



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

Juliana Prado Gusson

Análises celulares e moleculares das lignanas extraídas da *Piper cubeba* em linhagens tumorigênicas de cabeça e pescoço

São José do Rio Preto  
2019

Juliana Prado Gusson

Análises celulares e moleculares das lignanas extraídas da *Piper cubeba* em linhagens tumorigênicas 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP- Proc.. 2017/02100-3  
CAPES

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni

São José do Rio Preto  
2019

G982a Gusson, Juliana Prado  
Análises celulares e moleculares das lignanas extraídas da  
Piper cubeba em linhagens tumorigênicas de cabeça e  
pescoço / Juliana Prado Gusson. -- São José do Rio Preto,  
2019  
58 p.  
  
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. Lignanas. 3. Expressão gênica. 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.

Juliana Prado Gusson

Análises celulares e moleculares das lignanas extraídas da *Piper cubeba* em linhagens tumorigênicas 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP- Proc.. 2017/02100-3  
CAPES

Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni  
UNESP – Câmpus de Ilha Solteira  
Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Girol  
FIPA – Catanduva

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiéle da Silva Ribeiro  
UNESP – Câmpus de Ilha Solteira

São José do Rio Preto  
28 de fevereiro de 2019

## **DEDICO**

Aos meus amados pais Silvana Butinhão Prado Gusson e Jesus Gusson, minha querida irmã Geovana Prado Gusson, que são a minha base, e nunca mediram esforços para que eu chegasse até o presente momento, me ajudando a construir e realizar meus sonhos, oferecendo amor, apoio e carinho incondicional em todas as etapas de minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para a realização deste sonho, e por estar sempre presente em todos os momentos, me iluminando durante todo meu caminhar.

Aos meus amados pais e minha querida irmã pela compreensão e amor oferecido, e por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni a quem dedico toda minha gratidão, admiração e amizade, por sempre estar presente em todos esses anos de convívio, transmitindo seus ensinamentos e orientações, colaborando assim com minha aprendizagem e contribuindo com meu desenvolvimento acadêmico, científico e crescimento pessoal.

Ao meu querido e amado namorado Renato Alonso Zanetoni pelo apoio emocional, paciência e serenidade incondicional comigo.

Aos meus valiosos amigos que sempre estiveram presentes em todos os momentos de alegrias e dificuldades, dando sustento, incentivo e principalmente pela paciência e consideração para comigo. Agradeço aos meus amigos Cíntia Lionela Ambrósio, Maira Rodrigues, Luis Henrique Machado, Renan Geronel, por tudo que passamos juntos.

As minhas amigas e companheiras do Laboratório de Imunomorfologia, Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE-UNESP, Mab Corrêa, Jusciéle Moreli, Thaís Bravo, Julliene Monteiro, Janesly Prates, Rafaela Molás e Laila Toniol Cardin.

Em especial as professoras Dra. Sonia Maria Oliani e Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, pelo acesso e disponibilização de seus laboratórios e, principalmente pelos ensinamentos adquiridos. E também ao funcionário da Famerp, do laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica Prof. Dr Tiago Henrique, pelo auxílio prestado na realização da técnica de PCR em tempo real.

A todos os professores e ao programa da Pós-Graduação em Biociências por todos os ensinamentos. A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto IBILCE pela aprendizagem oferecida.

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

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).

## RESUMO

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço com acometimento de sítios anatômicos do trato aerodigestivo superior representa o sexto tipo mais comum de câncer no mundo. Algumas plantas vêm sendo utilizadas no tratamento do câncer e uma delas tem despertado interesse científico, a *Piper cubeba*. Com relação à importância da atividade antitumoral das lignanas extraídas da *Piper cubeba*, incluindo seus elementos químicos, foi proposto o presente trabalho que teve como objetivo geral avaliar o potencial efeito citotóxico e genotóxico de lignanas nas células sobre a morfologia, proliferação e migração celular, citotoxicidade, genotoxicidade, apoptose e necrose celular, e expressão gênica, observando como o fitoterápico age e como essas alterações participam do processo tumorigênico. Para isso foram utilizadas duas linhagens de células tumorigênicas e uma de células normais, após o tratamento com as lignanas cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, extrato total, hinoquinina e metilcubebina, todas extraídas das sementes de *Piper cubeba* em três concentrações (10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL), por 4, 24, 48 e 72 horas. A observação da morfologia foi realizada em microscópio invertido, o índice de proliferação pela curva de crescimento, a viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico, MTS (CC<sub>50</sub>), migração celular pelo método de transwell, genotoxicidade pelo ensaio cometa, avaliação da apoptose por citômetro de fluxo e expressão gênica pela técnica de PCR quantitativo. A estatística foi realizada por análise de variância para comparações múltiplas (ANOVA), seguido do ajuste de Bonferroni, pelo software GraphPad Prism 5.0. Os resultados evidenciaram que as diferentes lignanas não alteram a morfologia celular, mas diminuem a proliferação e migração das células, apresentam pouca citotoxicidade, e efeitos genotóxicos, provavelmente por indução de apoptose tardia e necrose celular, e ainda alteram a expressão de genes envolvidos com o processo inflamatório. Dessa maneira, as lignanas da *Piper cubeba* atuam diretamente nas células tumorigênicas, seja pelas vias apoptóticas e/ou inflamatórias e abrem novas

possibilidades de estudos futuros para terapias associadas no câncer de cabeça e pescoço.

**Palavras-chave:** câncer, potencial antitumorigênico, fitoterápico, processo inflamatório.

## ABSTRACT

Head and neck Squamous cell carcinoma with involvement of anatomical sites of the upper aerodigestive tract represents the sixth most common type of cancer in the world. Some plants have been used in the treatment of cancer and one of them has aroused scientific interest, *Piper cubeba*. Regarding the importance of the antitumor activity of the lignans extracted from *Piper cubeba*, including its chemical elements, the present work was proposed whose general objective was to evaluate the potential cytotoxic and genotoxic effects of lignans in cells on cell morphology, proliferation and migration, cytotoxicity, genotoxicity, apoptosis and cell necrosis and gene expression, observing how the phytotherapeutic acts and how these alterations participate in the tumorigenic process. After the treatment with the lignans cubebin, dihydrocubebin, ethylcubebin, total extract, hinokinin and metilcubebin, all of them were extracted from *Piper cubeba* seeds at three concentrations (10, 50 and 100µg/ml) for 4, 24, 48 and 72 hours. The morphology was determined by inverted microscopy, proliferation index by growth curve, cell viability was determined by the colorimetric method, MTS (IC<sub>50</sub>), cell migration by transwell method, genotoxicity by comet assay, flow cytometric apoptosis evaluation and gene expression by quantitative PCR technique. Statistical analysis was performed by analysis of variance for multiple comparisons (ANOVA), followed by Bonferroni adjustment by GraphPad Prism 5.0 software. The results showed that the different lignans do not alter the cellular morphology, but decrease cell proliferation and migration, have little cytotoxicity, and genotoxic effects, probably due to the induction of late apoptosis and cellular necrosis, and also alter the expression of genes involved with inflammatory process. Thus, *Piper cubeba* lignans act directly on tumorigenic cells, either through apoptotic and/or inflammatory pathways and open up new possibilities for future studies for associated therapies in head and neck cancer.

**Key words:** cancer, antitumorigenic potential, phytotherapeutic, inflammatory process.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Representação da via inflamatória do gene COX-2.....17
- Figura 2:** Esquema representativo do trabalho.....22
- Figura 3:** Fotomicrografia de fluorescência dos núcleos corados com *GelRed* nas células Hep-2, após tratamento com cubebina (concentração de 100µg/mL por 72 horas), evidenciando os diferentes tipos de danos avaliados pelo ensaio Cometa. Aumento de 400X, escala de 40µm.....26
- Figura 4.** Análise da morfologia das células Hep-2 (A), SCC-25 (B) e Fibroblasto (C). Controle e tratadas com a lignana cubebina. Aumento de 400X, escala de 40µm.....38
- Figura 5.** Curva de crescimento das células Hep-2 (A), SCC-25 (B) e Fibroblasto (C) tratadas com os compostos extraídos da *Piper cubeba* em três concentrações (10, 50 e 100µg/mL) por 4, 24, 48 e 72 horas. \* com  $p<0,05$ .....39
- Figura 6.** Efeitos dos tratamentos com as lignanas da *Piper cubeba* para o método colorimétrico de viabilidade/citotoxicidade celular (MTS) na linhagem Hep-2 (A), SCC-25 (B) e Fibroblasto (C). Gráfico com eixo X= tempo (horas) e y= viabilidade (porcentagem). \* com  $p<0,05$ .....40
- Figura 7.** Ensaio de migração Transwell das células Hep-2 (A), SCC-25 (B) e Fibroblasto (C). Foto da migração celular do grupo de células controle (superior), tratado com a lignana etilcubebina (mediano) e gráfico representando a densitometria (inferior). Aumento de 200X, escala de 20µm. \* com  $p<0,05$ .....41
- Figura 8.** Índice de danos às células Hep-2 (A), SCC-25 (B) e Fibroblasto (C) tratadas com as lignanas extraídas da *Piper cubeba* (cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, extrato total, hinoquinina, metilcubebina e podofilotoxina) nos tempos 72 horas para Hep-2 e SCC-25 e 24 horas para F5, na concentração de 100µg/mL. \* com  $p<0,05$ .....42
- Figura 9.** Histogramas (lado esquerdo) obtidos da citometria de fluxo demonstrando a viabilidade (Q4), apoptose inicial (Q3), apoptose tardia (Q2) e necrose (Q1) de células Hep-2 (A), SCC-25 (B) e F5 (C), incubadas com meio controle ou tratadas com as lignanas da *Piper cubeba*. A viabilidade celular foi

avaliada pela incubação com ANEXINA-V e/ou PI e a intensidade de fluorescência por citometria de fluxo. Gráficos (lado direito) demonstrando os efeitos dos tratamentos com as lignanas da *Piper cubeba* sobre a viabilidade, apoptose, apoptose tardia e necrose das células Hep-2, SCC-25 e F5.....**43**

**Figura 10.** Análise da expressão dos genes *COX2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, por PCR em tempo real para a linhagem Hep-2. A expressão gênica foi considerada significativa exibindo valores  $\geq 1.0$  ou  $\leq -1.0$  versus controle.....**44**

**Figura 11.** Análise da expressão dos genes *COX2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, por PCR em tempo real para a linhagem SCC-25. A expressão gênica foi considerada significativa exibindo valores  $\geq 1.0$  ou  $\leq -1.0$  versus controle.....**45**

**Figura 12.** Análise da expressão dos genes *COX2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, por PCR em tempo real para as células fibroblasto. A expressão gênica foi considerada significativa exibindo valores  $\geq 1.0$  ou  $\leq -1.0$  versus controle.....**46**

## SUMÁRIO

|        |                                                                                                                                     |    |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | INTRODUÇÃO .....                                                                                                                    | 13 |
| 2.     | OBJETIVOS .....                                                                                                                     | 19 |
| 3.     | MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                            | 20 |
| 3.1    | Linhagens celulares .....                                                                                                           | 20 |
| 3.2    | Lignanas da <i>Piper cubeba</i> .....                                                                                               | 20 |
| 3.3    | Procedimento de preparação do extrato e separação das lignanas<br>.....                                                             | 20 |
| 3.4    | Cultivo e análise da morfologia celular .....                                                                                       | 21 |
| 3.5    | Índice de proliferação celular.....                                                                                                 | 22 |
| 3.6    | Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular .....                                                                                | 23 |
| 3.7    | Ensaio de migração celular transwell .....                                                                                          | 24 |
| 3.8    | Ensaio cometa .....                                                                                                                 | 25 |
| 3.9    | Citometria de fluxo .....                                                                                                           | 27 |
| 3.10   | Análise de PCR quantitativo em tempo real .....                                                                                     | 27 |
| 3.10.1 | Seleção de genes de interesse .....                                                                                                 | 27 |
| 3.10.2 | PCRq em tempo real .....                                                                                                            | 28 |
| 3.11   | Análises estatísticas .....                                                                                                         | 28 |
| 4.     | RESULTADOS .....                                                                                                                    | 29 |
| 4.1    | A morfologia das células não sofrem modificações .....                                                                              | 29 |
| 4.2    | Lignanas da <i>Piper cubeba</i> diminuem a proliferação celular nas<br>linhagens Hep-2, SCC-25 e fibroblasto oral (F5) .....        | 29 |
| 4.3    | As lignanas da <i>Piper cubeba</i> apresentam pouca citotoxicidade<br>.....                                                         | 30 |
| 4.4    | Lignanas da <i>Piper cubeba</i> diminuem a migração das células Hep-<br>2, SCC-25 e fibroblasto oral (F5) .....                     | 31 |
| 4.5    | Danos ao material genético das células Hep-2, SCC-25 e F5<br>podem ser causados pela ação das lignanas da <i>Piper cubeba</i> ..... | 32 |
| 4.6    | Lignanas da <i>Piper cubeba</i> podem levar as células Hep-2, SCC-25<br>e F5 ao processo de apoptose tardia e a necrose .....       | 33 |
| 4.7    | Lignanas da <i>Piper cubeba</i> alteram a expressão gênica.....                                                                     | 34 |
| 5.     | DISCUSSÃO .....                                                                                                                     | 47 |

|    |                   |    |
|----|-------------------|----|
| 6. | CONCLUSÕES .....  | 52 |
|    | REFERÊNCIAS ..... | 53 |

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço envolve todos os tumores malignos do trato aerodigestivo superior, que começa na borda vermelha dos lábios e se estende até o início do esôfago. Aproximadamente 90% das neoplasias malignas de cabeça e pescoço são carcinomas de células escamosas, enquanto apenas 5% são adenocarcinomas (GOTZ et al., 2018). Esse tipo de câncer é a denominação genérica para o conjunto de tumores da cavidade oral, faringe e laringe, cuja incidência eleva-se a cerca de 680 mil casos e a mortalidade a 500 mil por ano no mundo. Esses números expressam a relevância da doença para a saúde pública. No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2018 assinalaram, para a cavidade bucal, cerca de 14.700 casos novos por ano, 11.200 em homens e 3.500 em mulheres (KFOURI et al., 2018).

Tumores que ocorrem nas regiões anatômicas da cabeça e pescoço são o sexto tipo mais comum de câncer no mundo (BASHEER et al., 2018). O desenvolvimento desse tipo de câncer resulta da interação de fatores ambientais e herança genética, tratando-se, portanto, de uma doença multifatorial. Tabagismo e alcoolismo são importantes fatores de risco para o desenvolvimento da doença (GALBIATTI; PADOVANI-JUNIOR, 2013).

Nas últimas décadas, uma taxa de incidência decrescente, particularmente para os cânceres da cavidade oral, hipofaringe e laringe, tem sido observada como efeito do consumo reduzido de tabaco nos países industrializados. No entanto, em contraste, houve um rápido aumento na taxa de incidência de tumores orofaríngeos, particularmente aqueles das amígdalas e base da língua, que foram associados ao vírus do papiloma humano (HPV) (GOTZ et al., 2018).

Com relação aos aspectos clínicos, o câncer de cabeça e pescoço usualmente se apresenta como um conjunto de sinais e sintomas que incluem lesão de cavidade oral, aumento de volume da região cervical, dificuldade de ingestão de alimentos, rouquidão, sangramento e dor em alguns casos. A incidência deste tipo de tumor aumenta com a idade, à semelhança do que ocorre com as demais neoplasias. Acomete indivíduos com idade superior a

40 anos, sendo que a maioria dos casos é identificada em indivíduos com idade superior a 50 anos (SANTIAGO, 2015).

