em um moinho de faca resultando em partículas de 0,5mm de diâmetro. O extrato total da *P. nigrum* foi preparado com o auxílio da Profa. Dra. Rosângela da Silva Laurentiz, Departamento de Física e Química da FEIS/UNESP. O pó da folha de *P. nigrum* foi colocada em solução etanólica (400mL de álcool 70%), mantido em repouso e ocasionalmente agitada durante uma semana. Após 7 dias, a solução foi filtrada e posteriormente foi adicionado carvão ativado para retirar o pigmento clorofila. Por fim, o solvente foi removido, a pressão reduzida em rotaevaporador, resultado assim no extrato total. Esse extrato total foi pesado resultando na massa de 0,8385g, que foi diluída em 5mL de DMSO (Dimetilsulfóxido) e 5mL de água destilada, sendo assim a maior concentração de DMSO no experimento foi de 100 µg/mL, possuindo assim 0,06% de DMSO do volume total do meio de cultura por poço. Nota-se que o papel do DMSO foi avaliado durante os experimentos para esclarecer sua contribuição apenas como agente diluente e não interferir nos dados. Com a diluição, a solução produzida está na concentração de 8385µg/mL.

3.3 Cultivo e análise da morfologia celular

A linhagem HEp-2 foi semeada em meio completo (MEM suplementado com 10% de soro bovino, 10mM aminoácidos não essenciais, 100mM piruvato de sódio, 1x antibiótico/antimicótico). A Linhagem SCC-25 foi semeada em meio completo MEM F12 suplementado, enquanto os fibroblastos da mucosa oral em DMEM (High Glucose), suplementado igualmente as demais linhagens. 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. O crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente em microscópio invertido de contraste de fase *Olympus CKX41*, quando a densidade celular se mostrava alta, o material foi submetido à tripsinização e subdividido em três réplicas.

Para os procedimentos abaixo descritos (índice de proliferação celular, citotoxicidade, viabilidade e migração celular) foram realizados três experimentos, com cada uma das duas linhagens celulares, um experimento controle negativo (sem tratamento, porém com o agente diluidor – veículo - Dimetilsulfóxido), um experimento controle positivo (podofilotoxina) e outro com o extrato total da folha da *P. nigrum* em três diferentes concentrações (10, 50 e 100ug/mL) a serem tratados por 4, 24, 48 e 72h.

Então, foi escolhido o tempo e a concentração, com maior diferença significativa, de acordo com os testes estatísticos de cada experimento. As células foram processadas, em maior número, para os ensaios específicos de cometa, citometria de fluxo, western blott e PCR quantitativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e executados no Laboratório de Imunomorfologia do Ibilce/UNESP. As diferentes condições experimentais são apresentadas no *Fluxograma 2*.

Fluxograma 2: Sequência experimental do projeto

Fonte: Elaborado pela autora

3.4 Índice de proliferação celular

Para a análise do índice de proliferação foi realizada uma curva de crescimento para cada concentração a ser testada, com contagem de células cultivadas em placas de cultura de 24 poços, semeadas na concentração de 5×10^4 em 500 µl de meio de meio completo (MEM e DMEM) com 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37°C em câmara úmida e atmosfera com 5% de CO₂, por 24 horas, até se fixarem no substrato. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura sem soro (MEM e DMEM 0%), a fim de deixar todas as células na mesma etapa celular.

Após 24 horas foi trocado o meio de cultura, substituído de acordo com os experimentos referidos acima. Nesse dia zero do experimento, o meio sem soro foi substituído pelo meio completo e adicionado o extrato total a ser estudado nas concentrações desejadas.

Após 4h de experimento, as células dos primeiros poços da placa foram tripsinizadas, coradas com Azul de Tripán e contadas no contador de células *Countess Automated Cell Counter II* (Life Technologies). As células das outras placas foram tripsinizadas e contadas após 24, 48 e 72 horas do experimento.

3.5 Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular (MTS)

O ensaio colorimétrico de citotoxicidade se baseia nas várias funções celulares, como a atividade enzimática celular. Nesse ensaio ocorre a conversão de um sal de tetrazolium em um formazan colorido, pela atividade mitocondrial das células vivas, sendo captado no comprimento de onda de 490nm em espectrofotômetro. Sendo que intensidade da coloração é diretamente proporcional a viabilidade celular (KABAKOV; GABAI, 2017)

Os ensaios foram realizados com células cultivadas em placas de cultura de 96 poços com uma concentração de 3×10^3 células em 100µL de meio completo (MEM e DMEM 10% de soro fetal bovino) e mantidas a 37°C em câmara úmida e atmosfera com 5% de CO₂, por 24 horas, até se fixarem no substrato. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura sem soro (MEM 0%) e após 24 horas foi substituído pelo meio completo e adicionado o extrato total da *P. nigrum* nas concentrações desejadas.

Após quatro horas do experimento iniciado, as células receberam 20µl da solução de MTS e foram encubadas por 4h, seguindo para a leitura em espectrofotômetro (Thermo Plate, Tp-Reader Basic) no comprimento de onda de 492nm.

As células dos outros poços foram mantidas para a continuação do experimento nos tempos de 24, 48 e 72 horas, no qual as células receberam o MTS para a leitura em espectrofotômetro.

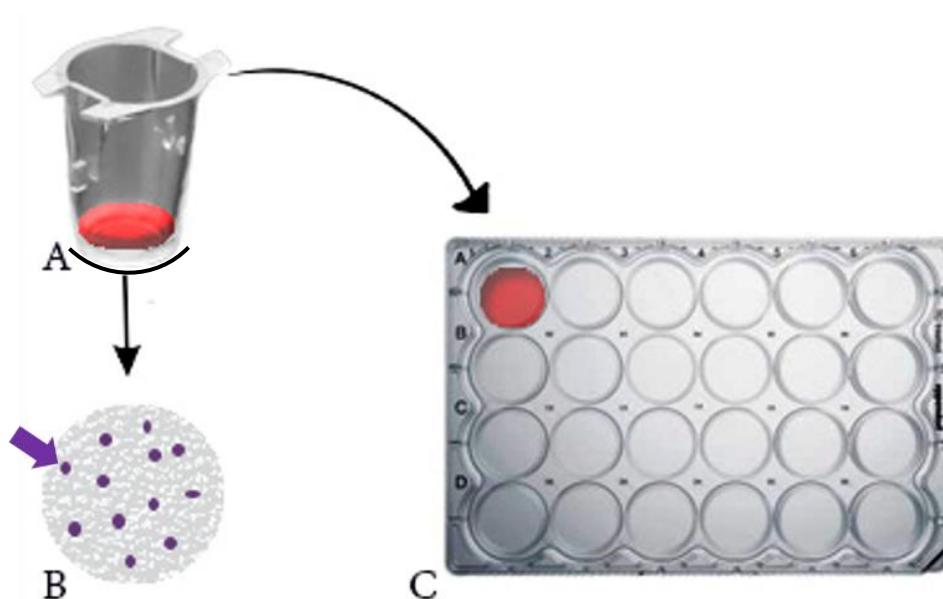
Após esse ensaio de citotoxicidade, foi aplicado o teste estatístico para a análise da viabilidade celular versus concentração, os valores de absorbância obtidos no tratamento com os compostos (A), foram normalizados para os valores obtidos com o controle (B) para obtenção da porcentagem de viabilidade celular (C) através da equação: $C = A/B \times 100$ para todas as concentrações estudadas, no qual o tempo e o número de células viáveis foram avaliados para sabermos se há diferença estatística significativa em relação à viabilidade celular.

3.6 Ensaio de Migração Celular *Transwell*

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 5×10^4 em 500 μ L, até se fixarem na placa de cultura. Após 24 horas, foi trocado novamente o meio de cultura por meio completo e adicionados os tratamentos, esse procedimento foi realizado para obter a quantidade necessária de células para fazer o experimento de migração *transwell*. Após a ação do extrato, novas placas de 24 poços receberam 500 μ L de meio completo e insertos *transwell* com membrana de poros (essas câmaras são compostas por dois compartimentos distintos, separados entre si por um filtro de polycarbonato com poros de 8 μ M de diâmetro, BD - Biosciences San Jose, CA, USA) para permitir a passagem das células, foram colocados dentro destes novos poços contendo apenas o meio de cultura (Figura 2). As placas contendo as células controle e tratadas foram tripsinizadas e retirada de cada condição a concentração de 3×10^4 de células que foram transferidas para o inserto *transwell* juntamente com 200 μ L de meio sem soro e na parte inferior 500 μ L de meio completo (10% SFB). Desta forma, fazendo com que as células pudessem migrar para a parte inferior externa do inserto, a qual estava em contato com o meio completo. Após, as células foram incubadas em estufa de CO₂, a 37°C de acordo com o tempo referente para que ocorresse a migração.

Os insertos foram lavados com PBS gelado e a fixação das células, na porção inferior, foi realizada com paraformaldeído a 4% diluído em PBS, por 30 minutos. Após coradas com solução de cristal violeta, por 60 minutos, posteriormente lavados com PBS para remover o excesso do corante, e deixados para secar em posição invertida no fluxo laminar. Secos, os insertos foram colocados sobre lâminas, analisados e fotografados em cinco diferentes campos, em microscópio invertido de contraste de fase *Olympus CKX41* com câmera acoplada em aumento de 400x, a análise quantitativa de células que migraram foi feita a partir das fotos.

Figura 2 – Esquema exemplificando o ensaio de migração *transwell*. Um inserto com poros de tamanho $0,8\mu\text{m}$ (A) é colocado sobre a superfície do poço com meio 0% (C), a fim de que as células (seta roxa) migrem para a parte inferior do inserto (B, coradas após com cristal violeta), no qual há o contato com o meio completo 10% (B-C).



Fonte: Elaborado pela autora

3.7 Ensaio de genotoxicidade (Cometa Alcalino)

As células HEP-2, SCC-25 foram cultivadas em placas de 6 poços em uma concentração de 5×10^5 em 1mL de meio completo 10% até se fixarem na placa de cultura. Após o plaqueamento, no dia seguinte, foi retirado o meio de cultura das placas e adicionado meio completo 10% juntamente com o extrato total da folha. Após a ação do extrato (24 horas na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ do extrato total de *P. nigrum*) o conteúdo dos poços foram tripsinizados e colocado em tubo falcon de 15ml e levados à centrifuga por 15 minutos a 1500rpm, a fim de formar um “*pellet*” de células no fundo dos tubos. O sobrenadante foi desprezado e o “*pellet*” de células misturado a agarose de baixo ponto de fusão/*Low Melting Temperature agarose* (LMP), disposto em lâminas de extremidades foscas que foram previamente mergulhadas em uma mistura de PBS (*Phosphate Buffer Solution*) e agarose de ponto de fusão normal/*Normal Melting agarose* (NMP) formando uma fina película sobre a lâmina. Após, o material disposto nas lâminas foram cobertos com lamínulas e levados a geladeira por 30 minutos para solidificar a agarose *Low Melting*.

Depois de solidificado, as lamínulas foram retiradas das lâminas e dispostas em cubas de vidro para a etapa de lise das membranas. A solução de lise pH 10 (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, Lauril 35mM, DMSO 10% e Triton-x100 1%), foi

adicionada às cubas, que em seguida foram cobertas por papel alumínio e acondicionadas em geladeira por 1 hora.

Após lisadas as membranas, as lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese com tampão de corrida pH 13 (NaOH 10N, EDTA 200mM), e permaneceram na cuba por 30 minutos antes de se iniciar a eletroforese. Transcorrido este tempo, seguiu-se uma eletroforese de 20 minutos a 25V e 300mA, para que o material pudesse se deslocar, possibilitando a formação da cauda do cometa.

Efetuada a corrida de eletroforese, as lâminas foram lavadas por 3 vezes com a solução de neutralização (Tris 0,4M) com pH 7,5. Com as lâminas neutralizadas e secas seguiu-se a etapa de fixação, onde as lâminas foram novamente acondicionadas em cubas de vidro preenchidas com etanol absoluto, ficando nesta condição por 10 minutos. Transcorrido este tempo, as mesmas foram expostas para secagem.

Na etapa de coloração, cada lâmina recebeu 100µL da solução (GelRed®, NaCl 1M e H₂O destilada) e após 5 minutos foram analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss, Oberkochen, Germany) em aumento de 400x.

Foram analisadas 100 células por grupo experimental. Os núcleos celulares foram classificados em classes de danos, descrito anteriormente por Kobayashi, 1995.

