



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

Luana Pereira Cardoso

**Efeito antitumorigênico da piperina em câncer de colo de útero modulado
pela via cicloxigenase prostaglandina**

São José do Rio Preto
2022

Luana Pereira Cardoso

**Efeito antitumorigênico da piperina em câncer de colo de útero modulado
pela via cicloxigenase prostaglandina**

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: CAPES - Proc. 88887.482914/2020-00

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

São José do Rio Preto
2022

C268e Cardoso, Luana Pereira
 Efeito antitumorigênico da piperina em câncer de colo
 de útero modulado pela via cicloxigenase prostaglandina /
 Luana Pereira Cardoso. -- São José do Rio Preto, 2022
 82 p. : il., tabs., fotos

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

 1. Inflamação. 2. Fitoterápicos. 3. Cicloxigenase 2. 4.
 Metaloproteinases. 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.

Luana Pereira Cardoso

**Efeito antitumorigênico da piperina em câncer de colo de útero modulado
pela via cicloxigenase prostaglandina**

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: CAPES - Proc. 88887.482914/2020-00

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora pelo PPG-Biociências IBILCE/UNESP

Prof. Dr. Andréia Machado Leopoldino
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Prof. Dr. Cristiane Damas Gil
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM
Membro do PPG-Biociências IBILCE/UNESP

São José do Rio Preto
15 de Agosto de 2022

À minha família que é a minha base e apesar do pouco conhecimento compreende minha
paixão pela ciência.

À minha querida orientadora Flávia, responsável pela cientista que sou e pela cientista que me
tornarei

Aos meus professores e colegas de turma da graduação que contribuíram para minha
formação crítica me fazendo quem eu sou como Bióloga

A todos os cientistas brasileiros que apesar de pouco suporte continuam amando e fazendo
ciência no Brasil

A Deus, aquele que acredito ter me dado forças para não desistir e continuar me esforçando

Aos meus amigos que me trazem alegrias, reflexões, saudades, conversas boas e muito amor
nessa vida

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elcio e Maria Rosa, que me apoiaram na carreira acadêmica, mesmo não a compreendendo inteiramente, mas por ver dentro de mim que a pesquisa é minha maior paixão.

À minha orientadora Flávia, por todos os ensinamentos compartilhados, referente a bancada, método científico, escrita acadêmica e pessoais que me fizeram crescer a cada dia como cientista.

Às políticas de permanência estudantil que me concederam bolsas, moradia e todo suporte para dedicação exclusiva à graduação.

À FAPESP pelo financiamento das minhas Iniciações Científicas que teve um papel importante na minha formação acadêmica até então.

Ao Ibilce por toda a estrutura física e de profissionais, que permitiu que cada experimento fosse realizado.

Aos meus amigos, principalmente Alessandra que sempre esteve ao meu lado me dando apoio e alegrias mesmo distantes

À minha amiga e companheira de laboratório Stefanie por todo apoio, ensinamentos e discussões científicas que traçamos durante nosso dia a dia juntas.

Ao meu grupo de pesquisa, Flávia, Stefanie, Juliana, Barbara, Sônia, Mayk e Laura, que estiveram comigo no laboratório e nas reuniões para discussões científicas. Cada comentário, elogio e crítica fizeram melhor esse trabalho e minha formação.

À professora Sonia Oliani, por nos permitir ocupar seu laboratório e por nos dar suporte para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao professor Sebastião Taboga por disponibilizar o uso do microscópio de fluorescência em seu laboratório, além de orientar sobre o uso do mesmo.

À professora Marília de Freitas Calmon por nos ceder uma alíquota de células CaSki, bem como por disponibilizar o uso do invertoscópio de fluorescência em seu laboratório. Muito obrigada!

À professora Cláudia Carareto por ceder a sala escura de seu laboratório para a revelação dos western blot, obrigada, foi de grande ajuda para gerar nossos resultados.

Ao professor Marinonio Cornelio por nos ceder a piperina para os ensaios e nos ajudar na diluição.

À banca de qualificação de mestrado, Marília de Freitas Calmon e Cristiéle da Silva Ribeiro, por todas as críticas, sugestões e elogio ao meu trabalho, cada comentário contribuiu muito para a melhora da qualidade dessa pesquisa.

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

88887.482914/2020-00, à qual agradeço pela bolsa que permitiu minha dedicação exclusiva a essa pesquisa.

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).

"Nobody warned you that the women whose feet you cut from running would give birth to daughters with wings: [Ninguém te avisou que as mulheres cujo os pés foram impedidos de correr daria á luz filhas com asas]" Ijeoma Umebinyuo (2016, p. 4)

*"... where ignorance is bliss,
'tis folly to be wise [quando a ignorância é felicidade,
É loucura ser sábio]" Thomas Gray Archive (1742, p. 99)*

*"Ubi dubium ibi libertas: [Onde há dúvida, há liberdade.]
Provérbio latino" Carl Sagan (1996, p. 343)*

RESUMO

O câncer cervical é o quarto tipo de câncer que mais causa morte em mulheres no mundo, sendo principalmente decorrente da infecção persistente pelo vírus do HPV, que atua como um estímulo inflamatório, desencadeando a secreção de citocinas e a ativação da via da cicloxigenase 2 (PTGS2) e das proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPKs), que induz a síntese de metaloproteínas de matriz (MMPs). Sabendo da inflamação envolvida nesse tipo de câncer, o uso de anti-inflamatórios se torna uma opção de tratamento, como a piperina que é um amino alcaloide derivado da *Piper nigrum*, que além do desse efeito, possui propriedade antitumorígenica demonstrada em vários modelos, mas é pouco compreendida na inflamação do câncer cervical, tornando um alvo de pesquisa. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito antitumoral de piperina *in vitro* em câncer cervical e determinar se esse efeito é modulado pela via PTGS2. Para isso, as células HeLa, SiHa, CaSki e HaCaT foram tratadas com piperina e avaliadas quanto a morfologia, proliferação, viabilidade e migração celular, formação de colônias, apoptose e ciclo celular, visando compreender o efeito de piperina sobre transformação neoplásica, além dos ensaios de qPCR e Western Blot das vias PTGS2 e MMPs, ELISA das citocinas IL-1 β , IL-8 e MCP-1 e imunocitoquímica das MAPKs (p38 e ERK), visando compreender como piperina modula essas vias inflamatórias. Os resultados mostraram que piperina alterou a morfologia das células, reduziu a proliferação e viabilidade celular, com efeitos menos acentuados nas células não tumorais que também apresentou IC₅₀ superior. Piperina também reduziu a formação de colônia, conduziu a parada das células na fase G1/G0 e G2/M do ciclo celular, com posterior indução a apoptose. Quanto a modulação das vias inflamatórias, piperina reduziu a expressão de PTGS2 e dos receptores 3 e 4 da PGE2 (PTGER3 e PTGER4), o que refletiu na redução da secreção das citocinas IL-1 β , IL-8 e MCP-1, junto a redução da expressão de p38 e ERK. Além disso, piperina inibiu a migração celular, devido a redução da expressão de MMP2 e MMP9 e aumento da expressão de TIMP1 e TIMP2. Portanto, piperina reduz parâmetros associados a evolução neoplásica *in vitro* por atuar sobre a via PTGS2, que por sua vez regula a secreção de citocinas e a expressão de MAPKs, MMPs e TIMPs, demonstrando ser um potencial fitoterápico para tratamento complementar de câncer de colo de útero.

Palavras-chave: Inflamação. Fitoterápicos. Cicloxigenase 2. Metaloproteínas.

ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth type of cancer that causes more death in women in the world, being mainly due to persistent infection by the HPV virus, which acts as an inflammatory stimulus, triggering the secretion of cytokines and the activation of the cyclooxygenase 2 (PTGS2) and mitogen-activated protein kinase (MAPKs) pathway, which induces the synthesis of matrix metalloproteinases (MMPs). Knowing the inflammation involved in this type of cancer, the use of anti-inflammatory drugs becomes a treatment option, such as piperine, which is an amino alkaloid derived from *Piper nigrum*, which, in addition to this effect, has antitumor property demonstrated in several models, but is poorly understood in cervical cancer inflammation, making it a research target. Thus, the aim of this work was to investigate the antitumor effect of piperine in vitro on cervical cancer and to determine whether this effect is modulated by the PTGS2 pathway. For this, HeLa, SiHa, CaSki and HaCaT cells were treated with piperine and evaluated for morphology, proliferation, viability and cell migration, colony formation, apoptosis and cell cycle were evaluated, aiming to understand the effect of piperine on neoplastic transformation and the qPCR and Western Blot assays of PTGS2 and MMPs pathways, ELISA of IL cytokines IL-1 β , IL-8 and MCP-1 and immunocytochemistry of MAPKs p38 and ERK, aiming to understand how piperine modulates these inflammatory pathways. The results showed that piperine altered cell morphology, reduced cell proliferation and viability, with less pronounced effects on non-tumor cells that also showed higher IC₅₀. Piperine also reduced colony formation, leading to cell arrest in the G1/G0 and G2/M phases of the cell cycle, with subsequent induction of apoptosis. As for the modulation of inflammatory pathways, piperine reduced the expression of PTGS2 and PGE2 receptors 2, 3 and 4 (PTGER2, PTGER3 and PTGER4), which reflected in the reduction of the secretion of the cytokines IL-1 β , IL-8 and MCP-1, together with reduced expression of p38 and ERK. In addition, piperine inhibited cell migration, due to reduced expression of MMP2 and MMP9 and increased expression of TIMP1 and TIMP2. Therefore, piperine reduces parameters associated the neoplastic evolution in vitro by acting on the PTGS2 pathway, which in turn regulates the secretion of cytokines and the expression of MAPKs, MMPs and TIMPs, proving to be a phytotherapeutic potential for complementary treatment of cervical cancer.

Keywords: Inflammation. Herbal medicines. Cyclooxygenase 2. Metalloproteinases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Figura 1 – Representação gráfica do câncer cervical desencadeado pela inflamação na infecção pelo HPV	16
Figura 2 – Representação gráfica da ação das citocinas no câncer cervical	18
Figura 3 – Representação gráfica do efeito da infecção pelo HPV na via PTGS2	19
Figura 4 – Via PTGS2/PGE2/PTGERs no câncer cervical	21
Figura 5 – Via MMPs/TIMPs no câncer cervical	25
Artigo: Piperine reduces neoplastic progression in cervical cancer by downregulating cyclooxygenase 2 pathway	
Figura 1 – Piperina altera morfologia, viabilidade e proliferação celular.	34
Figura 2 – Piperina inibe a formação de colônias, prejudica a progressão do ciclo celular e induz a apoptose por fragmentação do DNA	36
Figura 3 – Piperina reduz migração celular em câncer cervical por meio da regulação de metaloproteinases de matriz e seus antagonistas	38
Figura 4 - Piperina reduz a tumorigênese por regular a via inflamatória PTGS2 e a secreção de citocinas	40
Figura 5: Piperina reduz a expressão de oncogenes do HPV16 nas células CaSki	41
Figura 6 - Piperina modula a expressão de p38.	42
Figura 7 - Piperina modula a expressão de ERK	44
Figura 8 – Representação gráfica da modulação de piperina sobre IL-1 β e PTGS2	48

LISTA DE TABELAS

Artigo: Piperine reduces neoplastic progression in cervical cancer by downregulating cyclooxygenase 2 pathway

Tabela 1 – Índice de citotoxicidade de piperina nas células HeLa, SiHa, CaSki e HaCaT nos tempos de 4, 24, 48 e 72h	35
Tabela 2 – Primers utilizados na PCR em tempo real	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ACTB</i>	Beta actina gene
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
Akt	Proteína quinase B
AP-1	Proteína ativadora 1
ATCC	American Tissue Cell Culture
Bax	Proteína X associada a bcl 2
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CDK3	Quinase dependente de ciclina 3
CDK9	Quinase dependente de ciclina 9
cDNA	DNA complementar
Chk1	Ponto de verificação quinase 1
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E5	Oncoproteína do HPV E5
E6	Oncoproteína do HPV E6
E7	Oncoproteína do HPV E7
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EMT	Transição epitélio mesenquimal
ERK	Quinases reguladas por sinais extracelulares
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene
GSK3	Glicogênio sintase quinase 3
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HRP	Peroxidase Horseradish
IgG	Imunoglobina G
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico sintase induzido
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MAPKK	Proteína quinase quinase ativada por mitógeno

MCP-1	Proteína Quimiotática para Monócitos
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases de matriz
MMP13	Metaloproteinase de matriz 13
MMP2	Metaloproteinase de matriz 2
MMP9	Metaloproteinase de matriz 9
mTOR	Alvo mecanístico da rapamicina
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NOS-2	Óxido nítrico sintase 2
p53	Proteína de tumor
PAI-1	Inibidor 1 do ativador do plasminogênio
PBS	Tampão Fosfato Salino
PBST	PBS com tween
PGE2	Prostaglandina E2
PKA	Proteína quinase A
PKCα	Proteína quinase alfa
PLA2	Fosfolipase A2
pRB	Proteína do retinoblastoma
PTGER1	Receptor 1 da prostaglandina E2
PTGER2	Receptor 2 da prostaglandina E2
PTGER3	Receptor 3 da prostaglandina E2
PTGER4	Receptor 4 da prostaglandina E2
PTGS1	Ciclooxigenase 1
PTGS2	Ciclooxigenase 2
Raf-1	Serina/treonina quinase RAF
Ras	Proteína Ras
STAT3	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TGF	Fator de crescimento transformador
TUBB	Beta tubulina gene
U	Ubitiquina
uPAR	Receptor de uroquinase
UV-B	Raios ultravioletas B
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	Nanômetro
kcal	Quilo calorías
μM	Micromolar
μL	Micro litro
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
μm	Micrometro
μg	Micrograma
M	Molar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Câncer de colo de útero	13
1.2	Câncer cervical e inflamação	14
1.3	Papel da PTGS2 na inflamação associada ao câncer	18
1.4	Papel da via p38/MAPK e ERK/MAPK na inflamação associada ao câncer	21
1.5	Papel da via MMP na inflamação e metástase associada ao câncer	23
1.6	Agentes Anti-inflamatórios e câncer	25
1.7	Piperina no câncer	26
2	OBJETIVO	29
2.1	Objetivos gerais	29
2.2	Objetivos específicos	29
3.	ARTIGO: PIPERINE REDUCES NEOPLASTIC PROGRESSION IN CERVICAL CANCER BY DOWNREGULATING CYCLOOXYGENASE 2 PATHWAY	30
4	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de colo de útero

O câncer, no sentido mais amplo, refere-se a mais de 277 tipos diferentes de doenças ocasionadas por uma série de mutações sucessivas em genes associados a proliferação, morte celular e reparo do DNA, bem como alterações epigenéticas. Essas mutações mudam as funções celulares, atuando no descontrole do ciclo celular que gera o aumento da proliferação e inibição da apoptose (EVAN; VOUSDEN, 2001; HASSANPOUR; DEHGHANI, 2017).

