



INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL E DA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE E6 POR SAIS IMIDAZÓLICOS EM CÉLULAS DE CARCINOMA CERVICAL HPV-16 POSITIVAS

Clarissa M. L. Schrekker¹, Rodrigo Webber², Fatima M. Bento¹, Marcelo L. Lamers¹, Marília F. Calmon³, Paula Rahal³, Henri S. Schrekker²

¹Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, SP, Brasil.

cla.schrekker@gmail.com

Palavras-Chave: Sais imidazólicos, HPV-16, Oncoproteína E6.

Introdução

O papilomavírus humano (HPV) compreende um grupo de vírus de DNA pertencentes à família *Papillomaviridae*, capazes de infectar células epiteliais da pele e das mucosas. Embora grande parte das infecções seja transitória, a persistência de genótipos de alto risco oncogênico, especialmente HPV-16 e HPV-18, está associada ao desenvolvimento de diferentes neoplasias, com particular relevância para o câncer do colo do útero (James et al., 2025). Nesse processo, as oncoproteínas virais E6 e E7 desempenham papel central na transformação e manutenção do fenótipo tumoral. E6 promove a degradação da proteína supressora tumoral p53, enquanto E7 interfere na função da proteína do retinoblastoma (pRb), contribuindo para proliferação celular desregulada, resistência à morte celular e instabilidade genômica. Dessa forma, a expressão de E6 constitui um importante parâmetro molecular para a investigação de células tumorais HPV-positivas (Pytnia et al.; 2015).

A vacinação, associada ao rastreamento e ao diagnóstico precoce de lesões precursoras, constitui uma estratégia fundamental para reduzir a incidência das neoplasias relacionadas ao HPV. Entretanto, pacientes com doença persistente, recorrente ou avançada ainda podem apresentar limitações terapêuticas, resistência ao tratamento e efeitos adversos associados às abordagens convencionais. Nesse contexto, permanece relevante a investigação de novas moléculas bioativas capazes de atuar sobre células tumorais e sobre mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese associada ao HPV.

Entre as classes de compostos com potencial para essa finalidade estão os sais imidazólicos (SI). Sua elevada versatilidade estrutural permite modificações nas cadeias carbônicas, nos grupos substituintes ligados ao anel imidazólico e nos contraíons, influenciando suas propriedades físico-químicas e biológicas (Hejazifar et al., 2016; Schrekker et al., 2016). Diferentes SI têm demonstrado atividade antitumoral, incluindo efeitos sobre viabilidade celular, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), migração e mecanismos de morte

celular. Características como comprimento da cadeia alquílica, hidrofobicidade e natureza dos grupos substituintes podem modificar sua interação com membranas e componentes intracelulares, possibilitando investigar relações entre estrutura química e atividade biológica (Schrekker et al. 2026).

Nesse sentido, os sais cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio ($C_{16}MImCl$), cloreto de 1-metil-3-octadecilimidazólio ($C_{18}MImCl$) e cloreto de 1-benzil-3-hexadecilimidazólio ($C_{16}BnImCl$) (Khe et al.; 2024), constituem um conjunto relevante para avaliação comparativa, permitindo investigar preliminarmente a influência do comprimento da cadeia alquílica e da presença do grupo benzila sobre sua atividade biológica (**Figura 1**).