Classe 0 – sem dano aparente;

Classe 1 – cauda curta, menor que o diâmetro do núcleo;

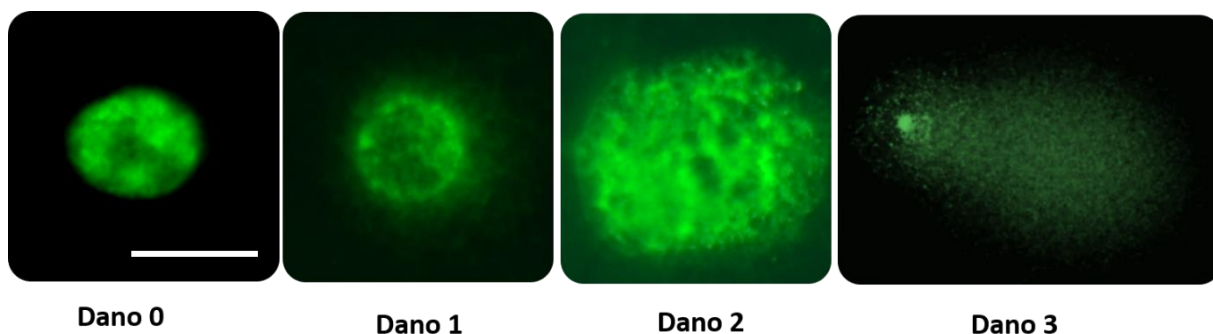
Classe 2 – comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo;

Classe 3 – comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo.

O Índice total de danos (ID total) foi calculado pela fórmula abaixo, onde n refere-se ao número de células de cada classe de danos: $ID\ total = 0.(n\ Classe\ 0) + 1.(n\ Classe\ 1) + 2.(n\ Classe\ 2) + 3.(n\ Classe\ 3)$.

Todas as etapas do ensaio foram realizadas em ambiente sem a incidência de luz direta e com temperaturas baixas, para evitar danos adicionais ao DNA.

Figura 3: Fluorescência dos núcleos corados com *GelRed* evidenciando os danos avaliados pelo ensaio Cometa após tratamento com o extrato total (concentração de 10µg/mL por 24 horas).



Fonte: Elaborado pela autora. Escala de 5µm.

3.8 Avaliação de Apoptose e Ciclo celular por Citometria

Para a avaliação de Apoptose as células HEP-2, SCC-25 foram cultivadas (4×10^5) em garrafas de 25cm², em 2 mL de meio completo e mantidas em câmara úmida, até se fixarem nas superfícies. Após o plaqueamento, no dia seguinte, após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio completo e assim adicionado o tratamento na concentração de 10µg/ml e 100 µg/ml, além da garrafa controle que recebeu apenas DMSO e uma segunda que recebeu podofilotoxina (controle positivo) e uma terceira apenas com células (controle negativo) para a calibração.

Passado o tempo de tratamento (24 horas), o conteúdo de cada triplicata e seu sobrenadante foram centrifugados a 1.500 rpm por 3 minutos para obtenção do *pellet*, e então lavadas três vezes com PBS.

Em seguida essas células foram contadas para se saber a quantidade de célula por tubo falcon, para que então se chegasse à contagem de 1×10^6 células/mL, após sendo adicionado o *buffer* 1x. Dessa solução foi transferido 100µl de cada amostra para um eppendorf de 1,5 mL, devidamente identificado. Então, foi adicionado 5 µl de PE (fitoeritrina) Anexina V e 5 µl de 7AAD (Amino-Actinomicina) (BD pharmigen, San Diego, USA) e feito uma homogeneização e incubação no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente. Após, foi adicionado 400 µl de tampão de ligação 1x e então foi realizada a leitura no aparelho citômetro, adquiridos 5.000 eventos de cada amostra (Guava Easy Cyte, MILLIPORE), para a investigação da expressão das moléculas relacionadas com apoptose e necrose após o tratamento com o extrato total da folha.

Para a análise de ciclo celular, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS, fixadas com etanol 70% e incubadas por uma hora em -20°C. A suspensão de células foi centrifugada e o *pellet* ressuspensionado em 200µl de solução do Kit *Guava Cell Cycle Reagent* (MILLIPORE, Temecula, USA) e então foi realizada a leitura no aparelho citômetro, adquiridos 10.000 eventos de cada amostra, para investigação do ciclo celular após o tratamento com o extrato total.

3.9 Análise de PCR quantitativo em tempo real

3.9.1 Genes alvos

Os genes a serem estudados nesse projeto (*PTGS2*, *PTGER3*, *PTGER4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*) foram previamente selecionados a partir dos marcadores potenciais identificados por estudos anteriores (Silveira *et al.*, 2008), utilizando bibliotecas SAGE. No projeto de mestrado de Cunha e colaboradores (2012), esses genes foram apontados como marcadores moleculares adequados nessa via de inflamação. A sequência de nucleotídeos dos genes encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Iniciadores de cadeia (primers) utilizados na PCR quantitativa

Oligonucleotídeo	Sequência
<i>PTGER3 anti-sense</i>	5' TCTCCGTGTGTGTCTTGCAG 3'
<i>PTGER3 sense</i>	5' AGCTTATGGGGATCATGTGC 3'
<i>PTGER4 anti-sense</i>	5' CCAAACCTGGCTGATATAACTGG 3'
<i>PTGER4 sense</i>	5' CGAGATCCAGATGGTCATCTTAC 3'
<i>MMP2 anti-sense</i>	5' CCGTCAAAGGGGTATCCATC 3'
<i>MMP2 sense</i>	5' AAGTCTGGAGCGATGTGACC 3'
<i>MMP9 anti-sense</i>	5' ATTCGACTCTCCACGCATC 3'
<i>MMP9 sense</i>	5' TTGTGCTCTTCCCTGGAGAC 3'
<i>PTGS2 anti-sense</i>	5' AGAAGGCTTCCCAGCTTTTG 3'
<i>PTGS2 sense</i>	5' ATCCCTTCCTTCGAAATGC 3'
<i>TIMP1 anti-sense</i>	5' TTTTCAGAGCCTTGGAGGAG 3'
<i>TIMP1 sense</i>	5' ACTGTTGGCTGTGAGGAATG 3'
<i>TIMP2 anti-sense</i>	5' CTATATCCTTCTCAGGCCCTTG 3'
<i>TIMP2 sense</i>	5' AGAAGGAAGTGGACTCTGGAAAC 3'

3.9.2 PCR quantitativo em tempo real

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, o GAPDH, considerado como melhor gene normalizador para controle endógeno. Em seguida as reações foram processadas em volume final de 20µL SYBR® Green PCR Master Mix e 100nM de cada primer, segundo protocolo da Applied Biosystems.

As condições de termociclagem compreenderam uma incubação de 2 min a 50°C, seguida por desnaturação inicial de 10 min a 95°C. Em seguida, o programa continuou com 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C, para anelamento de primers e extensão das cadeias, e 35 seg. a 65°C, para coleta do sinal. A curva de dissociação foi gerada após amplificação e compreendeu um passo de 15 seg. a 95°C seguido de 1 min a 60°C. A quantificação foi realizada comparando-se os valores de expressão obtidos das curvas padrões, as quais foram desenhadas pela diluição seriada a partir de um *pool* de amostras de cDNA. O fator de normalização utilizado foi a média geométrica do gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), utilizado como controle interno (controle endógeno). Os valores de expressão gênica obtidos nas análises foram quantificados tendo como base a amostra controle, escolhida como calibrador de todas as amostras. A análise dos resultados da PCR quantitativa em tempo real foi a partir dos valores do Ct (*Cycle threshold*) de cada amostra, sendo que foram calculadas as médias das triplicatas. Posteriormente, foi calculado o ΔCt a partir da subtração da média obtida para a sequência de interesse por aquela do controle interno. Para o cálculo do $\Delta\Delta Ct$, foi escolhida a amostra controle como calibrador, sendo atribuído ao mesmo o valor de zero como resultado da subtração com seu próprio ΔCt . Nas demais amostras (tratadas com o extrato total), o resultado do $\Delta\Delta Ct$ foi calculado a partir das diferenças dos valores de ΔCt de cada um deles em relação ao calibrador. Em seguida, foi calculado o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001). Por fim, para uma melhor representação gráfica, os resultados foram apresentados em uma escala logarítmica de base 2 ($\log_2$). Foi considerado aumento ou redução significativa de expressão quando o valor de expressão foi duas vezes maior ou menor, respectivamente, em relação à amostra controle ou quando esteve acima ou abaixo de 1 quando apresentado na forma de $\log_2$.

3.10 Expressão de proteínas pelo ensaio de western blott

As células foram lavadas com 5 mL de PBS gelado, e então adicionados em cada um dos 6 poços da placa: 150 µl de tampão RIPA (Sigma cod R0278), 1,5 µl do inibidor de protease (Sigma cod P8340) e 1 µl Na₃VO₄ (Sigma cod 450243), para então lisar as amostras e obter a solução homogênea. Em seguida, as células de cada linhagem foram delicadamente raspadas com o auxílio de um scraper, transferidas para microtubos previamente identificados e uma parte estocadas em -80°. Após, as amostras foram submetidas ao ensaio para quantificação em espectrofotômetro seguindo o protocolo de *BCA protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Meridian, USA) para o controle negativo e positivo e para o tratamento com o extrato total na concentração de 10µg/mL, a fim de padronizar a concentração total de proteínas em todas amostras.

Após a quantificação, foram coletados 100 µl da amostra lisada (que estava no freezer -80C), adicionados em cada tratamento 30 µl do tampão de amostra, 4 µl de β-mercapto (Sigma cod M6250), 2 µl de SDS 10% e após realizado fervura em banho seco 100°C por 5 minutos, sendo estocados a -20°C, para posteriormente realizar o protocolo do western blott. Quantidades iguais de proteínas (30µg/ml) foram usadas em todos os grupos através do Kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo S., Waltham, EUA). As proteínas foram separadas eletroforéticamente usando SDS-PAGE a 12%, antes de serem transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45µm (Millipore, Massachussetts, EUA). A transferência foi confirmada por coloração das membranas com uma solução de *Ponceau S* a 10% (Sigma Aldrich, Missouri, EUA). As membranas transferidas foram bloqueadas com TBS-T-leite a 5% por 3 horas ou overnight e lavadas 3 vezes com tampão TBS.

Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos PTGS2, PTGER4, (1:500 µL Abcam, Cambridge, UK) MMP2 (1:500 µL, ABclonal, Woburn, EUA) em leite com TBS-T 5% e lavado 3 vezes com tampão TBS. No dia seguinte, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-rabbit IgG conjugado com peroxidase horseradish (1:1000 µL Abcam, Cambridge, UK). Bandas imunorreativas (peroxidase atividade) foram detectados pelo método de quimioluminescência aprimorada (ECL), visualizado em filme fotográfico *Hyperfilme*.

A análise quantitativa dos anticorpos foi mensurada por densitometria usando

o software Image J (NIH, Maryland, EUA). A β -actina foi usada como controle endógeno (1:1500 μ L, Cell Signaling, Danvers, USA).