Em se tratando do tratamento para este tipo de câncer, cirurgia, quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia e terapia biológica são considerados intervenções padrões após o diagnóstico do câncer, podendo causar efeitos tardios e irreversíveis para os pacientes. Como consequência, pode ocorrer danos físicos como a perda de funções vitais na deglutição, fala e sentidos de sabor e cheiro, que podem vir acompanhados pela deterioração social e emocional (ROSSETTO, 2018). Assim o tratamento de escolha depende de múltiplos fatores, como grau do tumor, estágio e localização, envolvimento nodal e características do paciente (VEEN; NUYTS, 2017).

Além desses mecanismos de intervenções já conhecidos para o tratamento do câncer, algumas plantas se destacam na medicina popular e uma delas tem despertado o interesse dos cientistas, a *Piper cubeba*, conhecida popularmente como pimenta de Java, é uma planta usada extensivamente na medicina tradicional na Indonésia (RESENDE et al., 2012). Os compostos bioativos da *Piper cubeba* têm sido de grande valor na descoberta de novos agentes terapêuticos para tratar doenças associadas a problemas inflamatórios, distúrbios renais gonorréia, sífilis, dor abdominal, enterite e asma (GODOY DE LIMA; BARROS; DA SILVA LAURENTIZ, 2018).

Também tem sido relatado o efeito inibidor sobre a hepatite C na protease do vírus da hepatite C (JANUARIO et al., 2002) e significativas atividades anti-inflamatórias, antialérgicas e analgésicas do extrato metanólico da *Piper cubeba* em ratos machos por edema de pata, orelha e artrite, constatando claramente as atividades antialérgicas e anti-inflamatórias (CHOI; HWANG, 2003).

As espécies do gênero *Piper* compreendem um grande número de plantas medicinais e economicamente importantes que são amplamente utilizadas em sistemas tradicionais de medicina (RAJALEKSHMI et al., 2016). Apresentam ainda uma alta importância comercial e econômica por serem pimentas usadas, mundialmente, como temperos picantes. O interesse pela química desse gênero evoluiu bastante ao longo dos anos devido ao grande número de espécies estudadas e compostos isolados com importante valor farmacológico. Algumas espécies deste gênero têm sido bem investigadas do

ponto de vista fitoquímico e farmacológico. Tais espécies são fontes de óleos essenciais bioativos e de grande interesse para as indústrias farmacêuticas (SILVA, 2008).

As propriedades biológicas da *Piper cubeba* estão diretamente relacionadas à presença de lignanas como a cubebina, hinoquinina, dihidrocubebina entre outras (ELFAHMI et al., 2007). As lignanas são metabólitos secundários produzidos pelas plantas e geralmente estão associados à defesa da planta contra a ação de patógenos, ocorrem em várias espécies de plantas sendo frequentes no gênero *Piper* (LAURENTIZ, 2015). Várias lignanas exercem efeitos anticancerígenos, antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios, imunossupressores, antivirais e hepatoprotetores (NIWA et al., 2016).

As lignanas têm efeitos similares ao estrogênio *in vitro*, e sua ação é parcialmente atribuída à sua capacidade em se ligar a receptores específicos do estrogênio (SUGAHARA; YAMAUCHI; NISHIMOTO, 2008). Segundo o estudo realizado por Stark & Madar (2002), a lignana preveniu, de forma endógena, a oxidação de bases pirimidinas e purinas, reduzindo o dano oxidativo do DNA, um evento que aumenta a tumorigênese. A ação antioxidante dos fitoestrógenos também contribui para sua eficiência como agente anticancerígeno (CORDEIRO; FERNANDES; BARBOSA, 2009).

Essas lignanas também são conhecidas por sua diversidade estrutural e por inúmeras propriedades biológicas, sendo um dos membros mais importantes dessas lignanas a podofilotoxina, que apesar de ser de outra espécie (*Podophyllum*), apresenta comprovada atividade anticâncer (entretanto alta toxicidade) e seus derivados etoposídeo e tenoposídeo são usados clinicamente no controle de alguns tipos de câncer (CANEL et al., 2000).

A atividade citotóxica indica o grau de morte celular induzida que um extrato, resina ou substância oferece a um determinado tipo de célula. Assim, os ensaios de citotoxicidade são uma ferramenta guia para o descobrimento de novos fármacos que podem ser usadas em tratamentos contra o câncer. Embora nem todos os compostos citotóxicos apresentem aplicação anticancerígena na terapêutica, todos os anticancerígenos mostram elevada citotoxicidade. Dentre as várias classes, destacam-se as lignanas ariltetralínicas, em especial, a podofilotoxina, devido ao seu efeito

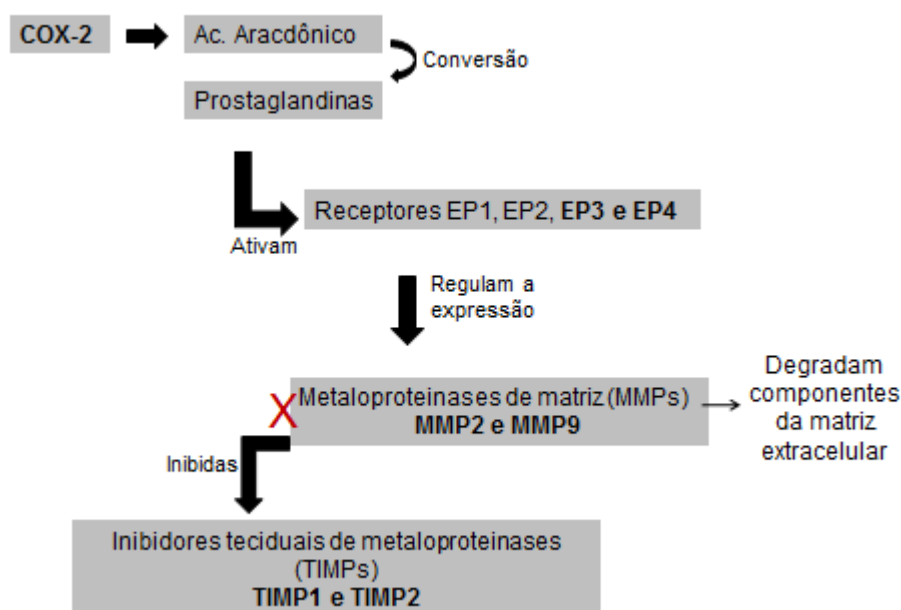
anticancerígeno comprovado. A podofilotoxina mostra-se um agente tanto com atividade citotóxica quanto anticancerígena e já foi utilizada por muito tempo para tratar condilomas venéreos (MEDRADO et al., 2014).

Embora a cubebina seja o composto mais abundante em *P. cubeba* existem poucos estudos relatados sobre seus derivados sintéticos e sua bioatividade, o trabalho de Silva e colaboradores (2008) relataram suas atividades anti-inflamatórias e analgésicas, mas não houve mais relatos na área de modificação química da cubebina e de seus derivados que explorassem em detalhes a sua atividade anticancerígena (RAJALEKSHMI et al., 2016).

Poucos relatos na literatura relacionam vias genéticas com a ação específica da *P. cubeba*, mas sabemos que genes relacionados com vias inflamatórias e/ou tumorigênicas podem ser modulados pela ação das lignanas (Cunha et al., 2016; Niwa et al., 2016). Dentre esses genes destacamos a ciclo-oxigenase 2 (COX-2), enzima responsável pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano, fundamentais no processo de inflamação tecidual. A síntese da COX-2, usualmente diminuta, sob estímulo de citocinas; fatores de crescimento celular e oncogenes têm sua expressão aumentada, se relacionando com a angiogênese, invasão e metástase tumoral. O aumento da COX-2 é observado em vários tipos de câncer, como por exemplo, nos cânceres de pâncreas, pulmão, mama, estômago, cólon, próstata e de cabeça e pescoço. Por via do AMPc, a COX-2 promove a migração e a disseminação destas células através do mecanismo de angiogênese, e além disso, aumenta a síntese do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), fundamental para esse processo de angiogênese (BONHIN et al., 2014).

A COX-2 sintetiza a prostaglandina E2 (PGE2), que pode ativar receptores acoplados à proteína G, tais como EP1, EP2, EP3 e EP4 e regula a expressão, secreção e ativação de várias metaloproteinases em diferentes tipos celulares, como mostra a via gênica relacionando diferentes genes com funções inflamatórias (Figura 1). Alguns dados da literatura sugerem que a expressão de EP3 possui papel prognóstico no câncer (ABRAHAO et al., 2010).

**Figura 1.** Representação da via inflamatória do gene COX-2.



Fonte: Elaborado pelo autor

As proteínas que naturalmente inibem a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) são as codificadas pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). A proteólise descontrolada das MMPs promove degradação da matriz extracelular, invasão de células tumorais e aumento do risco de metástase de células cancerígenas (BOURBOULIA et al., 2013). As MMPs são enzimas proteolíticas dependentes de zinco que degradam a maioria dos componentes da matriz extracelular incluindo colágeno, elastina e fibronectina. A degradação da matriz de colágeno é importante para a invasão de tecidos subjacentes e metástases. Várias MMPs possuem expressão elevada em câncer de cabeça e pescoço incluindo MMP-2, MMP-8, MMP-9 e MMP-13. MMP-2 e MMP-9 desempenham um papel importante na carcinogênese de cabeça e pescoço por degradar o colágeno tipo IV, o principal componente da membrana basal. Alguns estudos mostram uma correlação significativa entre a expressão de MMP-9 e baixa sobrevida em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (SANTIAGO, 2015).

A maioria desses fatores é produzida pelas células tumorais e inflamatórias, promovendo a comunicação parácrina e autócrina no

microambiente tumoral, podendo influenciar todos os estágios do desenvolvimento tumoral, incluindo a iniciação, promoção, progressão e metástase (AGGARWAL et al., 2009; GRIVENNIKOV; KARIN, 2011; NEURATH; FINOTTO, 2011), por essa razão decidimos estudar essa cascata gênica específica.

Diante desta revisão bibliográfica, foi elaborado o presente trabalho com o intuito de contribuir para o esclarecimento da ação das lignanas (cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, extrato total, hinoquinina, metilcubebina e podofilotoxina), avaliando o potencial efeito citotóxico, genotóxico desses compostos extraídas da *Piper cubeba* e a influência dessas na expressão gênica.

## 2. OBJETIVOS

Em função da importância da atividade antitumoral das lignanas extraídas da *Piper cubeba*, incluindo seus elementos químicos, foi proposto o presente trabalho que teve como objetivo geral investigar *in vitro* o efeito das lignanas nas células de câncer de cabeça e pescoço e normais.

Os seus objetivos específicos compreenderam avaliar o potencial efeito citotóxico e genotóxico de lignanas nas células neoplásicas sobre a morfologia, proliferação e migração celular, citotoxicidade, genotoxicidade, apoptose e necrose celular e expressão gênica dos genes (*COX-2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*), observando como o fitoterápico age e como essas alterações podem participar do processo tumorigênico.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Linhagens celulares**

Foram utilizadas duas linhagens tumorigênicas e uma linhagem de células normais. As linhagens tumorigênicas são carcinoma epidermoide de laringe (Hep-2) e de língua (SCC-25), ambas do banco de linhagem de células Americano (ATCC), que foram cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/FAMERP, SP. As células normais são células primárias derivadas de fibroblastos orais humanos normais (F5), foram cedidas pelo Prof. Dr. Ricardo Coletta, da Faculdade de Odontologia da Unicamp, Piracicaba, SP.

#### **3.2 Lignanas da *Piper cubeba***

As lignanas avaliadas foram cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, extrato total, hinoquinina e metilcubebina, todas extraídas das sementes de *Piper cubeba*, em projetos anteriores coordenados pela Profa. Dra. Rosângela da Silva Laurentiz, Departamento de Físico-Química da FEIS/UNESP.

Além disso, adicionamos ao projeto uma lignana sintética, como controle positivo, a podofilotoxina que apresenta atividade citotóxica conhecida contra várias linhagens de células cancerígenas (ZI et al., 2018). Todas as lignanas foram diluídas em 1mL de veículo (50% de Dimetilsulfoxide - DMSO e 50% de água ultrapura), então para todos os experimentos foi utilizada uma amostra controle com o diluente (veículo - DMSO), no volume máximo utilizado para a concentração de 100µg/mL.

Na cultura *in vitro* foi utilizada a faixa de concentração de 10, 50 e 100 µg/mL das lignanas (determinadas por estudos prévios) nas células Hep-2, SCC-25 e fibroblastos.

#### **3.3 Procedimento de preparação do extrato e separação das lignanas**

As sementes da *Piper cubeba* foram importadas da Índia com recursos de projetos anteriores já finalizados. As sementes secas foram trituradas num

moinho de facas até um pó fino com o qual foi feito o extrato etanólico. O extrato foi preparado a partir de 1Kg de pó das sementes em 5L de etanol, a mistura foi mantida em repouso com ocasional agitação por 1 semana. Após esse período a mistura foi filtrada e o solvente removido à pressão reduzida em rotaevaporador. O extrato obtido foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (várias colunas) usando gradientes com polaridade crescente desde hexano puro, misturas de hexano e diclorometano, até diclorometano puro. As frações recolhidas foram submetidas a análises de RMN e HPLC para a confirmação da estrutura e determinação da pureza. Na cultura in vitro foi utilizada a faixa de concentração de 10, 50 e 100µg/mL das lignanas (determinada por estudos prévios) nas linhagens celulares Hep-2, SCC-25 e F5.

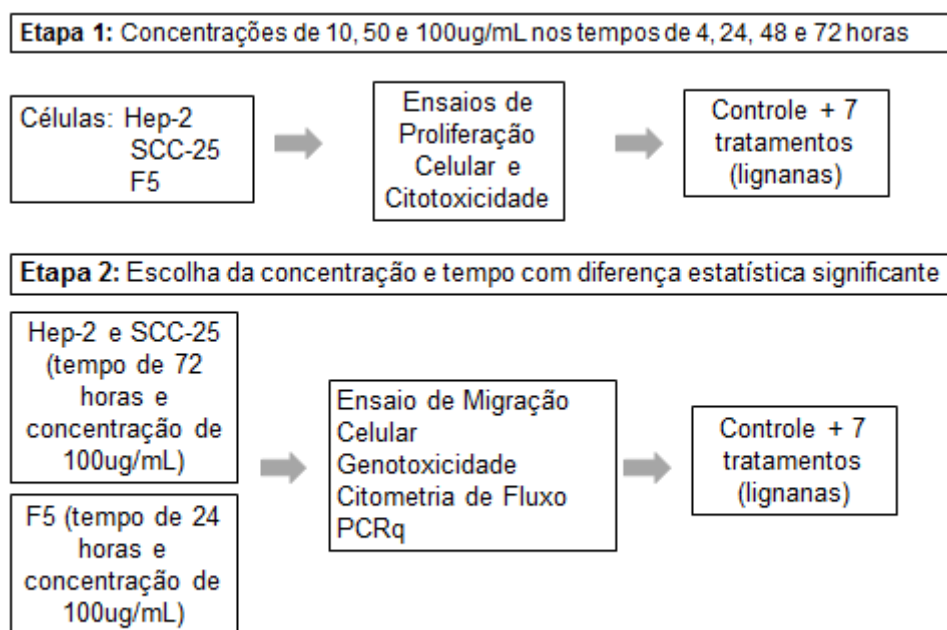
### **3.4 Cultivo e análise da morfologia celular**

A linhagem celular Hep-2 foi semeada em meio completo MEM-Earle medium (Cultilab), suplementado com 10% de soro bovino (Cultilab), 1% antibiótico/antimicótico (Invitrogen), 1% L-glutamina (200 µM) (Sigma Aldrich), 1% de aminoácidos não essenciais 10mM (Sigma Aldrich) e 1% de piruvato de sódio 100 mM (Sigma Aldrich). Para a linhagem SCC-25 foi utilizado o meio DMEM-HAM-F12 (Cultilab), já a linhagem F5 foi cultivada com o meio completo DMEM *high glucose* (Cultilab), ambas suplementadas igualmente a linhagem Hep-2. Essas células foram mantidas a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> 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 e, quando a densidade celular se mostrou alta, o material foi submetido à tripsinização e subdividido em duas réplicas.

