



# **AÇÃO ANTITUMORAL DO EXTRATO DE *PIPER NIGRUM* E PIPERINA: O ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA p53**

## **REVISÃO DE LITERATURA**

Submetido em: 28/7/2023

Aprovado em: 12/4/2024

doi:10.70293/ 10.70293/2764-2860.2024.6588

Julia Quarti\*<sup>1</sup>

Jerson L. Silva\*<sup>2</sup>

Tuane C.R.G. Vieira\*<sup>3</sup>

**RESUMO:** O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo. No Brasil, estimativas preveem cerca de 483 mil novos casos em 2024, segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). A proteína p53 é um fator essencial na supressão tumoral, pois pode bloquear o ciclo celular, reparar o DNA celular e induzir células a sofrer apoptose. No entanto, mutações no gene Tp53 podem comprometer o funcionamento da p53 como “guardiã do genoma”. Uma estratégia potencial para a prevenção e tratamento do câncer envolve o uso de compostos bioativos alimentares. O *Piper nigrum*, ou pimenta-preta, e seu principal constituinte ativo, a piperina, têm sido objeto de vários estudos que investigam seu potencial anticancerígeno. Esses compostos demonstraram efeitos antiproliferativos, pró-oxidantes, regulação do ciclo celular e indução de apoptose. Esta revisão examinará estudos sobre a relação entre a ação dessas substâncias e a proteína p53. Extratos de *P. nigrum* e piperina mostraram efeitos citotóxicos em células que não expressam p53, bem como em células com p53 do tipo selvagem ou mutante. Isso sugere que essas substâncias podem ser eficazes no tratamento do câncer, independentemente do status da p53. No entanto, mais pesquisas são necessárias para compreender completamente os mecanismos e o potencial terapêutico dessas substâncias no combate ao câncer.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Piper nigrum*; Proteína Supressora de Tumor p53; Neoplasias.

---

\*<sup>1</sup> Nutricionista. Doutora em Ciências Nutricionais pelo Instituto de Nutrição Josué de Castro – UFRJ. Pós-doutoranda do Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais Gregorio Weber do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis (IBqM) – UFRJ. E-mail: julia\_quarti@hotmail.com

\*<sup>2</sup> Médico. Doutor em Ciências Biológicas pelo Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ. Atualmente é Presidente da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Diretor do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas, bolsista (nível 1A) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), membro da Academia Brasileira de Ciências (membro efetivo), da Academia Mundial de Ciências (TWAS) – para o Avanço da Ciência em Países em Desenvolvimento (“Fellow”) e da Academia Nacional de Medicina (membro titular) e Professor Titular do IBqM – UFRJ. Endereço para correspondência: IBqM e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem, UFRJ, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: jerson@bioqmed.ufrj.br

\*<sup>3</sup> Bióloga. Doutora em Química Biológica pelo IBqM – UFRJ. Atualmente é Jovem Cientista do Nosso Estado FAPERJ e Professora Adjunta do IBqM – UFRJ. Endereço para correspondência: IBqM e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem, UFRJ, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: tuane@bioqmed.ufrj.br



**ABSTRACT:** Cancer is a major cause of death worldwide. In Brazil, estimates predict around 483,000 new cases in 2024, according to INCA (The National Cancer Institute José Alencar Gomes da Silva). The p53 protein is an essential factor in tumor suppression as it can block the cell cycle, repair cell DNA, and induce cells to undergo apoptosis. However, mutations in the *TP53* gene can compromise p53 functioning as the “guardian of the genome.” A potential cancer prevention and treatment strategy involves using food-bioactive compounds. *Piper nigrum*, or black pepper, and its main active constituent, piperine, have been the subject of several studies investigating their anticancer potential. These compounds have shown antiproliferative effects, pro-oxidant activity, cell cycle regulation, and induction of apoptosis. This review will examine studies on the relationship between the action of these substances and the p53 protein. *P. nigrum* extracts and piperine have shown cytotoxic effects on cells that express no p53 and those with wild-type or mutant p53. This suggests these substances may effectively treat cancer, regardless of p53 status. However, further research is necessary to fully understand these substances’ mechanisms and therapeutic potential in fighting cancer.

**KEYWORDS:** *Piper nigrum*; Tumor Suppressor Protein p53; Neoplasms.

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo, sendo responsável por uma estimativa de 10 milhões de mortes em 2020<sup>1</sup>. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) divulgou a estimativa, para o período entre 2023 e 2025, da ocorrência alarmante de cerca de 483 mil

novos casos de câncer por ano, excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 221 mil casos novos)<sup>2</sup>.

As células de câncer geralmente são conhecidas por sua rápida proliferação e caráter invasivo, em decorrência do acúmulo progressivo de mutações em seu genoma. Essas alterações na expressão ou função de genes essenciais para a manutenção da homeostasia celular provocam a perda da capacidade da célula de reparar danos no DNA e de responder aos sinais de proliferação e morte, adquirindo autonomia de crescimento e tornando-se independente de controles externos<sup>3</sup>. Além disso, pesquisas sobre o desenvolvimento do câncer têm destacado a complexidade dessa doença. Atualmente, é conhecido que as células cancerígenas exercem controle sobre um conjunto de células e moléculas, formando o microambiente tumoral. Assim, essas células alteram e impactam o comportamento das células normais circundantes, promovendo mudanças na vascularização e oxigenação, o que proporciona vantagens de sobrevivência e crescimento em comparação com as células normais<sup>4</sup>.

O desenvolvimento de tumores resulta de alterações na atividade dos proto-oncogenes, que se transformam em oncogenes e desencadeiam processos que levam as células normais a se tornarem malignas. Além disso, mutações em genes supressores de tumor, como o *TP53*, que codifica a proteína p53, uma proteína tetramérica de cerca de 53 kDa, também podem contribuir para esse processo<sup>5</sup>. A p53 desempenha um papel crucial como “guardiã do genoma”, seja interrompendo o ciclo celular e reparando danos no DNA celular, seja induzindo as células à apoptose. Recentemente, outras vias que também sofrem regulação pela p53 têm sido descritas como, por exemplo, associadas ao metabolismo celular e ao estresse oxidativo<sup>6</sup>. No entanto, aproximadamente 50-60% dos



cânceres apresentam mutação no gene *TP53*, comprometendo as atividades como “guardião do genoma” da p53<sup>7</sup>.

A espécie *Piper nigrum*, cujos frutos são conhecidos tradicionalmente como pimenta-do-reino ou pimenta-preta<sup>8</sup>, tem sido cada vez mais estudada devido a suas inúmeras propriedades farmacológicas, inclusive contra o câncer<sup>9</sup>. Acredita-se que os extratos brutos da espécie *P. nigrum* tenham essa ação antitumoral principalmente devido ao efeito sinérgico de seus constituintes ativos, que parecem atuar por meio de mecanismos moleculares distintos que se complementam<sup>10</sup>. Esses extratos podem ser produzidos a partir de diferentes partes da planta, como raízes, sementes e frutos. Uma vez que cada parte da planta possui composição química diferente, podem gerar efeitos citotóxicos diversos nas células de câncer. Além disso, o processo de extração com diferentes tipos de solventes também pode provocar efeitos variáveis contra o câncer, uma vez que pode extrair diferentes classes de compostos com atividades biológicas distintas<sup>10</sup>. Portanto, no geral, os estudos realizados com extratos da espécie *P. nigrum* destacam os seguintes efeitos contra o câncer: atividade pró-oxidante<sup>11</sup>; efeito antiproliferativo<sup>11</sup>; potencial antiangiogênico<sup>12</sup>; regulação do ciclo celular e indução de apoptose, mediados por p53<sup>13</sup>.