3.11 Análises estatísticas

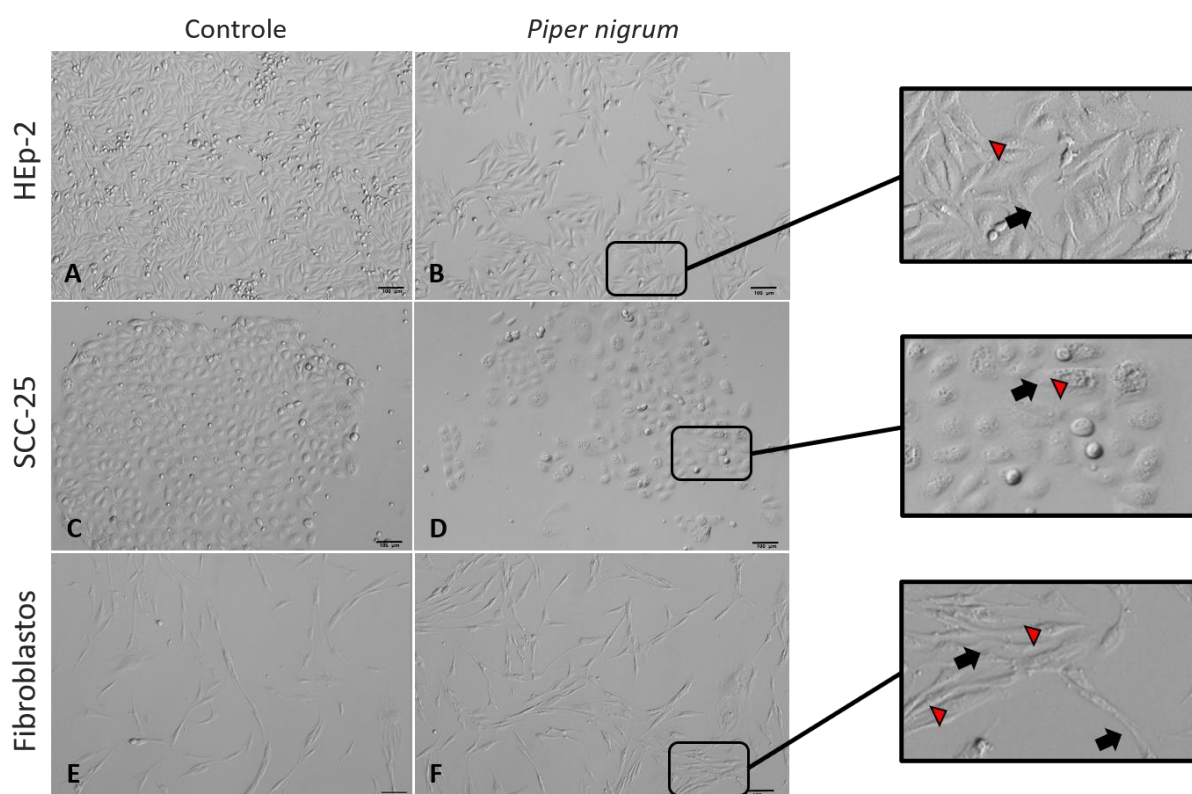
Os dados de todos os experimentos foram analisados utilizando o software *Prisma* ®*GraphPad* versão 8.0. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (SD) e a análise estatística foi realizada por análise de variância para comparações múltiplas (ANOVA) seguido do *post hoc Bonferroni* ou *Dunnet's*. Os valores de p inferiores a 0,05 foram considerados para indicar resultados estatisticamente significativos. A estatística dos dados para o Ensaio Cometa foi baseada em análise de variância não paramétrica de *post hoc* de *Kruskal-Wallis*, ao nível de 5% de probabilidade e as médias foram comparadas por meio do *teste t* de *student* ao nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1 A morfologia das células não sofre modificações

Inicialmente, as células HEp-2, SCC-25 e fibroblasto oral foram cultivadas e observadas em microscopia de contraste de fase diariamente. O aspecto morfológico da linhagem celular HEp-2 (Figura 4A) é caracterizada por uma monocamada de células nucleadas e aspecto fusiforme. A aparência da morfologia das células SCC-25 (Figura 4C) é definida por células pequenas com um citoplasma escasso, núcleo grande, com aspecto variando de arredondado a fusiforme e padrão de crescimento em grumos, sendo uma característica dessa linhagem. Ao microscópio de luz, os fibroblastos (Figura 4E) apresentam-se com núcleo grande, prolongamentos citoplasmáticos e com formato fusiforme. Assim, ao serem observadas, essas linhagens de células não apresentaram alterações visíveis após os tratamentos (Figura 4B, D, F).

Figura 4: Morfologia das células (HEp-2, SCC-25 e fibroblastos) controles (A,C,E) e após tratamento com a *Piper nigrum* (B, D, F) na concentração de 10µg/mL por 24 horas, evidenciando núcleos (setas vermelha) e prolongamentos citoplasmáticos (setas pretas).



Fonte: Elaborado pela autora. Escala de 100µm.

4.2 O extrato total da folha de *P.nigrum* diminui a proliferação celular nas linhagens HEP-2, SCC-25 e fibroblasto oral

O ensaio de proliferação celular, por meio da curva de crescimento foi realizado para as três linhagens estudadas, no qual comparamos as células tratadas ou não com o extrato total da *P. nigrum* nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL nos diferentes tempos de 4, 24, 48 e 72 horas.

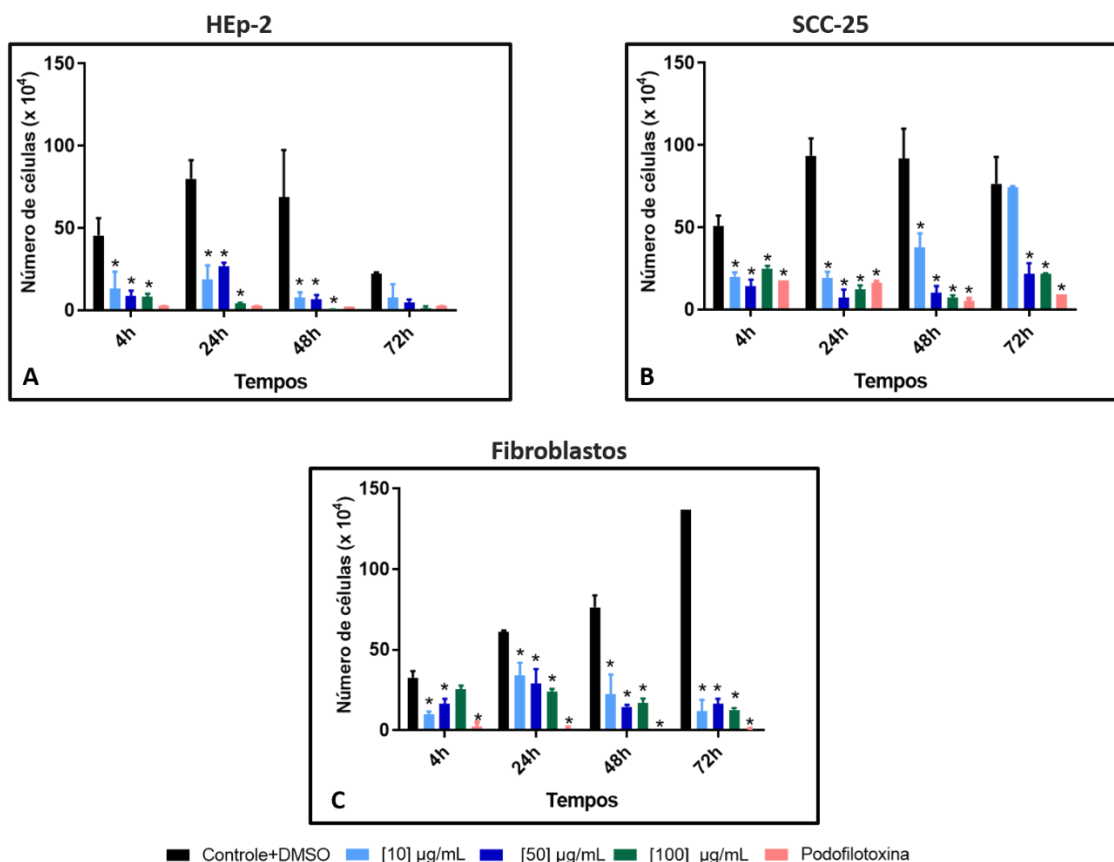
Na linhagem de carcinoma epidermoide de laringe (HEp-2), foi observado o efeito de inibição da proliferação celular pela influência do tratamento com o extrato total nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL, demonstrando uma redução do crescimento dessas células tumorigênicas nos tempos testados quando comparados as amostras controle. Na análise do tratamento após 72h, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de células ao longo das contagens nas três concentrações (Figura 5A).

Para a linhagem de carcinoma epidermoide de língua (SCC-25), podemos constatar que após o tratamento com o extrato total ocorreu uma redução significativa da proliferação celular na linhagem nas três concentrações (10, 50 e 100 µg/mL), ao longo dos tempos de tratamento em relação ao controle. Na [10] µg/mL, em 72 horas, observou-se que não houve diferença estatística em relação ao controle (Figura 5B).

Nos fibroblastos orais normais, observou-se que houve uma redução significativa dos grupos tratados em relação as amostras controle, mas também foi possível constatar que quando foi maior a concentração do extrato, como a de 100 µg/ml, ao longo dos tempos, mais intensa foi a redução da proliferação celular nessa linhagem normal (Figura 5C).

Ao que tudo indica, quando usado, o extrato total da *P. nigrum* age nas células tumorigênicas causando morte celular, fazendo com que a proliferação dessas células diminua. Como já era esperado, por ser utilizada como um controle positivo, a podofilotoxina apresentou alta atividade antiproliferativa em todas as linhagens tumorigênicas.

Figura 5: Ensaios de proliferação celular com o extrato total da folha nas diferentes condições experimentais nas linhagens HEP-2, SCC-25 e fibroblastos



Fonte: Elaborado pela autora. (*) = $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao controle.

4.3 O extrato total da folha não altera a viabilidade celular das células normais ao longo do tempo

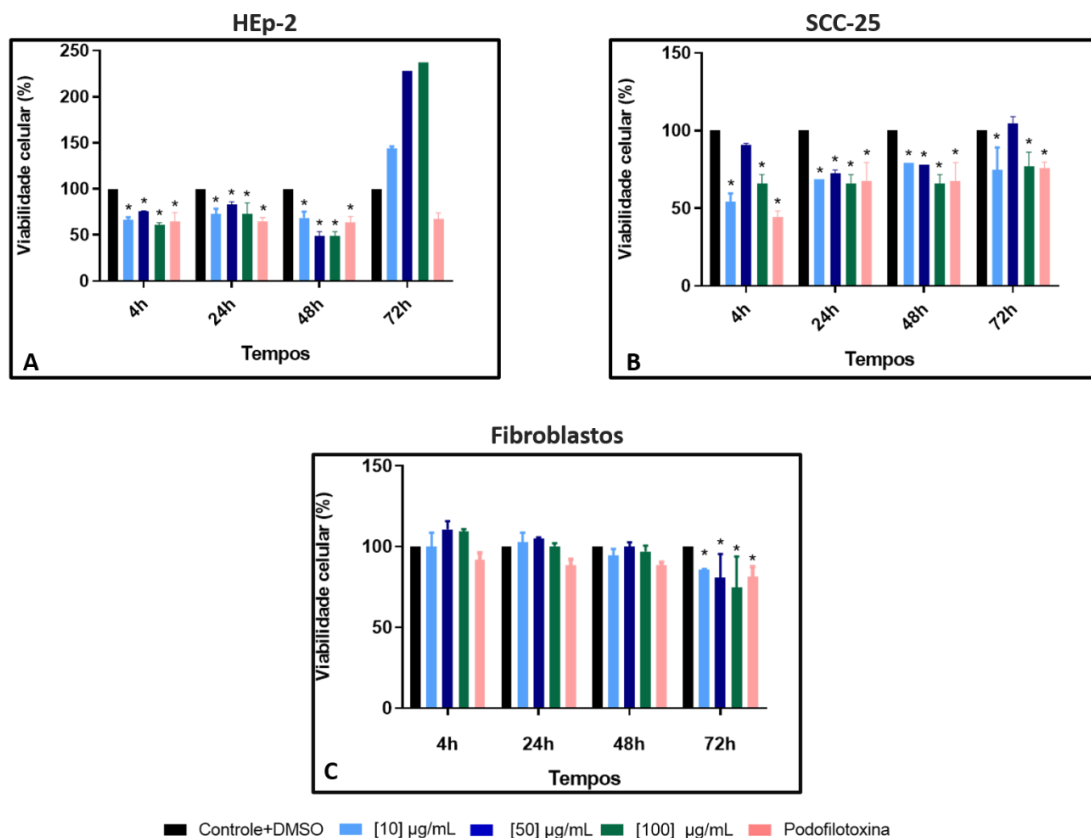
Na figura 6, os gráficos representam a viabilidade celular do ensaio colorimétrico de citotoxicidade. Observamos que houve uma diminuição da viabilidade celular ao longo do tempo na linhagem tumorigênica HEP-2, com o extrato total nas três concentrações e foi significativo em todas as concentrações nos tempos de 4, 24 e 48 horas de ação (Figura 6A), mas sem ser considerado tóxico, pois não reduziram a viabilidade celular abaixo de 50%. Também foi observado que a partir do tempo de 72h houve um aumento na viabilidade celular, provavelmente por fatores parácrinos eliminados pelas próprias células tumorais, aumentando assim essa viabilidade.

Na linhagem tumorigênica SCC-25 após o tratamento, observou-se que houve uma viabilidade alta para a concentração de 50 µg/ml no tempo de 72h (Figura 6B). No entanto, nas demais concentrações observou-se que houve uma diminuição da viabilidade celular, sendo apenas tóxica para o controle positivo com podofilotoxina.

no tempo de 4 horas, mas não sendo tóxica para as células tratadas, ou seja, a viabilidade celular se manteve acima de 50%. Podemos observar que para as células normais o extrato total não interferiu na viabilidade celular nos três primeiros tempos, havendo uma diminuição significativa apenas no tempo de 72 horas de ação do extrato (Figura 6C).