Para os procedimentos abaixo descritos (índice de proliferação celular, citotoxicidade e viabilidade) foram realizados oito experimentos, com cada um dos três tipos celulares, um experimento controle (tratamento com DMSO) e sete com diferentes tratamentos (cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, extrato total, hinoquinina, metilcubebina e podofilotoxina), 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, para prosseguir os ensaios de migração celular, genotoxicidade, citometria de fluxo e de expressão gênica. Ou seja, após essa determinação, as células foram processadas, em maior número, para os ensaios específicos de migração transwell, cometa, citometria de fluxo e PCR quantitativo. As diferentes condições experimentais são apresentadas na Figura 2.

**Figura 2:** Esquema representativo do trabalho.



Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.5 Índice de proliferação celular

Para a análise do índice de proliferação foi realizada uma curva de crescimento para cada concentração a ser testada, em triplicatas (3 experimentos independentes), com contagem de células cultivadas em placas de cultura de 6 poços, semeadas na concentração de  $5 \times 10^4$  em 2mL de meio de cultura com 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37°C em câmara úmida e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas, até se fixarem no substrato. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio sem soro (meio 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 das lignanas 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, o qual foi realizado em duplicatas. O contador de células *Countess II* utiliza lâminas específicas e o corante vital Tripán blue, no qual ele distingue as células viáveis das células mortas, gerando assim três contagens para cada tempo, uma de células totais, outra de células viáveis e outra de células mortas, no próprio visor.

Após esse ensaio de proliferação celular foi aplicado o teste estatístico Análise de variância a um critério, no qual o tempo e a concentração foram avaliados para sabermos qual dará uma maior diferença estatística significativa em relação ao crescimento celular, onde  $p < 0,5$  foi considerado significativo.

### **3.6 Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular**

O ensaio de citotoxicidade foi realizado por meio da aplicação do reagente MTS- CellTiter 96 AQ Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (PROMEGA, USA). A avaliação com MTS, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4sulfofenil)-2H-tetrazólio, é um método colorimétrico que analisa quantitativamente a viabilidade celular/citotoxicidade.

Os experimentos foram feitos para as três células (Hep-2, SCC-25 e F5) em triplicatas, utilizando placas de 96 poços ( $5 \times 10^3$  células/poço) seguindo os tratamentos com as lignanas e controle nas concentrações desejadas, nos tempos de 4, 24, 48 e 72 horas de incubação. Para o ensaio foi adicionado 20ul de reagente MTS (de acordo com o protocolo do fabricante). A leitura foi realizada após os tempos mencionados de incubação do reagente (na estufa a 37°C, CO<sub>2</sub> a 5%, umidificada) em leitor de placas no comprimento de onda de 492nm (Thermo Plate, Tp-Reader Basic).

Após esse ensaio de citotoxicidade foi aplicado o teste estatístico para a análise da viabilidade celular *versus* concentração, bem como o cálculo do CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica que matou 50% das células), os valores de absorbância obtidos no tratamento com os compostos (A), foram normalizados para os valores obtidos com o solvente (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 qual a maior diferença estatística significativa em relação à viabilidade celular.

### 3.7 Ensaio de migração celular transwell

As células foram cultivadas em placas de 24 poços ( $5 \times 10^4$ ) em meio MEM para a linhagem Hep-2, meio DMEM-HAM-F12 para a linhagem SCC-25 e DMEM *high glucose* para o fibroblasto, todas por 24 horas, com 10% SFB para todas as células, depois foi retirado o meio e adicionado meio sem soro por mais 24h. Passado esse tempo foi retirado o meio e adicionado novamente o meio completo (10% SFB), sendo que essas células em seguida receberam os diferentes tratamentos (7 lignanas e controle) e então foram incubadas nos devidos tempos de 72 horas para as linhagens Hep-2 e SCC-25 e 24 horas para o fibroblasto, na concentração de 100ug/mL. Após, as células foram tripsinizadas e colocadas na quantidade de  $3 \times 10^4$  sobre os insertos, do tipo *Transwell* (CorningCostar, New York, USA), utilizando filtros com poros de 8µm, em placas de 24 poços. Na porção superior da câmara foi adicionado 150µL de meio sem SFB e na inferior 500µL de meio completo (10% SFB). A placa foi incubada por 24 horas, em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C.

Seguidamente o período de incubação, os poços foram lavados com PBS gelado e os insertos limpos interiormente com cotonetes na porção superior da câmara. A fixação das células, na porção inferior, foi realizada com paraformaldeído a 4% em PBS, por 30 minutos, e coradas com solução de Cristal Violeta por mais 30 minutos. Em seguida, os insertos foram fotografados em cinco campos aleatórios.

### 3.8 Ensaio cometa

O ensaio cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas particularidades e vantagens quando comparado a outros testes para a detecção de substâncias genotóxicas (GONTIJO; TICE, 2003).

As células Hep-2, SCC-25 e F5 foram cultivadas em placas de 12 poços na concentração de  $3 \times 10^4$  de acordo com os tempos de 72 horas para as linhagens Hep-2 e SCC-25 e 24 horas para F5, com os devidos grupos controle e tratados com as lignanas na concentração de 100µg/mL. Essas células foram então tripsinizadas, e o conteúdo da placa de cultura foi retirado e colocado em um tubo falcon de 15ml. As células foram centrifugadas e o “pellet” formado foi misturado a agarose de baixo ponto de fusão/*Low Melting Temperature agarose* (LMP) e colocado sobre lâminas de extremidades foscas que continham uma mistura de PBS (Phosphate Buffer Solution) e agarose de ponto de fusão normal/*Normal Melting agarose* (NMP) para que ficasse uma fina película do composto sobre a lâmina. Após esse procedimento, a etapa de lise foi aplicada para que tivesse a quebra das membranas das células, sendo que as lâminas foram mergulhadas em uma cuba de vidro com a solução de lise pH10 (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, Lauril 35mM), a 4°C durante 60 minutos.

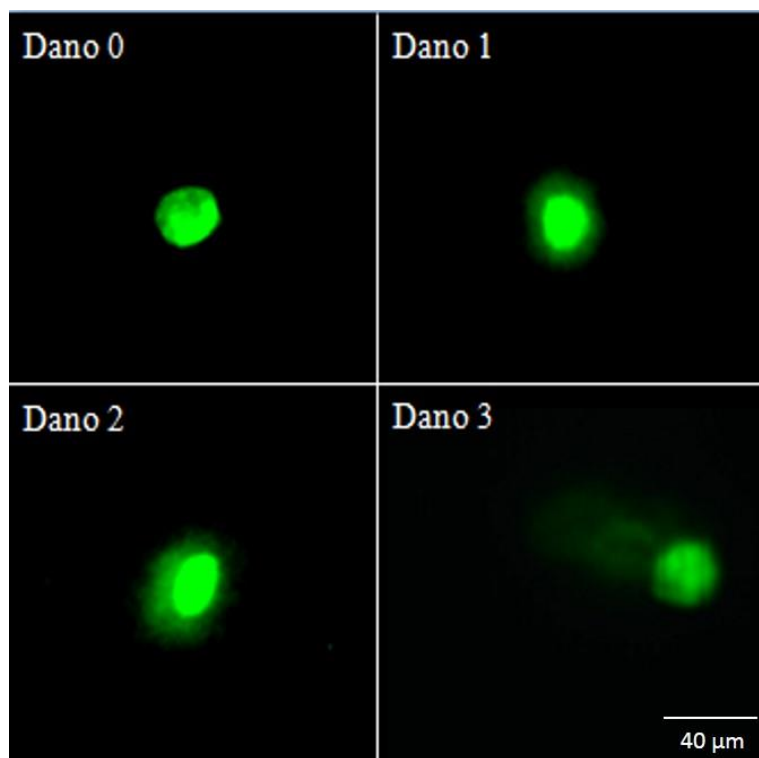
Na sequência, foi realizada a eletroforese com duração de vinte minutos, em cuba horizontal a 25V e 300mA, para que o material genético pudesse se deslocar, possibilitando a formação da cauda do cometa. Antes de iniciar a eletroforese as lâminas ficaram na solução tampão de eletroforese pH13 (EDTA 200mM, NaOH 10N) por cerca de trinta minutos. Logo após foi feito o processo de neutralização das lâminas, com 5mL de solução de neutralização pH 7,5 (Tris 0,4M), deixando agir por cinco minutos, e repetindo esse processo três vezes.

Em seguida as lâminas passaram pelo processo de fixação, com a utilização de álcool etílico 100% por dez minutos. Depois as lâminas foram posicionadas em uma superfície para a secagem em temperatura ambiente, e então foram acondicionadas em caixas plásticas e guardadas em geladeira. Desde o início do procedimento até o final de todas as etapas as amostras foram mantidas com a ausência de luz e calor, para evitar possíveis danos ao

DNA, assim às etapas foram devidamente realizadas em sala escura e ambiente controlado a 18°C. As lâminas depois de fixadas foram coradas com uma solução de Gel Red 10000x, NaCl 1M e água destilada, e analisadas em microscópio de fluorescência em aumento de 400x. Foram analisadas 100 células por grupo experimental.

Os núcleos celulares foram classificados em uma classe de dano que é determinada de acordo com a intensidade e tamanho da cauda do cometa (KOBAYASHI, 1995), como mostra a figura 3, sendo: 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:  $ID\ total = 0.(n\ Classe\ 0) + 1.(n\ Classe\ 1) + 2.(n\ Classe\ 2) + 3.(n\ Classe\ 3)$ .

**Figura 3:** Fotomicrografia de fluorescência dos núcleos corados com *GelRed* nas células Hep-2, após tratamento com cubebina (concentração de 100µg/mL por 72 horas), evidenciando os diferentes tipos de danos avaliados pelo ensaio Cometa. Aumento de 400X, escala de 40µm.



Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.9 Citometria de fluxo

Para a análise do citômetro as células Hep-2, SCC-25 e F5 foram cultivadas em garrafas de cultura pequenas na concentração de  $4 \times 10^5$ , sendo uma garrafa para cada condição controle e tratadas com as lignanas. No devido tempo de tratamento de cada célula essas garrafas com as foram lavadas com 2 mL de PBS, e então desagregadas com 1,5 de tripsina, e esse conteúdo celular de cada garrafa foi transferido para tubo falcon identificado (15 mL). Logo após essas células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 3 minutos para obtenção do pellet, e então lavadas três vezes com PBS gelado.

Em seguida essas células foram contadas para se saber a quantidade de célula por falcon, para que então se chegasse à contagem de  $1 \times 10^6$  do qual é realizado o citômetro. Depois de contadas as células foram centrifugadas novamente para a adição do 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 FITC Anexina V e 5 µl de PI (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 (*Guava Easy Cyte, MILLIPORE*) para a investigação da expressão das moléculas relacionadas com apoptose e necrose após o tratamento com as lignanas.

### 3.10 Análise de PCR quantitativo em tempo real

#### 3.10.1 Seleção de genes de interesse

Os genes estudados nesse projeto (*COX-2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*) foram previamente selecionados a partir dos marcadores potenciais identificados por estudos anteriores (Cunha et al., 2012), utilizando bibliotecas SAGE. As vias metabólicas desses marcadores potenciais foram avaliadas e alguns genes relacionados a elas também foram escolhidos. No projeto de mestrado de Cunha e colaboradores (2012) esses genes foram apontados como bons marcadores moleculares nessa via de inflamação. Os

primers foram disponibilizados pela Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, do laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica- da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, SP.

### 3.10.2 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 20 $\mu$ L contendo 100 a 500ng de cDNA, SYBR® Green PCR Master Mix e 100nM de cada primer, segundo protocolo da Applied Biosystems.

O fator de normalização utilizado foi a média geométrica do gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), utilizado como controle interno (controle endógeno). Finalmente, os valores de expressão gênica obtidos nas análises foram quantificados tendo como base a amostra controle, escolhida como calibrador de todas as amostras. Em seguida, foi utilizado o método de Pfaffl, 2001 para os cálculos de análise comparativa.

### 3.11 Análises estatísticas

Os dados de todos os experimentos foram analisados utilizando o software *Prisma®GraphPad* versão 5.00. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e a análise estatística foi realizada por análise de variância para comparações múltiplas (ANOVA), seguido do ajuste de Bonferroni. Os valores de *P* inferiores a 0.05 foram considerados para indicar resultados estatisticamente significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 A morfologia das células não sofrem modificações

Inicialmente as análises da morfologia celular das células estudadas (Hep-2, SCC-25 e Fibroblasto oral) foram realizadas em microscopia de contraste de fase diariamente.

O aspecto morfológico da linhagem celular Hep-2 (Figura 4A) mostrou-se irregular, com núcleo arredondado central e citoplasma escasso, sem alterações após os tratamentos com as lignanas extraídas da *Piper cubeba*.

A morfologia das células SCC-25 (Figura 4B) é definida por células pequenas e padrão de crescimento em grumos, pois dependem de adesão celular para o crescimento. As células tratadas com as lignanas não sofreram mudanças em sua morfologia, quando comparadas ao grupo controle.

Ao microscópio óptico, os fibroblastos (Figura 4C) apresentam-se fusiformes, com prolongamentos citoplasmáticos e sem modificações morfológicas após todos os tratamentos com as lignanas.

### 4.2 Lignanas da *Piper cubeba* diminuem a proliferação celular nas linhagens Hep-2, SCC-25 e fibroblasto oral (F5)

O ensaio de proliferação por meio da curva de crescimento foi realizado para as três linhagens estudadas, no qual comparamos as células tratadas ou não com as lignanas extraídas da *Piper cubeba* 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 (Figura 5A), foi observado o efeito de inibição do crescimento celular pela influência das lignanas, referentes aos tratamentos em relação ao controle. As concentrações de 50 e 100 µg/mL das lignanas, reduziram o crescimento das células tumorigênicas para os sete compostos analisados (cubebina, hinoquinina, dihidrocubebina, etilcubebina, metilcubebina, podofilotoxina e extrato total) nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Por meio deste ensaio podemos observar diferenças estatísticas entre os grupos tratados em relação ao grupo controle no tempo de 72 horas e na concentração de 100 µg/mL, sendo os resultados

considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

Para a linhagem de carcinoma epidermoide de língua SCC-25, podemos constatar que os tratamentos com as lignanas (cubebina, metilcubebina, dihidrocubebina, hinoquinina e podofilotoxina) apresentaram diminuição do crescimento celular na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , em relação ao controle. Com relação à lignana etilcubebina, as concentrações estudadas não apresentaram diferenças estatísticas para com o controle sem tratamento. Já para o extrato total foi verificado que as concentrações de 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$  tiveram redução do crescimento das células no tempo de 48 horas. Pode-se concluir, a partir da análise de proliferação celular e da análise estatística, que o tempo de 72 horas foi o mais significativo estatisticamente, considerando  $p < 0,05$  (Figura 5B).

Nos fibroblastos orais normais (F5), as diferenças estatísticas entre os tratamentos com as lignanas (cubebina, metilcubebina, etilcubebina, dihidrocubebina, hinoquinina, extrato total e podofilotoxina) em relação ao controle ocorreram na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  nos tempos de 24 e 48 horas, considerando resultados significantes quando  $p < 0,05$  (Figura 5C).