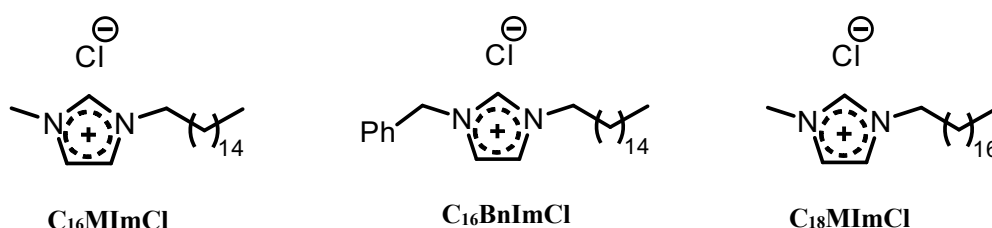


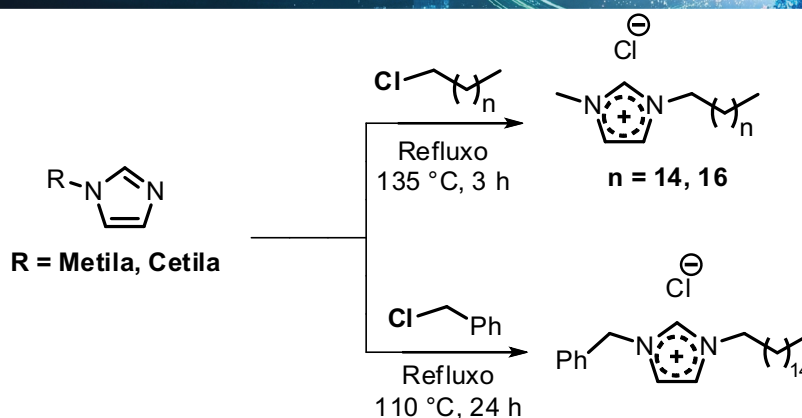
Figura 1. Estruturas químicas dos sais imidazólicos $C_{16}MImCl$, $C_{16}BnImCl$ e $C_{18}MImCl$.

Apesar das evidências de atividade antitumoral dos SI, seus efeitos sobre mecanismos moleculares associados às oncoproteínas virais em células tumorais HPV-positivas permanecem pouco explorados. Particularmente, ainda não está estabelecido se diferenças estruturais entre SI podem estar associadas, além da citotoxicidade, à modulação da expressão de genes virais envolvidos na manutenção do fenótipo tumoral.

Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica dos SI $C_{16}MImCl$, $C_{16}BnImCl$ e $C_{18}MImCl$ em células de carcinoma cervical CaSki HPV-16 positivas e investigar seus efeitos sobre a expressão relativa do oncogene viral E6, buscando identificar compostos promissores e possíveis relações entre estrutura química, atividade antitumoral e modulação de um marcador molecular associado à carcinogênese induzida pelo HPV-16.

Material e Métodos

Os SI cloreto de $C_{16}MImCl$, $C_{18}MImCl$ e $C_{16}BnImCl$ foram sintetizados conforme procedimentos previamente descritos na literatura (Khe et al., 2024; Thomas et al., 2018), conforme o **Esquema 1**.



Esquema 1. Sínteses dos sais imidazólicos $C_{16}MImCl$, $C_{16}BnImCl$ e $C_{18}MImCl$.

A linhagem de carcinoma cervical HPV-16 positiva CaSki (ATCC CRL-1550) foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Cultilab, BR) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, BR) e 1% de penicilina (10.000 UI/mL)/estreptomicina (10 mg/mL) (Gibco, USA), a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 .

A viabilidade celular após exposição aos SI foi determinada pelo ensaio de MTT. As células foram semeadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) e mantidas por 24 h para aderência. Em seguida, foram tratadas com $C_{16}MImCl$, $C_{16}BnImCl$ ou $C_{18}MImCl$ nas concentrações de 0,04; 0,08; 0,16; 0,31; 0,62; 1,25; 2,50 e 5,00 mg/mL por 24 h. Após o tratamento, o meio foi removido e adicionaram-se 100 μ L de MTT (1 mg/mL em DMEM) por poço. Após 30 min de incubação a 37 °C, o MTT foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados com 100 μ L de DMSO, sob agitação a 200 rpm por 5 min. A absorbância foi determinada a 572 nm, e a viabilidade celular foi expressa em relação ao controle não tratado. Os experimentos foram realizados em três ensaios independentes, com três réplicas.

Para avaliação da expressão de E6 do HPV-16, células CaSki foram semeadas em placas de 12 poços (2×10^5 células/poço). Após 24 h, foram tratadas com $C_{16}MImCl$, $C_{16}BnImCl$ e $C_{18}MImCl$ em concentrações selecionadas a partir dos resultados do ensaio de MTT e incubadas por 24 h. Células não tratadas e células expostas ao veículo foram utilizadas como controles. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min para obtenção do pellet celular (Khamseh et al.; 2025).

O RNA total foi isolado utilizando TRIzol, e 1 μ g de RNA de cada amostra foi submetido à transcrição reversa com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, utilizando iniciadores aleatórios. A síntese de cDNA foi realizada a 25 °C por 10 min, 37 °C por 2 h e 85 °C por 5 min. A expressão relativa de E6 foi determinada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) no sistema QuantStudio 12K Flex. A reação continha os seguintes componentes: 10 μ L de GoTaq Probe qPCR master mix (Promega, EUA), 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo¹, 0,25 μ M de sonda e 2 μ L de cDNA (100 ng) e água livre de nucleases até completar o volume de 20 μ L. A ciclagem consistiu em 95 °C por 2 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 56 °C por 1 min. A PCR em tempo real foi realizada em triplicata para cada amostra. O nível de expressão das amostras estudadas foi calculado com base no método delta-delta CT, ajustado para a expressão de *RNaseP* (controle endógeno) e em relação ao nível de expressão da amostra calibradora (controle de veículo).