Por meio deste ensaio e do ensaio de proliferação celular, considerou-se como melhores condições, os tempos e concentrações que apareciam mais vezes como significativos estatisticamente quando observada a atividade antiproliferativa e citotóxica para as células tumorigênicas e foi considerado simultaneamente a atividade proliferativa e com menor efeito citotóxico para as células normais (fibroblastos). Esta análise trouxe como condições experimentais mais promissoras, o tempo de 24 horas e a concentração de 10µg/mL, e em segundo lugar o tempo de 24 horas e concentração de 100µg/mL. Sendo assim, os experimentos posteriores foram realizados nas condições experimentais de 10µg/mL em 24 horas de ação do tratamento, e para a análise de citometria de fluxo optamos em nos utilizar das duas concentrações para uma melhor investigação dos dados.

Figura 6: Ensaios de viabilidade e citotoxicidade nas linhagens HEp-2, SCC-25 e fibroblastos



Fonte: Elaborado pela autora. (*) = $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao controle.

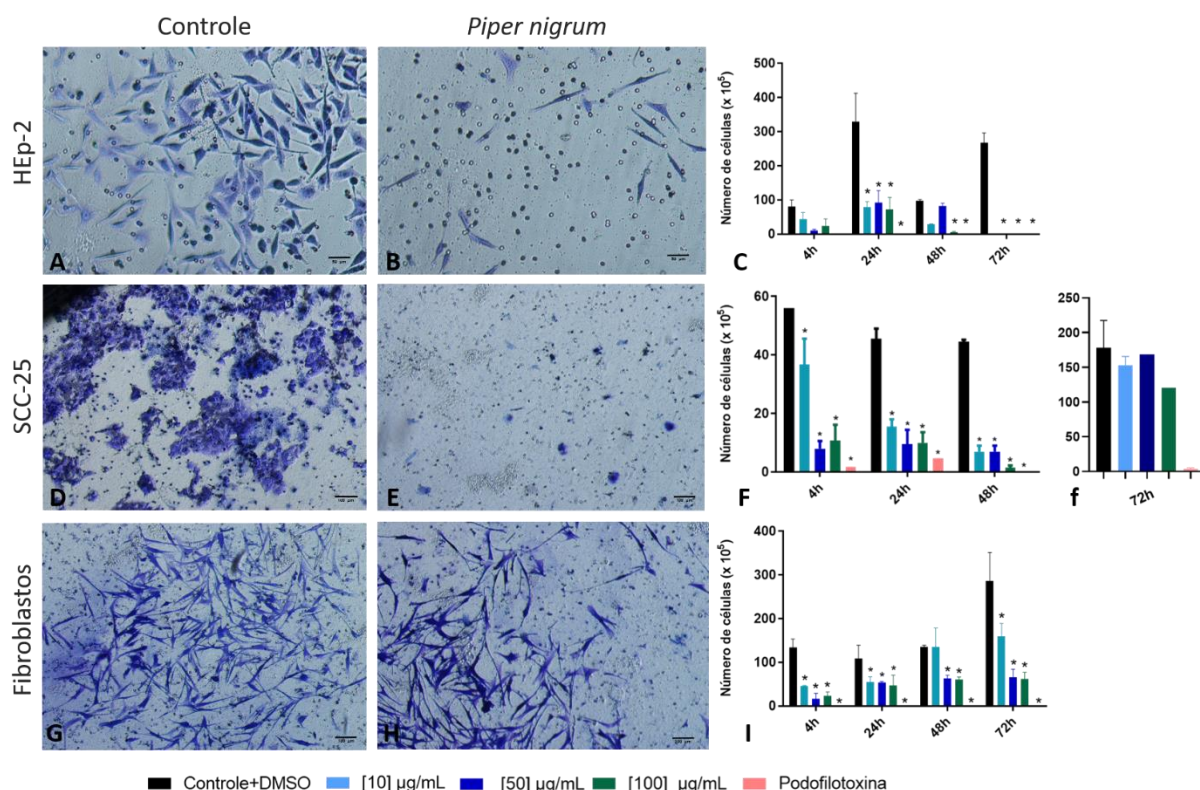
4.4 O extrato total da folha diminui a migração das células HEP-2, SCC-25 e fibroblastos

A invasão de células tumorais em tecidos normais ocorre pela migração celular através da barreira endotelial. Utilizamos o ensaio de migração para observar se esse evento continua ocorrendo após a administração do extrato total da *P.nigrum* nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL nos diferentes tempos de 4, 24, 48 e 72 horas. Observou-se, que após o tratamento com as concentrações do extrato total da folha e com o controle positivo com podofilotoxina, as linhagens tumorigênicas apresentaram diminuição significativa na capacidade migratória.

Na linhagem celular HEP-2 o tratamento com o extrato total da folha diminuiu a migração celular, os dados estatísticos mostraram esse decréscimo da taxa de migração (Figura 7A,B), ocorrendo diferença significativa em todas as concentrações no tempo de 24 e 72 horas (Figura 7C). Na linhagem celular SCC-25, o tratamento com o extrato total da folha diminuiu a capacidade migratória celular (Figura 7D,E), sendo que essa taxa foi significativa em todas as concentrações ao longo dos tempos (Figura 7F), sendo com exceção o tempo de 72h que o tratamento mostrou não possuir mais o efeito inicial quando comparado com outros tempos, ou seja, as células retomaram a alta taxa de migração (Figura 7f).

Nas células normais (fibroblastos) foi possível observar que a concentração de 10 µg/mL de *P. nigrum*, em quase todos os tempos, teve menor efeito anti-migratório sobre essa linhagem normal quando comparadas ao controle. No tempo de 4, 24 e 72 horas observou-se que houve uma diminuição da taxa de migração celular, apresentando diferença significativa, em todas as concentrações. Interessantemente, no tempo de 48 horas, observou-se que a concentração 10 µg/mL evidenciou um aumento na migração celular. Desse modo a taxa migratória se manteve consideravelmente estável na menor concentração do extrato (Figura 7G, H). O controle positivo com podofilotoxina diminuiu drasticamente a migração nas células normais (Figura 7I).

Figura 7: Ensaios de Migração celular *Transwell* controle e após o tratamento com o extrato total. Controle (A,D,G), tratamento com *Piper nigrum* (B,E,H) na concentração de 10µg/ml por 24 horas e gráfico representando C,F,I,f).

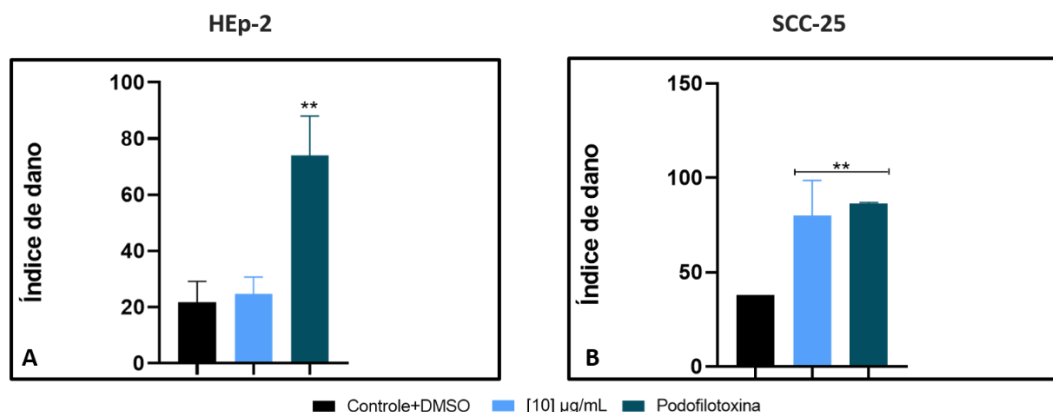


Fonte: Elaborado pela autora. Escala 100µm

4.5 A genotoxicidade da *Piper nigrum* nas linhagens tumorigênicas

Por meio do ensaio cometa foi possível verificar se ocorrem danos ao material genético das células das duas linhagens tumorigênicas (HEp-2 e SCC-25), após os tratamentos com o extrato total da *P. nigrum* no tempo de 24 horas e concentração de 10µg/ml (Figura 8A,B).

Para a linhagem HEp-2, observou-se que apesar de haver uma redução, não houve uma diferença estatística na avaliação dos danos em relação ao controle. Para a linhagem SCC-25, foi possível observar que houve danos significativos após o tratamento com o extrato e controle positivo com podofilotoxina. O aparecimento da cauda pode ser induzido pela apoptose celular, formando a característica de forma semelhante à de um cometa, onde a maior parte do DNA danificado se move para a cauda do cometa (MAJTNEROVÁ; ROULAR, 2018).

Figura 8: Índice de danos obtidos pelo ensaio de genotoxicidade para as linhagens HEP-2 e SCC-25

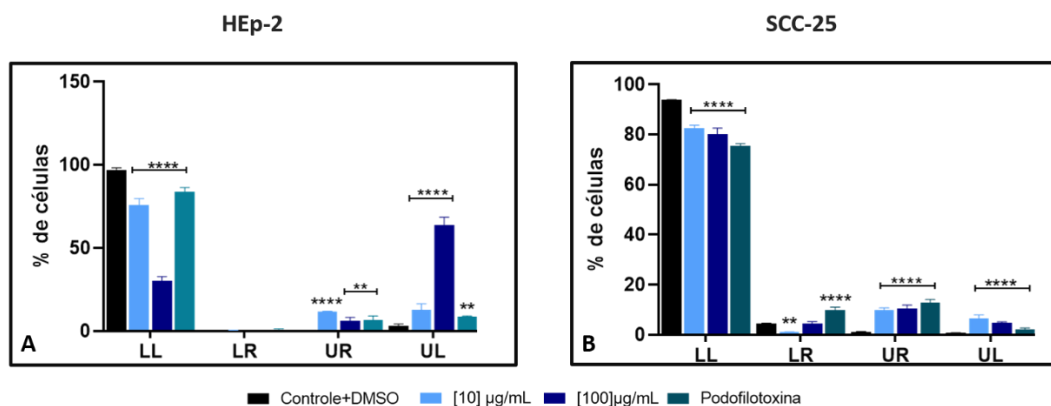
Fonte: Elaborado pela autora. (**) = $p < 0,01$ diferença significativa do tratamento em relação ao controle.

4.6 O extrato total da folha induziu a morte celular nas linhagens tumorigênicas

Os *dot plots* representativos na Figura 10 mostram os resultados obtidos após a incubação com PE (fitocoeritrina) anexina V e 7-AAD (7-Amino-Actinomicina), em cada grupo de células. A porção Q4 representa o número de células viáveis, ou seja, não apresentam nenhuma marcação, enquanto a porção Q3 mostra o número de células em apoptose inicial onde ocorreu a externalização do fosfolípídio fosfatidilserina (PS) na membrana plasmática, que é marcada pela anexina V. A porção Q1 representa o nº de células em necrose onde ocorreu o rompimento da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo intracelular. Assim, ocorre a ligação das células com 7-AAD, que é um intercalador de estruturas intracelulares, como o DNA, permitindo a sua marcação e detecção. A porção Q2 representa o número de células em apoptose tardia, demonstrando a externalização de PS na superfície, quando ocorre a ruptura da membrana além da marcação com o 7-AAD, havendo a dupla marcação.

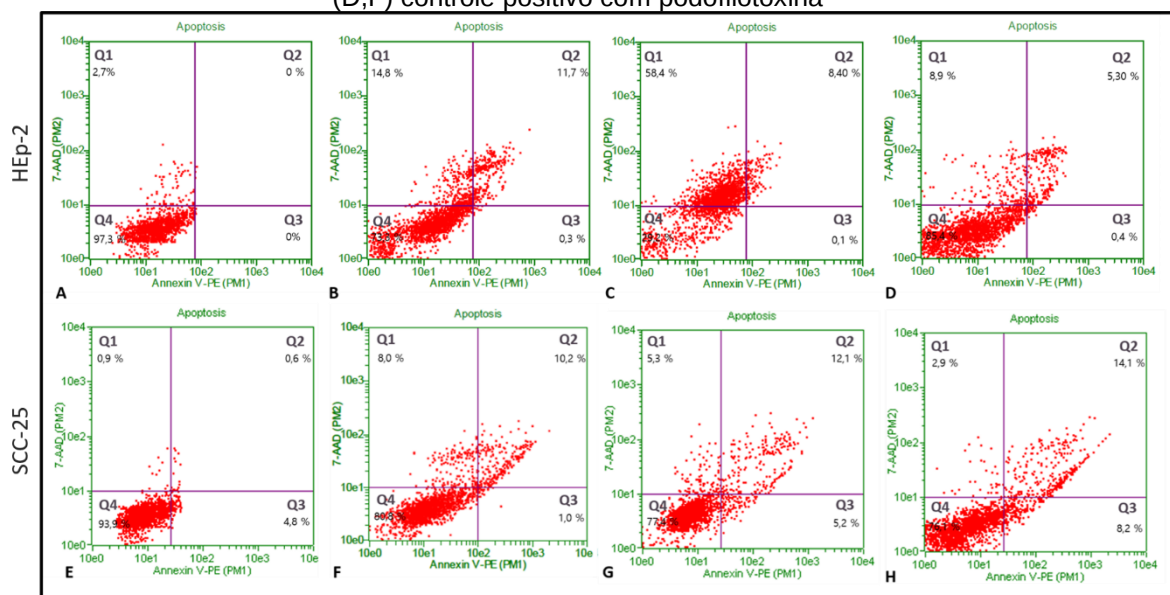
No experimento para as linhagens tumorigênicas após 24 horas de tratamento na concentração de 10 e 100 µg/mL, pode-se observar que o gráfico representando as células após a incubação com PE anexina V mostram que essas, quando tratadas tiveram uma diminuição das células viáveis (LL), ocorrendo uma concentração de células em apoptose tardia e necrose para a linhagem HEP-2 (Figura 9A), e apoptose inicial, tardia e necrose para a linhagem SCC-25 (Figura 9B), ou seja o tratamento pode estar levando ao processo de apoptose. Além disso foi observado a ação apoptótica do controle positivo com podofilotoxina em ambas linhagens (Figura 10).