A piperina é o principal alcaloide e composto bioativo presente nos grãos de pimenta-do-reino, sendo que seu teor nesses frutos pode variar entre 3-9%<sup>14</sup>. Já foi descrito previamente em estudos *in vitro* e *in vivo* que esse composto apresenta importante ação quimiopreventiva e quimioterapêutica<sup>15</sup>. Entre os mecanismos de ação sugeridos, destacam-se: atividade antioxidante<sup>16</sup> e pró-oxidante<sup>17</sup>; efeito antiproliferativo<sup>18</sup>; potencial anti-metastático<sup>19</sup>; reversão da

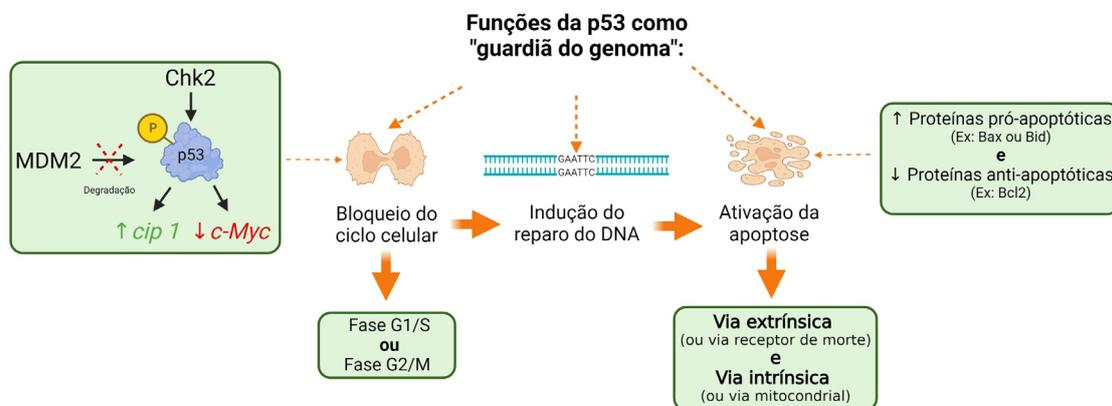
resistência a quimioterápicos<sup>20</sup>; regulação do ciclo celular e indução de apoptose, mediados por p53<sup>21</sup>.

Nessa revisão, abordaremos a relação entre a função de p53 na regulação do ciclo celular e na apoptose e os efeitos modulatórios dos extratos da *P. nigrum*, bem como de seu principal constituinte ativo, a piperina. O efeito dos extratos da *P. nigrum*, assim como da piperina, pode se dar tanto de forma dependente de p53 selvagem<sup>11-13,21-24</sup>, quanto de forma independente dessa proteína<sup>25-27</sup>. Além disso, algumas mutações em p53 conferem resistência à ação dos extratos da *P. nigrum* e da piperina, enquanto outras parecem conferir certa sensibilidade<sup>24-26</sup>. Sendo assim, para a elucidação e compreensão dos mecanismos de ação dos extratos da *P. nigrum* e da piperina, é necessária a análise do envolvimento da p53, tanto na sua forma selvagem quanto na mutante, nos diferentes modelos estudados.

## A proteína p53 como “guardião do genoma”

A p53 é amplamente conhecida como uma proteína supressora tumoral, uma vez que atua como um fator de transcrição capaz de regular diferentes funções celulares relacionadas à proteção das células contra o câncer (Figura 1). Sua ativação é induzida por sinais de estresse celular e, uma vez ativada, liga-se a diversos promotores de genes envolvidos com 1) o bloqueio do ciclo celular, o que impede a proliferação descontrolada das células e ainda permite 2) o reparo dos danos ao DNA celular, quando necessário. No entanto, caso os danos ao DNA sejam mais intensos do que a capacidade da célula de os reparar, a ativação prolongada da p53 induz a 3) morte celular por apoptose. Por isso, as principais funções da p53 como “guardião do genoma” envolvem o bloqueio do ciclo celular, o reparo de danos ao DNA e a indução da apoptose<sup>6</sup>.

**Figura 1.** Esquema da ativação da p53: estresse celular



**Fonte:** Funções da p53 como “guardião do genoma”. A p53 é uma proteína supressora tumoral que regula funções celulares essenciais, como: bloqueio do ciclo celular, reparo do DNA celular e indução da apoptose, em caso de danos intensos ao DNA que excedam a capacidade de reparo da célula. Em resposta ao estresse celular persistente, a p53 é fosforilada por Chk2, resultando em sua estabilização e impedindo sua degradação via MDM2. A p53, quando estabilizada, pode induzir e reprimir seus genes alvo, como *cip1* e *c-Myc*, provocando o bloqueio do ciclo celular na fase G1/S ou G2/M. A p53 é capaz de induzir a transcrição do gene *cip1*, resultando na produção da proteína p21, que atua inibindo a proliferação celular. Por outro lado, a p53 também pode reprimir transcricionalmente alguns oncogenes, incluindo o *c-Myc*, impedindo a divisão celular. Além disso, a p53 regula vias de morte celular, como a apoptose. A p53 ativa a cascata de sinalização de caspases nas vias extrínseca e intrínseca da apoptose, ligando-se a receptores de morte na membrana celular e aumentando a expressão de proteínas pró-apoptóticas, como Bax e Bid, ou interagindo com proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl2, fora do núcleo.

Em células normais, a p53 é sintetizada e prontamente degradada, apresentando um rápido *turnover* devido à ação da proteína MDM2 (*murine double minute gene 2*), principal reguladora negativa da p53<sup>28</sup> (Figura 1). No entanto, em situações de estresse celular persistente, a p53 é fosforilada pela proteína de checkpoint 2 (Chk2), sendo estabilizada e impedida de ser degradada pela MDM2<sup>29</sup>. A estabilização dos níveis celulares de p53 pode provocar a indução e a repressão de seus genes alvo, como *cip1* e *c-Myc*, respectivamente. A p53 é capaz de induzir a transcrição de um de seus principais genes alvo, o *cip1*, cujo produto é a proteína p21. Quando localizada no núcleo, p21 atua como inibidor de cinases dependentes de ciclinas (CDKs) das fases G1/S e G2/M do ciclo celular, impedindo a passagem da fase G1 para fase S, assim como da G2 para M, por meio da inibição da fosforilação de várias proteínas regulatórias do ciclo celular, o

que leva ao bloqueio da divisão celular<sup>30</sup>. Por outro lado, a p53 também pode promover a repressão transcricional de alguns oncogenes, como o *c-Myc*, com o objetivo de impedir a proliferação celular por meio da inibição da expressão de proteínas associadas à regulação do ciclo celular, como a CDK4, as ciclinas D1, D2, E, A<sup>31</sup> e p21<sup>32</sup>.

A p53 também é capaz de modular vias de morte celular, como a apoptose, por meio da interação direta com proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas (Figura 1). Os estudos demonstram que a p53 participa dos processos apoptóticos na via extrínseca (ou via do receptor de morte), ligando-se aos receptores de morte presentes na membrana das células e induzindo a cascata de sinalização de caspases; e, na via intrínseca (ou via mitocondrial), aumentando a expressão de proteínas pró-apoptóticas, como Bax e Bid<sup>33</sup>, capazes de formar poros na membrana mitocondrial, liberando citocromo c



para o citosol. Posteriormente, o citocromo c se liga a um fator de ativação de proteases apoptóticas (Apaf-1), formando o apoptossoma, que, por sua vez, recruta a pró-caspase 9 clivando-a, o que resulta na ativação de caspases efetoras<sup>34</sup>. A p53 também pode atuar fora do núcleo, induzindo a apoptose por meio da ligação a proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl2<sup>35</sup>.

### Mutações no gene *TP53*

Mutações no gene *TP53* capazes de prejudicar as atividades da p53 como “guardiã do genoma” podem ser classificadas como **1.** mutações de contato, que comprometem diretamente a interação entre a p53 e o DNA da célula, como os mutantes R248Q, R273H, R280K ou **2.** mutações conformacionais, que alteram a conformação da p53 e, consequentemente, sua atividade, como os mutantes R175H e R282W<sup>36-38</sup>.

Além da perda de sua atividade normal como proteína antitumoral<sup>39</sup>, a p53 mutante pode exercer papel importante na formação do câncer por outros dois mecanismos: **1.** Efeito de ganho de função (GF), no qual a p53 mutante adquire novas funções oncogênicas, especialmente por meio da interação com outras proteínas e/ou ácidos nucleicos<sup>40,41</sup>; **2.** Efeito de dominância negativa (DN), em que a p53 mutante se associa às moléculas de p53 selvagem, inativando-as<sup>42</sup>.

Alterações na estabilidade estrutural da proteína, devido à ocorrência de mutações de contato ou conformacionais, podem levar ao mau enovelamento da p53, desencadeando um processo de agregação intracelular, gerando espécies amiloides ou agregados amorfos<sup>43-45</sup>. Já foi demonstrado previamente que a agregação de p53 tem relação com o efeito de DN, ou efeito *prion-like*, como foi sugerido por nosso grupo de pesquisa<sup>43,46,47</sup>, e com a perda<sup>48</sup> ou ganho de novas funções capazes de promover a tumorigênese<sup>49,50</sup>.