Resultados e Discussão

Os sais imidazólicos $C_{16}MImCl$ e $C_{18}MImCl$ foram sintetizados de acordo com procedimento descrito na literatura (Thomas et al., 2018), por reação de quaternização do 1-metilimidazol com o respectivo cloreto de alquila. O 1-metilimidazol (2,10 mmol; 1,00 equiv.) e o cloreto de alquila correspondente (2,20 mmol; 1,05 equiv.) foram misturados e mantidos sob refluxo a 135 °C por 3 h. Após resfriamento à temperatura ambiente, o produto foi lavado com acetato de etila. O sólido cristalino branco obtido foi isolado por filtração, novamente lavado com acetato de etila e seco em estufa a vácuo. Os rendimentos obtidos foram de 85% para $C_{16}MImCl$ e 83% para $C_{18}MImCl$.

O $C_{16}BnImCl$ foi preparado empregando procedimento descrito na literatura, com modificações (Khe et al.; 2024). Uma mistura de 1-hexadecilimidazol (1,00 mmol; 1,00 equiv.) e cloreto de benzila (2,00 mmol; 2,00 equiv.) foi mantida sob refluxo a 110 °C por 24 h. Após o término da reação, o produto bruto foi recrystalizado em acetato de etila, fornecendo $C_{16}BnImCl$ como sólido branco-pálido, com rendimento de 76%.

A atividade dos SI foi inicialmente avaliada pelo ensaio de MTT em células de carcinoma cervical CaSki, modelo HPV-16 positivo. Os SI $C_{16}MImCl$, $C_{16}BnImCl$ e $C_{18}MImCl$ apresentaram redução da viabilidade celular dependente da concentração após 24 h de exposição, sendo os efeitos mais pronunciados nas maiores concentrações avaliadas (**Figura 2**). Em concentrações menores, observou-se maior preservação da atividade metabólica celular. As diferenças de resposta entre os compostos sugerem que modificações estruturais dos SI influenciam sua atividade biológica.

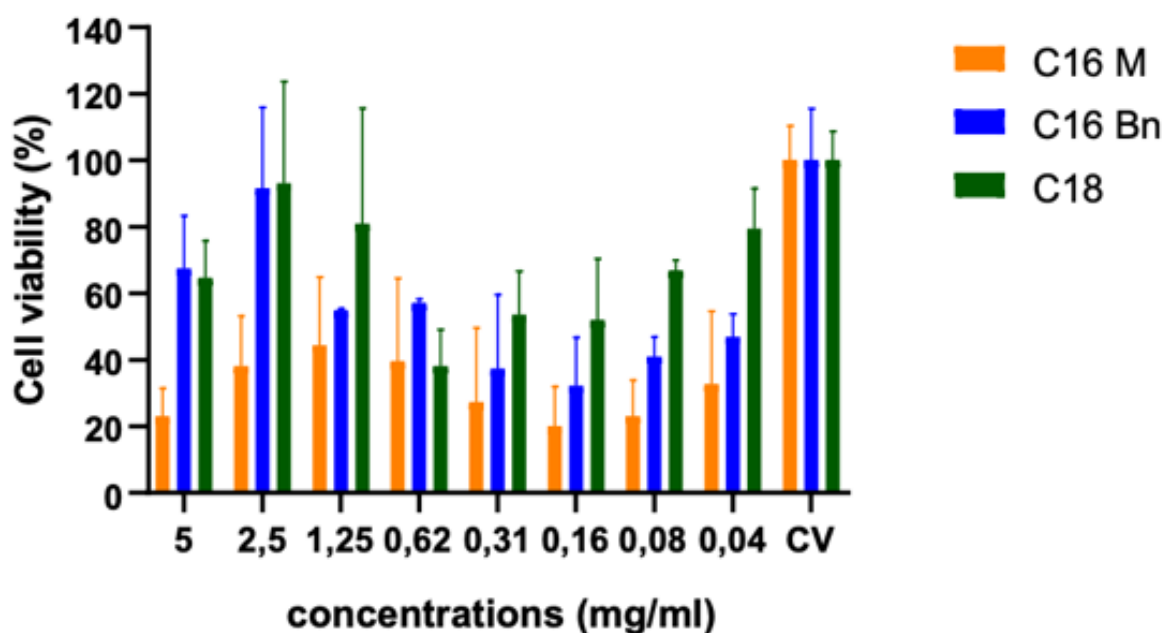


Figura 2. Efeito dos sais imidazólicos $C_{16}MImCl$, $C_{16}BnImCl$ e $C_{18}MImCl$ sobre a viabilidade de células de carcinoma cervical CaSki HPV-16 positivas. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT após 24 h de exposição aos compostos nas concentrações de 0,04 a 5,00

mg/mL. Os resultados são expressos como porcentagem de viabilidade em relação ao controle não tratado e representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata.