#### **4.3 As lignanas da *Piper cubeba* apresentam pouca citotoxicidade**

O ensaio de citotoxicidade celular foi realizado para as três linhagens estudadas (Hep-2, SCC-25 e F5) nos tempos de 4, 24, 48 e 72 horas, nas concentrações de 10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Para a linhagem de câncer de laringe Hep-2, as células quando tratadas com as lignanas cubebina, metilcubebina, etilcubebina, dihidrocubebina, extrato total e podofilotoxina apresentaram uma maior viabilidade, em relação ao grupo controle estatisticamente nas concentrações de 10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , sendo mais prevalente nos tempos de 4 e 72 horas (Figura 6A). Já as células tratadas com a lignana hinoquinina mostraram, no tempo de 48 horas e na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , menor viabilidade celular, quando comparada ao controle, por meio das análises estatísticas.

Na linhagem de carcinoma epidermoide de língua SCC-25, observamos que as lignanas cubebina, dihidrocubebina, extrato total e podofilotoxina reduziram a viabilidade celular, principalmente nas concentrações de 10 e 50

µg/mL, após 72 horas. Para a lignana etilcubebina foi verificado que nenhuma concentração estudada modificou a citotoxicidade, em relação ao controle, nos tempos analisados. Também podemos observar que na concentração de 10 µg/mL, as células tratadas com as lignanas metilcubebina e hinoquinina, no tempo de 48 horas, apresentaram maior viabilidade que o controle (Figura 6B).

Para a linhagem derivada de fibroblasto oral (F5), de uma maneira geral, as células tratadas com as lignanas apresentaram uma menor viabilidade celular em relação ao controle. Por exemplo, foi observado que a viabilidade celular foi menor, em relação ao controle, quando tratada com a cubebina no tempo de 48 horas, nas concentrações de 10 e 50 µg/mL, sendo que na concentração de 10 µg/mL a lignana se mostrou citotóxica, devido ao seu CC<sub>50</sub> ser menor que 50%. Os fibroblastos quando tratados com metilcubebina, dihidrocubebina e hinoquinina tiveram uma diminuição da viabilidade celular, em relação ao controle, no tempo de 48 e 72 horas, porém sem ser citotóxico, pois o CC<sub>50</sub> foi superior a 50%. Para a lignana etilcubebina nenhuma concentração verificada modificou a citotoxicidade, em relação ao controle. As células quando tratadas com o composto extrato total mostraram que nos tempos de 4 e 24 a concentração de 50 µg/mL teve maior efeito sobre a citotoxicidade, pois as células apresentaram menos viabilidade quando comparado ao controle. Por meio do teste estatístico podemos observar que as células tratadas com a lignana podofilotoxina na concentração de 10 µg/mL apresentaram menor viabilidade que o controle no tempo de 4 horas (Figura 6C).

#### **4.4 Lignanas da *Piper cubeba* diminuem a migração das células Hep-2, SCC-25 e fibroblasto oral (F5)**

O ensaio de migração foi realizado com as três linhagens na concentração de 100µg/mL, tratadas por 72 horas (linhagens Hep-2 e SCC-25) ou 24 horas (fibroblastos).

Na linhagem Hep-2 os tratamentos com as lignanas (cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, extrato total, hinoquinina e podofilotoxina) diminuíram a migração dessas células em relação ao controle. As análises estatísticas mostraram que o tratamento com essas lignanas diminuem a taxa

de migração, e ainda apresenta diferença significativa em relação ao grupo controle. Somente o composto metilcubebina não apresenta diferença estatística significativa, mas quando comparado ao controle podemos observar uma menor migração celular (Figura 7A).

Para a linhagem celular SCC-25, ocorreu uma diminuição significativa da migração das células após o tratamento com as lignanas dihidrocubebina, etilcubebina, metilcubebina e podofilotoxina, em relação ao controle, com base no teste estatístico. Podemos também observar que as lignanas cubebina, extrato total e hinoquinina reduziram a taxa de migração celular, porém não apresentaram diferença significativa em relação ao controle (Figura 7B).

Nos fibroblastos, foi observado que apenas a lignana etilcubebina exerceu um efeito migratório menor quando comparado ao controle, apresentando uma diferença estatística significativa. As lignanas extrato total e hinoquinina diminuíram a taxa de migração, porém não apresentaram diferença significativa, em relação ao controle. Já as lignanas cubebina, dihidrocubebina, metilcubebina e podofilotoxina, apresentaram maior quantidade de células migradas do que o controle, podendo ser inferido que essas lignanas têm baixo efeito de ação sobre a migração celular na linhagem normal do fibroblasto oral (Figura 7C).

#### **4.5 Danos ao material genético das células Hep-2, SCC-25 e F5 podem ser causados pela ação das lignanas da *Piper cubeba*.**

Por meio do ensaio cometa foi possível analisar o índice de danos ocasionados no material genético, gerados pelo efeito genotóxico das lignanas extraídas da *Piper cubeba* nas linhagens celulares. O tempo de incubação das lignanas foi de 72 horas para as linhagens Hep-2 e SCC-25 e 24 horas para os fibroblastos, na concentração de 100µg/mL.

Para a linhagem de carcinoma de laringe Hep-2, podemos observar que as lignanas cubebina e podofilotoxina apresentaram maiores índices significativos de danos em seus núcleos do que as células controle. Já as demais lignanas dihidrocubebina, etilcubebina, extrato total, hinoquinina e metilcubebina mantiveram seus danos semelhantes, quando comparadas ao controle (Figura 8A).

Em relação à linhagem SCC-25, foi avaliado que todas as lignanas (cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, extrato total, hinoquinina, metilcubebina e podofilotoxina) causaram danos significativos aos núcleos das células tratadas, em relação ao controle (Figura 8B).

Já nos fibroblastos, apenas as lignanas cubebina e metilcubebina geraram mais lesões ao DNA, estatisticamente, do que nas células controle. O índice de danos das células tratadas com os demais lignanas analisadas (dihidrocubebina, etilcubebina, extrato total, hinoquinina e podofilotoxina) mostraram-se equivalentes aos danos das células controle (Figura 8C).

#### **4.6 Lignanas da *Piper cubeba* podem levar as células Hep-2, SCC-25 e F5 ao processo de apoptose tardia e necrose.**

Os experimentos foram realizados após 72 horas de incubação para as linhagens Hep-2 e SCC-25 e 24 horas para os fibroblastos com os tratamentos propostos com as lignanas extraídas da *Piper cubeba*, na concentração de 100µg/mL.

No experimento para a linhagem Hep-2 (Figura 9A), podemos observar que o gráfico representando as células viáveis e em apoptose inicial apresenta uma quantidade de células semelhantes tanto para o controle como para praticamente todos os tratamentos com as lignanas, exceto para dihidrocubebina e hinoquinina. Quanto às células em apoptose tardia, quando tratadas com algumas lignanas (metilcubebina, podofilotoxina, extrato total e hinoquinina) se apresentam em maior porcentagem, em relação ao controle. Já as células em necrose, notamos uma maior quantidade no grupo controle, quando comparadas aos grupos tratados com as lignanas.

Na linhagem SCC-25 (Figura 9B), o gráfico que retrata as células viáveis mostra que essas, quando tratadas com as lignanas metilcubebina, dihidrocubebina, extrato total e hinoquinina, tiveram um menor número em relação ao controle, já para as lignanas podofilotoxina e cubebina praticamente mantiveram a mesma quantidade de células viáveis, estando somente maior nessa porcentagem de células a lignana etilcubebina.

Com relação a apoptose inicial podemos observar que as lignanas etilcubebina e cubebina aumentaram o número de células em relação ao

controle e as demais lignanas estudadas. Para o gráfico de apoptose tardia, as lignanas dihidrocubebina, extrato total e cubebina também aumentaram a porcentagem de células quando comparadas ao controle, podendo ser observado o mesmo critério para as lignanas etilcubebina, metilcubebina, podofilotoxina e hinoquinina para o gráfico de necrose.

Para os fibroblastos (Figura 9C), foi verificado tanto no histograma como no gráfico, que as células viáveis estão em maior número apenas quando tratadas com podofilotoxina e cubebina, em relação ao controle e as demais lignanas. Para a apoptose inicial, as lignanas metilcubebina, extrato total e hinoquinina diminuíram a quantidade de células em relação as demais lignanas e ao próprio controle.

Com relação a apoptose tardia, podemos observar que tanto o controle como os grupos tratados com as lignanas estão semelhantes em relação ao número de células. Já para o gráfico de necrose, as lignanas podofilotoxina, extrato total, hinoquinina e cubebina aumentaram o número de células, quando comparados ao controle.

#### **4.7 Lignanas da *Piper cubeba* alteram a expressão gênica**

Os genes analisados (*COX-2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*) estão envolvidos em vias relacionadas à inflamação e processos de invasão tumoral. A linhagem celular Hep-2 (Figura 10), quando tratada com as diferentes lignanas, mostrou uma expressão aumentada dos genes *EP3*, *EP4* e *MMP9* e diminuída dos genes *COX-2*, *MMP2*, *TIMP1* e *TIMP2*, em comparação ao grupo controle, sem tratamento. Mas, a expressão dos genes *EP3*, *MMP2* e *TIMP1* nessas células, quando tratadas com hinoquinina, se mostraram diferencialmente expressos em relação às demais lignanas estudadas.

A linhagem celular SCC-25 (Figura 11), quando tratada com as diferentes lignanas, mostrou uma expressão aumentada dos genes *COX-2* e *MMP9* e diminuída dos genes *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *TIMP1* e *TIMP2*, em comparação com o grupo controle, sem tratamento. Mas, a expressão do gene *MMP9* nessas células, quando tratadas com hinoquinina, também foi evidenciada como diferencialmente expressos em relação as demais lignanas estudadas. O mesmo efeito pode ser visto para os genes *TIMP1* e *TIMP2*, quando tratadas

com a etilcubebina. Com relação ao gene *TIMP2*, não foi realizado o estudo da sua expressão nessas células SCC-25, tratadas com as lignanas cubebina e dihidrocubebina.

Os fibroblastos orais normais (Figura 12), quando tratados com as diferentes lignanas, mostraram uma expressão aumentada dos genes *COX-2*, *EP3*, *MMP2* e *MMP9* e diminuída dos genes *EP4*, *TIMP1* e *TIMP2*, em comparação com o grupo controle, sem tratamento. Mas, a expressão dos genes *COX-2*, *EP3*, *MMP2* nessas células, quando tratadas com podofilotoxina, se mostraram diferencialmente expressos em relação as demais lignanas estudadas. O mesmo efeito pode ser visto para os genes *EP3* e *EP4*, quando tratadas com a etilcubebina.

## Legendas:

**Figura 4.** Análise da morfologia das células Hep-2 (A), SCC-25 (B) e Fibroblasto (C). Controle (lado esquerdo) e tratadas com a lignana cubebina (lado direito) na concentração de 10 $\mu$ g/mL por 24 horas. Escala de 40 $\mu$ m.

**Figura 5.** Curva de crescimento das células Hep-2 (A), SCC-25 (B) e Fibroblasto (C) tratadas com os compostos extraídos da *Piper cubeba* em três concentrações (10, 50 e 100 $\mu$ g/mL) por 4, 24, 48 e 72 horas. \* com  $p < 0,05$ .

**Figura 6.** Efeitos dos tratamentos com as lignanas da *Piper cubeba* para o método colorimétrico de viabilidade/citotoxicidade celular (MTS) na linhagem Hep-2 (A), SCC-25 (B) e Fibroblasto (C). Gráfico com eixo X= tempo (horas) e y= viabilidade (porcentagem). \* com  $p < 0,05$ .

**Figura 7.** Ensaio de migração Transwell das células Hep-2 (A), SCC-25 (B) e Fibroblasto (C). Foto da migração celular do grupo de células controle (superior), tratado com a lignana etilcubebina (mediano) e gráfico representando a densitometria (inferior). Aumento de 200X, escala de 20 $\mu$ m. \* com  $p < 0,05$ .

**Figura 8.** Índice de danos às células Hep-2 (A), SCC-25 (B) e Fibroblasto (C) tratadas com as lignanas extraídas da *Piper cubeba* (cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, extrato total, hinoquinina, metilcubebina e podofilotoxina) nos tempos 72 horas para Hep-2 e SCC-25 e 24 horas para F5, na concentração de 100 $\mu$ g/mL. \* com  $p < 0,05$ .