Figura 9: Efeito do tratamento com o extrato total da folha de *Piper nigrum* sobre a viabilidade, apoptose, apoptose tardia e necrose. LL (Células Viáveis), LR (Apoptose Inicial), UR (Apoptose Tardia) e UL (Necrose).



Fonte: elaborado pela autora. (**) = $p < 0,01$ (***) = $p < 0,001$ (****) = $p < 0,0001$ diferença significativa em relação ao controle

Figura 10: Dotplots obtidos da citometria de fluxo. Viabilidade (Q4), apoptose inicial (Q3), apoptose tardia (Q2) e necrose (Q1). (A,E) controle, (B,G) tratamento 10µg/mL e (C,H) tratamento 100µg/mL (D,F) controle positivo com podofilotoxina



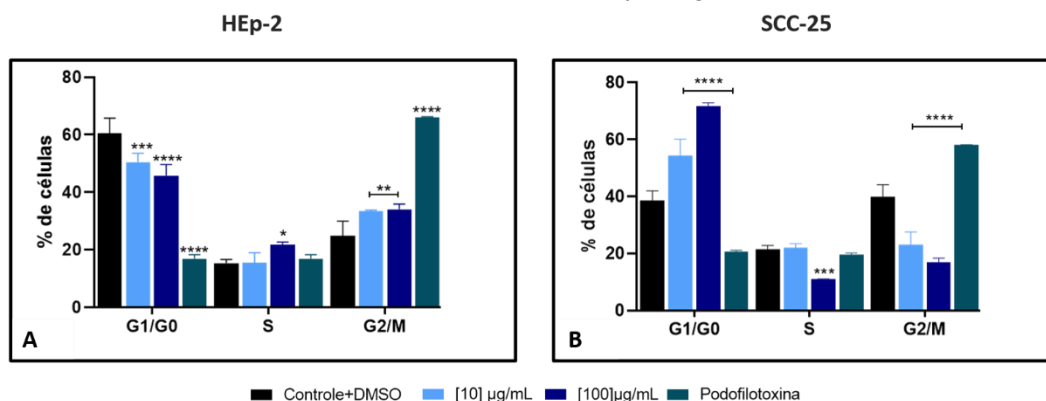
Fonte: elaborado pela autora

4.7 As células tratadas sofreram parada do ciclo celular em G0/G1 e G2/M

No experimento de ciclo celular após o período de incubação com o extrato total (10 e 100µg/mL), foi possível observar para a linhagem HEP-2 que essas foram induzidas a estacionarem na fase G2/M da parada do ciclo celular em ambas concentrações, além de também ter estacionado na fase S na [100] µg/mL (Figura 11A e 12 A-C) e as células da linhagem SCC-25 a estacionarem na fase G1/G0 do processo de parada do ciclo celular (Figura 11B e 12 E-G).

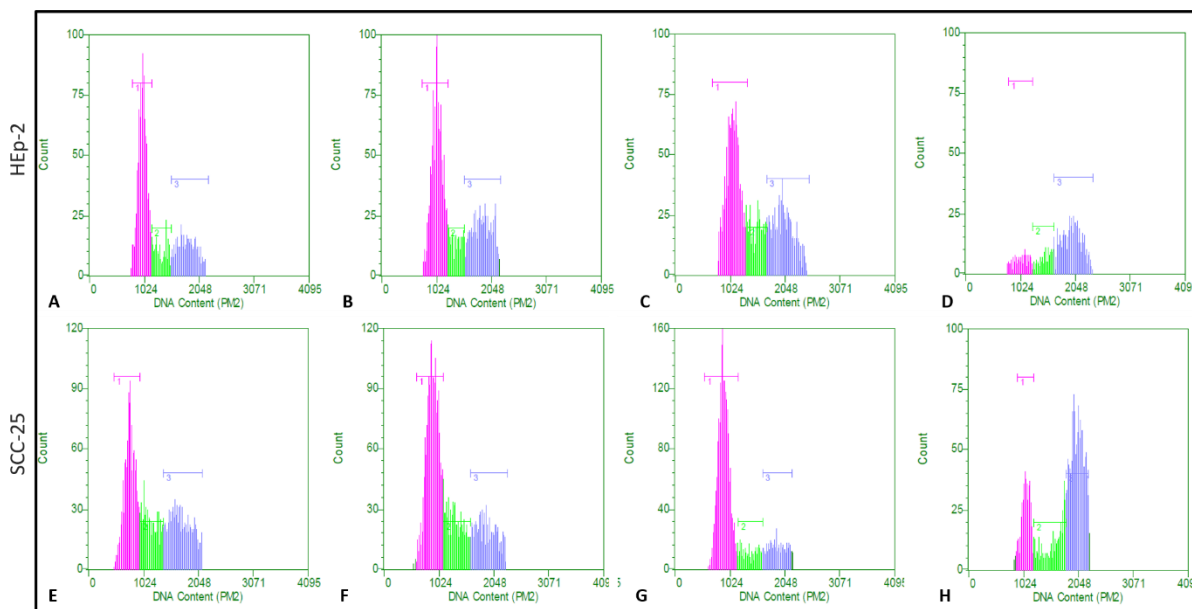
O controle positivo com a podofilotoxina induziu a um processo de apoptose e parada do ciclo celular sinalizada na fase G2/M e S (Figura 11 e 12 D,H).

Figura 11: Análise da progressão do ciclo celular (Fase G1/G0, S e G2/M) após o tratamento com o extrato total da folha de *Piper nigrum*



Fonte: elaborado pela autora. (**) = $p < 0,01$, (***) = $p < 0,001$ (****) = $p < 0,0001$ diferença significativa em relação ao controle.

Figura 12: Histogramas representativos da progressão do ciclo celular para as linhagens tumorígenicas tratadas. Fase G0/G1 (rosa), Fase S (verde) e Fase G2/M (azul). (A,E) controle, (B,F) tratamento 10µg/mL, (C,G) tratamento 100µg/mL (D,H) controle positivo com podofilotoxina.



Fonte: Elaborado pela autora

4.8 O extrato total da folha modulou a via inflamatória da ciclooxygenase-2

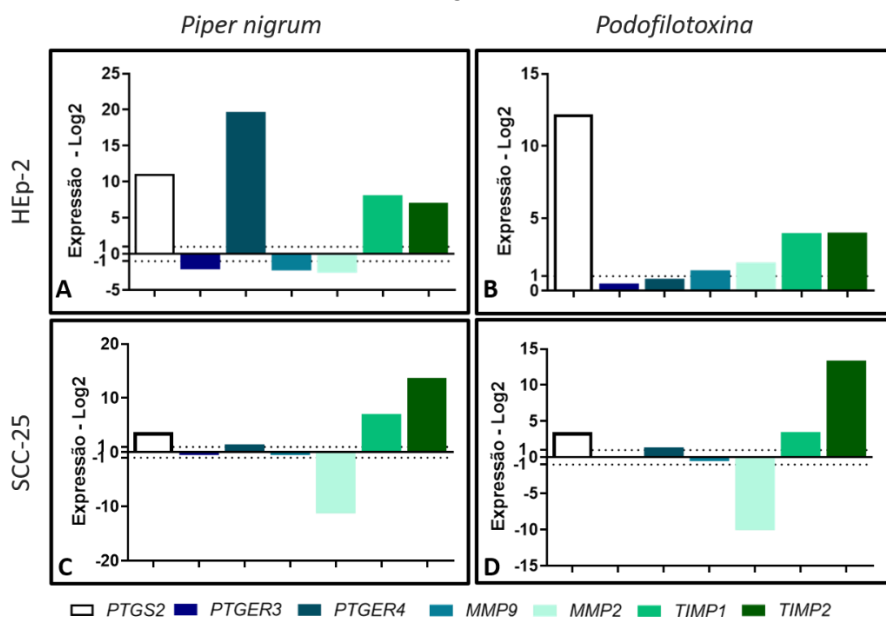
Previamente a PCR quantitativa em tempo real, realizamos a validação da integridade dos RNAs e cDNAs obtidos das diferentes amostras em gel de agarose 1%. Os resultados obtidos foram expressos em valores de Ct (número de ciclos de

amplificação) necessários para que o sinal fluorescente emitido atingisse o limiar de detecção. Os genes de interesse (*PTGS2*, *PTGER3*, *PTGER4*, *MMP9*, *MMP2*, *TIMP1* e *TIMP2*) estão envolvidos em cascatas relacionadas com inflamação e processos de invasão tumoral (Figura 14). Nas linhagens tumorais, observamos que os genes dessa cascata inflamatória foram modulados após tratamento com o extrato total (10µg/mL) da *P.nigrum* e com o controle positivo (podofilotoxina).

O gene *PTGS2*, teve sua expressão aumentada nas células após tratamento com a *P. nigrum* e com o controle podofilotoxina, esta última, também influenciou o aumento dos demais genes em ambas linhagens, com exceção da *MMP's* e *PTGER3* na SCC-25. Além disso, o gene *PTGER3* exibiu uma expressão reduzida nas células tumorais após o tratamento com o extrato. Diferentemente, houve um aumento na expressão do *PTGER4*, *TIMP1* e *TIMP2*, e consequentemente uma diminuição na expressão das metaloproteinases *MMP9* e *MMP2*.

Com relação a expressão da *MMP9*, o tratamento não influenciou significativamente para a linhagem SCC-25. Esses achados indicam que a expressão gênica e proteica da via da *PTGS2*, após o tratamento com o extrato total, pode estar envolvida com os efeitos antitumorais na carcinogênese de cabeça e pescoço.

Figura 13: Expressão de genes por Real-Time PCR em células HEP- e SCC-25. As expressões do RNAm da via foram analisadas após os tratamentos com 10µg/mL do extrato total, em relação ao controle. A linha pontilhada ($\geq 1,0$ ou $\leq -1,0$) é equivalente à diferença da expressão significativa, com base no logaritmo 2.