### Modulação da p53 pelo extrato de *Piper nigrum* e pela piperina

Apesar de existirem inúmeros estudos científicos sobre o efeito antitumoral do extrato da *P. nigrum* ou da piperina<sup>51,52</sup>, o envolvimento da p53 na ação dessas substâncias é elusivo. Diferentes extratos brutos da *P. nigrum* foram testados sobre linhagens de câncer de mama: 1) extração com álcool<sup>11</sup>; 2) extração com fluido supercrítico – um método de extração seguro e facilmente acessível que utiliza uma tecnologia livre de solventes orgânicos poluentes, resultando em redução nos custos de pós-processamento<sup>13</sup>; 3) extração com metanol<sup>25</sup>; 4) extração com diclorometano<sup>25</sup> (Tabela 1). Os extratos com álcool e com fluido supercrítico foram testados apenas em uma das linhagens de câncer de mama (MCF-7), mas demonstraram excelentes valores de IC<sub>50</sub>, especialmente considerando o curto período de incubação, de apenas 24 horas ( $27,1 \pm 2,0 \mu\text{g/mL}$ <sup>11</sup> e  $27,8 \pm 6,8 \mu\text{g/mL}$ <sup>13</sup>, respectivamente). Com relação ao extrato com metanol ou diclorometano, ambos reduziram a viabilidade das 3 linhagens de câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-468 e MDA-MB-231). Entretanto, a extração com diclorometano resultou em uma maior disparidade de efeito entre essas linhagens celulares após o tratamento por 72 horas, sendo o efeito citotóxico mais pronunciado sobre as células MCF-7 ( $23,46 \pm 1,10 \mu\text{g/mL}$ ) e MDA-MB-468 ( $7,94 \pm 4,52 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto apresentou um efeito citotóxico menor sobre a linhagem MDA-MB-231 ( $38,82 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$ )<sup>25</sup>. A hipótese levantada para explicar essa diferença foi em função do tipo de mutação da célula MDA-MB-231 (p53 mutante R280K), que seria capaz de estabilizar o principal regulador negativo da p53, a proteína MDM2, o que protegeria essas células da apoptose<sup>53</sup>.

**Tabela 1.** Efeito antitumoral do Extrato de *P. nigrum*

Tipos de câncer	Modelo experimental	Status de p53	Efeito antitumoral relacionado a p53:
			Extrato bruto da <i>P. nigrum</i>
Câncer de mama	<i>In vitro</i> Linhagem MCF-7	p53 selvagem	Extração com álcool: IC <sub>50</sub> = 27,1 ± 2,0 µg/mL (24 h) <sup>11</sup> Extração com fluido supercrítico: IC <sub>50</sub> = 27,8 ± 6,8 µg/mL (24 h) <sup>13</sup> Extração com metanol: IC <sub>50</sub> = 20,25 ± 0,01 µg/mL (72 h) <sup>25</sup> Extração com diclorometano: IC <sub>50</sub> = 23,46 ± 1,10 µg/mL (72 h) <sup>25</sup>
	<i>In vitro</i> Linhagem MDA-MB-231	p53 mutante (R280K)	Extração com metanol: IC <sub>50</sub> = 22,37 ± 2,31 µg/mL (72 h) <sup>25</sup> Extração com diclorometano: IC <sub>50</sub> = 38,82 ± 0,23 µg/mL (72 h) <sup>25</sup>
	<i>In vitro</i> Linhagem MDA-MB-468	p53 mutante (R273H)	Extração com metanol: IC <sub>50</sub> = 9,04 ± 0,71 µg/mL (72 h) <sup>25</sup> Extração com diclorometano: IC <sub>50</sub> = 7,94 ± 4,52 µg/mL (72 h) <sup>25</sup>
	<i>In vitro</i> Ratos portadores de tumor de Ehrlich	?	Efeito quimioterapêutico: 100 mg/Kg de peso corporal <sup>11,13</sup> Bloqueio do ciclo celular na fase G1/S <sup>11</sup> ou na fase G2/M <sup>13</sup> Indução da apoptose dependente de p53 <sup>11,13</sup> ↑ p53 e Bax <sup>11,13</sup> ↓ Bcl-Xl e ciclina A <sup>11,13</sup> ↓ CDK2 <sup>13</sup>
Câncer colorretal	<i>In vitro</i> Linhagem HT-29	p53 mutante (R273H)	Extração com álcool: IC <sub>50</sub> = 80,5 ± 6,6 µg/mL (24 h) <sup>11</sup>

No entanto, as células HT-29 de câncer colorretal também demonstraram resistência ao extrato etanólico da *P. nigrum* após 24 horas de tratamento, apresentando um valor de IC<sub>50</sub> de 80,5 ± 6,6 µg/mL<sup>11</sup>, mesmo expressando o mesmo mutante de p53 (R273H) encontrado na linhagem de câncer de mama MDA-MB-468, que se mostrou extremamente sensível tanto ao extrato com metanol (IC<sub>50</sub> = 9,04 ± 0,71 µg/mL)<sup>25</sup> quanto com o diclorometano (IC<sub>50</sub> = 7,94 ± 4,52 µg/mL)<sup>25</sup> após 72 horas de incubação. Apesar dos diferentes períodos de incubação testados com os extratos de *P. nigrum* dificultarem a comparação entre essas células (24 horas para a linhagem celular HT29 e 72 horas para a MDA-MB-468), observou-se que as células portadoras da mutação R273H em p53 apresentam sensibilidades variadas aos extratos de *P. nigrum*. Assim, não foi possível estabelecer uma correlação direta entre a presença dessa mutação e a intensidade do efeito citotóxico dos extratos de *P. nigrum*.

Além de avaliar o efeito *in vitro* do extrato alcoólico da *P. nigrum*, também foi

avaliado seu efeito *in vivo* sobre o câncer de mama em ratos portadores do tumor de Ehrlich<sup>11</sup>. Demonstrou-se que esse extrato exerce efeito quimioterapêutico, com inibição do crescimento tumoral e aumento do tempo de sobrevivência dos animais, quando administrado na dose de 100 mg/kg de peso corporal<sup>11</sup>. Além disso, observou-se indução do bloqueio do ciclo celular na fase G1/S e promoção da apoptose, evidenciada pelo aumento da expressão de p53 e Bax, enquanto houve redução na expressão de Bcl-xL e ciclina A<sup>11</sup>. O extrato da *P. nigrum* obtido por fluido supercrítico apresentou efeito semelhante ao do extrato alcoólico, utilizando um modelo experimental similar<sup>13</sup>. A dose de 100 mg/kg de peso corporal do extrato obtido por fluido supercrítico também demonstrou inibição do crescimento tumoral e aumento do tempo de sobrevivência dos animais, provavelmente relacionados ao bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, através da inibição da CDK2 e ciclina A, e à indução da apoptose, evidenciada pelo aumento da expressão de proteínas

pró-apoptóticas, como p53 e Bax, e pela inibição da proteína anti-apoptótica Bcl-xL<sup>13</sup>.

Embora a piperina seja o principal constituinte ativo da *P. nigrum*, outros compostos como piperlongumina, pelitorina, e kusunoquinina também apresentaram importantes propriedades antitumorais. A eliminação da piperina do extrato de *P. nigrum* e sequencial fracionamento foi capaz de isolar frações com atividade antitumoral ainda maior do que a própria piperina nos ensaios de viabilidade celular<sup>25</sup>, sugerindo o

efeito sinérgico dos demais compostos bioativos presentes nesse fruto. Além disso, assim como observado no extrato da *P. nigrum* com diclorometano, as frações sem piperina também afetaram mais a viabilidade das células MCF-7 e MDA-MB-468 em relação à linhagem MDA-MB-231<sup>25</sup>.