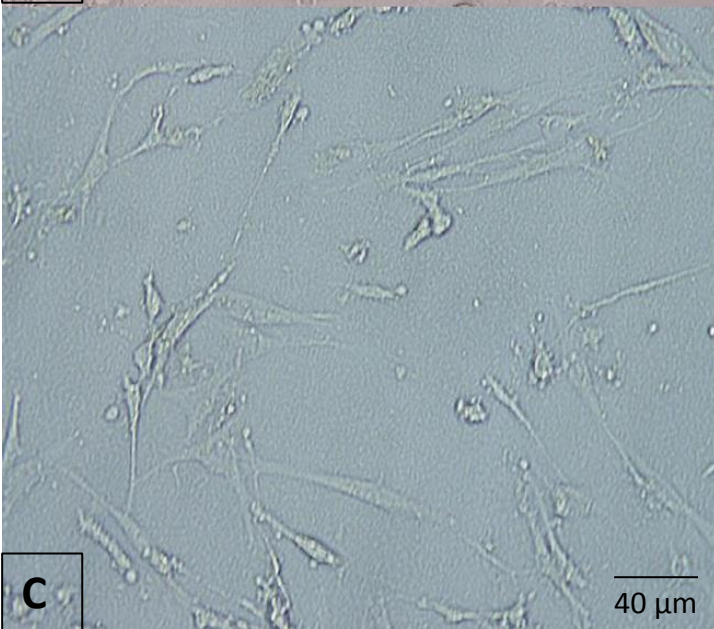
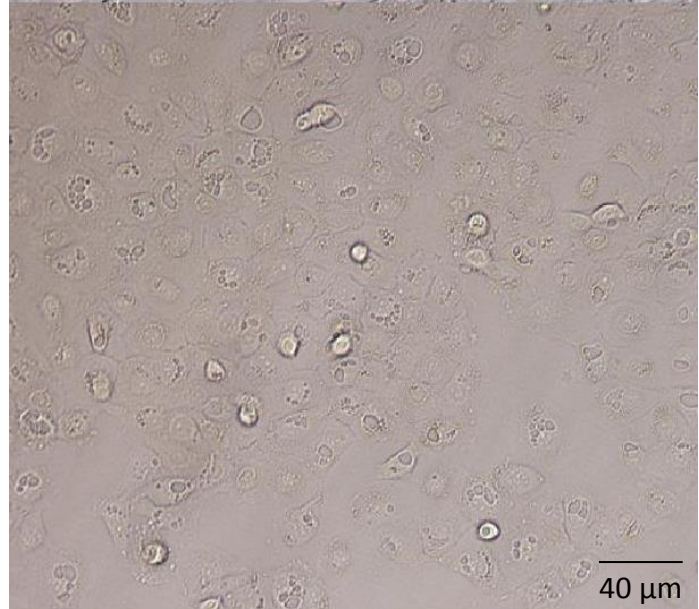
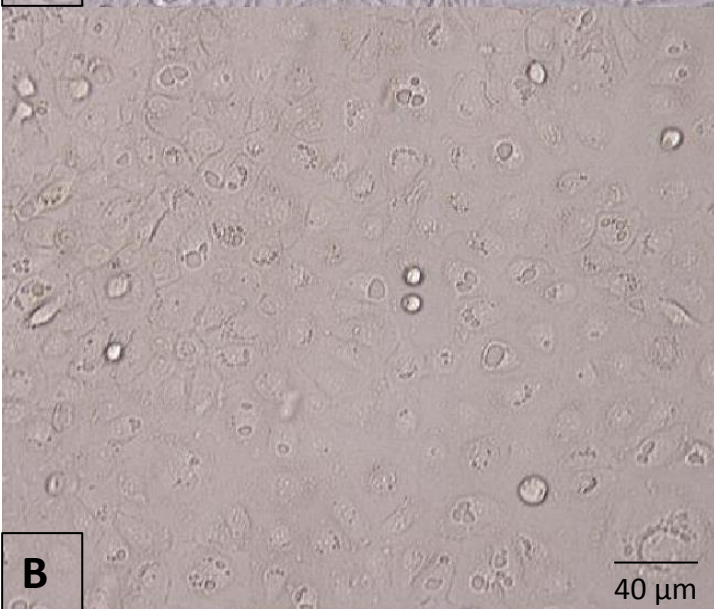
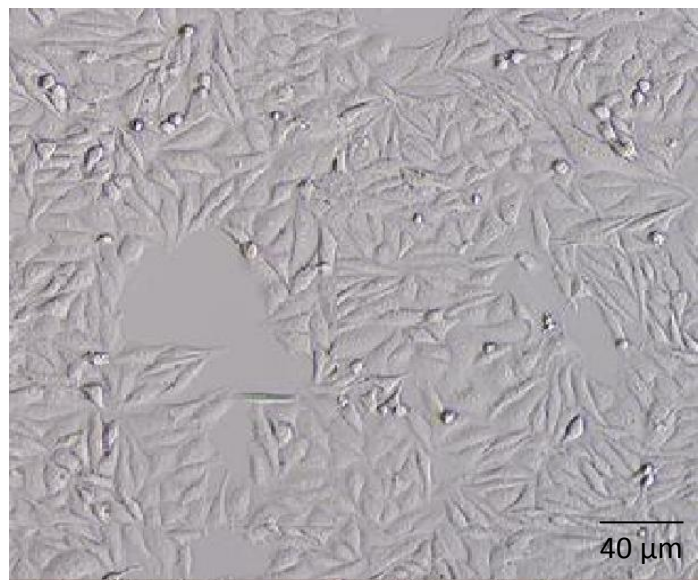
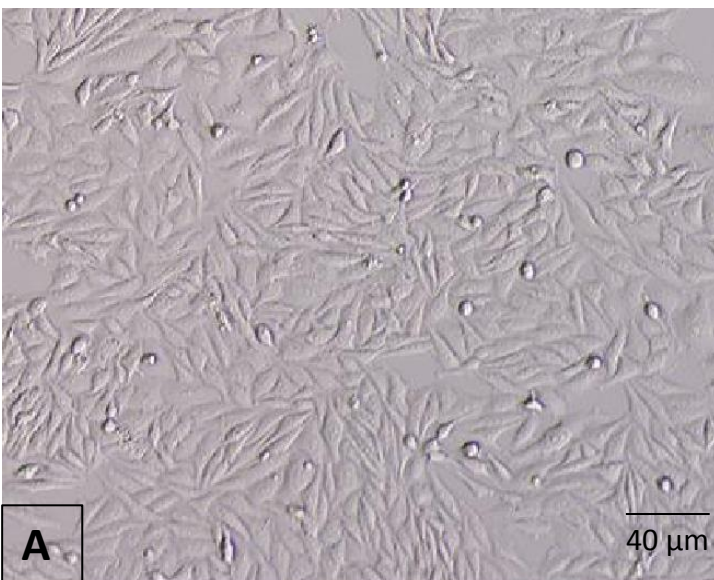
**Figura 9.** Histogramas (lado esquerdo) obtidos da citometria de fluxo demonstrando a viabilidade (Q4), apoptose inicial (Q3), apoptose tardia (Q2) e necrose (Q1) de células Hep-2 (A), SCC-25 (B) e F5 (C), incubadas com meio controle ou tratadas com as lignanas da *Piper cubeba*. A viabilidade celular foi avaliada pela incubação com ANEXINA-V e/ou PI e a intensidade de fluorescência por citometria de fluxo. Gráficos (lado direito) demonstrando os efeitos dos tratamentos com as lignanas da *Piper cubeba* sobre a viabilidade,

apoptose, apoptose tardia e necrose das células Hep-2, SCC-25 e F5.

**Figura 10.** Análise da expressão dos genes *COX2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, por PCR em tempo real para a linhagem Hep-2. A expressão gênica foi considerada significativa exibindo valores  $\geq 1.0$  ou  $\leq -1.0$  *versus* controle.

**Figura 11.** Análise da expressão dos genes *COX2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, por PCR em tempo real para a linhagem SCC-25. A expressão gênica foi considerada significativa exibindo valores  $\geq 1.0$  ou  $\leq -1.0$  *versus* controle.

**Figura 12.** Análise da expressão dos genes *COX2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, por PCR em tempo real para as células fibroblasto. A expressão gênica foi considerada significativa exibindo valores  $\geq 1.0$  ou  $\leq -1.0$  *versus* controle.