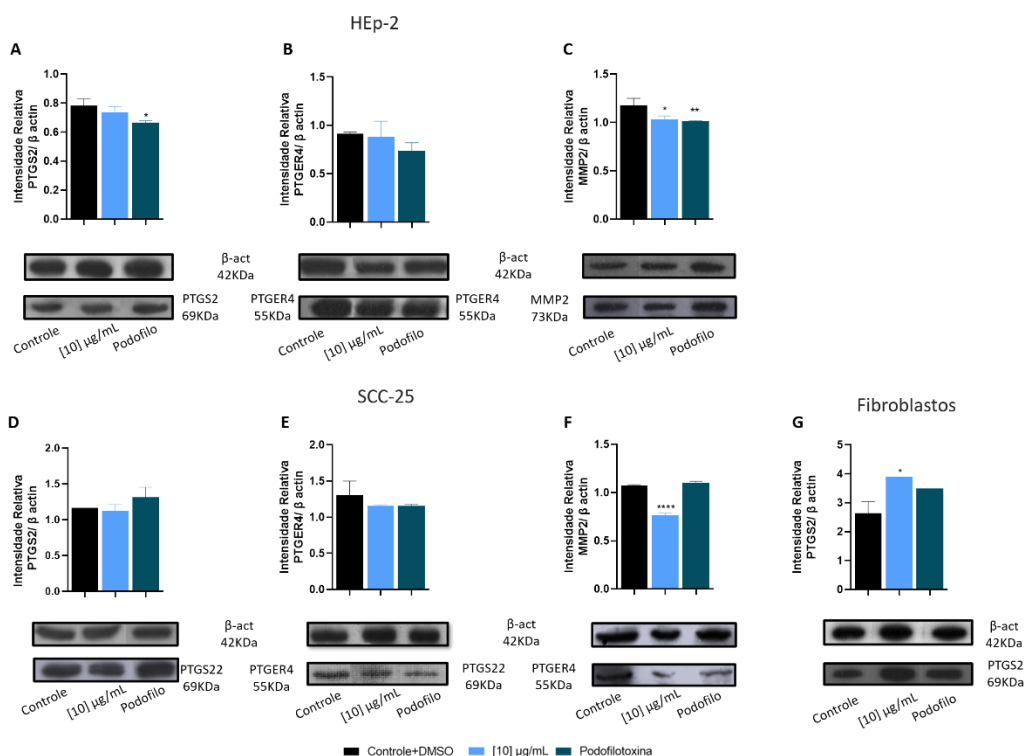


Fonte: elaborado pela autora

4.9 O extrato total da folha modulou a expressão de proteínas envolvidas com o processo inflamatório

A análise da expressão proteica mostrou níveis reduzidos de PTGS2 (Figura 13A,D), PTGER4 (Figura 13B,E) e MMP2 (Figura 13C,F) nos grupos tratados com a concentração de [10] µg/mL do extrato total nas linhagens HEp-2 e SCC-25, porém sendo significativo apenas para MMP2 nas células tumorigênicas (Figura 13C,F). As células normais de fibroblastos, após a administração com o extrato, mostraram níveis aumentados de PTGS2 e não tiveram expressão visível na densitometria das proteínas PTGER4 e MMP2 (Figura 13G).

Figura 14: Expressão de PTGS2, PTGER4 e MMP2 por western blott em células HEp-2, SCC-25 e fibroblastos. As expressões da proteína β-Actina foi usada como controle endógeno na linhagem HEp-2 (A-C), SCC25 (D-F) e nas células normais (G). As estatísticas de dados estão demonstradas como unidades arbitrárias das expressões relativas de PTGS2 69kDa, PTGER4 55kDa e MMP2 73kDa.



Fonte: elaborado pela autora

5. DISCUSSÃO

A *Piper nigrum* é uma planta medicinal que pela sua fonte de moléculas bioativas com propriedades farmacológicas, têm sido recentemente destacada como contendo comprovada propriedade anticâncer em suas partes constituintes, incluindo citotoxicidade, apoptose, autofagia, e interferência com vias de sinalização em diferentes linhagens de células tumorigênicas e modelos animais. Extratos da *P. nigrum* podem oferecer uma sinergia interessante de seus constituintes bioativos únicos, alcançando atividade anticancerígena por mecanismos complementares (TAKOOREE *et al.*, 2019; TURRINI; SESTILI; FIMOGNARI, 2020), com isso a investigação do potencial anticâncer do extrato total da folha se fez necessária.

O câncer é um conjunto de doenças que tem acometido desde os ancestrais de humanos modernos, que remontam a mais de um milhão de anos, (ODES *et al.*, 2016) até os dias mais recentes na espécie humana. Nessa doença, os agentes de destruição são as próprias células do indivíduo que perderam a capacidade de se autodirigir e, de certo modo, que foram transformadas em partes essenciais para a proliferação de tumores.

Nosso estudo evidenciou que o extrato total da pimenta quando administrado diminuiu a proliferação e a viabilidade das células de carcinoma de cabeça e pescoço (HEp-2 e SCC-25) ao longo dos tempos e concentrações, e tais efeitos também foram observados para a proliferação das células normais (fibroblastos orais), porém diferentemente a viabilidade celular se manteve inteiramente íntegra nessas células.

Na literatura não existem estudos, ao nosso conhecimento, sobre a folha da *P. nigrum* em linhagens de câncer de cabeça e pescoço, mas três lignanas presentes nas folhas de *P. nigrum*, sendo elas (-)-cubebina, (-)-3,4-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxi-cobina e (-)-3-desmetoxicubebina foram pesquisadas por Matsuda e colaboradores (2004) e Hirata e colaboradores (2007), que aplicaram esses compostos em linhagem celular de melanoma B16 de murinos (B16F1) e observaram que não ocorreu a diminuição na proliferação celular. Outros estudos, como de Abu e colaboradores (2016), que ao estudar compostos da *Piper methysticum* diferentemente observaram uma redução na proliferação em células de tumores de mama.

Desse modo, esses dados demonstram que o extrato da folha da *P. nigrum* inibiu a proliferação nas células de carcinoma epidermoide de laringe e língua (HEp-2

e SCC-25), ocasionando uma diminuição na proliferação do processo tumoral e mantendo as células normais íntegras e viáveis.

As respostas celulares aos danos ao DNA está diretamente relacionada à biologia do câncer, pois é por meio desses danos que ocorre a suscetibilidade ao desenvolvimento de células com material genético danificado, e consequentemente sua progressão. É também por esses danos que as modalidades terapêuticas atuais têm utilizado para tratar a tumorigênese, pois sabe-se que células com uma resposta de dano de DNA frequentemente morrem em resposta a esses danos, reduzindo assim a probabilidade de progressão para malignidade (KASTAN; BARTEK, 2004). Sendo assim, o estudo dos danos no DNA também se fez importante para nossa análise, e para isso utilizamos o ensaio cometa, que é um método sensível de avaliação de danos em células únicas por meio da sua capacidade de detecção de lesão do núcleo, e em consequência, o material genético de dupla cadeia que se encontra no ambiente nuclear (AFANASIEVA; SIVOLOB, 2018).

Detectamos, em nosso ensaio de genotoxicidade, que a *P. nigrum* na concentração escolhida de [10] µg/mL, após 24 horas, na linhagem HEp-2, não causou efeito genotóxico significativo, mas em contraponto gerou danos significativos para a linhagem SCC-25, o que foi também elucidado por Hang e colaboradores (2018), que ao administrar em células tumorigênicas de cabeça e pescoço (UMSCC10A) a piperlongumina, um alcaloide isolado da planta *Piper longum*, observaram que houveram danos ao DNA e elevados níveis de espécies reativa de oxigênio (ROS) nessas células.

Considerando os danos ao DNA nas células tratadas com *P.nigrum* e sabendo que essa fragmentação do material genético ocorre no processo de morte celular, a apoptose, resolvemos investigar esse tipo de morte no nosso trabalho. A apoptose é um tipo de morte celular programada, que busca uma homeostase no ambiente, diminuindo o crescimento e a divisão celular anormal. Esse processo de morte é caracterizado por mudanças na membrana (encolhimento e *blebbing*), no citoplasma das células (compactação) e degeneração do núcleo celular, caracterizada por uma condensação da cromatina (OBENG, 2021).

Observamos nesse estudo que o extrato total da folha da *P.nigrum* levou ao processo de apoptose nas linhagens tumorais onde ocorreu uma diminuição das células viáveis e um aumento de células em apoptose tardia e necrose, na linhagem HEp-2; e em apoptose inicial, tardia e necrose na linhagem SCC-25. Achados com a

P. nigrum mostraram que o extrato total livre de Piperina e dois compostos bioativos do fruto, kusunokina e piperlongumina, induziram a apoptose celular, pela via extrínseca, em células cancerígenas de mama, e menor efeito sobre as células normais mamárias (SRIWIRIYAJAN *et al.* 2017; SRIWIRIYAJAN *et al.* 2015). Desse modo, é interessante destacar que o processo de apoptose é uma resposta fundamental na tumorigênese, por ser uma morte celular programada e não provocar respostas inflamatórias, possuindo assim um papel terapêutico no câncer.

Ao contrário da vida de um organismo que pode ser vista como uma progressão linear, a vida de uma célula segue um padrão cíclico. Esse mecanismo é identificado como ciclo celular e possui uma função elementar que é duplicar o genoma e dividir o DNA de maneira a manter sua integridade nas células (LEMMENS; LINDQVIST, 2019), sendo um sistema regulado cuidadosamente por mecanismos genéticos que levam à interrupção da progressão do ciclo por estímulos intrínsecos ou extrínsecos, onde ocorre o acúmulo das células em uma de suas fases. Essa regulação ocorre nos pontos de verificação do ciclo celular, sendo composto pelas fases G1/G0, S e G2/M. Neste último período ocorre a etapa da mitose, onde as células dividem o material genético e ocorre a citocinese (KASTAN; BARTEK, 2004).

Com o intuito de saber se o tratamento promoveu a parada do ciclo celular, utilizamos o ensaio de citometria de fluxo e observamos que as células HEp-2 após o período de incubação com o extrato total da *Piper nigrum* (10 e 100µg/mL), foram induzidas a estacionarem na fase G2/M e S do processo de parada do ciclo celular. O que foi observado em alguns estudos sobre a atividade citotóxica do extrato da fruta de *P. nigrum* enriquecida de piperina, onde foi afirmada sua capacidade de estacionar o ciclo celular na fase G2/M em células de câncer de mama (GREENSHIELDS *et al.*, 2015), em osteossarcoma (ZHANG *et al.*, 2015), ovário (QIU; XUE; ZHANG, 2019), pulmão (LIN *et al.*, 2013) e carcinoma escamoso oral (SIDDIQUI *et al.*, 2017). Diferentemente para as células SCC-25, o tratamento induziu a parada na fase G1/G0 do processo do ciclo celular, e interessante quanto maior foi a concentração (100µg/mL), proporcionalmente maior foi o efeito do tratamento sobre essa linhagem.

As alterações genéticas do câncer determinam o destino das células cancerosas, afetando a proliferação, divisão do ciclo celular e a apoptose. Esses eventos quando desorganizados estão envolvidos na metástase, um dos processos biológicos cruciais para a continuidade do câncer no organismo (NOVIKOV *et al.*, 2020). Nesse processo as células cancerígenas invadem o tecido circundante através

da barreira endotelial, onde ocorrem deformações no núcleo e seus constituintes, ou podendo bem como ocorrer pelos vasos sanguíneos próximos (PFEIFER; IRIANTO; DISCHER, 2019).

Em nosso ensaio de migração celular, constatamos que o tratamento induziu as linhagens tumorigênicas a uma diminuição significativa na capacidade migratória, ao longo dos tempos testados, ocorrendo também esse efeito nas células normais, porém curiosamente houve uma possível retomada, ou menor efeito, sobre a migração dessas células com a administração de 10µg/ml do extrato total. Foi observado em um estudo recente, que o composto (-)-kusunokina, extraído das sementes da *P. nigrum* diminuiu a migração em células cancerígenas de mama (MCF-7) e inibiu o crescimento do tumor em modelos de ratos (TEDASEN *et al.*, 2020). A migração celular é fundamental para estabelecer e manter a organização adequada dos organismos ao longo da sua vida, porém quando analisada do ponto de vista tumorigênico, a migração de células alteradas é certamente algo não propício para essa organização celular. De fato, esses resultados nos faz esperar, por exemplo, que consigamos o quanto mais breve, mediante um aprofundamento sobre o efeito na capacidade migratória, ter respostas para diminuir a propagação e invasão de células cancerígenas altamente malignas.

Desse modo, sabemos que no câncer, as células tumorais adquirem a capacidade de mudar de forma, desprender e se mover facilmente nos espaços desorganizados da arquitetura normal do tecido. Essa capacidade de invasão e migração, são processos complexos e que envolvem a cooperação de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases cujos substratos incluem componentes de matriz extracelular (ECM), incluindo a membrana basal (CUI, 2017). As metaloproteinases são estimuladas, a partir de uma cascata gênica e proteica, que se inicia na resposta a um estímulo inflamatório com a ciclooxigenase-2, que possui um papel vital na regulação de processos relacionados à tumorigênese, e que desencadeia uma série de respostas celulares, como a ativação dos receptores de prostaglandinas e conseqüentemente, ativação das MMP's (ABRAHAO *et al.*, 2010).

Para tentar encontrar o papel do extrato total da *P. nigrum*, no câncer de cabeça e pescoço, realizamos a análise de expressão gênica e proteica da cascata da ciclooxigenase-2 (*PTGS2*) e nossos achados evidenciaram, em ambas linhagens tumorigênicas estudadas, que o tratamento influenciou positivamente modulando essa via.

Na análise, observamos que o gene da ciclooxigenase-2 (*PTGS2*) teve sua expressão aumentada em ambas linhagens tumorais (HEp-2 e SCC-25) após o tratamento com o extrato. Com essa resposta na expressão das células de carcinoma de cabeça e pescoço, se torna importante destacar que o *PTGS2* é presente em vários tipos de câncer, incluindo o câncer de laringe, e sua ligação aos receptores é associada aos processos de resposta inflamatória protumorigênica e agressividade no câncer de células epidermóides orais (NASRY; RODRIGUEZ-LECOMPTE; MARTIN, 2018).