Segundo dados da GLOBOCAN 2020, houveram cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer (18,1 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) e quase 10,0 milhões de mortes por câncer (9,9 milhões excluindo câncer de pele não melanoma). Estimativas para 2040 calculam 28,4 milhões de casos, um aumento de 47% em relação a 2020, com um maior aumento nos países em desenvolvimento (64% a 95%) em comparação com países desenvolvidos (32% a 56%), em função das mudanças demográficas. Esse acréscimo pode ser devido ao aumento dos fatores de riscos associados à globalização e ao crescimento da economia (SUNG et al., 2021).

Especificamente o câncer de colo de útero, também denominado câncer cervical, foi registrado incidência de 604.127 (13,3%) novos casos e 341,831 mortes (7,3%) em todo o mundo. Esta doença é classificada como o quarto câncer mais frequentemente diagnosticado e a quarta principal causa de morte por câncer em mulheres. Em termos globais, a maioria dos casos (58,5%) e mortes (70,4%) ocorrem em áreas com menores níveis de desenvolvimento humano (SUNG et al., 2021). Isso ocorre porque a maioria dos casos de câncer cervical são causados por infecção persistente com genótipos carcinogênicos do vírus do papiloma humano (HPV) (SUNG et al., 2021) com prevalência mundial em aproximadamente 90% dos carcinomas cervicais (ARBYN et al., 2020).

Os HPVs são membros de vírus de DNA que são epiteliotrópicos, ou seja, infectam o tecido epitelial, e, com base em sua capacidade, são divididos em 3 grupos: de alto risco (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73, -82), provavelmente de alto risco (HPV-26, -53, -66) e de baixo risco (HPV-6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72, -81) (DUEÑAS-GONZÁLEZ, et al., 2005).

Os tipos HPV-16 e o HPV-18, dentre os HPV de alto risco, comprovadamente aumentam a suscetibilidade de desenvolvimento do câncer de colo do útero em infecções persistentes (BOUVARD, et al., 2009). O vírus geralmente infecta o epitélio mucocutâneo e

produz partículas virais em células epiteliais amadurecidas (UNGER; BARR, 2004), tornando-se integrado ao genoma da célula hospedeira do colo do útero e, à medida que esse processo progride através de lesões pré-cancerosas para o câncer de colo do útero, a frequência da integração do genoma viral aumenta (DE MIGUEL et al., 2014). Outros fatores que estão associados ao câncer de colo de útero incluem tabagismo, outras infecções sexualmente transmissíveis (HIV e *Chlamydia trachomati*), alto número de gravidez e uso prolongado de contraceptivos orais (BUSKWOFIE et al., 2020).

A via de prevenção é o principal caminho para evitar o câncer cervical, que são feitas a partir de rastreamento, com a avaliação de células da região do colo de útero, (Colpocitologia Oncológica ou Papanicolau) e aplicação de vacinas contra o HPV. No entanto, a vacinação tem benefício limitado para mulheres já infectadas com HPV de alto risco, e estratégias alternativas de intervenção terapêutica são necessárias para essas mulheres (COHEN et al., 2019; ADEFUYE; SALES, 2012). As vias de tratamento atualmente existentes dependem da extensão da doença no diagnóstico e dos recursos disponíveis localmente, e pode envolver histerectomia radical ou quimiorradiação, ou uma combinação de ambas, entretanto na maioria dos casos avançados esses tratamentos são ineficazes. Outra via de tratamento em casos avançados é a imunoterapia com a incorporação do agente anti-VEGF bevacizumabe que aumentou a sobrevida dos pacientes para mais de 12 meses (COHEN et al., 2019). Apesar dos esforços, essas formas de tratamento podem ser invasivas e causar efeitos colaterais durante o tratamento, o que contribui negativamente para a saúde dos pacientes (CHARI, 2008).

Três linhagens celulares de câncer de colo de útero muito estudadas em projetos de pesquisas científica contém a presença do HPV, sendo elas SiHa, HeLa e CaSKi que foram avaliadas nessa pesquisa. A linhagem celular de carcinoma epitelial de colo de útero (SiHa) é infectada pelo HPV 16 (ROSA et al., 2019), a linhagem de adenocarcinoma de colo de útero (HeLa) é infectada pelo HPV 18 (MACVILLE, et al., 1999) e a linhagem CaSKi é infetada pelo HPV 16 e 18 (YEE et al., 1985). Os tipos histológicos mais comuns do câncer de colo de útero é o escamoso e adenocarcinoma, representando 70% e 25% respectivamente, na qual SiHa e CaSki são escamosas e a HeLa é adenocarcinoma (SMALL et al., 2017).

1.2 Câncer cervical e inflamação

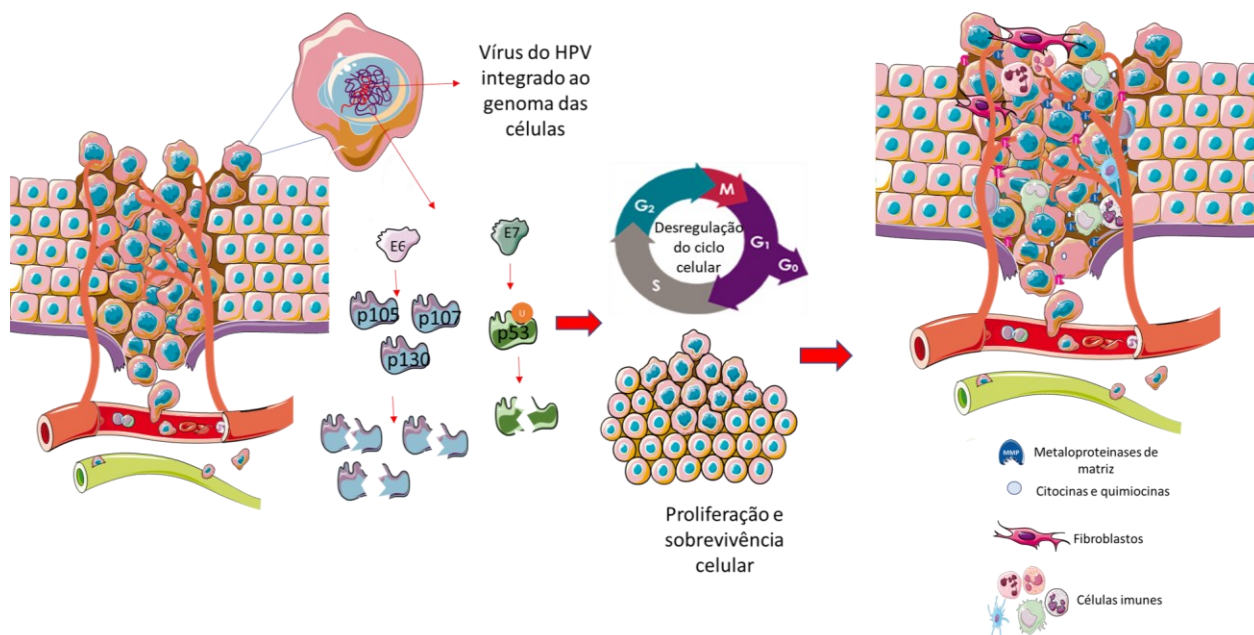
A inflamação é um complexo mecanismo projetado para proteção do organismo, a qual envolve células do sistema imunológico, vasos sanguíneos e mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas. A liberação dos mediadores inflamatórios ativa a resposta imune

inata do hospedeiro, que em conjunto recrutam células efetoras para o local da lesão ou infecção. Após a resolução, a inflamação deve ser desativada de modo programado, porém, se o estímulo for persistente, a inflamação aguda se torna crônica. Evidências sugerem que a inflamação, quando crônica, pode desencadear ou progredir uma neoplasia (LIU et al., 2016; CHEN et al., 2018). Aproximadamente 20% dos cânceres humanos estão associados a inflamação crônica por agentes infecciosos ou lesões por exposição a agentes nocivos, como é o caso do câncer cervical, no qual a inflamação crônica após infecção persistente por HPV contribui para a gênese e progressão tumoral (SINGH et al., 2019; YE et al., 2020).