O extrato de *P. nigrum* livre de piperina (PFPE – *piperine-free P. nigrum extract*) também foi testado em outras linhagens celulares de câncer com diferenças no status de p53<sup>22</sup> (Tabela 2), como: câncer de mama

**Tabela 2.** Efeito antitumoral do Extrato de *P. nigrum* livre de piperina (PFPE)

Tipos de câncer	Modelo experimental	Status de p53	Efeito antitumoral relacionado a p53:
			Extrato bruto da <i>P. nigrum</i>
Câncer de mama	<i>In vitro</i> Linhagem MCF-7	p53 selvagem	IC <sub>50</sub> = 7,45 ± 1,59 µg/mL (72 h) <sup>25</sup> ; IC <sub>50</sub> = 7,45 ± 0,60 µg/mL (72 h) <sup>22</sup> Indução de apoptose dependente de p53 <sup>22</sup> ↑ p53 e Liberação de citocromo C ↓ topoisomerase II <sup>22</sup>
	<i>In vitro</i> Linhagem MDA-MB-231	p53 mutante (R280K)	IC <sub>50</sub> = 21,68 ± 1,69 µg/mL (72 h) <sup>25</sup> ; IC <sub>50</sub> = 22,67 ± 2,31 µg/mL (72 h) <sup>22</sup>
	<i>In vitro</i> Linhagem MDA-MB-468	p53 mutante (R273H)	IC <sub>50</sub> = 18,19 ± 0,59 µg/mL (72 h) <sup>25</sup> ; IC <sub>50</sub> = 18,19 ± 0,59 µg/mL (72 h) <sup>22</sup>
	<i>In vitro</i> Linhagem ZR-75-1	p53 selvagem	IC <sub>50</sub> = 13,85 ± 1,25 µg/mL (72 h) <sup>22</sup>
	<i>In vivo</i> Indução de tumores com NMU em ratos	?	Efeito quimiopreventivo: 100 e 200 mg/Kg de peso corporal <sup>22</sup> Efeito quimioterapêutico: 100, 200 e 400 mg/Kg de peso corporal <sup>22</sup> Inibição da divisão celular e indução da apoptose dependente de p53 <sup>12</sup> ↑ p53 ↓ c-Myc ↑ Liberação de citocromo c ↑ Bax <sup>12</sup>
	Câncer colorretal	<i>In vitro</i> Linhagem HT-29	p53 mutante (R273H)
<i>In vitro</i> Linhagem SW-620		p53 mutante (R273H)	IC <sub>50</sub> = 29,56 ± 2,47 µg/mL (72 h) <sup>22</sup>
Câncer de pulmão	<i>In vitro</i> Linhagem HT-29	p53 selvagem	IC <sub>50</sub> = 30,77 ± 1,23 µg/mL (72 h) <sup>22</sup>
	<i>In vitro</i> Linhagem A-549	Não expressa p53	IC <sub>50</sub> = 34,69 ± 3,05 µg/mL (72 h) <sup>22</sup>
Neuroblastoma	<i>In vitro</i> Linhagem SK-N-SH	p53 selvagem	IC <sub>50</sub> = 34,69 ± 3,05 µg/mL (72 h) <sup>22</sup>
	<i>In vitro</i> Linhagem LA-N-5	p53 selvagem	IC <sub>50</sub> = 111,28 ± 8,85 µg/mL (72 h) <sup>22</sup>



MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 e ZR-75-1; câncer colorretal HT-29 e SW-620; câncer de pulmão A-549 e H-358; e neuroblastoma SK-N-SH e LA-N-5. Não foi observada uma correlação direta entre a expressão de p53 selvagem e o efeito mais pronunciado do PFPE nos experimentos de citotoxicidade<sup>22</sup>. Por exemplo, apesar de a LA-N-5 expressar p53 selvagem, foi a linhagem mais resistente à ação do PFPE ( $IC_{50} = 111,28 \pm 8,85 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto a MCF-7, que também expressa p53 selvagem, foi a linhagem mais sensível à ação do PFPE nos ensaios de viabilidade celular ( $IC_{50} = 7,45 \pm 0,60 \mu\text{g/mL}$ ), dentre todas que foram testadas no estudo. Como o PFPE levou a um aumento dos níveis de p53 em MCF-7, proteínas responsáveis pela apoptose podem ter sido ativadas, como Bax ou PUMA<sup>54-56</sup>, provocando a liberação de citocromo C que foi observada nos experimentos, ao mesmo tempo que também inibiu a expressão de topoisomerase II, causando danos no DNA celular<sup>22</sup>.

Da mesma forma que ocorreu com os extratos de *P. nigrum*<sup>11,25</sup>, também não foi possível observar uma correlação entre a expressão de p53 mutante e o efeito do PFPE, uma vez que células que apresentam a mesma mutação em p53 (R273H) demonstraram sensibilidades distintas ao PFPE. Por exemplo, a linhagem de câncer de mama MDA-MB-468 obteve um dos menores  $IC_{50}$  ( $18,19 \pm 0,59 \mu\text{g/mL}$ ) após o tratamento com PFPE por 72 horas, enquanto as células de câncer colorretal HT-29 ( $IC_{50} = 27,74 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$ ) e SW-620 ( $IC_{50} = 29,56 \pm 2,47 \mu\text{g/mL}$ ) tiveram um dos maiores  $IC_{50}$ <sup>22</sup>.

Esses dados sugerem que os efeitos dos extratos de *P. nigrum* ou do PFPE estão mais relacionados ao tipo de câncer estudado do que ao status de p53<sup>22</sup> (Tabela 2). Observou-se maior sensibilidade das células de câncer de mama ao efeito citotóxico dos extratos de *P. nigrum*, em relação à célula de câncer colorretal<sup>11,25</sup>. Além disso, linhagens de cãn-

cer colorretal e de pulmão mostraram-se mais resistentes à ação do PFPE nos experimentos de citotoxicidade, enquanto as linhagens de câncer de mama foram mais sensíveis, embora também tenham sido realizados controles com células não-transformadas de mama (MCF-12A) em que foi constatado efeito citotóxico reduzido do PFPE ( $IC_{50} = 46,31 \pm 0,76$ )<sup>22</sup>.

Sendo assim, não foi possível atribuir o efeito citotóxico dos extratos de *P. nigrum* ou do PFPE apenas à modulação via p53 selvagem ou mutante. Por isso, embora já tenha sido demonstrado que a extração de *P. nigrum*, tanto com álcool<sup>11</sup> quanto com fluido supercrítico<sup>13</sup>, e o PFPE<sup>22</sup> exercem efeito direto sobre a p53, parece que esse não é o único mecanismo de ação, mostrando o potencial envolvimento de outras vias de sinalização, que inclusive podem ser específicas de acordo com cada tipo de câncer, uma vez que podem sofrer influência de seu microambiente tumoral.

O efeito *in vivo* do PFPE sobre o câncer de mama também foi testado utilizando-se um modelo de indução de danos ao DNA com o agente alquilante N-Nitroso-N-metiluréia (NMU)<sup>12,22</sup>, que é capaz de provocar metilação do DNA celular<sup>57</sup>. Observou-se que o PFPE (100 e 200 mg/Kg de peso corporal) foi efetivo em proteger os ratos do efeito tumorigênico desse agente alquilante, demonstrando ser capaz de prevenir o aparecimento de tumores de mama nesse modelo animal<sup>22</sup>. Além da ação quimiopreventiva do PFPE, também foi avaliado seu efeito no tratamento do câncer. As concentrações de 100, 200 e 400 mg/Kg de PFPE reduziram significativamente o tamanho dos tumores dos animais, sugerindo um importante efeito antitumoral<sup>22</sup>. O PFPE (100, 200 e 400 mg/Kg de peso corporal) foi capaz de controlar o tamanho do tumor, inibindo a proliferação das células cancerígenas por meio do aumento da expressão de p53 (nas concentrações

de 100 e 200 mg/Kg de peso corporal) e redução dos níveis de c-Myc (nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/Kg de peso corporal)<sup>12</sup>. A repressão de c-Myc é um importante pré-requisito para que a p53 seja capaz de bloquear o ciclo celular na fase G1 em linhagens celulares de humanos e de camundongos, assim como em tecidos de camundongos<sup>58</sup>. Além da possível modulação

do ciclo celular, o PFPE também parece ter induzido as células de câncer à apoptose, uma vez que foi observado aumento dos níveis de Bax e citocromo c nos tumores marmários dos ratos tratados<sup>12</sup>.