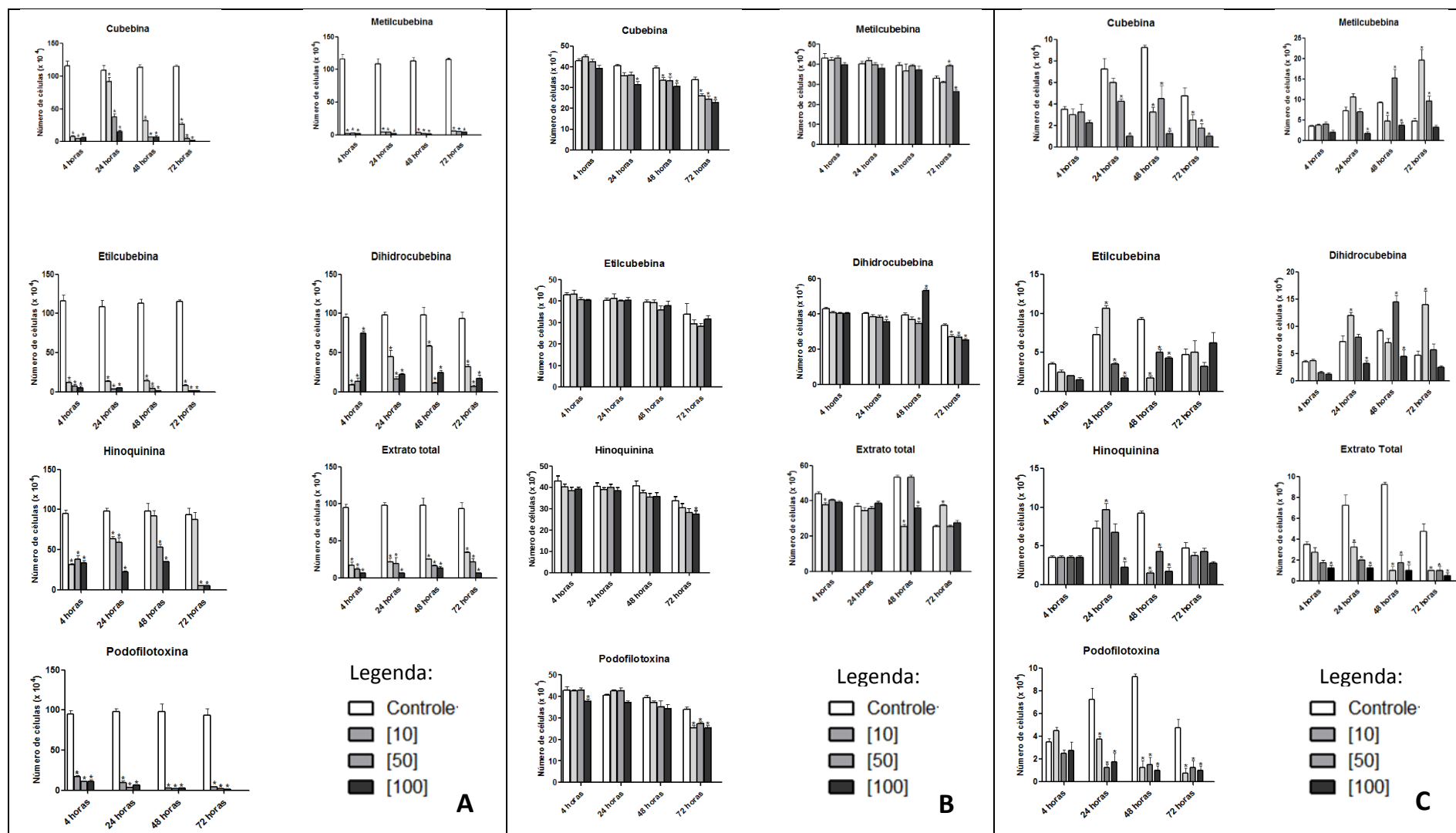


Figura 5

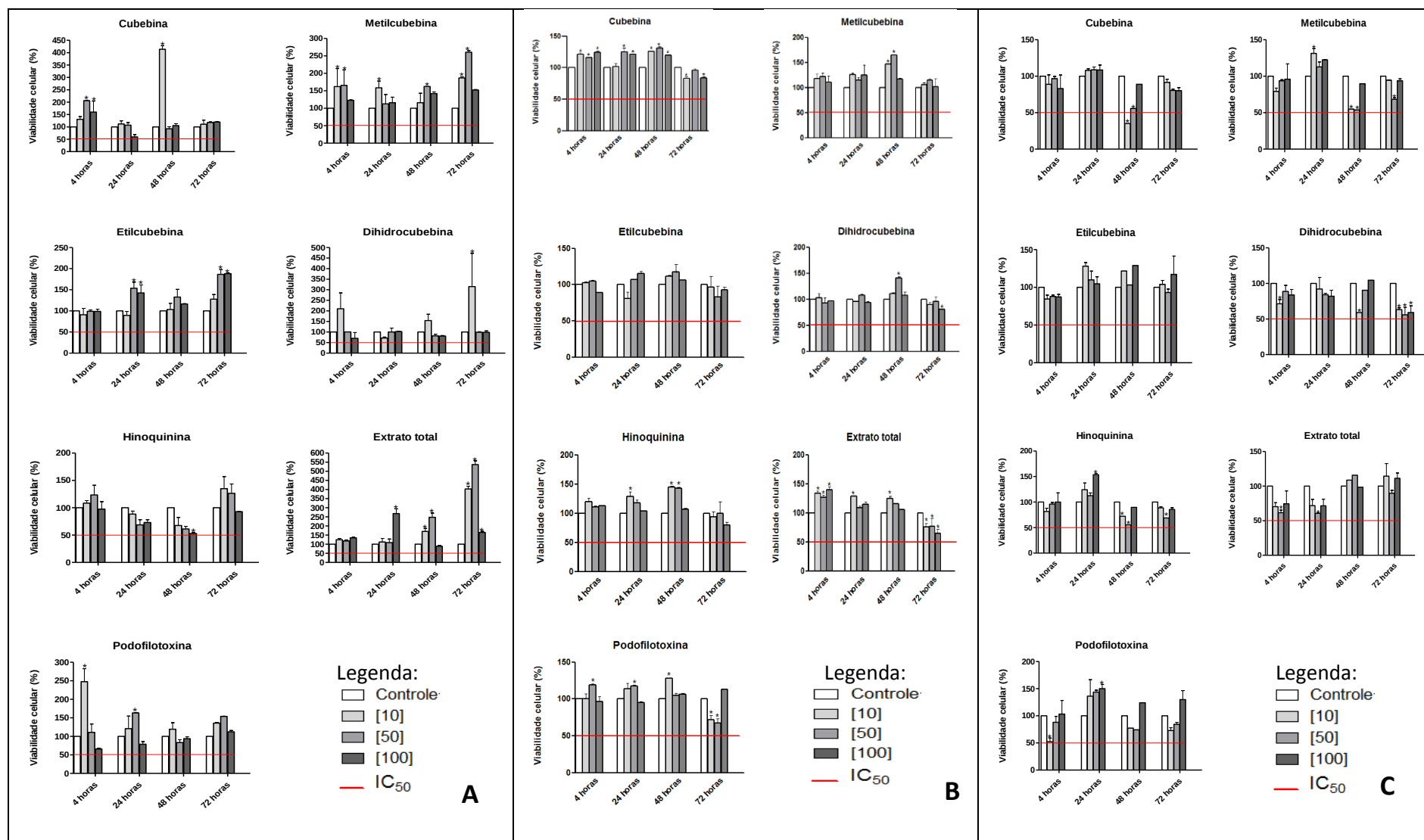


Figura 6

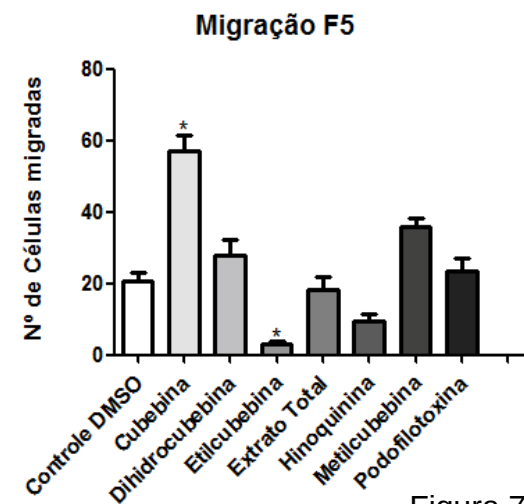
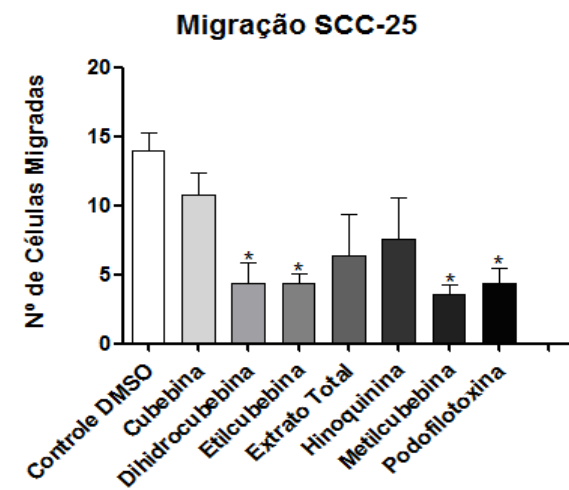
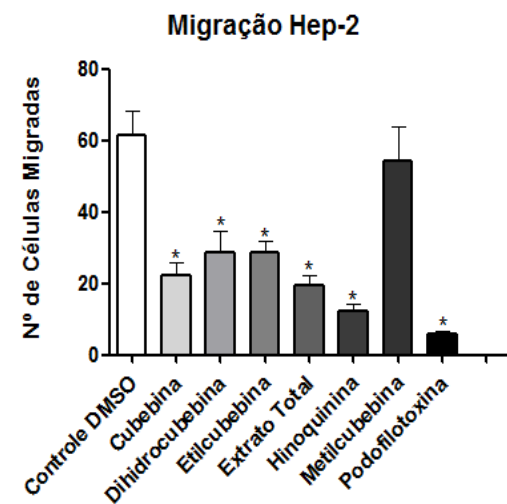
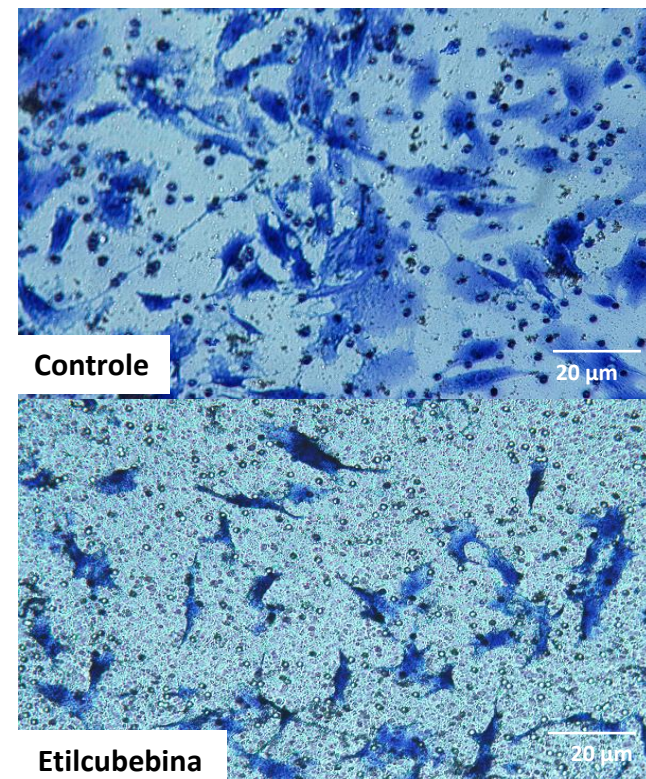
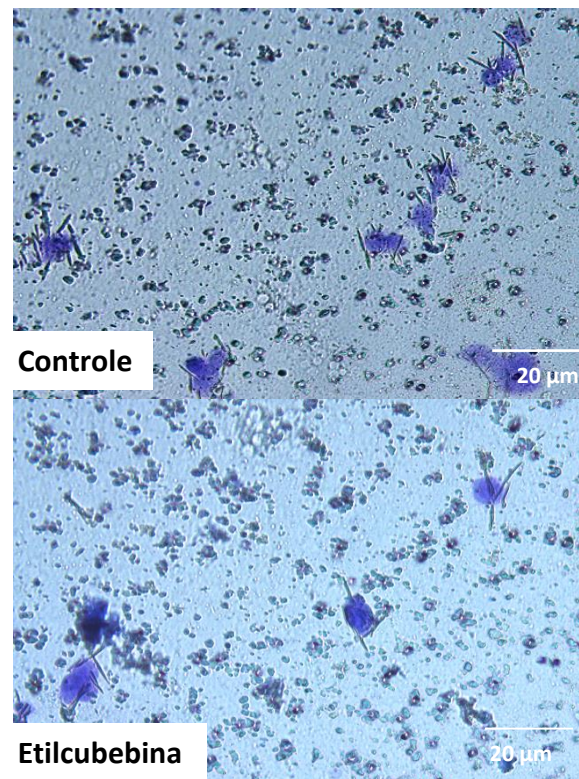
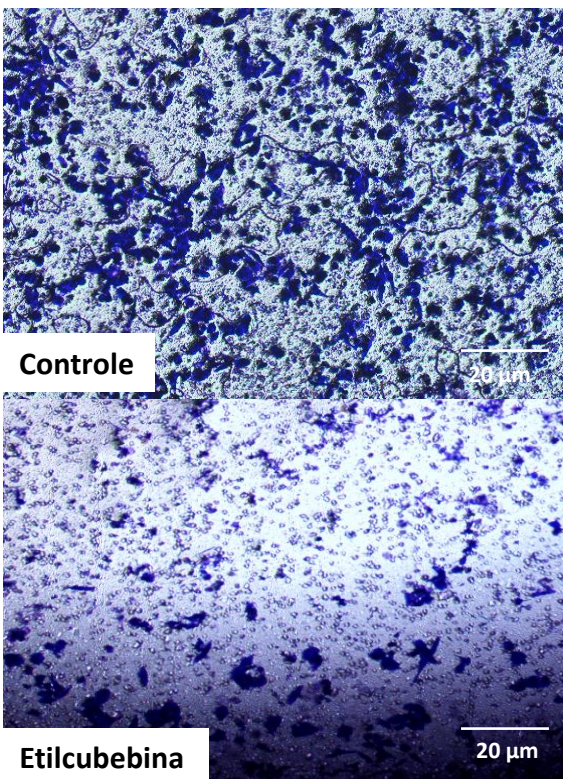