A inflamação crônica contribui para a gênese do tumor por propiciar a indução de mutações gênicas. Nesse contexto, a inflamação atua como uma ferida que não cicatriza, exigindo assim uma renovação constante das células, acelerando a divisão celular, o que aumenta o risco de mutações e transformação neoplásica. Ademais, o ambiente inflamatório contém agentes que causam danos ao DNA, como detritos da fagocitose, incluindo as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além de contribuir para a gênese tumoral, o ambiente inflamatório pode contribuir para a progressão do tumor devido a ativação do estroma, liberação de fatores de crescimento, angiogênese e ativação de metaloproteinases de matriz (MMP) para a migração de células imunes ao local da inflamação, e esses efeitos favorecem a proliferação celular e metástase tumoral (FERNANDES et al., 2015; NAHAND et al., 2019; COUSSENS; WERB, 2002).

O HPV contribui para neoplasias a partir da atuação de oncoproteínas nas células hospedeiras, as oncoproteínas são E5, E6 e E7. Essas oncoproteínas parecem acelerar a progressão do câncer do colo do útero, revogando os principais inibidores da proliferação celular (WERNES; LEVINE; HOWLEY, 1990; GHITTONI, et al., 2010), por mecanismos oncoproteicos pelos quais o E7 se liga aos membros da família de proteínas do retinoplastoma, pRB (p105, p107, p130) promovendo sua degradação, enquanto o E6 se liga e inativa o supressor de tumor p53, por uma via dependente de ubiquitina. A perda das funções das proteínas p53 e pRB resulta em progressão descontrolada do ciclo celular e perda dos mecanismos de reparo do DNA, com o conseqüente acúmulo de mutações criando instabilidade genômica (SENBA; MORI, 2012), esse processo pode ser observado na Figura 1. Essas mudanças nas funções celulares desencadeadas pela ação de oncoproteínas virais contribuem para o aumento da produção de óxido nítrico, dano ao DNA e ativação de receptores de ciclooxigenase-2/prostaglandina E2 (PTGS2/PGE/PTGERS), uma via inflamatória que leva ao aumento da inflamação e tumorigênese (GEORGESCU et al., 2018; ADEFUYE; SALES, 2012; FERNANDES et al., 2015).

Figura 1: Representação gráfica do câncer cervical desencadeado pela inflamação na infecção pelo HPV



Subtítulo: representação da infecção pelo vírus do HPV nas células cervicais, no qual o genoma do vírus se integra ao genoma das células hospedeiras, o que causa a síntese de oncoproteínas E6 e E7. Essas oncoproteínas degradam as proteínas do grupo pRB e a p53, desencadeando aumento da proliferação e sobrevivência celular e desregulação do ciclo celular. Além disso há um processo inflamatório exacerbado que estimula fatores associados ao microambiente tumoral, como metaloproteínas de matriz, citocinas e quimiocinas, fibroblastos e células imunes.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022.

Sob esses estímulos, células tumorais e inflamatórias podem liberar citocinas, quimiocinas e prostaglandinas que agem de forma autócrina/parácrina para regular a função das células endoteliais, estromais, neoplásicas, epiteliais e infiltrantes do sistema imunológico, causando aumento da angiogênese e do crescimento tumoral, diminuição da apoptose e da vigilância imunológica local. Essas condições favorecem a tumorigênese e a permanência do vírus no microambiente tumoral (HEMMAT; BAGHI, 2018; FERNANDES et al., 2015; SADRI-NAHAND et al., 2019).

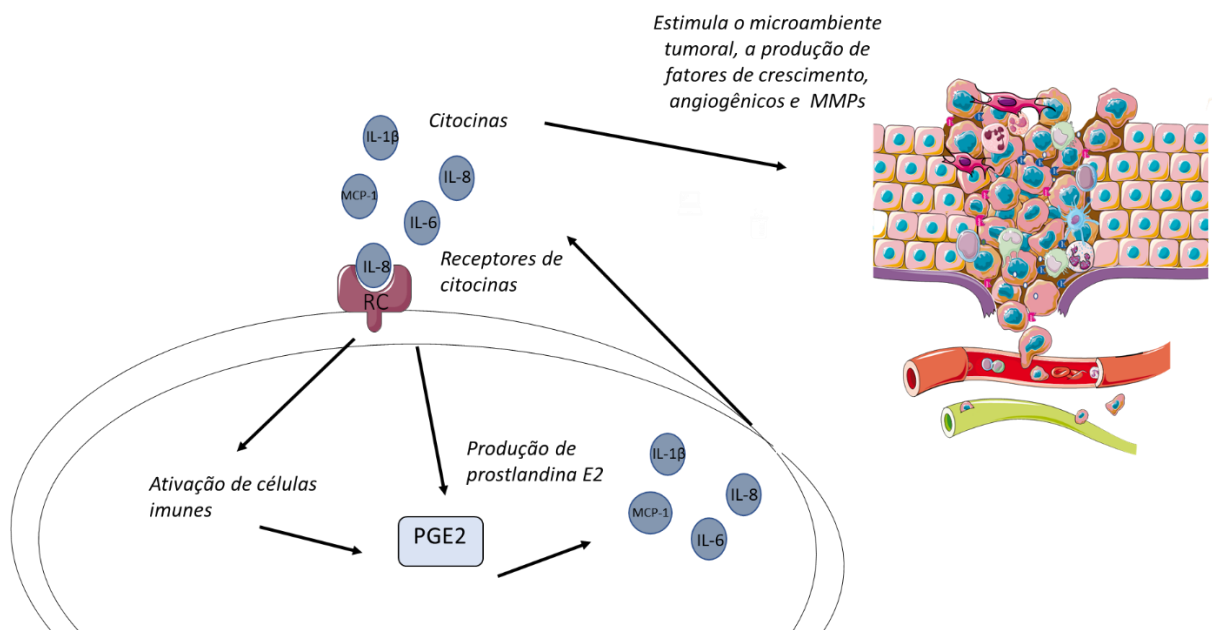
As citocinas são proteínas, cuja principal função é fazer comunicação célula a célula, a partir da sua secreção e ligação em receptores específicos presente nas membranas celulares. Suas respostas vão desde a regulação do crescimento, diferenciação celular até a ativação de células imunes. As alterações celulares que dão origem ao câncer provocam alterações na expressão local de citocinas. Essas perturbações estimulam infiltrados de células imunes, que, por sua vez, liberam citocinas adicionais que atuam de forma autócrina, parácrina e endócrina (DRANOFF et al., 2004).

As citocinas são liberadas em resposta a uma gama diversificada de estresses celulares, incluindo lesão induzida por carcinógeno, infecção e inflamação (DRANOFF et al., 2004). Na

infecção por HPV, as citocinas funcionam para estimular uma resposta do hospedeiro visando controlar a infecção e minimizar os danos celulares. Porém, no caso dessa infecção ser persistente, esse processo se torna contínuo, com altos níveis de citocinas que resulta em angiogênese, progressão tumoral, diminuição da apoptose e da vigilância imunológica local. Essas condições favorecem a tumorigênese e a permanência do vírus no microambiente tumoral (HEMMAT; BAGHI, 2018; DRANOFF et al., 2004; FERNANDES et al., 2015; SADRI-NAHAND et al., 2019).