Desse modo, os nossos resultados evidenciaram que o receptor *PTGER3* teve sua expressão reduzida e o *PTGER4* aumentada em ambas as linhagens tumorais; indicando que a ciclooxigenase-2 estava sintetizando *PGE2*, e consequentemente ativando apenas o receptor 4, que é relatado como abundantemente expresso em linhagens de carcinoma de língua e a sua hipermetilação está ligada a recidiva em pacientes com câncer laríngeo (OSAWA *et al.*, 2019). Em particular, os resultados com o receptor *PTGER3* após a administração com o extrato é promissor, pois a expressão dos receptores *PTGER3* pode desempenhar um papel significativo na progressão no câncer de células epidermóides orais (KASHIF; ISHFAQ; NAGI, 2015), e foi observado por Hoshikawa e colaboradores (2009), os efeitos inibitórios do crescimento celular e desenvolvimento do câncer após utilizar um antagonista seletivo para *PTGER3* em células de carcinoma oral com alta expressão de ciclooxigenase-2.

O extrato total da *Piper nigrum*, promoveu o mecanismo de ação dos *TIMPs* estudados em ambas linhagens tumorais, em consequência a isso, houve uma maior interação com as metaloproteinases (*MMP9* e *MMP2*), que tiveram uma resposta antagônica, ou seja, reduzida após a ação dos inibidores teciduais nas linhagens HEp-2 e SCC-25. Esses resultados confirmam os mecanismos biológicos dos *TIMP's* e suas interações com as *MMP's* após o tratamento com o extrato.

Vários estudos relataram a expressão e o papel de *MMP-9* e *MMP-2* na agressividade e migração no câncer de cabeça e pescoço. Em um destes estudos foi observado, que em tecidos de câncer bucal humano o aumento da expressão dessas metaloproteinases foram significativamente associado à metástase (VICENTE *et al.*, 2005), sendo assim, os nossos resultados são promissores por demonstrarem o efeito do tratamento modulando a ação desregulada destas enzimas proteolíticas associadas ao câncer, além disso, se correlacionam com os nossos resultados aqui

destacados sobre o efeito antimigratório nas linhagens tumorais após o tratamento com o extrato da folha de *P.nigrum*.

Na análise proteica, como esperado, observamos uma tendência a diminuição das proteínas PTGS2, PTGER4 e MMP2 após o tratamento com o extrato total da folha, porém havendo diferença significativa apenas para a MMP2 nas células tumorais. Assim como foi relatado em um estudo com o extrato etanólico da folha de *O. sanctum* (Manjerição) que exerceu seu efeito anti-invasivo nas células epidermóides de cabeça e pescoço, atenuando a atividade da MMP9 e MMP2, que estão relacionadas a agressividade nesse tipo de câncer (UTISPAN *et al.*, 2020). Ainda, em células de osteossarcoma, foi demonstrado o efeito antimigratório associado a diminuição da expressão das MMP's nas células tratadas com piperina (ZHANG *et al.*, 2015).

Também foi observado no nosso estudo, que diferentemente nas células normais (fibroblastos), houve um aumento na expressão proteica de PTGS2, e não houve expressão visível na densitometria das proteínas PTGER4 e MMP2 após a administração do extrato. Esses achados, até aqui, indicam que a *Piper nigrum* pode induzir a uma diminuição proteica e gênica da via inflamatória estudada, principalmente relacionada com a inibição das metaloproteinases pelos inibidores teciduais (*TIMP'S*), portanto está diretamente relacionada aos efeitos antitumorais e antimigratórios da progressão dos tumores de cabeça e pescoço.

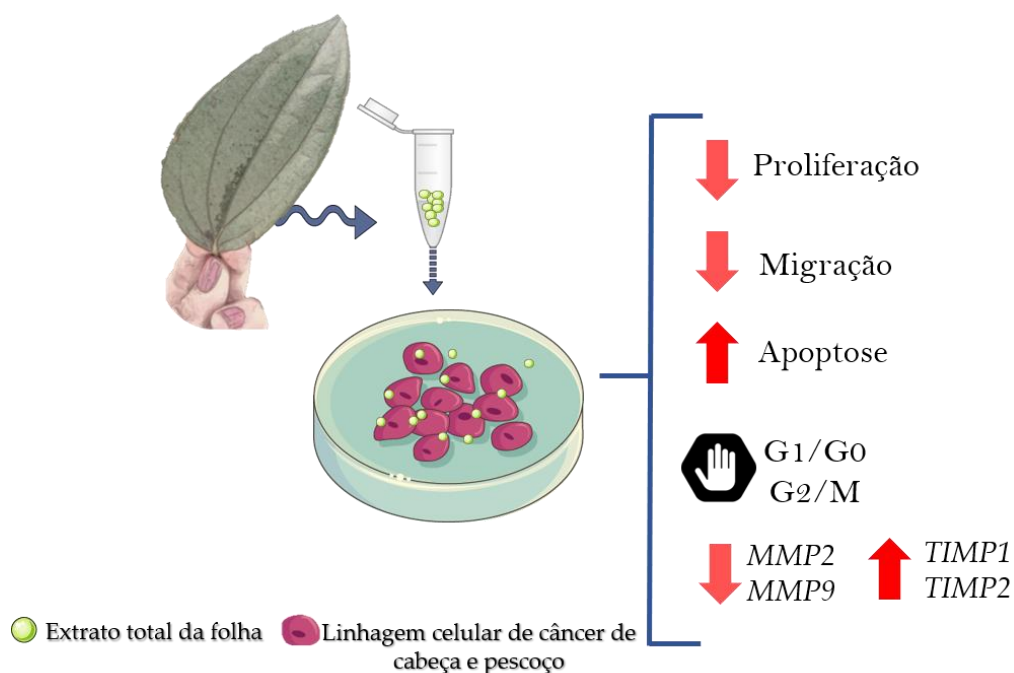
Também é interessante descrever aqui, que ao longo do estudo utilizamos a podofilotoxina, uma lignana extraída de *Podophyllum spp.*, como controle positivo por apresentar comprovada atividade anticâncer já relatada. Apesar de termos resultados contraditórios nos valores de citotoxicidade, com a maioria de seus valores não sendo considerados citotóxicos, nos demais ensaios tivemos resultados semelhantes aos descritos na literatura. Observou-se uma diminuição significativa da proliferação celular, danos substanciais no material genético, diminuição na migração celular, indução a morte, parada do ciclo celular na fase G2/M e aumento significativo da expressão da via da ciclooxigenase-2 nas linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço estudadas.

Hu e colaboradores (2017) corroboram nossos dados, pois observaram que a podofilotoxina inibiu efetivamente a polimerização de tubulina e a montagem de microtúbulo, induzindo a parada na fase G2/M por níveis reguladores da ciclina B1 e do gene da proteína quinase dependente de ciclina. Além disso, conjugados dessa

lignana também induziram a apoptose, interromperam a rede de microtúbulos e inibiram a migração celular e atividade proliferativa em hepatócitos (ZHANG *et.al*, 2017), demonstrando sua eficácia antitumoral e sua importância como efeito desejado sendo a variável independente neste projeto.

Desse modo, observamos que poucos estudos têm avaliado o efeito do extrato da folha da *Piper nigrum* no câncer e a partir desses dados, podemos concluir que o extrato total diminui a proliferação e migração das células, não é citotóxico as células tumorais e normais, possui o efeito genotóxico provavelmente por indução de apoptose e/ou necrose celular, induz a parada do ciclo celular e ainda está relacionado a cascata inflamatória da ciclooxigenase-2 (Figura 13 e 14). Portanto, em função dos resultados obtidos, podemos salientar que o extrato total da folha apresentou efeitos promissores nas células de câncer de cabeça e pescoço (Figura 15).

Figura 15 – Resumo gráfico do potencial modulatório da folha de *P.nigrum* em CECP



Fonte: Elaborado pela autora

6. CONCLUSÃO

Nossos achados, até o presente momento, permitem concluir que o extrato total da *P. nigrum*, nas linhagens celulares tumorigênicas e fibroblastos:

- não altera a morfologia celular, mas reduz a proliferação e migração celular;
- não é citotóxico, porém genotóxico para a linhagem de câncer de língua (SCC-25);
- induz o processo de apoptose inicial, tardia e necrose;
- induz as células estacionarem nas fases G1/G0, S e G2/M do ciclo celular;
- modula a expressão de genes e proteínas envolvidas com o processo inflamatório;

Dessa maneira, o extrato total da folha de *Piper nigrum* parece apresentar uma sinergia entre seus metabólitos atuando diretamente nas células tumorigênicas por mecanismos relacionados às vias antiproliferativas, apoptóticas e/ou inflamatórias e abrem novas possibilidades de estudos futuros para terapias associadas no câncer de cabeça e pescoço.

REFERÊNCIAS

ABRAHAO, A. C. *et al.* A role for PTGS2- 8 PGE2 and PGE2-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. **Oral Oncol**, v.46, n.12, p.880-7, 2010.

ABU, N. *et al.* Flavokawain B induced cytotoxicity in two breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB231 and inhibited the metastatic potential of MDA-MB231 via the regulation of several tyrosine kinases In vitro. **BMC complementary and alternative medicine**, Kuala Lumpur, v. 16, n. 1, p. 86, 2016.

AFANASIEVA, Katerina; SIVOLOB, Andrei. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophysical Chemistry**, [S.L.], v. 238, p. 1-7, jul. 2018.

AZIZ, N.; MEHMOOD, M. H.; GILANI, A.-H. Studies on two polyherbal formulations (ZPTO and ZTO) for comparison of their antidyslipidemic, antihypertensive and endothelial modulating activities. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, p. 1-9, 2013.

BETTS, Helen M *et al.* Hypoxia imaging with [¹⁸F]HX4 PET in squamous cell head and neck cancers: a pilot study for integration into treatment planning. **Nucl Med Commun**, Reino Unido, p.1-6, 26 out. 2018.

BODNAR, M. *et al.* Tumor progression driven by pathways activating matrix metalloproteinases and their inhibitors. **J Oral Pathol Med**. 44:437–443, 2015.

BOURBOULIA, Dimitra; STETLER-STEVENSON, William G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Seminars In Cancer Biology**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.161-168, jun. 2010.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [s.l.], v. 68, n. 6, p. 394-424, 12 set. 2018.

BREW, Keith; NAGASE, Hideaki. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Cell Research**, [s.l.], v. 1803, n. 1, p.55-71, jan. 2010.

BUI, Thi Tho *et al.* *Piper Nigrum* extract improves OVA-induced nasal epithelial barrier dysfunction via activating Nrf2/HO-1 signaling. **Cellular Immunology**, [S.L.], v. 351, p. 104035, maio 2020.

BUMBER, Boris. *et al.* Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the development of cervical metastases in papillary thyroid cancer. **Clinical Otolaryngology**, [S.L.], v. 45, n. 1, p. 55-62, 13 nov. 2019.

CANEVARI, R. A.; ROGATTO, S. R. Câncer de cabeça e pescoço. In: FERREIRA C.G., CASALLI J.C.R., organizadores. **Oncologia molecular**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; p.189-203, 2004.

CARLSON, Eric R.; KADEMANI, Deepak. Head and Neck Cancer Awareness Month. **The Journal Of The American Dental Association**, [S.L.], v. 151, n. 4, p. 223-224, abr. 2020.

COMEN, Elizabeth A.; BOWMAN, Robert L.; KLEPPE, Maria. Underlying Causes and Therapeutic Targeting of the Inflammatory Tumor Microenvironment. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, [s.l.], v. 6, n. 64, p.[S;l], 12 jun. 2018.

CUI, Ning; HU, Min; KHALIL, Raouf A.. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. **Progress In Molecular Biology And Translational Science**, [S.L.], p. 1-73, 2017.

CUNHA, W. R.; ANDRADE E SILVA, M. L.; SOLA VENEZIANI, R. C.; AMBRÓSIO, S. R.; KENUPP BASTOS, J. Lignans: Chemical and Biological Properties. In *Phytochemicals - A Global Perspective of their Role in Nutrition and Health*; Rao, V., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2012.

DHULL, Anil Kumar *et al.* Major Risk Factors in Head and Neck Cancer: a retrospective analysis of 12-year experiences. **World Journal Of Oncology**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 80-84, 2018.

ESTÉS, Clarissa Pinkola. **Mulheres que correm com os lobos: mitos e histórias do arquétipo da mulher selvagem**. Rio de Janeiro: Rocco, 2018. p, 113.