Figura 7

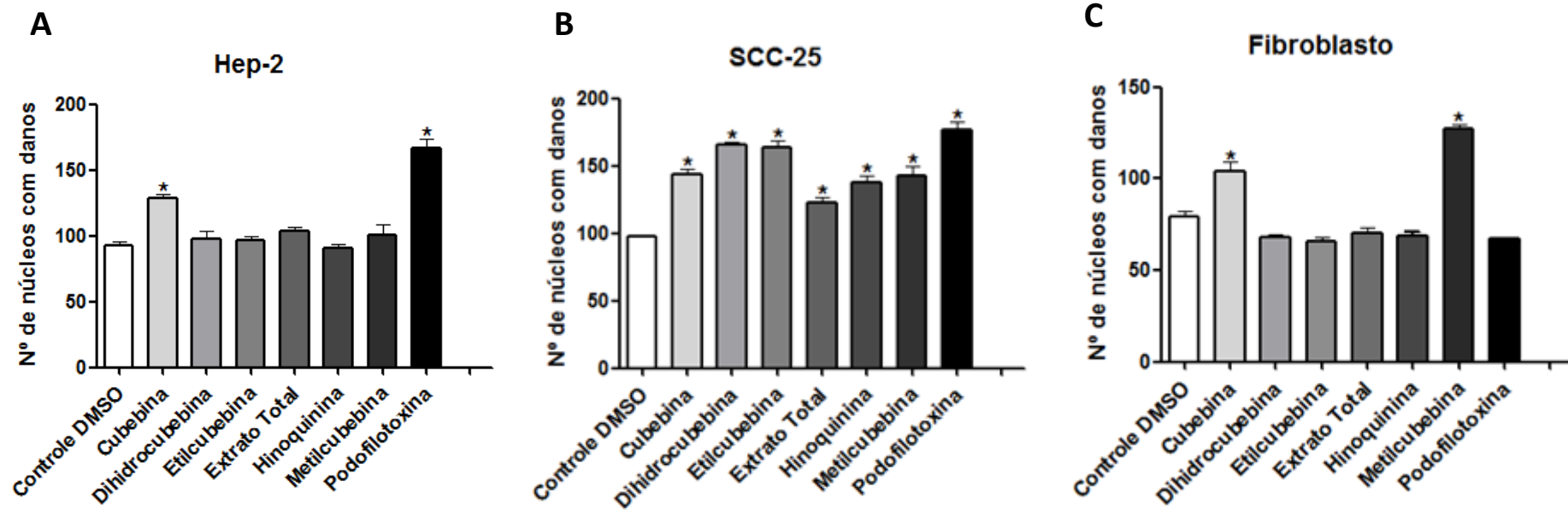


Figura 8

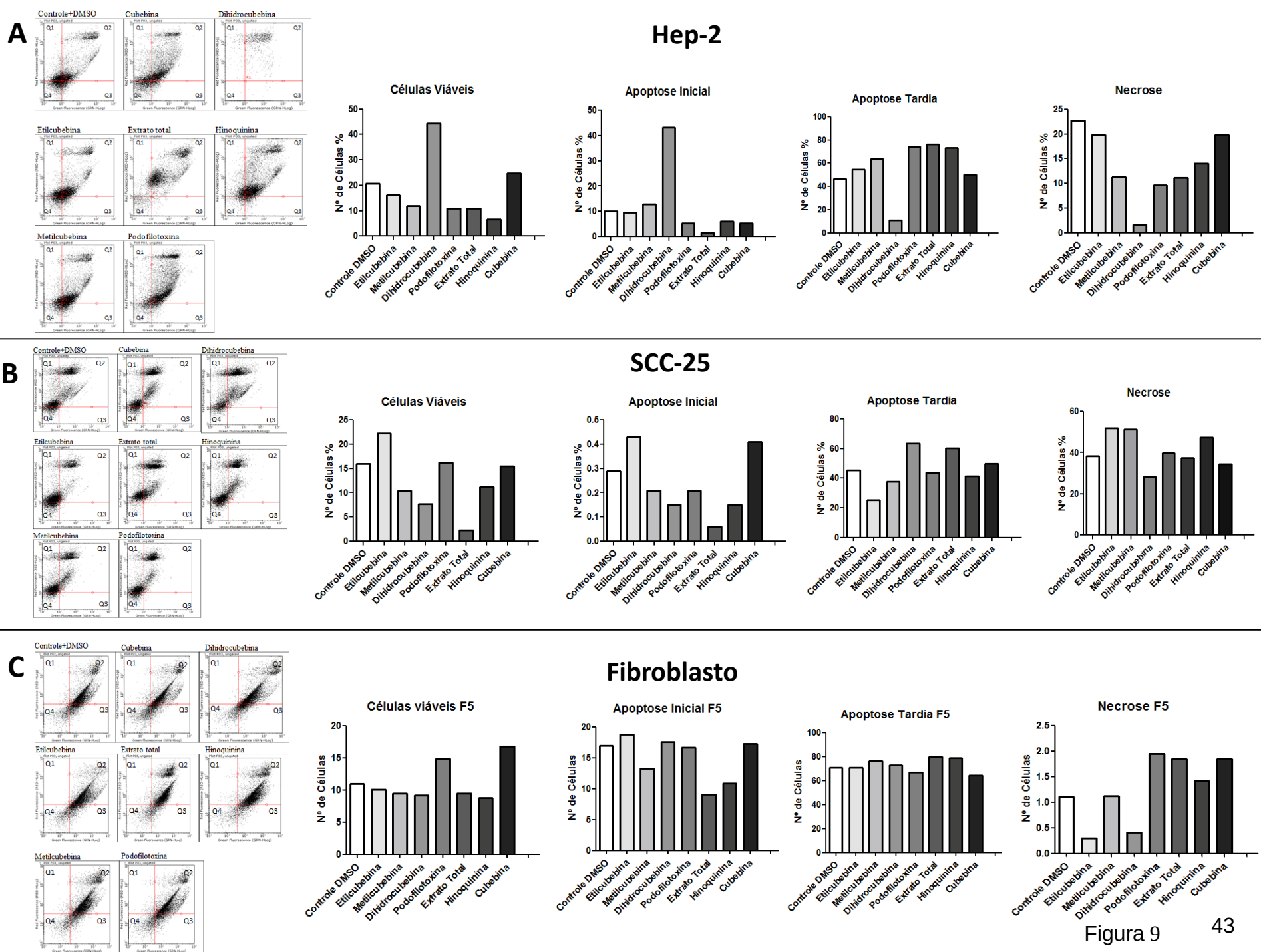


Figura 9

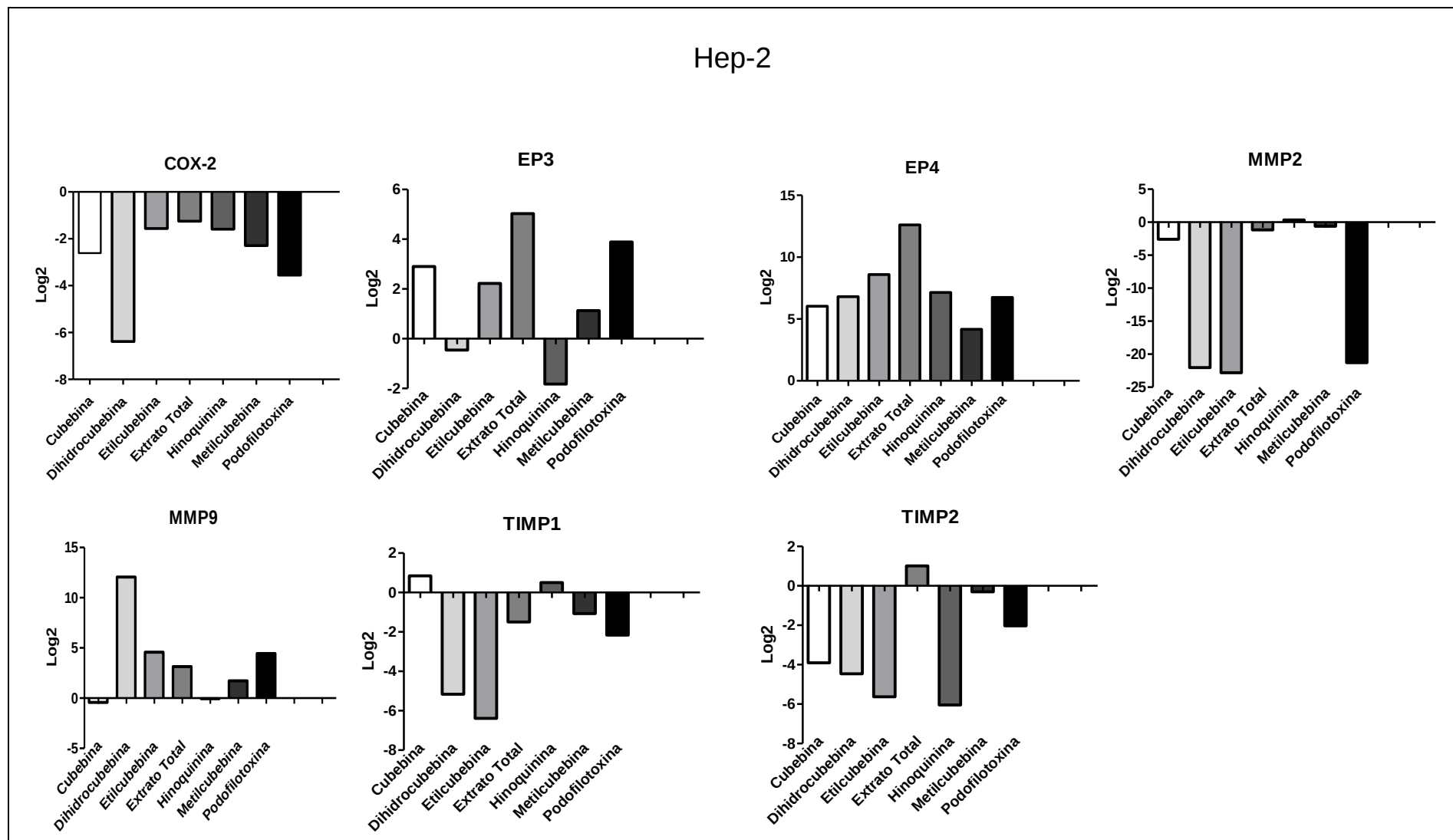


Figura 10

# SCC-25

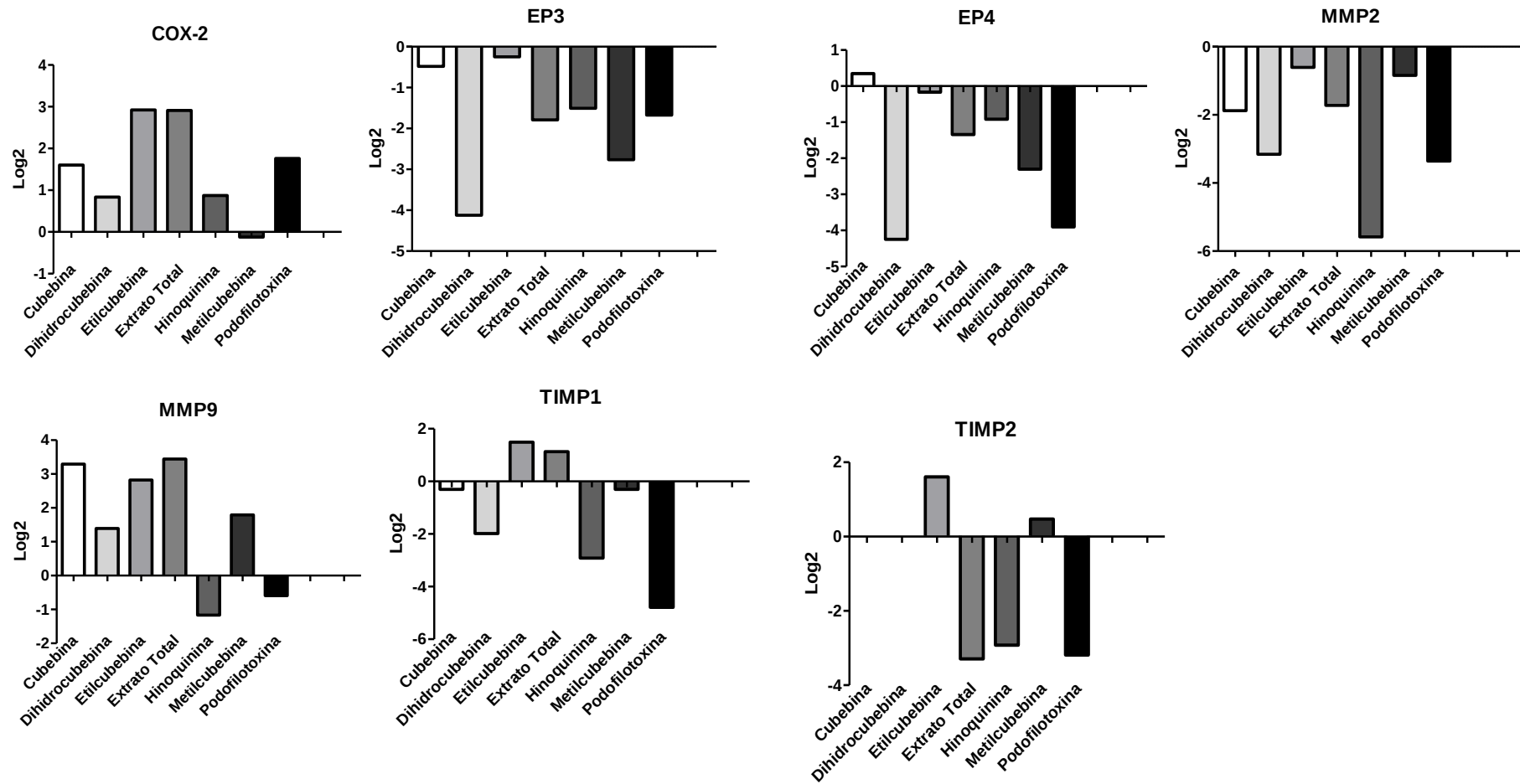


Figura 11

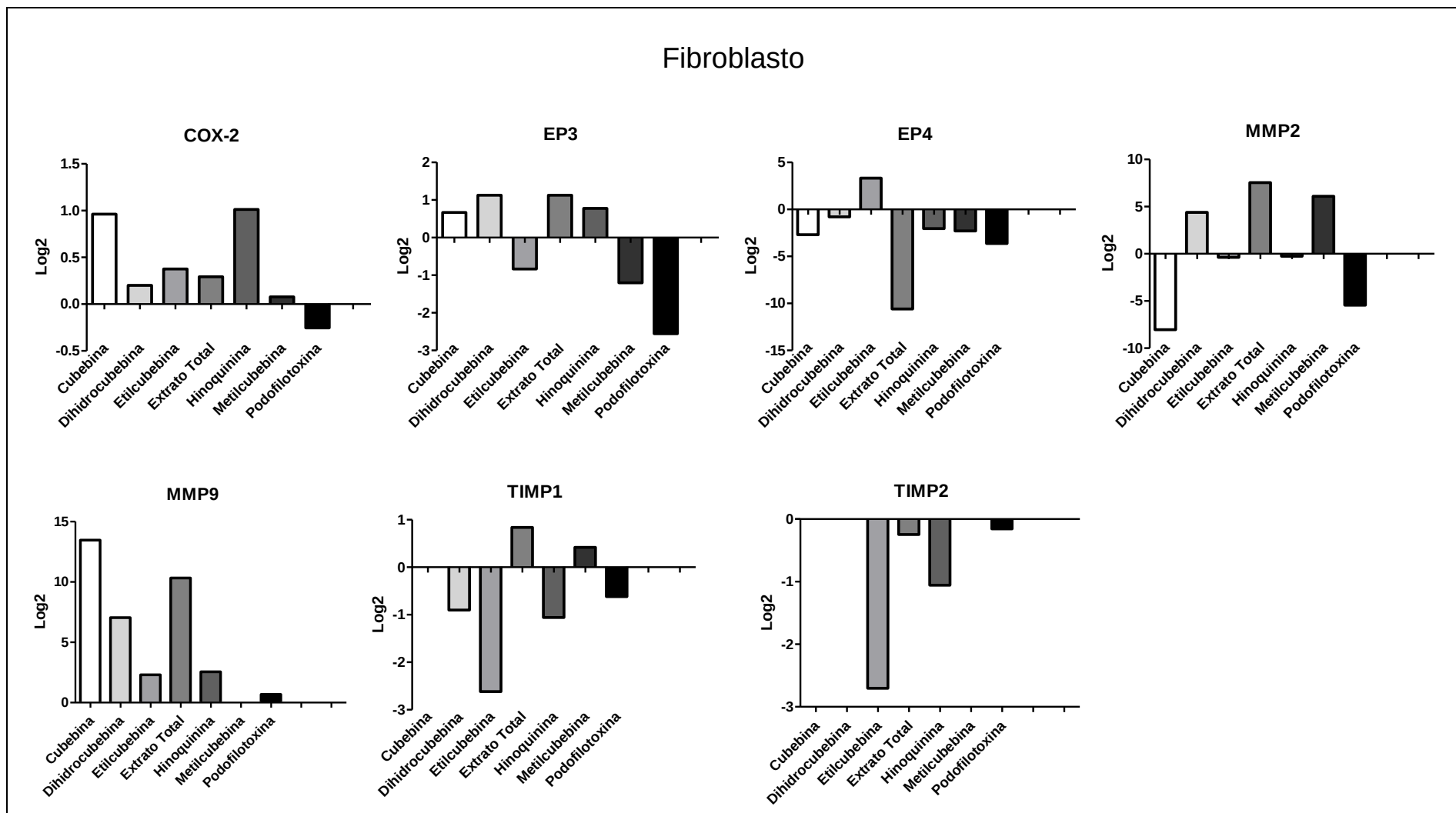


Figura 12

## 5. DISCUSSÃO

O tratamento antineoplásico para pacientes com câncer de cabeça e pescoço consiste em cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou terapia combinada. Estes tratamentos são realizados de acordo ao estágio e localização do tumor (QUISPE et al., 2018). Como consequência esses tratamentos são muitas vezes invasivos, assim tem-se buscado novas abordagens terapêuticas para o tratamento do câncer. Uma delas é o estudo com plantas medicinais, como exemplo, a *Piper cubeba*, que possui propriedades biológicas conhecidas como lignanas. No entanto, há a necessidade de maior investigação sobre atuação desses compostos bioativos para o câncer de cabeça e pescoço.

No presente trabalho, avaliando as células de câncer Hep-2 e SCC-25, e células normais derivadas de fibroblastos orais humanos (F5) foi observado que a morfologia dessas células não sofreu alteração após os tratamentos com as lignanas (cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, extrato total, hinoquinina, metilcubebina e podofilotoxina). Apesar disso, observamos a diminuição da proliferação celular após os tratamentos nas linhagens Hep-2, SCC-25 e F5, evidenciando o envolvimento dessas lignanas nos mecanismos de antiproliferação, assim como, Lima e colaboradores (2018), também verificaram inibição da proliferação do crescimento celular pelas lignanas cubebina, hinoquinina em células Hep-2.

Podemos observar ainda, que no ensaio de proliferação celular a lignana cubebina inibiu o crescimento das células estudadas, nesse aspecto a literatura mostra que a mesma lignana inibiu a proliferação em células de câncer de próstata humano (LNCaP) por reduzir a síntese de DNA e induzir apoptose, assim essa lignana possui como atividade biológica uma ação antitumoral (PEREIRA, 2016). Em relação à outra lignana estudada, a hinoquinina, foi observada sua atuação em três linhagens de células de câncer de mama como um agente antiproliferativo, devido aos efeitos de morte celular por apoptose, pela regulação molecular do ciclo celular e também pelos genes que controlam o ciclo celular (*CCNA2*, *CCNE1*, *CCND1*, *CDKN1A* e *CCCKN1B*) (CUNHA et al., 2016).

No experimento de citotoxicidade, pelo ensaio MTS, foi visto que essas lignanas apresentam pouca citotoxicidade para as células Hep-2, SCC-25 e fibroblasto, com excessão para o fibroblasto na concentração de 10 µg/mL, na qual a lignana cubebina se mostrou citotóxica, devido ao seu CC<sub>50</sub> ser menor que 50%, corroborando assim com o trabalho de Pusztal, Abrantes e Sherly (2010), no qual a lignana hinoquinina apresentou 50% de inibição do crescimento em células de câncer de pulmão (A549), indicando assim atividade citotóxica. Podemos também observar os efeitos do extrato da *Piper cubeba*, investigado pelo ensaio MTT, com uma maior atividade citotóxica do extrato metanólico da *Piper cubeba* em células tumorigênicas e células normais da mama em relação às células de fibroblastos normais (GRAIDIST, MARTLA E SUKPONDMA, 2015).

Com relação ao ensaio de migração celular, foi verificado que as lignanas promoveram, de uma maneira geral, um efeito antimigratório nas linhagens Hep-2, SCC-25 e F5, assim como no trabalho de Abu e colaboradores (2016), também estudando uma planta da família Piperaceae, observaram um potencial efeito antimigratório da Flavokawain B em linhagens celulares metastáticas e não metastáticas de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB231). Chikara e colaboradores (2017) também observaram o mesmo efeito antimigratório, no qual similarmente utilizaram um bioativo derivado de planta, a enterolactona, na qual ocorreu a diminuição da migração e invasão de células de câncer de pulmão.

No estudo de genotoxicidade, foi observado que as lignanas da *Piper cubeba* realmente causam danos nos núcleos das linhagens Hep-2, SCC-25 e de fibroblastos; assim como visto em células de camundongo, a lignana cubebina também produziu efeitos genotóxicos, investigados por ensaios de micronúcleos (MN) sobre células da medula óssea e ensaio cometa em linfócitos de sangue periférico (MAISTRO et al., 2011). Pelo ensaio cometa, também foi descoberto a genotoxicidade da piperlongumina (alcaloide isolado da *Piper longum*) em células de câncer de cabeça e pescoço (UMSCC10A), pois causaram não só danos ao DNA, mas também elevados níveis de espécies de oxigênio reativo intracelular (HANG et al., 2018).

Em relação a apoptose, as células tumorigênicas e normais estudadas, de uma forma geral, mostraram-se em apoptose tardia ou necrose depois dos

tratamentos com as lignanas. Diferentes compostos presentes nas diferentes Piperaceae atuam como agentes atitumorigênicos principalmente mediados pela ação da apoptose, achados com a *Piper longum* mostraram induzir a apoptose celular em múltiplas células tumorigênicas, incluindo ovário (Gong et al., 2014), mama (Yao et al., 2014), próstata (Ginzburg et al., 2014) e linfoma de Burkett (Han et al., 2013). Chen e colaboradores (2016) observaram apoptose dependente de caspase, depois do tratamento da piperlongumina, em carcinoma de células orais e sugeriram a supressão do crescimento tumoral pela regulação do ciclo celular, indução da apoptose, senescência e seu potencial efeito quimioterápico para esse tipo celular.

O extrato etanólico da *Piper nigrum* mostrou causar uma super produção de espécies de oxigênio reativo, redução do crescimento tumoral, bloqueio do ciclo celular e indução de apoptose em células de carcinoma de Ehrlich de camundongos (GRINEVICIUS et al., 2016). Da mesma maneira, estudos com a *Piper cubeba* também mostraram atividade antitumorigênica da cubebina, em cinco diferentes linhagens celulares, agindo na apoptose mediada pela via de morte celular (RAJALEKSHMI et al., 2016).

Para completar nossa investigação sobre o efeito das lignanas da *Piper cubeba* na resposta inflamatória nas células Hep-2, SCC-25 e fibroblasto, verificamos a expressão de sete genes (*COX-2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*) relacionados com processos de inflamação e de invasão tumoral. Nessa análise de expressão gênica, foi observado que o tratamento com as lignanas alteram a expressão dos genes analisados em todas as células estudadas.

Evidenciamos em nosso estudo a redução da expressão do gene *COX-2* para a linhagem celular Hep-2, já para as células SCC-25 e fibroblasto, as lignanas atuam aumentando a expressão desse gene. A *COX-2* é uma enzima de expressão induzível responsável pela produção de prostaglandinas em locais de inflamação, desempenhando um papel na iniciação e progressão de várias doenças humanas. Embora a *COX-2* também tenha demonstrado contribuir para a resistência das células tumorais à quimioterapia convencional e à radioterapia, ou seja, prevenindo o dano ao DNA, aumentando a secreção de citocinas e estimulando o crescimento de células-tronco cancerígenas (SHI et al., 2018). Assim, nossos achados com a linhagem celular Hep-2,

corroboram com o estudo de Siddiqui e colaboradores (2018), na qual verificaram redução na expressão do marcador pró-inflamatória COX-2, na presença de piperina, quando comparada ao controle não tratado na linhagem celular neuronal (Neuro-2a). Ainda a expressão reduzida do gene COX-2 pode estar diretamente relacionada com nossos dados de indução da apoptose tardia pela ação das lignanas, já que estudos mostram que COX-2 e prostaglandina E2 (PGE2) modulam a via intrínseca da apoptose, por alterar os limiares apoptóticos ao envolver várias vias de sinalização diferentes (GREENHOUGH et al., 2009).

O gene *EP3* apresentou baixa expressão a partir dos tratamentos com as lignanas, na linhagem SCC-25, diferentemente nas células Hep-2 e fibroblasto, no qual esse gene se mostrou mais expresso. Essas diferenças de expressão do gene *EP3* para as diferentes células estudadas podem estar relacionadas parcialmente devido às distintas isoformas desse gene, uma vez que essas isoformas sinalizam principalmente as proteínas Gi (inibitória), mas também, parcialmente, pela cascata de  $Ca^{2+}$  fosfolipase ou pelas proteínas Gs (estimulatória). Portanto, diferentes efeitos em estudos sobre o gene *EP3* podem ser, até certo ponto, devido a diferentes padrões de expressão das isoformas (SEMMLINGER et al., 2018).

Como esperado, o gene *EP4* se mostrou com baixa expressão nas células SCC-25 e fibroblasto. Já na linhagem celular Hep-2 a expressão do gene foi modulada positivamente. Dessa maneira, a inativação ou a expressão negativa do receptor *EP4*, promove efeitos de redução do processo tumorigênico, podendo ser ocasionado pelo bloqueio da sobrevivência das células tumorais dependentes da PGE2, ou devido a uma redução no suprimento sanguíneo necessário para a oxigenação, proliferação e sobrevivência das células tumorais (XIN; MAJUMDER; GIRISH, 2012). Estudos sobre os papéis dos receptores COX-2 e EPs em carcinomas de cabeça e pescoço revelaram o aumento significativo da expressão de COX-2 assim como todos os receptores EPs (MAJUMDER; NANDI; OMAR, 2018).