As citocinas IL-1 β , IL-8 e MCP-1 são importantes mediadores inflamatórios que participam da inflamação associada ao câncer, como demonstrado na Figura 2 e 3. Essas citocinas conduzem diretamente o processo inflamatório e induzem a expressão de genes pró-inflamatórios como *PTGS2*, *iNOS* (Óxido nítrico sintase induzido), *IL6*, entre outras citocinas/quimiocinas. Essas sinalizações levam à rápida ativação de células imunes e células do estroma para a produção de prostaglandina E2 (PGE2), óxido nítrico e citocinas, que, como feedback positivo, estimulam a produção de IL-1 β , IL-8 e MCP-1, representando assim uma importante amplificação da resposta inflamatória (VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012). Essas citocinas também regulam a síntese de MMPs participando para a remodelação da matriz extracelular, que é um importante processo para a entrada de células inflamatórias (APTE et al., 2006; VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; RÉBÉ; GHIRINGHELLI, 2020; SINGH et al., 2015; YANG et al., 2020). Em câncer cervical essas citocinas estão presente em altos níveis se correlacionado com o mal prognóstico devido a eventos metastáticos e angiogênicos (AINOUZE et al., 2018; AL-TAHHAN, ETEWA; BEHERY, 2011; JIA et al., 2018; PARADKAR et al., 2014; VAHEDPOUR et al., 2021; KLEINE-LOWINSKI et al., 1999).

Figura 2: Representação gráfica da ação das citocinas no câncer cervical



Subtítulo: As citocinas IL-1 β , IL-8 e MCP-1 ao se ligarem aos seus respectivos receptores ativam células imunes e estimulam a produção de prostaglandina E2 (PGE2), que por sua vez através de um feedback positivo estimula a síntese dessas citocinas. E esses mediadores em conjunto contribui para proliferação celular e para o microambiente tumoral.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022.

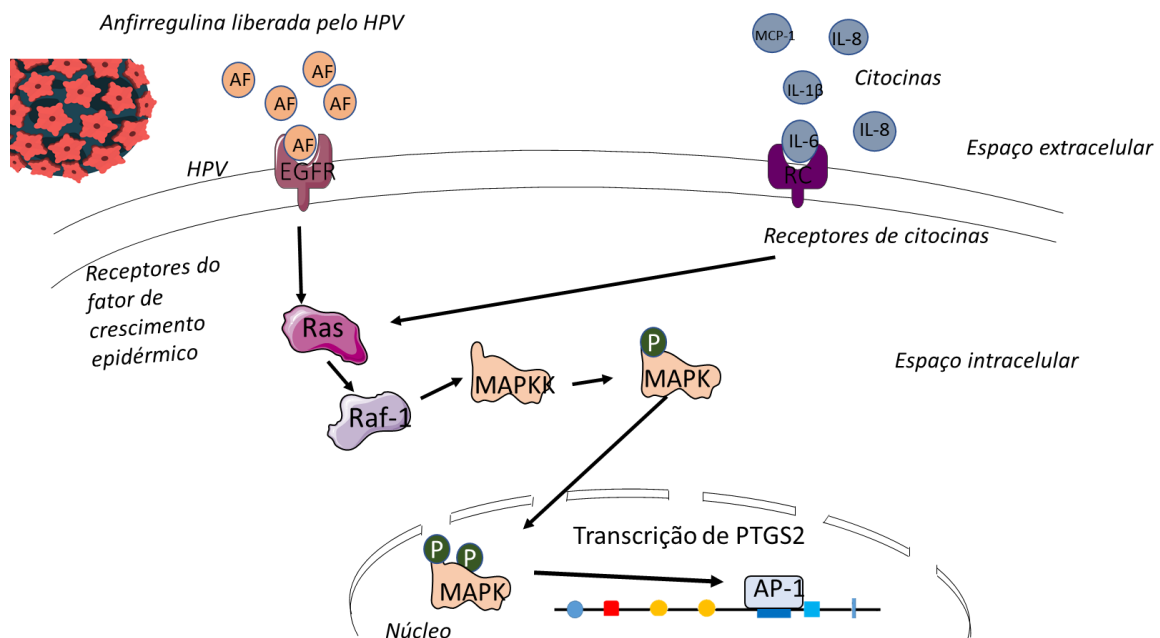
1.3 Papel da PTGS2 na inflamação associada ao câncer

Acredita-se que a via transdutora de sinais dos receptores da cicloxigenase-2-prostaglandina E2 (PTGS2-PGE 2-PTGERS) é a via central envolvida na inflamação crônica associada a transformações oncológicas nas carcinogêneses ginecológicas. Dados demonstram uma regulação positiva dessa via em câncer cervical induzida por HPV (YE et al., 2020). Como mencionado, a atuação das oncoproteínas do HPV sobre p53 e complexo Rb pode levar o aumento da produção de óxido nítrico e danos ao DNA, e tais estímulos ativam a via inflamatória PTGS2-PGE2-PTGERS aumentando a inflamação e a tumorigênese (ADEFUYE; SALES, 2012). Outra atividade pró-tumorigênica dessa via está relacionada à supressão da resposta imune local. A PGE2 inibe a ativação de macrófagos, células T e células natural killer e conseqüentemente produz imunossupressão, favorecendo o desenvolvimento tumoral (GUERROUAHEN et al., 2020).

Além disso, evidências mostraram que as oncoproteínas E6 e E7 do HPV16 estimulam a transcrição de PTGS2 a partir da ativação da via EGFR→Ras→MAPK→AP-1, na qual AP-1 é o fator de transcrição responsável pela síntese de PTGS2 (SUBBARAMAIAH; DANNENBERG, 2007), como demonstrado na Figura 3. As oncoproteínas E6 e E7 estimulam

a liberação de anfirregulina, uma proteína que se liga ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Ao se ligar a esse receptor ocorre a ativação de Ras que por sua vez ativa a serina/treonina quinase RAF, a qual dá início a cascata de eventos de fosforilação ativando MAPKK que, por sua vez, fosforila MAPK. A MAPK se transloca para o núcleo onde fosforila e, assim, ativa fatores de transcrição, nesse caso o AP-1. Esse fator de transcrição desencadeia a transcrição de PTGS2, a enzima central na inflamação associada ao câncer (HAGLUND; RUSTEN; STENMARK, 2007; SUBBARAMAIAH; DANNENBERG, 2007; KIM et al., 2013).

Figura 3: Representação gráfica do efeito da infecção pelo HPV na via PTGS2



Subtítulo: A anfirregulina (AF) e as citocinas IL1 β , IL-8 e MCP-1 se ligam aos receptores associados e ativam a via MAPK se iniciando pela proteína Ras que ativa Raf-1, esta por sua vez ativa MAPKK que é fosforilada se tornando MAPK, por fim MAPK é translocada para o núcleo, e quando fosforilada novamente ativa fatores de transcrição como o AP1 que por sua vez ativa a transcrição de PTGS2.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022.