A comparação entre $C_{16}\text{MImCl}$, $C_{18}\text{MImCl}$ e $C_{16}\text{BnImCl}$ permite uma análise preliminar da relação entre estrutura química e atividade biológica. O aumento da cadeia alquílica e a introdução de diferentes grupos substituintes podem alterar propriedades físico-químicas relevantes, como hidrofobicidade e interação com membranas celulares. Entretanto, os resultados obtidos não permitem estabelecer quais propriedades são responsáveis pelas diferenças de citotoxicidade observadas, sendo necessários estudos adicionais de relação estrutura-atividade.

A partir dos resultados de viabilidade celular, foram selecionadas condições experimentais que permitissem investigar o efeito dos SI sobre a expressão relativa do oncogene E6 do HPV-16. A análise por qPCR demonstrou redução da expressão relativa de E6 após o tratamento com $C_{16}\text{BnImCl}$ e $C_{18}\text{MImCl}$, avaliados na concentração de 2,5 mg/mL, com maior redução observada para $C_{16}\text{BnImCl}$ (**Figura 3**). Esse resultado é relevante porque E6 desempenha papel central na carcinogênese associada ao HPV-16, incluindo sua participação na inativação da proteína supressora tumoral p53 e, consequentemente, na manutenção da sobrevivência e proliferação das células transformadas.

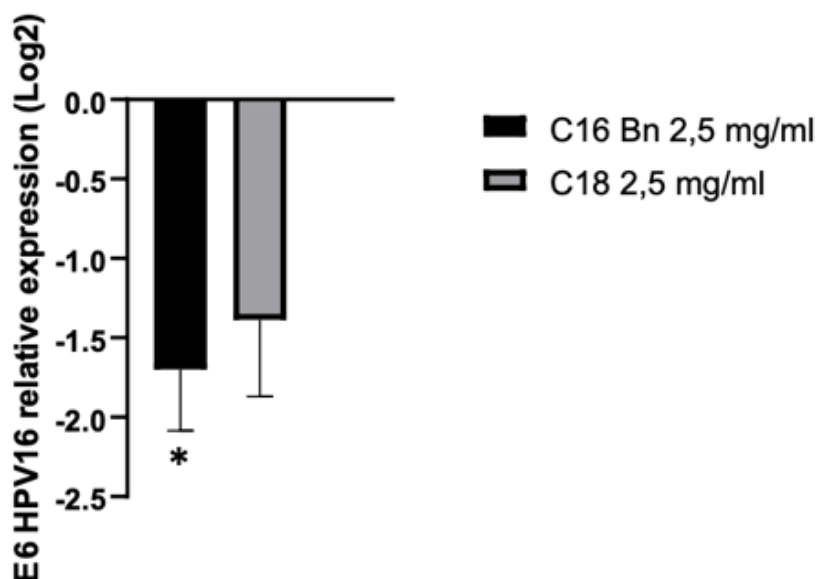


Figura 3. Expressão relativa do oncogene E6 do HPV-16 em células de carcinoma cervical CaSki após 24 h de exposição aos sais imidazólicos $C_{16}\text{BnImCl}$ e $C_{18}\text{MImCl}$, na concentração de 2,5 mg/mL. A expressão gênica foi determinada por qPCR e calculada pelo método delta-delta CT, ajustado para a expressão de *RNaseP* (controle endógeno) e em relação ao nível de expressão da amostra calibradora (controle de veículo).

Entre os compostos avaliados, $C_{16}\text{BnImCl}$ apresentou o perfil mais promissor, associando atividade citotóxica à maior redução da expressão relativa de E6. Uma possível hipótese para esse comportamento envolve a presença do grupo benzila, que diferencia $C_{16}\text{BnImCl}$ dos sais contendo apenas substituintes alquílicos e pode modificar suas



propriedades físico-químicas e interações com componentes celulares. Essa interpretação, entretanto, deve ser considerada uma hipótese de relação estrutura-atividade, uma vez que os dados disponíveis não permitem estabelecer uma relação causal entre a presença do grupo benzila e a modulação de E6.