FRANCHI, A. *et al.* Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. **Cancer**, [S.L.], v. 95, n. 9, p. 1902-1910, 25 out. 2002.

FREJBORG, Ellen; SALO, Tuula; SALEM, Abdelhakim. Role of Cyclooxygenase-2 in Head and Neck Tumorigenesis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 23, p. 9246, 3 dez. 2020.

GEZICI, Sevgi; ŞEKEROĞLU, Nazım. Current Perspectives in the Application of Medicinal Plants Against Cancer: novel therapeutic agents. **Anti-Cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 101-111, 8 maio 2019.

GRINEVICIUS, V. M. A.S.; *et al.* *Piper nigrum* ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 189, p. 139–147, 2016.

GOMES, E. P. A. A. *et al.* Head and neck cancer patients' quality of life: analysis of three instruments. **Journal Of Dentistry**, [S.L.], v. 21, n. , p. 31-41, mar. 2020.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Comet assay for detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, editors. **Mutagênese ambiental**. Canoas, RS, Brazil: ULBRA Inc.; p. 247–75, 2003.

GUTIERREZ, R. M. P. *et al.* Alkaloids from Piper: a review of its phytochemistry and pharmacology. **Mini Reviews In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 163-193, 1 fev. 2013.

GREENSHIELDS, Anna L. *et al.* Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 357, n. 1, p. 129-140, fev. 2015.

HOSHIKAWA. Expression of prostaglandin E2 receptors in oral squamous cell carcinomas and growth inhibitory effects of an EP3 selective antagonist, ONO-AE3-240. **International Journal Of Oncology**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 847-852, 9 fev. 2009. Spandidos Publications.

HANG, Wei. *et al.* Piperlongumine and p53-reactivator APR-246 selectively induce cell death in HNSCC by targeting GSTP1. **Oncogene**, [S.L.], v. 37, n. 25, p. 3384-3398, 18 jan. 2018.

HIRATA, N. *et al.* Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (-)-cubebin in murine B16 melanoma cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 14, p. 4897–4902, 2007a.

HIRATA, N. *et al.* Testosterone 5 α -reductase inhibitory active constituents of *Piper nigrum* leaf. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 12, p. 2402–5, 2007b.

HIRATA, N. *et al.* Histamine release inhibitory activity of *Piper nigrum* leaf. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 10, p. 1973–1976, 2008.

HRITCU, L. *et al.* Anxiolytic and antidepressant profile of the methanolic extract of *Piper nigrum* fruits in beta-amyloid (1–42) rat model of Alzheimer's disease. **Behavioral And Brain Functions**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-13, 29 mar. 2015.

HU, Cui. *et al.* Design, synthesis and anti-cancer evaluation of novel podophyllotoxin derivatives as potent tubulin-targeting agents. **Medicinal Chemistry Research**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 351-365, 11 dez. 2017.

INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: **INCA**, 2021. p. 120, 2019.

KASHIF, Muhammad; ISHFAQ, Muhammad; NAGI, A. H.. Expression of Prostanoid EP3 Receptors in Oral Squamous Epithelium and Oral Squamous Cell Carcinoma. **Pathology Research International**, [S.L.], v. 2015, p. 1-7, 9 fev. 2015.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun** 3:103-115, 1995.

KABAKOV, Alexander E.; GABAI, Vladimir L.. Cell Death and Survival Assays. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 107-127, 26 nov. 2017.

KASTAN, Michael B.; BARTEK, Jiri. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, [S.L.], v. 432, n. 7015, p. 316-323, nov. 2004.

LARONHA, Helena; CALDEIRA, Jorge. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. **Cells**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 1076, 26 abr. 2020.

LEMMENS, Bennie; LINDQVIST, Arne. DNA replication and mitotic entry: a brake model for cell cycle progression. **Journal Of Cell Biology**, [S.L.], v. 218, n. 12, p. 3892-3902, 11 nov. 2019.

LIN, Yi. *et al.* Piperine induces apoptosis of lung cancer A549 cells via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. **Tumor Biology**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 3305-3310, 24 nov. 2013

LIU, Ying-Qian. *et al.* Recent Progress on C-4-Modified Podophyllotoxin Analogs as Potent Antitumor Agents. **Medicinal Research Reviews**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 1-62, 14 maio 2014.

MA, Jun *et al.* Upregulated TIMP-1 correlates with poor prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, [S.L.], v. 1, n. 7, p.246-254, 15 dez. 2013

MATSUDA, H. *et al.* Melanogenesis stimulation in murine B16 melanoma cells by *Piper nigrum* leaf extract and its lignan constituents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 10, p. 1611–1616, 2004.

MAJTNEROVÁ, Pavlína; ROUĽAR, Tomáš. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular Biology Reports**, [S.L.], v. 45, n. 5, p. 1469-1478, 18 jul. 2018.

MENDES, R. A. *et al.* An overview on the expression of cyclooxygenase-2 in tumors of the head and neck. **Oral Oncology**, [S.L.], v. 45, n. 10, p. 124-128, out. 2009.

MOILANEN, M. *et al.* Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinomas. **J Pathol**, v.197, p.72-81, 2002.

NASRY, Walaa; RODRIGUEZ-LECOMPTE, Juan; MARTIN, Chelsea. Role of COX-2/PGE2 Mediated Inflammation in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Cancers**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 348, 22 set. 2018.

NIKOLIĆ, Miloš *et al.* Could essential oils of green and black pepper be used as food preservatives? **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 52, n. 10, p.6565-6573, 11 mar. 2015.

NGO, Q. T. *et al.* Alkaloids from *Piper nigrum* Exhibit Antiinflammatory Activity via Activating the Nrf2/HO1 Pathway. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 4, p. 663–670, 2017.

NOVIKOV, Nikita M. *et al.* Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. **British Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 124, n. 1, p. 102-114, 18 nov. 2020.

OBENG, E.. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. **Brazilian Journal Of Biology**, [S.L.], v. 81, n. 4, p. 1133-1143, dez. 2021.

ODES, Edward J. *et al.* Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from swartkrans cave, south africa. **South African Journal Of Science**, [S.L.], v. 112, n. 7/8, p. 1-1, 27 jul. 2016.

OSAWA, Kohei; UMEMURA, Masanari; NAKAKAJI, Rina; TANAKA, Ryo; ISLAM, Rafikul Md; NAGASAKO, Akane; FUJITA, Takayuki; YOKOYAMA, Utako; KOIZUMI, Toshiyuki; MITSUDO, Kenji. Prostaglandin E 2 receptor EP4 regulates cell migration through Orai1. **Cancer Science**, [S.L.], v. 111, n. 1, p. 160-174, 18 dez. 2019.

PEI, Heying. *et al.* Alkaloids from Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Exhibit Anti-Inflammatory Activity in Murine Macrophages by Inhibiting Activation of NF- κ B Pathway. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 68, n. 8, p. 2406-2417, 7 fev. 2020.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, London, v. 9, n. 29, p. 2002-2007, 2001.

PFEIFER, Charlotte R.; IRIANTO, Jerome; DISCHER, Dennis E.. Nuclear Mechanics and Cancer Cell Migration. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [S.L.], p. 117-130, 2019.

PIETRUSZEWSKA, Wioletta; BOJANOWSKA-POŹNIAK, Katarzyna; KOBOS, Józef. Matrix metalloproteinases MMP1, MMP2, MMP9 and their tissue inhibitors TIMP1, TIMP2, TIMP3 in head and neck cancer: an immunohistochemical study. **Otolaryngologia Polska**, [s.l.], v. 70, n. 3, p. 29_40, 30 jun. 2016.

QIU M, Xue C, ZHANG L. Piperine alkaloid induces anticancer and apoptotic effects in cisplatin resistant ovarian carcinoma by inducing G2/M phase cell cycle arrest, caspase activation and inhibition of cell migration and PI3K/Akt/GSK3 β signalling pathway. **J BUON**, [S.I.], v. 24, n. 6, p. Dez. 2019.

REUTHER, William J.; BRENNAN, Peter A.. Is nicotine still the bad guy? Summary of the effects of smoking on patients with head and neck cancer in the postoperative period and the uses of nicotine replacement therapy in these patients. **British Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 52, n. 2, p. 102-105, fev. 2014.

SCOTT, I.M. *et al.* Efficacy of *Piper nigrum* (Piperaceae) extract for control of insect defoliators of forest and ornamental trees. **The Canadian Entomologist**, [S.L.], v. 139, n. 4, p. 513-522, ago. 2007.

SIDDIQUI, Sahabjada. *et al.* Piperine Triggers Apoptosis of Human Oral Squamous Carcinoma Through Cell Cycle Arrest and Mitochondrial Oxidative Stress. **Nutrition And Cancer**, [S.L.], v. 69, n. 5, p. 791-799, 20 abr. 2017.

SIEMIANOWICZ, Krzysztof. *et al.* Chemoprevention of Head and Neck Cancers: does it have only one face?. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2018, p. 1-15, 25

SILVEIRA, Nelson Jf. *et al.* Searching for molecular markers in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) by statistical and bioinformatic analysis of larynx-derived SAGE libraries. **Bmc Medical Genomics**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 56, 11 nov. 2008.

SINGH, Nitin. *et al.* Inflammation and cancer. **Annals Of African Medicine**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 121-126, 14 ago. 2019.

SRIWIRIYAJAN, Somchai. *et al.* Anticancer and Cancer Prevention Effects of Piperine-Free *Piper nigrum* Extract on N-nitrosomethylurea-Induced Mammary Tumorigenesis in Rats. **Cancer Prevention Research**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 74-82, 28 out. 2015.

SRIWIRIYAJAN, Somchai. *et al.* (–)-Kusunokinin and piperloguminine from *Piper nigrum*: An alternative option to treat breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 92, p.732-743, ago. 2017.

STANCIU, Adina. *et al.* Imbalance between Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Promotes Invasion and Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Clinical Laboratory**, [S.L.], v. 63, n. 10/2017, p. 1613-1620, out. 2017.

SPEIGHT, Paul M. *et al.* Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology And Oral Radiology**, [S.L.], v. 125, n. 6, p. 612-627, jun. 2018.

TANG,Gui-Hua *et al.* Cytotoxic Amide Alkaloids from *Piper boehmeriaefolium*. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 74, n. 1, p. 45-49, 28 jan. 2011.

TAKOOREE, Heerasing *et al.* A systematic review on black pepper (*Piper nigrum* L.): from folk uses to pharmacological applications. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.],p.1-34,11 fev. 2019.

TEDASEN, Aman. *et al.* (–)-Kusunokinin inhibits breast cancer in N-nitrosomethylurea-induced mammary tumor rats. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 882, p. 173311, set. 2020.

TRIBIUS, S. *et al.* Update zu HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinomen – Highlights der ASCO-Jahrestagung 2019. **Hno**, [S.L.], v. 67, n. 12, p. 912-917, 7 nov. 2019.

TU, Y.; ZHONG, Y.; DU, H.; LUO, W.; WEN, Y.; LI, Q.; ZHU, C.; LI, Y. Anticholinesterases and antioxidant alkamides from *Piper nigrum* fruits. **Natural Product Research**, v. 30, n. 17 , p. 1945-1949, 2015.

TURRINI, Eleonora; SESTILI, Piero; FIMOIGNARI, Carmela. Overview of the Anticancer Potential of the “King of Spices” *Piper nigrum* and Its Main Constituent Piperine. **Toxins**, [S.L.], v. 12, n. 12, p. 747, 26 nov. 2020.

UTISPAN, Kusumawadee. *et al* Ethanolic Extract of Ocimum sanctum Leaves Reduced Invasion and Matrix Metalloproteinase Activity of Head and Neck Cancer Cell Lines. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 363-370, 1 fev. 2020.

WERNER, J. A.; RATHCKE, I. O.; MANDIC, R. The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Clin Exp Metastasis**, v.19, n.4, p.275-82, 2002.

YOSHIZAKI, T. *et al*. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v.95, n.1, p.44-50, 2001.

YOU, Youngjae. Podophyllotoxin Derivatives: current synthetic approaches for new anticancer agents. Current **Pharmaceutical Design**, [S.L.], v. 11, n. 13, p. 1695-1717, 1 maio 2005.

ZADOROZHNA, Mariia; TATARANNI, Tiziana; MANGIERI, Domenica. Piperine: role in prevention and progression of cancer. **Molecular Biology Reports**, [S.L.], v. 46, n. 5, p. 5617-5629, 4 jul. 2019.

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

ZHANG, Lei. *et al*. Synthesis and biological evaluation of novel podophyllotoxin-NSAIDs conjugates as multifunctional anti-MDR agents against resistant human hepatocellular carcinoma Bel-7402/5-FU cells. European **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 131, p. 81-91, maio 2017.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 03/09/2021



Assinatura do autor