A complexa via PTGS2-PGE2-PTGERs tem início nos fosfolipídios da membrana plasmática, onde é liberado o ácido araquidônico pela fosfolipase A2 (PLA2), na qual é convertido pela enzima PTGS2 em prostaglandina H2, que por sua vez é convertida por isomerases específica em diferentes prostaglandinas, incluindo a PGE2. (YE et al., 2020; COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994). A prostaglandina E2 (PGE2) é a mais abundante em humanos e é caracterizada como um mediador chave na inflamação. Suas funções ocorrem a partir de ligação aos seus respectivos receptores acoplados a proteína G presente na membrana, sendo eles PTGER1, PTGER2, PTGER3 e PTGER4, e cada qual sinaliza uma

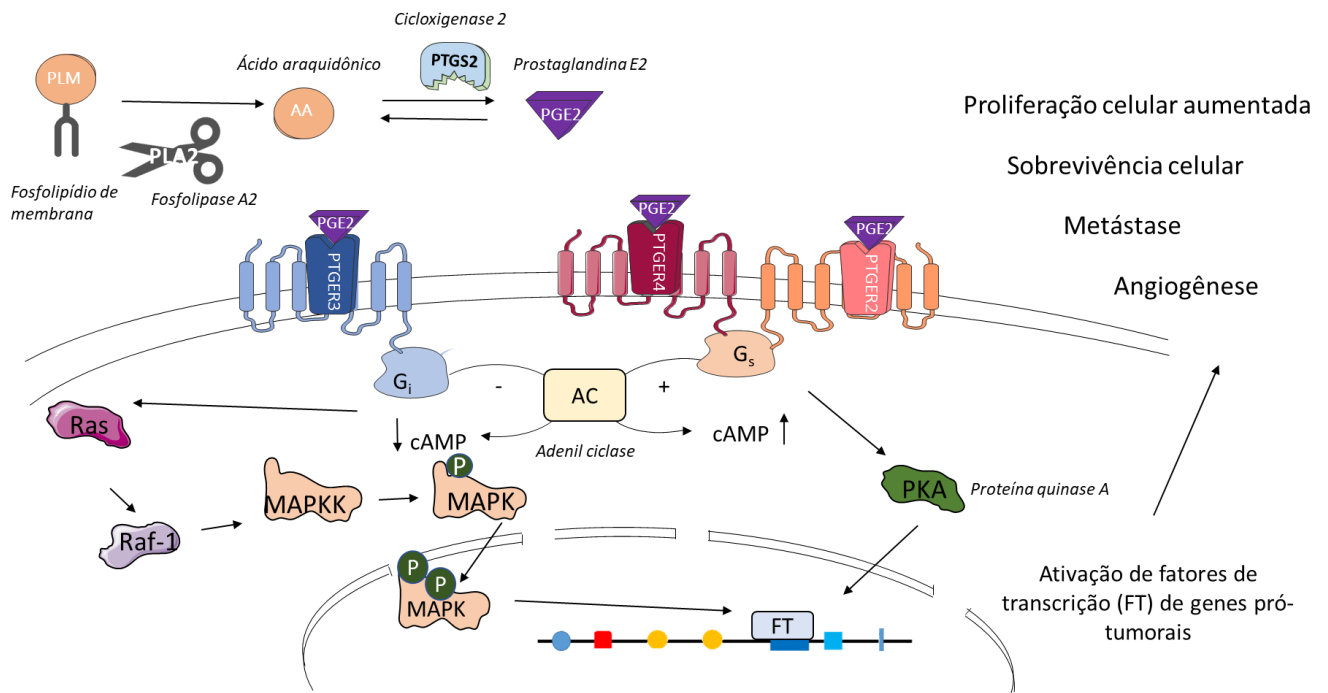
resposta (O'CALLAGHAN; HOUSTON, 2015). Os receptores PTGER2, PTGER3 e PTGER4 quando recebem a ligação de PGE2 contribuem para a tumorigênese cervical mediando aumento da proliferação celular, metástase e angiogênese, na qual PTGER3 atua pela redução de cAMP que ativa a cascata de MAPK, enquanto que PTGS2 e PTGS4 aumenta os níveis de cAMP ativando Adenil ciclase que ativa a proteína quinase A (PKA), tendo a mediação por MAPK quanto por PKA ativam fatores de transcrição no núcleo (NF- κ B e AP-1), que desencadeia a transcrição de PTGS2 (PARIDA et al., 2016; SCHMOECKEL et al., 2020) demonstrada na Figura 4.

Os receptores PTGER2 e PTGER4 mostraram estar relacionados a carcinogênese cervical, pois foram positivamente regulados juntamente com PTGS2 e PGE2 em amostras neoplásicas cervicais comparado com amostras cervicais normais (SALES et al., 2001). Foi demonstrado o acúmulo de cAMP após estímulo de PGE2 em células HeLa, indicando novamente a atuação desses receptores (SALES et al., 2002). Em corroboração, dados demonstram a ação direta da oncoproteína E5 sobre a expressão de PTGER4 (OH et al., 2009). Em estudo usando um antagonista do PTGER4 em câncer cervical, ocorreu o bloqueio da sua sinalização e consequente diminuição da fosforilação de PKA, aumento da atividade de Bax e redução da fosforilação do glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) β . Além disso, esse bloqueio reduziu a fosforilação de EGFR, o que diminuiu significativamente a atividade de Akt, proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e GSK3 β . Conjuntamente, verificou a translocação nuclear de β -catenina de uma maneira dependente do tempo. Em consequência de todas essas sinalizações, houve controle da sobrevivência, proliferação e angiogênese das células nos modelos *in vitro* e de xenoenxerto de câncer cervical (PARIDA et al., 2016). Além disso, foi demonstrado o papel direto do PTGER2 no câncer cervical, no qual houve aumento da expressão de PTGER2 conforme maior o grau da neoplasia intraepitelial cervical (SCHMOECKEL et al., 2020).

Quanto ao receptor PTGER3 foi demonstrado seu papel como prognóstico prejudicado nas taxas de sobrevivência global de 250 pacientes, onde apresentou superexpressão, principalmente nos estágios linfonodal e estágio FIGO (HEIDEGGER et al., 2017). Ye e colaboradores (2020) demonstraram o papel e mecanismo de atuação de PTGER3 sobre a proliferação e a migração celular em câncer cervical. Seus resultados mostraram que PTGER3 facilitou a migração de células de câncer cervical por meio da modulação da produção de PAI-1 e uPAR em estágios vantajosos de malignidade cervical. Após o silenciamento de PTGER3 os níveis de PAI-1 foram aumentados, para a fosforilação de ERK1/2 (que também foi regulada positivamente) e para a translocação de p53 do citoplasma para o núcleo. Além disso, a alta

expressão de PAI-1 inibe a clivagem de uPAR contribuindo para a migração inibida de células cancerígenas do colo do útero (YE et al., 2020).

Figura 4: Via PTGS2/PGE2/PTGERS no câncer cervical



Subtítulo: Os fosfolípidios de membrana são hidrolisados pela enzima fosfolipase A2 em ácido araquidônico que por sua vez é convertido em prostaglandina E2 por intermédio da enzima cicloxigenase 2. A prostaglandina se liga aos seus respectivos receptores associados a proteína G; quando ela se liga ao receptor 3 tem uma redução dos níveis de Adenil ciclase que causa redução de AMP cíclico (cAMP) que por sua vez ativa a via MAPK que ativa fatores de transcrição responsáveis por transcrevem genes pró-tumorais. Já quando PGE2 se liga aos receptores 4 e 2, os níveis de cAMP aumentam devido a ativação de Adenil ciclase, resultando na ativação da proteína quinase A que também ativa fatores de transcrição de genes pró-tumorais. A ativação desses genes resulta em proliferação celular aumentada, sobrevivência celular, metástase e angiogênese.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022

Além de mediar processos inflamatórios e vias de transdução de sinais relacionadas ao câncer, foi evidenciado o papel da via PTGS2 sobre danos ao DNA. Foi relatado que durante o metabolismo do ácido araquidônico mediado pela enzima PTGS2 ocorreu a formação de heptanona-eteno (Hε)-DNA, um composto altamente mutagênico em células de mamíferos, sendo outro mecanismo de contribuição para a carcinogênese (SPEED; BLAIR, 2011).