O efeito da piperina isolada sobre células de câncer de pulmão, de melanoma, de mama, de osteossarcoma e de câncer colorretal também foi avaliado<sup>21,23,24,26,27</sup> (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito antitumoral da piperina

Tipos de câncer	Modelo experimental	Status de p53	Efeito antitumoral relacionado a p53:
			Extrato bruto da <i>P. nigrum</i>
Câncer de mama	<i>In vitro</i> Linhagem MCF-7	p53 selvagem	Redução na viabilidade celular: 100 e 150 µM (72 h) <sup>26</sup>
	<i>In vitro</i> Linhagem MDA-MB-231	p53 mutante (R280K)	Redução na viabilidade celular: 150 µM (72 h) <sup>26</sup>
	<i>In vitro</i> Linhagem MDA-MB-468	p53 mutante (R273H)	Redução na viabilidade celular: 50, 100 e 150 µM (72 h) <sup>26</sup> Indução de apoptose <sup>26</sup>
	<i>In vitro</i> Linhagem T-47D	p53 mutante (L194F)	Redução na viabilidade celular: 50, 100 e 150 µM (72 h) <sup>26</sup>
Câncer colorretal	<i>In vitro</i> Linhagem HT-29	p53 mutante (R273H)	IC <sub>50</sub> = 53 ± 1 µM (72 h) <sup>27</sup> Bloqueio do ciclo celular na fase G1 e indução de apoptose <sup>27</sup>
	<i>In vitro</i> Linhagem HCT-116	p53 selvagem	HCT-116 (p53+/+): IC <sub>50</sub> = 109 ± 9 µM (72 h) <sup>27</sup> HCT-116 (p53-/-): IC <sub>50</sub> = 118 ± 7 µM (72 h) <sup>27</sup>
	<i>In vitro</i> Linhagem SW-480	p53 mutante (R273H e P309S)	IC <sub>50</sub> = 29,56 ± 2,47 µg/mL (72 h) <sup>22</sup>
	<i>In vitro</i> Linhagem Caco-2	Não expressa p53	IC <sub>50</sub> = 54 ± 5 µM (72 h) <sup>27</sup>
Câncer de pulmão	<i>In vitro</i> Linhagem A-549	p53 selvagem	IC <sub>50</sub> = 428 µM (48 h) <sup>21</sup> Bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e indução de apoptose dependente de p53 <sup>21</sup> ↑ p53 ↑ caspases-3 e 9 ↑ Bax/Bcl-2 <sup>21</sup>
Melanoma	<i>In vitro</i> Linhagem SK-MEL-28	p53 selvagem	IC <sub>50</sub> = 136 µM (72 h) <sup>21</sup> Bloqueio do ciclo celular na fase G1 e indução de apoptose dependente de p53 <sup>21</sup> ↑ p53 ↑ p21, caspase-3 e PARP-1 clivadas <sup>21</sup> ↓ XIAP e Bid (full length) <sup>21</sup>
Osteossarcoma	<i>In vitro</i> Linhagem U2OS	p53 selvagem	IC <sub>50</sub> = 136 µM (72 h) <sup>21</sup> Bloqueio do ciclo celular na fase G1 e indução de apoptose dependente de p53 <sup>21</sup> ↑ p53 ↑ p21, caspase-3 e PARP-1 clivadas <sup>21</sup> ↓ XIAP e Bid (full length) <sup>21</sup>
	<i>In vitro</i> Linhagem 143B	p53 mutante (R156P)	IC <sub>50</sub> = 484 µM (48 h) <sup>24</sup> Indução de apoptose dependente de p53 <sup>24</sup> ↑ p53 ↑ Bax ↓ Bcl-2 <sup>24</sup> Potencialização do efeito do quimioterápico doxorubicina <sup>24</sup>



Concentrações entre 175 e 700  $\mu\text{M}$  de piperina foram capazes de atuar de maneira dependente de p53 em células de câncer de pulmão A-549 (p53 selvagem), induzindo o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e, ainda, levando as células à apoptose pela ativação da via das caspases-3 e 9, assim como pelo aumento da relação Bax/Bcl-2<sup>23</sup>.

Também foi investigado o efeito da piperina sobre a linhagem de câncer de pele do tipo melanoma SK-MEL-28 que expressa p53 selvagem<sup>21</sup>. Esse composto bioativo reduziu a viabilidade dessas células de forma dose-dependente (75 – 300  $\mu\text{M}$ ), além de também ter bloqueado o ciclo celular na fase G1 (100, 150 e 200  $\mu\text{M}$ ). A ativação da proteína p53 e a indução de p21 que foram observadas após incubação com piperina (100, 150 e 200  $\mu\text{M}$ ) podem estar relacionadas com o bloqueio do ciclo celular<sup>21</sup>. Além disso, a modulação da p53 também pode estar envolvida com a indução de apoptose, uma vez que o tratamento com piperina (100, 150 e 200  $\mu\text{M}$ ) gerou aumento da marcação com Anexina-V<sup>21</sup>, capaz de se ligar ao fosfolípido de membrana fosfatidilserina, que sofre externalização durante a apoptose<sup>59</sup>. Esse fitoquímico também provocou aumento da clivagem de caspase-3 (150 e 200  $\mu\text{M}$ ) e PARP-1 (100, 150 e 200  $\mu\text{M}$ ), bem como redução dos níveis de XIAP (100, 150 e 200  $\mu\text{M}$ )<sup>21</sup>, uma das principais proteínas inibidoras de apoptose<sup>60,61</sup>, e Bid (*full length*, não-clivada) (150 e 200  $\mu\text{M}$ )<sup>21</sup>, uma proteína pró-apoptótica que precisa ser clivada para desempenhar sua ação<sup>62</sup>.

No entanto, dependendo do modelo estudado, a expressão de p53 selvagem sem alteração funcional parece não ser um pré-requisito para que a piperina exerça sua atuação sobre as células de câncer<sup>26</sup>. A piperina diminuiu a viabilidade celular de forma mais pronunciada das células MDA-MB-468, em comparação com as linhagens MCF-7 e

MDA-MB-231<sup>26</sup>, como já tinha sido observado para os extratos brutos de *P. nigrum*<sup>25</sup>. A piperina foi capaz de promover apoptose (100 e 150  $\mu\text{M}$ ) na linhagem MDA-MB-468 de forma dependente de caspase. No entanto, como essa linhagem expressa a proteína p53 não funcional (mutante), esse mecanismo deve ter sido induzido de forma independente dessa proteína<sup>26</sup>. Além disso, o efeito desse composto foi menos pronunciado sobre a linhagem MCF-7, que expressa essa proteína selvagem, sugerindo uma ação independente da proteína p53. Resultados semelhantes foram encontrados utilizando-se um modelo de câncer colorretal em que a linhagem HCT-116 foi silenciada para *TP53*, possibilitando a comparação dos efeitos citotóxicos da piperina nas células que expressam ou não essa proteína selvagem<sup>27</sup>. O efeito da piperina sobre a viabilidade das células HCT-116 (p53<sup>+/+</sup>) e HCT-116 (p53<sup>-/-</sup>) foi semelhante, como pôde ser visto por meio dos valores de IC<sub>50</sub> obtidos nos experimentos: 109  $\pm$  9  $\mu\text{M}$  e 118  $\pm$  7  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Esses dados também sugerem que a presença da p53 selvagem não é essencial para que a piperina exerça seu efeito antitumoral, sugerindo o envolvimento de outros mecanismos celulares<sup>27</sup>. Como o gene *TP53* é frequentemente mutado ou não funcional em muitos tipos de tumores, a atividade citotóxica da piperina de forma independente da p53 pode ter relevância clínica.

Diferentemente dos estudos anteriores, a piperina foi capaz de aumentar os níveis de p53, tanto selvagem quanto mutante, em células de osteossarcoma<sup>24</sup>. Esse composto bioativo (200  $\mu\text{M}$ ) induziu as linhagens de osteossarcoma U2OS (p53 selvagem) e 143B (p53 mutante) a apoptose, resultando em redução nos níveis de Bcl-2 e aumento nos níveis de Bax e p53. Além disso, também aumentou a suscetibilidade dessas células à ação do quimioterápico doxorrubicina, revelando efeito sinérgico<sup>24</sup>.



Ainda não foi possível compreender os mecanismos relacionados ao efeito dos extratos da *P. nigrum*, com diclorometano ou com metanol, ou da piperina sobre células de câncer de mama que expressam mutações em p53. Enquanto a célula MDA-MB-231, que expressa o mutante R280K, demonstrou grau de resistência a esses compostos nos experimentos de citotoxicidade, essas substâncias apresentaram efeito pronunciado sobre a linhagem MDA-MB-468, que expressa o mutante R273H<sup>25,26</sup>. A discrepância nesses resultados pode ser explicada pelas diferenças no potencial de agregação dos mutantes R273H e R280K. A agregação da p53 mutante pode resultar na aquisição de novas funções oncogênicas, representando um mecanismo importante de resistência a quimioterápicos<sup>49,50</sup>. Sendo assim, diferenças na agregação de p53 podem influenciar o grau de resistência das células à ação de compostos, como o extrato de *P. nigrum* ou a piperina.