A redução da expressão de E6 observada para C₁₆BnImCl e C₁₈MImCl constitui uma evidência inicial de modulação de um marcador molecular associado à carcinogênese pelo HPV-16. Entretanto, os resultados atuais não permitem determinar se essa redução decorre de uma ação específica sobre mecanismos relacionados à expressão de E6 ou se está, ao menos parcialmente, associada às alterações de viabilidade e atividade metabólica induzidas pelos SI. A avaliação da expressão de E6 em condições subcitotóxicas e em diferentes concentrações e tempos de exposição será importante para estabelecer a relação entre esses fenômenos.

Da mesma forma, a redução de E6 em células CaSki não deve ser interpretada, isoladamente, como demonstração de atividade antiviral contra o HPV-16. Os resultados indicam atividade antitumoral associada à modulação de um oncogene viral em um modelo celular HPV-16 positivo, enquanto a demonstração de um efeito antiviral exigirá abordagens experimentais específicas. Estudos adicionais deverão ainda avaliar a resposta em outras linhagens HPV-positivas e HPV-negativas, bem como em células não tumorais, permitindo investigar a seletividade dos compostos e a eventual dependência do efeito em relação ao status de HPV.

Em conjunto, os resultados demonstram que C₁₆MImCl, C₁₆BnImCl e C₁₈MImCl apresentam atividade citotóxica em células CaSki, enquanto C₁₆BnImCl e C₁₈MImCl foram associados à redução da expressão relativa de E6 nas condições avaliadas. O destaque observado para C₁₆BnImCl justifica sua priorização em estudos posteriores envolvendo diferentes condições de exposição, avaliação de E6/E7 e de proteínas relacionadas às suas vias de ação, particularmente p53 e pRb, além da investigação dos mecanismos de morte celular. Esses estudos poderão esclarecer a relação entre estrutura química, atividade antitumoral e modulação de mecanismos moleculares associados à carcinogênese induzida pelo HPV-16.

Conclusões

Os resultados demonstram que os SI C₁₆MImCl, C₁₆BnImCl e C₁₈MImCl apresentam atividade citotóxica dependente da concentração em células de carcinoma cervical CaSki HPV-16 positivas. Além disso, C₁₆BnImCl e C₁₈MImCl promoveram redução da expressão relativa do oncogene E6, destacando-se o C₁₆BnImCl pela associação entre atividade citotóxica e maior redução da expressão desse marcador molecular. Esses achados constituem evidências preliminares de que determinados SI, além de afetarem a viabilidade de células tumorais, podem modular a expressão de um oncogene relevante para a carcinogênese associada ao HPV-16. Entretanto, estudos adicionais são necessários para determinar a relação entre a redução da viabilidade celular e a modulação de E6, bem como para estabelecer a seletividade e os mecanismos de ação envolvidos. Nesse contexto, o C₁₆BnImCl apresenta-se como o composto mais promissor para investigações posteriores do potencial antitumoral dos SI em modelos de neoplasias HPV-positivas.



Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro, por meio do Edital nº 24/2551-0001744-5, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

- HEJAZIFAR, M. et al. Ionic liquid-based microemulsions in catalysis. **J Org Chem**. 81(24): 12332-12339. 2016.
- JAMES CD. et al. Fibroblasts regulate the transcriptional signature of human papillomavirus-positive keratinocytes. **Tumor Virus Research**. 19: 200302. 2025.
- KHAMSEH A, FARHADI A, JALILVAND S. et al. Analysis of HPV-16 viral load, integration status, and p16 expression in relation to EBV co-infection and cervical lesion severity. *Sci Rep*. 2025;15(1):8329. doi:10.1038/s41598-025-93358-x.
- KHE JM; FONG Z; LEE WL. et al. Synthesis, characterization and biological evaluation of novel bisimidazolium mononuclear and dinuclear silver(I)-N-heterocyclic carbene complexes with long N-alkyl chains. **Journal of Organometallic Chemistry**. 1009(2024): 123076.
- SCHREKKER CML. et al. Multitask imidazolium salt additives for innovative poly(l-lactide) biomaterials morphology control, Candida spp. biofilm inhibition, human mesenchymal stem cell biocompatibility, and skin tolerance. **ACS Appl Mater Interface**. 8(33): 21163-21176. 2016. 10.1021/acsami.6b06005
- SCHREKKER CML; BARRA T; VIEIRA MO. et al. Selective anticancer activity of imidazolium salts in prostate cancer cells via ROS-mediated mechanisms. *Bioorganic Chemistry*. 181:110264. 2026. doi: 10.1016/j.bioorg.2026.110264
- PYTYNIA, et al. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**. 50(5): 380-386. 2015.
- THOMAS E. et al. 1-Hexadecyl-3-methylimidazolium chloride: structure, thermal stability, and decomposition mechanism. **J Mol Liq**. 249: 404-411. 2018.