Portanto, tratamentos que visem a via PTGS2 podem atuar de forma eficiente para o controle neoplásico por estar intimamente relacionado ao processo tumorigênico.

1.4 Papel da via MAPK (p38 e ERK) na inflamação associada ao câncer

As cascatas de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) são vias de sinalizações principais que regulam uma ampla variedade de processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose e respostas ao estresse (GUO et al., 2020). Geralmente, estímulos (fatores de crescimento, citocinas, vírus, ligantes de receptores acoplados à proteína G e oncogenes) se ligam e ativam glicoproteínas transmembrana da família do receptor tirosina quinase e ativam a cascata de transdução de sinal por fosforilação, seguida de transdução de sinal por intermediários citosólicos e, finalmente no núcleo, desencadeia a regulação da transcrição/tradução de genes efetores (BRAICU et al., 2019; CARGNELLO; ROUX, 2011).

A cascata de ativação de sinais ocorre na seguinte ordem: MAPKKK (Mitogen Activated Protein kinase kinase kinase, representada por RAF e suas variantes), seguida por MAPK quinase (MAPKK: MEK1/2/3/4/5/6/7), e finalmente o MAPK, essa via pode ser observada nas Figuras 3 e 4. Existem três principais MAPKs clássicas com diferentes isoformas, ERKs, JNKs e p38, estas ao ser ativadas executam a resposta translocando-se ao núcleo e ativando fatores de transcrição que conduzem a expressão de genes de que coordenam inúmeros processos biológicos (BRAICU et al., 2019). Essas vias permitem que as células interpretem uma ampla gama de sinais externos e respondam adequadamente gerando uma infinidade de diferentes efeitos biológicos, porém a ativação excessiva dessas demonstrou induzir várias doenças, incluindo câncer e inflamação (CUADRADO; NEBREDÁ, 2010; GROSSI et al., 2014).

No câncer cervical desencadeado pela infecção persistente por HPV, essas vias desempenham papel crucial reconhecendo o vírus a partir do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) induzindo a cascata Ras→MAPK→AP-1, resultando em uma resposta inflamatória e proliferativa, didaticamente demonstrado na Figura 3 (BONAB et al., 2021; SUBBARAMAIAH; DANNENBERG, 2007). A via p38/MAPK está relacionada principalmente ao estresse e apoptose das células, enquanto a via de sinalização ERK/MAPK, está intimamente relacionada à proliferação e diferenciação celular (BRAICU et al., 2019).

A via p38 responde principalmente a sinais de estresse ambiental e estímulos inflamatórios e desempenha papéis importantes na manutenção da homeostase celular e resistência a drogas (LEE; RAUCH; KOLCH, 2020). No câncer, p38 está envolvida intimamente com o microambiente tumoral, e desempenha um papel duplo, podendo atuar como antiproliferativo e supressor de tumor, mas também como oncogene em mecanismos de invasão, inflamação e angiogênese (GROSSI et al., 2014; LEE; RAUCH; KOLCH, 2020). No caso do câncer cervical, p38 desempenha papel oncogênico (JIN et al., 2016).

A p38 é inativa no estado não fosforilado, tornando-se rapidamente ativada pela dupla fosforilação, enquanto a duração da fosforilação é crucial na regulação do destino celular, por exemplo quando a fosforilação é longa frequentemente está associada à indução de apoptose; em contraste, a fosforilação transitória pode estar associada à sobrevivência induzida pelo fator de crescimento (COULTHARD et al., 2009).

As proteínas ERK ativadas podem entrar no núcleo e se ligarem a fatores de transcrição que induzem a expressão gênica em resposta a estímulos extracelulares e regulam a proliferação, diferenciação, apoptose e transcrição celular (GUO et al., 2020). A ativação contínua da via de sinalização ERK pode promover a transformação de células normais em células tumorais, enquanto a inibição da via de sinalização ERK pode restaurar as células tumorais a um estado não transformado *in vitro* e pode inibir o crescimento tumoral *in vivo* (SEBOLT-LEOPOLD et al., 1999; GUO et al., 2020).

Tanto ERK, quanto p38 ativam fatores de transcrição que leva a síntese de PTGS2 como demonstrado nas Figuras 3 e 4, bem como de metaproteínas de matriz, atuando como intermediários chaves da inflamação no câncer, contribuindo para metástase, angiogênese, sobrevivência e proliferação celular (YOSHITAKE et al., 2020; SIMON et al., 1999)

1.5 Papel da via MMP na inflamação e metástase associada ao câncer

Uma outra via genética está intimamente ligada a PTGS2, é a via da metaloproteinases da matriz (MMPs), estudos mostraram que em alguns tipos de câncer, a expressão diminuída de PTGS2 resulta no nível reduzido de MMPs (SIVULA et al., 2005; LIU et al., 2015), assim como, a indução da superexpressão de PTGS2 leva ao aumento de MMPs (YANG et al., 2006; GAN et al., 2016). Isso ocorre porque as MMPs estão envolvidas no processo inflamatório, pois as mesmas atuam na remodelação da matriz extracelular (MEC), ocasionando a conversão na vasculatura, que segue por extravasamento de células imunes e angiogênese (LIBRA et al., 2009; ADEFUYE et al., 2012). Além da mesma ter sua regulação dependente de citocinas e quimiocinas que são secretadas durante o processo inflamatório. Alguns estudos relatam uma associação entre essas transcrições de MMPs e a transcrição de HPV E6 e E7 na remodelação e diferenciação de tecidos (FERRANDINA et al., 2002; NUOVO et al., 1995).

Especificamente no câncer, as MMPs participam do processo metastático que é o principal responsável pela malignidade tumoral. A metástase tumoral é um complexo processo biológico que envolve inúmeras etapas, na qual ocorre interações entre as células tumorais, as células hospedeiras e a matriz extracelular. Nesse processo, a proliferação de células tumorais

é aumentada, a adesão diminuída e componentes da matriz extracelular degradados. Consequentemente, as células tumorais saem do seu local de origem e são migradas pela corrente sanguínea até outros tecidos e órgão (LI; TUERGAN; ABULIZI, 2015).

A degradação da matriz extracelular é de grande importância para a metástase acontecer. A matriz extracelular é o componente não celular que fornece suporte físico para estabilização dos constituintes celulares nos tecidos e órgãos e também permite a adesão célula a célula a partir da ligação do citoesqueleto celular à MEC. Essa estrutura é altamente dinâmica, pois é continuamente remodelada, para a manutenção da função normal. A homeostase é mediada pela secreção coordenada de metaloproteinases de matriz (MMPs) e contrabalançado por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). As MMPs degradam proteoliticamente a matriz extracelular e causa o desprendimento entre as células e o tecido, dessa forma as células são capazes de se mover. Na carcinogênese a homeostase tecidual se torna desregulada, com aumento de MMPs e consequente metástase (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010).