Apesar de ambas as mutações em p53 serem de contato (R273H e R280K), sendo capazes de comprometer a interação da p53 com o DNA da célula<sup>63,64</sup>, ainda é debatido o potencial do mutante R273H em formar agregados. Experimentos de espectroscopia de fluorescência com proteína recombinante *in vitro* demonstraram que esse mutante apresenta uma estabilidade estrutural similar à p53 selvagem<sup>36</sup>, sugerindo que podem agregar de forma semelhante. Além disso, não foi observada a ocorrência de agregados de p53 em linhagens de câncer colorretal WiDr<sup>65,66</sup> ou de câncer do sistema nervoso central SW1783 e U251<sup>66</sup> que expressam p53 R273H, e não há dados na literatura sobre a ocorrência de agregação desse mutante na linhagem MDA-MB-468. Contudo, foi demonstrada a presença de agregados de p53 em amostras de tumores de pacientes que apresentam a mutação R273H<sup>46</sup>. Já o mutante R280K apresenta capacidade de agregação

tanto *in vitro*, quanto em modelo de linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231<sup>47,67</sup>. Portanto, o mutante R273H parece apresentar menor propensão a agregação, enquanto o R280K demonstra maior agregação nos modelos experimentais citados.

Sendo assim, os compostos não seriam capazes de reverter o processo de agregação do mutante R280K na linhagem MDA-MB-231, já que essa linhagem foi resistente aos extratos da *P. nigrum*, com diclorometano<sup>25</sup> ou com metanol<sup>25</sup>, ou à piperina<sup>26</sup>. No entanto, uma vez que essas substâncias tiveram uma ação importante sobre a linhagem MDA-MB-468 (p53 R273H)<sup>25,26</sup>, o potencial reduzido de agregação desse mutante justificaria a sensibilidade dessa célula à ação desses extratos de *P. nigrum* ou da piperina.

Portanto, uma investigação desse tipo é de extrema relevância, a fim de elucidar os mecanismos de ação dos extratos de *P. nigrum* e da piperina envolvendo o processo de agregação da p53 em células que expressam essa proteína mutante. No entanto, a utilização de linhagens diferentes, com o intuito de comparar o efeito dos compostos, parece não ser o melhor modelo experimental para esses ensaios, uma vez que as células apresentam inúmeras outras diferenças, além da expressão (ou não) de p53 mutante. Para contornar esse problema, a utilização de modelos *knockin/knockout*, em que é possível silenciar parcial ou totalmente o gene *TP53* em células que expressam a p53 mutante, é bastante relevante. Caso a substância atue por essa via, é esperado que ocorra a reversão de seu efeito ao silenciar o gene que codifica essa proteína. Ou então, pode ser induzida a superexpressão da p53 mutada em células que não expressam essa proteína naturalmente, adicionando-se cópias do gene *TP53* ao genoma celular. Nesse caso, o composto deve passar a ter ação sobre essas células modificadas, caso seu efeito dependa da p53 mutante<sup>68</sup>.



## 2. CONCLUSÃO

Os extratos de *P. nigrum*, assim como seu principal composto bioativo, a piperina, se mostraram capazes de modular a p53 selvagem e induzir células, especialmente de câncer de mama, ao bloqueio do ciclo celular e apoptose. No entanto, dependendo do tipo de câncer, esses compostos também têm ação sobre células que não expressam p53, demonstrando modular vias independentes dessa proteína, o que seria uma importante abordagem, considerando o elevado percentual de cânceres com mutações em *TP53*. Além disso, não está claro o efeito que essas substâncias exercem sobre os diferentes mutantes de p53, sendo essencial investigação mais aprofundada sobre os detalhes moleculares envolvidos na modulação dessa proteína, especialmente sua forma agregada.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Cancer. 2022 [Internet]. [cited 2023 Jul 19] 19 jul. 2023]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Instituto Nacional de Câncer (BR). Estimativa 2023. Incidência de câncer no Brasil. 2023. [cited 2023 Jul 19] 19 jul. 2023]. Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>.
3. National Cancer Institute (USA). What is cancer? 2021 [Internet]. [cited 2023 Jul 19] 19 jul. 2023]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
4. Siemann DW, Horsman MR. Modulation of the tumor vasculature and oxygenation to improve therapy. *Pharmacol Ther*. 2015;153:107-124. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1016/j.pharmthera.2015.06.006.
5. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, et al. Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: a review. *Anticancer Res*. 2020;40:6009-6015. [2023 Jul 19]. Available from: doi: 10.21873/anticancerres.14622.
6. Boutelle AM, Attardi LD. p53 and tumor suppression: it takes a network. *Trends Cell Biol*. 2021;31(4):298-310. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1016/j.tcb.2020.12.011.
7. Baugh EH, Ke H, Levine AJ, Bonneau RA, Chan CS. Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? *Cell Death Differ*. 2018;25(1):154-160. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1038/cdd.2017.180.
8. Nisha P, Singhal RS, Pandit AB. The degradation kinetics of flavor in black pepper (*Piper nigrum* L.). *J Food Eng*. 2009;92(1):44-49. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.10.018.
9. Srivastava AK, Singh VK. Biological action of *Piper nigrum*: the king of spices. *Eur J Biol Res*. 2017;7(3):223-233. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1016/S2221-1691(12)60524-3.
10. Turrini E, Sestili P, Fimognari C. Overview of the anticancer potential of the “King of Spices” *Piper nigrum* and its main constituent piperine. *Toxins (Basel)*. 2020;12(12):747. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.3390/toxins12120747.
11. de Souza Grinevicius VM, Kwiecinski MR, Santos Mota NS, Ourique F, Porfirio Will Castro LS, Andregueti RR, et al. *Piper nigrum* ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative da-



- mage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 2016;189:139-147. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi: 10.1016/j.jep.2016.05.020.
12. Deng Y, Sriwiriyan S, Tedasen A, Hiranai P, Graidist P. Anti-cancer effects of *Piper nigrum* via inducing multiple molecular signaling in vivo and in vitro. *J Ethnopharmacol.* 2016;188:87-95. [cited 2023 Jul 19]. Disponível em: doi:10.1016/j.jep.2016.04.047.
13. Grinevicius VMAS, Andrade KS, Mota NSRS, Bretanha LC, Felipe KB, Ferreira SRS, et al. CDK2 and Bcl-xL inhibitory mechanisms by docking simulations and anti-tumor activity from piperine enriched supercritical extract. *Food Chem Toxicol.* 2019;132:110644. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi: 10.1016/j.fct.2019.110644.
14. Lwamba C, Aboushanab SA, Ambati RR, Kovaleva EG. Innovative green approach for extraction of piperine from black pepper based on response surface methodology. *Sustain Chem.* 2023;4(1):40-53. [cited 2023 19 Jul]. Available from: doi:10.3390/suschem4010005.
15. Rather RA, Bhagat M. Cancer chemoprevention and piperine: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:10. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.3389/fcell.2018.00010.
16. Mohany H, Mahmoud MA, El-Shehawy AA, Gaber M, Elmetwalli A, Salama AF, et al. Antioxidant and cytotoxicity potential of piperine and sorafenib combination in human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem Lett.* 2021;17:108-116. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.21608/blj.2021.200558.
17. Jafri A, Siddiqui S, Rais J, Ahmad MS, Kumar S, Jafar T, et al. Induction of apoptosis by piperine in human cervical adenocarcinoma via ROS mediated mitochondrial pathway and caspase-3 activation. *EXCLI J.* 2019;18:154-164. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.17179/excli2018-1928.
18. Banerjee S, Katiyar P, Kumar V, Saini SS, Varshney R, Krishnan V, et al. Black pepper and piperine induce anticancer effects on leukemia cell line. *Toxicol Res (Camb).* 2021;10(2):169-182. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1093/toxres/tfab001.
19. Zhang J, Zhu X, Li H, Li B, Sun L, Xie T, et al. Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/-9 expression. *Int Immunopharmacol.* 2015;24(1):50-58. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1016/j.intimp.2014.11.012. Epub 2014. Erratum in: *Int Immunopharmacol.* 2024;129:111493.
20. Wojtowicz K, Sterzyńska K, Świerczewska M, Nowicki M, Zabel M, Januchowski R. Piperine targets different drug resistance mechanisms in human ovarian cancer cell lines leading to increased sensitivity to cytotoxic drugs. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):4243. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.3390/ijms22084243.
21. Fofaria NM, Kim SH, Srivastava SK. Piperine causes G1 phase cell cycle arrest and apoptosis in melanoma cells through checkpoint kinase-1 activation. *PLoS One.* 2014;9(5):e94298. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1371/journal.pone.0094298.
22. Sriwiriyan S, Tedasen A, Lailerd N, Boonyaphiphat P, Nitiruangjarat A, Deng Y, et al. Anticancer and cancer prevention effects of