Com relação às metaloproteinases de matriz, encontramos uma menor expressão de *MMP2* nas linhagens celulares Hep-2 e SCC-25, e uma maior expressão nos fibroblastos. Essa expressão diminuída nas linhagens tumorigênicas pode estar relacionada com nossos resultados do efeito

antimigratório das lignanas estudadas, pois é sabido que diferentes grupos de enzimas proteolíticas estão envolvidos na quebra da matriz e o grupo mais importante na invasão tumoral e metástase é o grupo das MMPs (CURRAN; MURRAY, 2000). Inclusive pesquisas tem mostrado que o tratamento com curcumina inibe a invasão celular em carcinoma oral por meio da redução da expressão da *MMP2* e *MMP9* (LEE et al., 2015).

Já para a metaloproteinase *MMP9* foi observado um aumento de sua expressão em todas as células analisadas. Ao contrário do estudo de Zeng e Yang (2018), na qual investigaram a ação da piperina, e acharam que a mesma reduziu significativamente a expressão de *MMP-9* em células de câncer de próstata DU145. Essas metaloproteinases também foram estudadas por Zhang e colaboradores (2015), no qual verificaram que a piperina também inibiu a atividade dessas metaloproteinases de matriz (*MMP2* e *MMP9*) e aumentou a expressão do inibidor tecidual da metaloproteinase (*TIMP1* e *TIMP2*) em células de osteossarcoma humano, diferentemente dos nossos resultados, onde os inibidores teciduais de metaloproteinases (*TIMPs*) se encontraram expressos negativamente nas células Hep-2, SCC-25 e fibroblasto. Em outro estudo foi verificado que a expressão de *TIMP1* e *TIMP2* inibiu a migração e invasão de células de câncer de mama por meio da ação anti- tumorigênica e anti-metastática de células- tronco mesenquimais (CLARKE; IMHOFF; BAIRD, 2014).

A partir desses dados, podemos concluir que as diferentes lignanas não alteram a morfologia celular, mas diminuem a proliferação e migração das células, sendo pouco citotóxicas, mas com efeitos genotóxicos, provavelmente por indução de apoptose tardia e/ou necrose celular e ainda promovem a modulação da expressão dos genes relacionados com o processo inflamatório.

Pelas análises realizadas, verificamos que as lignanas cubebina, metilcubebina e podofilotoxina apresentaram maior efeito nas células de câncer de cabeça e pescoço na ação antiproliferativa, antimigratória e genotóxica. Em função desses resultados, podemos propor a utilização dessas lignanas como uma alternativa terapêutica para o tratamento de tumores de cabeça e pescoço.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com as linhagens celulares tumorigênicas e fibroblastos tratadas com as lignanas extraídas da *Piper cubeba*, em relação às células controle, permitem concluir:

- a morfologia celular não sofre modificação, mas a proliferação e migração celular são reduzidas;
- não são citotóxicas, porém são genotóxicas;
- induzem ao processo de apoptose tardia e necrose;
- modulam a expressão de genes envolvidos com o processo inflamatório.

Dessa maneira, as lignanas da *Piper cubeba* atuam diretamente nas células tumorigênicas, seja pelas vias 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 COX2- derived PGE2 and PGE2-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. **Oral Oncol**, Oxford, v. 46, n. 12, p. 880-887, 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.
- AGGARWAL, B. B.; GEHLOT, P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? **Curr Opin Pharmacol**, Houston, v. 9, n. 4, p. 351-369, 2009.
- BASHEER, H. A. *et al.* Hypoxia modulates CCR7 expression in head and neck cancers. **Oral Oncology**, Jordan, v. 80, p. 64-73, 2018.
- BONHIN, R. G. *et al.* Correlação entre a expressão de ciclooxigenase-2, VEGF e KI-67 em carcinomas de células escamosas da laringe e hipofaringe com estadiamento TNM. **Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço**, Campinas, v. 43, n.1, p.42-49, 2014.
- BOURBOULIA, D. *et al.* Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Semin Cancer Biol**, Gaithersburg, v. 20, n. 3, p. 161-168, 2013.
- CANEL, C.; MORAES, R. M.; DAYAN, F. E. Molecules of interest: podophyllotoxin. **Phytochemistry**, Mississippi, v. 54, n. 2, p. 115-120, 2000.
- CHEN, S.; LIU, G.; CHAO, W. Piperlongumine suppresses proliferation of human oral squamous cell carcinoma through cell cycle arrest, apoptosis and senescence. **Int. J. Mol. Sci**, Basel, v. 17, n. 4, p. 1-4, 2016.
- CHIKARA, S. *et al.* Enterolactone alters FAK-Src signaling and suppresses migration and invasion of lung cancer cell lines. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 30, 2017.
- CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Investigations of anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrid*. **Journal of Ethnopharmacology**, Seul, v. 89, n. 1, p. 171-175, 2003.
- CLARKE, M. R.; IMHOFF, F. M.; BAIRD, S. K. Mesenchymal stem cells inhibit breast cancer cell migration and invasion through secretion of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2. **Molecular Carcinogenesis**, Dunedin, v. 54, n. 10, p.1214-1219, 2014.

CORDEIRO, R.; FERNANDES, P.L.; BARBOSA, L. A. Semente de linhaça e o efeito de seus compostos sobre as células mamárias. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 3, p. 727-732, 2009.

CUNHA, N. L. *et al.* Hinokinin induces G2/M arrest and contributes to the antiproliferative effects of doxorubicin in breast cancer cells. **Planta medica**, Stuttgart, v. 82, n. 6, p. 530-538, 2016.

CURRAN, S.; MURRAY, G.I. Matrix metalloproteinases: Molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. **Eur. J. Cancer**, Aberdeen, v. 36, p. 1621-1630, 2000.

ELFAHMI, N. V. *et al.* Lignan profile of *Piper cubeba*, an Indonesian medicinal plant. **Biochemical Systematics and Ecology**, Bandung, v. 35, n. 7, p. 397-402, 2007.

FERNÁNDEZ-MATEOS, J. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway polymorphisms as predictive markers of cetuximab toxicity in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in a Spanish population. **Oral Oncology**, Salamanca, v. 63, p. 38-43, 2016.

GALBIATTI, A. L. S. *et al.* Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 79, n. 2, p. 239-247, 2013.

GINZBURG, S. *et al.* Piperlongumine inhibits NF- $\kappa$ B activity and attenuates aggressive growth characteristics of prostate cancer cells. **Prostate**, Philadelphia, v. 74, n. 2, p. 177-186, 2014.

GODOY DE LIMA, R.; BARROS, M. T.; DA SILVA LAURENTIZ, R. Medicinal attributes of lignans extracted from *Piper Cubeba*: Current Developments. **ChemistryOpen**, Weinheim, v. 7, n. 2, p. 180-191, 2018.

GONG, L. H. *et al.* Piperlongumine induces apoptosis and synergizes with cisplatin or paclitaxel in human ovarian cancer cells. **Oxid. Med.Cell. Longev**, Hangzhou, v. 2014, n. 8, p. 1-10, 2014.

GOTZ, C. *et al.* Detection of HPV infection in head and neck cancers: Promise and pitfalls in the last ten years. **Molecular and Clinical Oncology**, Munich, v. 10, n. 1, p. 17-28, 2018.

GRAIDIST, P.; MARTLA, M. A.; SUKPONDMA, Y. Cytotoxic activity of *Piper cubeba* extract in breast cancer cell lines. **Nutrients**, Songkhla, v. 7, n. 4, p. 2707-2718, 2015.

GREENHOUGH, A. *et al.* The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. **Carcinogenesis**, Clifton, v. 30, n. 3, p. 377-386, 2009.

- GRINEVICIUS, V. M. A. S.; KVIECINSKI, M. R.; MOTA, N. S. R. S. *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 Ethnopharmacol**, Limerick, v. 189, p. 139-147, 2016.
- GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. **Ann Rheum Dis**, San Diego, v. 70, n. 1, p. 104-108, 2011.
- HAN, S.S. *et al.* Piperlongumine inhibits proliferation and survival of Burkitt lymphoma in vitro. **Leukemia Res**, Iowa City, v. 37, n. 2, p. 146-154, 2013.
- HANG, W. *et al.* Piperlongumine and p53-Reactivator APR-246 Selectively Induce Cell Death in HNSCC by Targeting GSTP1. **Oncogene**, China, v. 37, n. 25, p. 3384-3398, 2018.
- INSTITUTO ONCOGUIA. **Tudo sobre o câncer de cabeça e pescoço**. Equipe Oncoguia, set. 2015. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/reportagem-tudo-sobre-o-cancer-de-cabeca-e-pescoco/5475/8/>. Acesso em: 22 mar. 2017.
- JANUARIO, A.H. *et al.* Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Phytotherapy Research**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 5, p. 445–448, 2002.
- KFOURI, S. A. *et al.* Fração de câncer de cabeça e pescoço atribuível ao tabaco e ao álcool em cidades de três regiões brasileiras. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 21, p. e180005, 2018.
- KOBAYASHI, H. *et al.* A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun**, Osaka, v. 3, p. 103-115, 1995.
- LAURENTIZ, R.S. Avaliação da atividade antimicobacteriana da lignana diidro cubebina extraída da *Piper cubeba* e de seus derivados semissintéticos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 17, n. 4, p. 782-789, 2015.
- LEE, A. Y. *et al.* Curcumin Inhibits Invasiveness and Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma Through Reducing Matrix Metalloproteinase 2, 9 and Modulating p53-E-Cadherin Pathway. **Integr. Cancer Ther**, Hsinchu, v. 14, n. 5, p. 484–490, 2015.
- MA, X.; AOKI, T.; TSURUYAMA, T. Definition of Prostaglandin E2-EP2 Signals in the colon tumor microenvironment that amplify inflammation and tumor growth. **Cancer Research**, Tóquio, v. 75, n. 14, p. 15-75, 2015.
- MAISTRO, E. L. *et al.* Genotoxic effects of cubebin in somatic cells of mice. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 31, n. 2, p. 185-189, 2011.

MAJUMDER, M. *et al.* EP4 as a therapeutic target for aggressive human breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, Ontário, v. 19, n. 4, p. 1019-1029, 2018.

MEDRADO, H.H.S. *et al.* Distribution, biological activities, synthesis, and purification methods for podophyllotoxin and its derivatives. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 243-248, 2014.

NEURATH, M. F.; FINOTTO, S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, Bayreuth, v. 22, n. 2, p. 83-89, 2011.

NIWA, A. M. *et al.* Evaluation of lignan (–)-cubebin extracted from *Piper cubeba* on human colon adenocarcinoma cells (HT29). **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, Londrina, v. 79, n. 2, p. 92-100, 2016.

PEREIRA, C. C. e S. S. **Avaliação da atividade antitumoral "in vitro" e in vivo da cubebina (tumor sólido de Ehrlich), isolado do extrato bruto de *Piper cubeba* (Piperaceae)**. 2016, 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016. Disponível em: [http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/317666/1/Pereira\\_CarlaCosta eSilvaScarpa\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/317666/1/Pereira_CarlaCosta eSilvaScarpa_M.pdf). Acesso em: 12 nov. 2017.

PUSZTAL, R.; ABRANTES, M.; SHERLY, J. Atividade Antitumoral de Lignanas: Inibição da Expressão Gênica do Citomegalovírus Humano IE. **Anticancer Research International Journal of Cancer Research and Treatment**, Lisboa, v. 30, n. 2, p. 451-454, 2010.

QUISPE, R. A. *et al.* Estudo caso-controle de índices de doenças bucais em indivíduos com câncer de cabeça e pescoço após terapia antineoplásica. **Einstein**, São Paulo, v. 16, n. 3, p.1-6, 2018.

RAJ, L. *et al.* Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. **Nature**, Boston, v. 475, p. 231-234, 2011.

RAJALEKSHMI, D. S. *et al.* Anticancer activity studies of cubebin isolated from *Piper cubeba* and its synthetic derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Thiruvananthapuram, v. 26, n. 7, p.1767-1771, 2016.

RESENDE, F.A. *et al.* Mutagenicity and antimutagenicity of (-)-hinokinin a trypanosomicidal compound measured by Salmonella microsome and comet assays. **BMC Complement Altern Med**, Araraquara, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2012.

ROSSETTO, M. A. A. de M. **Qualidade de vida em pacientes com câncer de cabeça e pescoço**. 2018, 49 f. Dissertação (Mestrado em Gestão de Saúde Coletiva) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, 2018. Disponível em: [http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/331063/1/Rossetto\\_MariaAngelaAdamoliDeMoraes%20\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/331063/1/Rossetto_MariaAngelaAdamoliDeMoraes%20_M.pdf). Acesso em: 25 jan. 2019

SANTIAGO, M. B. **Análise de proteoma no carcinoma de células escamosas de laringe**. 2015, 136 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Universidade Estadual de Campinas, 2015. Disponível em: [http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/312537/1/Santiago\\_MariliaBueno\\_D.pdf](http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/312537/1/Santiago_MariliaBueno_D.pdf). Acesso em: 9 jun. 2018.

SEMMLINGER, A. *et al.* EP3 (prostaglandin E2 receptor 3) expression is a prognostic factor for progression-free and overall survival in sporadic breast cancer. **BMC Cancer**, Munich, v. 18, n. 1, p. 431, 2018.

SHI, C. *et al.* High COX-2 expression contributes to a poor prognosis through the inhibition of chemotherapy-induced senescence in nasopharyngeal carcinoma. **International Journal of Oncology**, Changchun, v. 53, n. 3, p. 1138-1148, 2018.

SIDDIQUI, S.; KANWAL, A.; JAMAL, K. S. Piperine attenuates the cancerous activity response in Neuro-2a cell line. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, Karachi, v. 31, n. 4, p. 1529-1538, 2018.

SILVA, A. M. D. **Metabolismo secundário e ligninas de espécies de Piper**. 2008, 152 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade de São Paulo, 2008. Disponível em: [file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/TESE\\_Adalberto\\_Manoel\\_da\\_Silva\\_Quimica\\_Organica.pdf](file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/TESE_Adalberto_Manoel_da_Silva_Quimica_Organica.pdf). Acesso em: 23 abr. 2018.

STARK, A.; MADAR, Z. Phytoestrogens: a review of recent findings. **J Pediatr Endocr Met**, Rehovot, v. 15, n. 5, p. 561-572, 2002.

SUGAHARA, T.; YAMAUCHI, S.; NISHIMOTO, S. The structure-activity relationships of flaxseed lignan, secoisolariciresinol. **Interdisciplinary studies on environmental chemistry-biological responses to chemical pollutants**, Shikoku, v. 1, p. 263-268, 2008.

VEEN, J. V. D.; NUYTS, S. Can intensity-modulated-radiotherapy reduce toxicity in head and neck squamous cell carcinoma? **Cancers**, Leuven, v. 9, n. 12, p.1-12, 2017.

XIN, X.; MAJUMDER, M.; GIRISH, G. V. Targeting COX-2 and EP4 to control tumor growth, angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis to the lungs and lymph nodes in a breast cancer model. **Laboratory Investigation**, Toronto, v. 92, n. 1, p.1115-1128, 2012.

YAO, J.X.; YAO, Z.F.; LI, Z.F.; LIU, Y.B. Radio-sensitization by *Piper longum* of human breast adenoma MDA-MB-231 cells in vitro. **Asian Pac. J. Cancer Prev**, Nanjing, v. 15, p. 3211-3217, 2014.

ZENG, Y.; YANG, Y. Piperine depresses the migration progression via downregulating the Akt/mTOR/MMP-9 signaling pathway in DU145 cells. **Molecular Medicine Reports**, Xiam, v. 17, n. 5, p. 6363-6370, 2018.

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

ZI, C. *et al.* Synthesis and anticancer activity of dimeric podophyllotoxin derivatives. **Drug Design, Development and Therapy**, Kunming, v. 12, p. 3393-3406, 2018.

## 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, 28/03/2019



---

Assinatura do autor