- piperine-free piper nigrum extract on n-nitrosomethylurea-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Prev Res.* 2016;9(1):74-82. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0127.
23. Lin Y, Xu J, Liao H, Li L, Pan L. Piperine induces apoptosis of lung cancer A549 cells via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Tumor Biol* 2014;35(4):3305-3310. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1007/s13277-013-1433-4.
24. Qi Y, Yao L, Liu J, Wang W. Piperine improves the sensitivity of osteosarcoma cells to doxorubicin by inducing apoptosis and inhibiting the PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  pathway. *J Orthop Surg Res.* 2023;18(1):180. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1186/s13018-023-03642-7.
25. Sriwiriyan S, Ninpesh T, Sukpondma Y, Nasomyon T, Graidist P. Cytotoxicity screening of plants of genus *Piper* in breast cancer cell lines. *Trop J Pharm Res.* 2014;13(6):921-928. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.4314/tjpr.v13i6.14.
26. Greenshields AL, Doucette CD, Sutton KM, Madera L, Annan H, Yaffe PB, et al. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2015;357(1):129-140. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1016/j.canlet.2014.11.017.
27. Yaffe PB, Power Coombs MR, Doucette CD, Walsh M, Hoskin DW. Piperine, an alkaloid from black pepper, inhibits growth of human colon cancer cells via G1 arrest and apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. *Mol Carcinog.* 2015;54(10):1070-1085. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1002/mc.22176.
28. Nag S, Zhang X, Srivenugopal KS, Wang MH, Wang W, Zhang R. Targeting MDM-2-p53 interaction for cancer therapy: are we there yet? *Curr Med Chem.* 2014;21(5):553-574. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.2174/09298673113206660325.
29. Caspari T. Checkpoints: how to activate p53. *Current Biology.* 2000;10(8):R315-R317. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1016/S0960-9822(00)00439-5.
30. Dutto I, Tillhon M, Cazzalini O, Stivala LA, Prosperi E. Biology of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A: molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Arch Toxicol.* 2015;89(2):155-178. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1007/s00204-014-1430-4.
31. Liao DJ, Dickson RB. c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2000;7(3):143-164. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1677/erc.0.0070143.
32. Podar K, Anderson KC. A therapeutic role for targeting c-Myc/Hif-1-dependent signaling pathways. *Cell Cycle.* 2010;9(9):1722-1728. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.4161/cc.9.9.11358.
33. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(4):177-181. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1016/j.tips.2004.02.009.
34. Fuster JJ, Sanz-González SM, Moll UM, Andrés V. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol Med.* 2007;13(5):192-199. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1016/j.molmed.2007.03.002.



35. Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(10):793-805. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1038/nrc1455.
36. Bullock AN, Henckel J, Fersht AR. Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene*. 2000;19(10):1245-1256. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1038/sj.onc.1203434.
37. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007;28(6):622-629. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1002/humu.20495.
38. Joerger AC, Ang HC, Fersht AR. Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(41):15056-15061. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1073/pnas.0607286103.
39. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(1):a001008. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1101/cshperspect.a001008.
40. Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: One name, many proteins. *Genes Dev*. 2012;26(12):1268-1286. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1101/gad.190678.112.
41. Alvarado-Ortiz E, de la Cruz-López KG, Becerril-Rico J, Sarabia-Sánchez MA, Ortiz-Sánchez E, García-Carrancá A. Mutant p53 Gain-of-Function: role in cancer development, progression, and therapeutic approaches. *Front Cell Dev Biol*. 2021;8:607670. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.3389/fcell.2020.607670.
42. de Vries A, Flores ER, Miranda B, Hsieh HM, van Oostrom CT, Sage J, et al. Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(5):2948-2953. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1073/pnas.052713099.
43. Silva JL, Gallo CVDM, Costa DCF, Rangel LP. Prion-like aggregation of mutant p53 in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2014;39(6):260-267. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1016/j.tibs.2014.04.001.
44. Silva JL, Vieira TC, Gomes MP, Bom AP, Lima LM, Freitas MS, et al. Ligand binding and hydration in protein misfolding: insights from studies of prion and p53 tumor suppressor proteins. *Acc Chem Res*. 2010;43(2):271-279. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi: 10.1021/ar900179t.
45. de Oliveira GAP, Petronilho EC, Pedrote MM, Marques MA, Vieira TCRG, Cino EA, et al. The status of p53 oligomeric and aggregation states in cancer. *Biomolecules*. 2020;10(4):548. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.3390/biom10040548.
46. Ano Bom AP, Rangel LP, Costa DC, de Oliveira GA, Sanches D, Braga CA, et al. Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils. *J Biol Chem* 2012;287(33):28152-28162. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1074/jbc.



M112.340638.

47. Rangel LP, Ferretti GDS, Costa CL, Andrade SMMV, Carvalho RS, Costa DCF, et al. P53 reactivation with induction of massive apoptosis-1 (PRIMA-1) inhibits amyloid aggregation of mutant p53 in cancer cells. *J Biol Chem.* 2019;294(10):3670-3682. [cited 2023 Jul 19]. Disponível em: doi:10.1074/jbc.RA118.004671.

48. Ghosh S, Salot S, Sengupta S, Navalkar A, Ghosh D, Jacob R, et al. P53 amyloid formation leading to its loss of function: implications in cancer pathogenesis. *Cell Death Differ.* 2017;24(10):1784-1798. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1038/cdd.2017.105.

49. Pedrote MM, Motta MF, Ferretti GDS, Norberto DR, Spohr TCLS, Lima FRS, et al. Oncogenic gain of function in glioblastoma is linked to mutant p53 amyloid oligomers. *iScience.* 2020;23(2):100820. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1016/j.isci.2020.100820.

50. Ferretti GDS, Quarti J, dos Santos G, Rangel LP, Silva JL. Anticancer therapeutic strategies targeting p53 aggregation. *Int J Mol Sci.* 2022;23(19):11023. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.3390/ijms231911023.

51. Quarti J, Torres DNM, Ferreira E, Vidal RS, Casanova F, Chiarini LB, et al. Selective cytotoxicity of piperine over multi-drug resistance leukemic cells. *Molecules.* 2021;26(4):934. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.3390/molecules26040934.

52. Mitra S, Anand U, Jha NK, Shekhawat MS, Saha SC, Nongdam P, et al. Anticancer applications and pharmacological properties

of piperidine and piperine: a comprehensive review on molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Front Pharmacol.* 2022;12:772418. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.3389/fphar.2021.772418.

53. Peng Y, Chen L, Li C, Lu W, Agrawal S, Chen J. Stabilization of the MDM2 oncoprotein by mutant p53. *J Biol Chem.* 2001;276(9):6874-6878. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1074/jbc.C000781200.

54. Nakajima W, Tanaka N. Synergistic induction of apoptosis by p53-inducible Bcl-2 family proteins Noxa and Puma. *J Nippon Med Sch.* 2007;74(2):148-157. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1272/jnms.74.148.

55. Toshiyuki M, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995;80(2):293-299. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1016/0092-8674(95)90412-3.

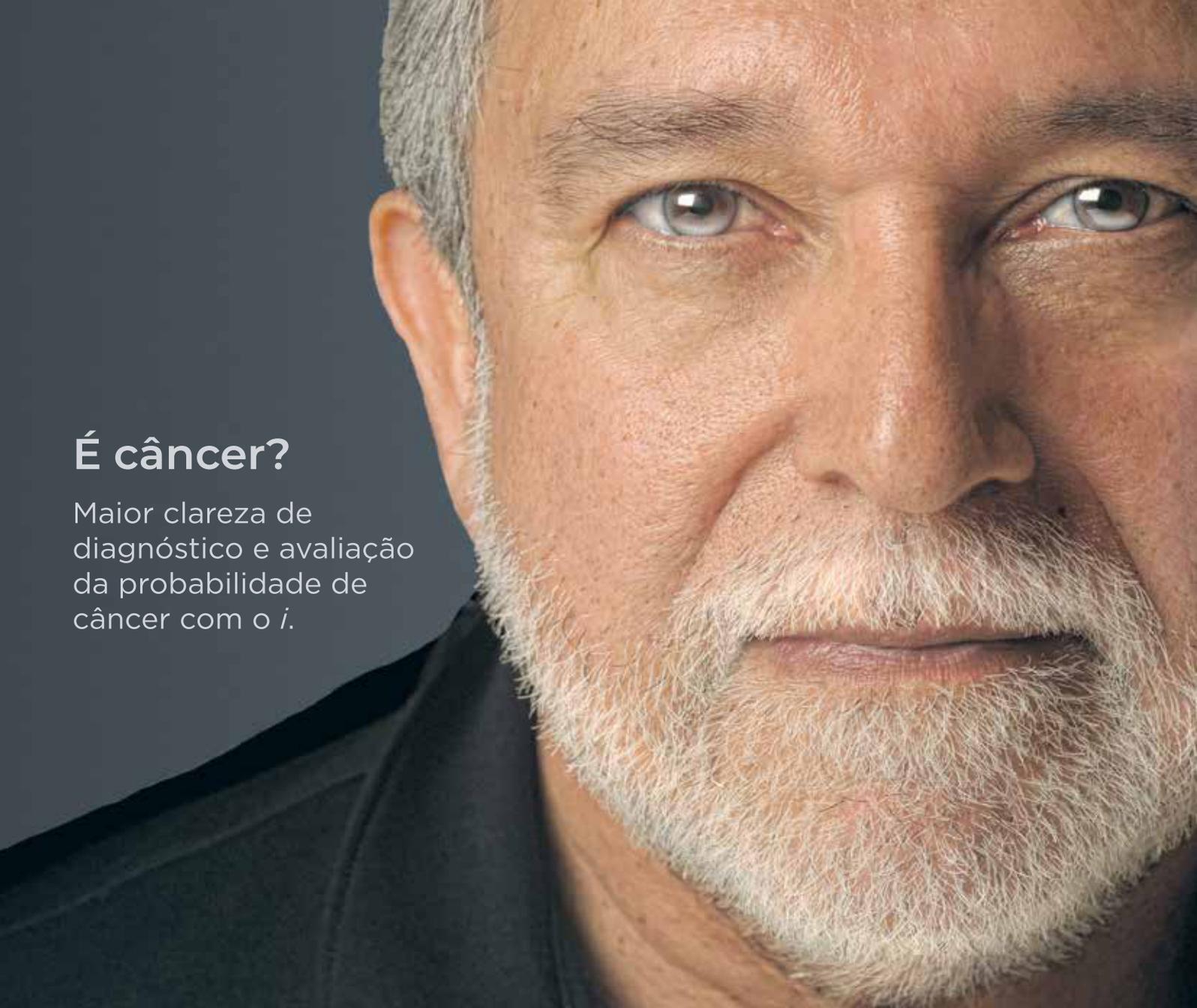
56. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene.* 1994;9(6):1799-1805.

57. Wurdeman RL, Douskey MC, Gold B. DNA methylation by N-methyl-N-nitrosourea: Methylation pattern changes in single- and double-stranded DNA, and in DNA with mismatched or bulged guanines. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(21):4975-4980. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1093/nar/21.21.4975.

58. Ho JSL, Ma W, Mao DYL, Benchimol S. p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle



- arrest. *Mol Cell Biol.* 2005;25(17):7423-7431. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1128/mcb.25.17.7423-7431.2005.
59. Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 1998;5(7):551-562. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1038/sj.cdd.4400404.
60. Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, et al. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell.* 2003;11(2):519-527. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1016/S1097-2765(03)00054-6.
61. Scott FL, Denault JB, Riedl SJ, Shin H, Renatus M, Salvesen GS. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: Evolutionary conserved mechanism of IAPs. *EMBO J.* 2005;24(3):645-655. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1038/sj.emboj.7600544.
62. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998;94(4):491-501. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1016/S0092-8674(00)81590-1.
63. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* (1979). 1994;265(5170):346-355. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1126/science.8023157.
64. Gomes AS, Trovão F, Andrade Pinheiro B, Freire F, Gomes S, Oliveira C, et al. The crystal structure of the R280K mutant of human p53 explains the loss of DNA binding. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1184. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.3390/ijms19041184.
65. Xu J, Reumers J, Couceiro JR, de Smet F, Gallardo R, Rudyak S, et al. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol.* 2011;7(5):285-295. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1038/nchembio.546.
66. de Smet F, Saiz Rubio M, Hompes D, Naus E, De Baets G, Langenberg T, et al. Nuclear inclusion bodies of mutant and wild-type p53 in cancer: a hallmark of p53 inactivation and proteostasis remodelling by p53 aggregation. *J Pathol.* 2017;242(1):24-38. [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1002/path.4872.
67. Ferraz da Costa DC, Campos NPC, Santos RA, Guedes-da-Silva FH, Martins-Dinis MMDC, Zanphorlin L, et al. Resveratrol prevents p53 aggregation in vitro and in breast cancer cells. *Oncotarget.* 2018;9(49):29112-29122 [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.18632/oncotarget.25631.
68. Katti A, Diaz BJ, Caragine CM, Sanjana NE, Dow LE. CRISPR in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2022;22(5):259-279 [cited 2023 Jul 19]. Available from: doi:10.1038/s41568-022-00441-w.



## É câncer?

Maior clareza de diagnóstico e avaliação da probabilidade de câncer com o *i*.

## » ÍNDICE DE SAÚDE DA PRÓSTATA (*phi*)

Trate seus pacientes com mais eficácia,  
identifique quais pacientes precisam de biópsia



## Mais confiança antes da biópsia

Os resultados de um ensaio clínico prospectivo multicêntrico demonstraram que o *phi* pode fornecer melhor estratificação de risco em comparação a %fPSA para identificar os pacientes que realmente precisam de uma biópsia.

**Ele pode reduzir as biópsias desnecessárias em até 30%.**

Reduções nas biópsias têm sido observadas na prática clínica.<sup>3,4</sup>

### ● ACELERE O TRATAMENTO COM INFORMAÇÕES IMPORTANTES

Para obter mais informações sobre o *phi*, acesse [www.ProstateHealthIndex.org](http://www.ProstateHealthIndex.org)



#### Referências

1. EAU guidelines: Mottet N, van den Bergh RCN, Briers E, et al. EAU-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. 2018.
2. Stephan et al. Multicenter evaluation of [-2] proprostate-specific antigen and the prostate health index for detecting prostate cancer.
3. White J, Shenoy BV, Tutrone RF, et al. Clinical utility of the Prostate Health Index (*phi*) for biopsy decision management in a large group urology practice setting. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2018, 21(1):7884.
4. Tosoian JJ, Druskin SC, Andreas D, et al. Use of the Prostate Health Index for detection of prostate cancer: results from a large academic practice. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2017, 20(2):228233.
5. Catalona W. et al. A Multi-Center Study of [-2]Pro-Prostate-Specific Antigen (PSA) in Combination with PSA and Free PSA for Prostate Cancer Detection in the 2.0 to 10.0 ng/mL PSA Range *J Urol.* 2011 May ; 185(5): 16501655.
6. Loeb, S. et al. The Prostate Health Index Selectively Identifies Clinically Significant Prostate Cancer. *J Urol.* 2015;193:1163-69.

Os resultados do *phi* são destinados ao uso como um auxílio para a distinção entre câncer de próstata e condições benignas da próstata em indivíduos com 50 anos de idade ou mais com resultados de PSA total na faixa de 210 ng/mL e achados do exame de toque retal (ERD) negativos.

Resultados da biópsia de pacientes na faixa de 210 ng/mL.

© 2019 Beckman Coulter, Inc. Todos os direitos reservados. A Beckman Coulter, o logotipo estilizado e as marcas de produtos e serviços da Beckman Coulter mencionados neste documento são marcas comerciais ou marcas comerciais registradas da Beckman Coulter, Inc. nos Estados Unidos e em outros países.

Para consultar as localizações dos escritórios e os números de telefone da Beckman Coulter a nível global, visite [www.beckmancoulter.com/contact](http://www.beckmancoulter.com/contact)

BR-231102 PT-BR