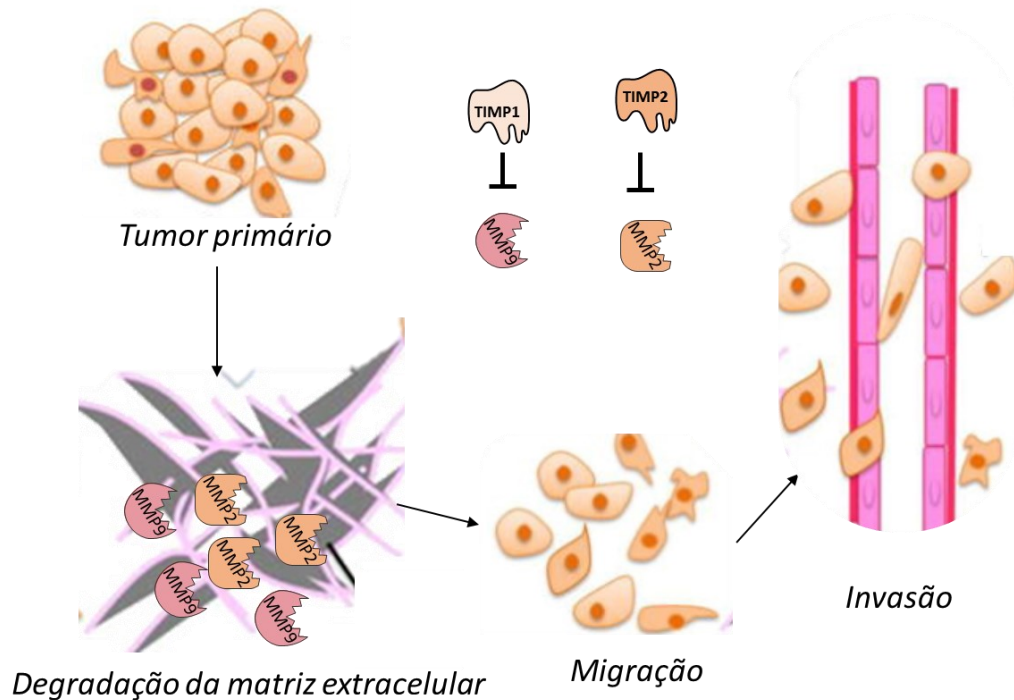
Dentre as MMPs, duas estão fortemente correlacionadas ao processo de invasão e metástase de células tumorais, a MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B), elas foram encontradas em grandes quantidades nos tecidos cancerígenos e plasmas (LIBRA et al., 2009; BRAICU et al., 2014; ZAJKOWSKA et al., 2018; FERNANDES et al., 2008). Como demonstrado na Figura 5, MMP2 e MMP9 degradam proteoliticamente o colágeno de gelatina IV presentes na matriz extracelular e promove a infiltração de células tumorais ao longo da membrana basal lesada, promovendo a invasão e metástase do tumor através dos novos capilares (LI; TUERGAN; ABULIZI, 2015). O TIMP1 e TIMP2 inibe a ativação de MMP9 e MMP2, essa regulação ocorre por ligação do complexo C-terminal do TIMP com o domínio C-terminal da pro-MMP (ZUCKER; CAO; CHEN, 2000; CALDEIRA; LARANHA, 2020).

Evidências mostram que MMP2 quando silenciada diminui a proliferação celular, apoiando a hipótese de que além de desencadear metástase ela também controla indiretamente a proliferação celular, pois seu silenciamento foi acompanhado da redução da expressão de IL-6, fosfo-Stat3, Cyclin D1 e c-Myc, que são proteínas associadas ao ciclo celular e a apoptose (CUI; HU; KHALIL; 2017; KESANAKURTI et al., 2013).

Em câncer cervical evidências demonstram total relação de MMP2 e MMP9 com mal prognóstico metastático, a expressão dessas metaloproteinases foram aumentadas em amostras cervicais de pacientes, em que quanto mais elevada pior o prognóstico (BRANCA et al., 2006; WANG et al., 2013). Foi observada elevada expressão de MMP2 e contrariamente baixa expressão do seu antagonista TIMP2 (BRANCA et al., 2006). A migração das células HeLa de adenocarcinoma de colo de útero foi significativamente reduzida após regulação positiva de

TIMP1 e negativa de MMP9 (HUSSAIN et al., 2012). Essas evidências indicam que um tratamento que visa regulação positiva de TIMPs e negativa de MMPs reduzem a invasão e metástase de câncer cervical, se mostrando assim marcadores alvos para controle neoplásico.

Figura 5: Via MMPs/TIMPs no câncer cervical



Subtítulo: O tumor primário é convertido a um tumor metastático pela ação de metaloproteinases de matriz (MMP) que degradam componentes da matriz extracelular, que desencadeia a migração e invasão das células tumorais para outros tecidos e órgãos. Os TIMPs inibem as ações de MMPs que consequentemente contém os processos metastáticos.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022.

1.6 Agentes Anti-inflamatórios e câncer

Sabendo do papel da inflamação no câncer, o efeito anti-inflamatório sobre a via PTGS2 se mostra bastante promissor como um alvo terapêutico no câncer (TASLEEM et al., 2014). Evidências demonstram que a ingestão diária de aspirina ou outros anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), produziu reduções de risco de 63% para câncer de cólon, 39% para mama, 36% para pulmão e 39% para câncer de próstata. Além de também prevenir câncer de esôfago (73%), estômago (62%) e ovário (47%) (HARRIS et al., 2005). Em câncer cervical estudos mostraram que uso de AINEs provocam redução do risco do desenvolvimento neoplásico em 54% (FRIEL et al., 2015), além de reduzir a angiogênese e induzir a apoptose (JOHARATNAM-HOGAN et al., 2020).

O mecanismo subjacente a ação anti-inflamatórias da aspirina é pela inibição irreversível por acetilação da enzima PTGS1 e PTGS2 em plaquetas. As plaquetas circulantes demonstram estar relacionadas as metástases tumorais, por facilitar a interação das células tumorais com a matriz extracelular, permitindo a evasão imune de células tumorais. Estudos demonstraram o aumento metastático em carcinoma de cólon após exposição as plaquetas e redução dessa capacidade com introdução da aspirina (GUILLEM-LLOBAT et al., 2017; JOHARATNAM-HOGAN et al., 2020).

Sabendo da eficiência da inflamação como alvo terapêutico no câncer, outros agentes anti-inflamatórios estão sendo investigado, como o alcaloide piperina. Esse alcaloide demonstrou efeito inibidor de PTGS2, e um melhor valor de afinidade (-7,8 kcal mol⁻¹) e ligação de energia (-85,08 kcal mol⁻¹) do que aspirina e celecoxibe (ZAKERALI; SHAHBAZI, 2018). Outros dados apontam o efeito anti-inflamatório de piperina por suprimir a PTGS2 e a produção de PTG2, bem como MMP-3 e MMP13 em condrócitos de osteoartrite humano (YING et al., 2013). Piperina também suprimiu a inflamação induzida por isquemia-reperfusão cerebral através da repressão de ciclooxigenase-2 (PTGS2), óxido nítrico sintase (NOS-2) e fator nuclear kappa B (NF-κB). Além disso, piperina atuou na ativação de p38 fosforilado, JNK e AP-1, bem como os níveis de PTGS2/ PGE2 e síntese de iNOS em células de queratinócitos humanos após irradiação de UV-B, tendo, portanto, efeito anti-inflamatório modulado por essas vias (JAISIN et al., 2020). Entretanto, a via inflamatória por ação de piperina foi pouco investigada em casos de neoplasias.

1.7 Piperina no câncer

A piperina (1-piperoilpiperidina) é um amino alcaloide considerado o principal metabólito derivado do fruto da *Piper nigrum* (pimenta do reino) e da *Piper longum* (pimenta longa), ela possui além da atividade anti-inflamatória outras propriedades farmacológicas e bioquímicas (ZADOROZHNA; TATARANNI; MANGIERI, 2019) sendo elas, imunomoduladoras, antioxidantes, antiasmáticas, anti-úlceras, anti-amebianas e anticancerígenas (MEGHWAL; GOSWAMI, 2013). Nas últimas décadas, os fitomedicamentos demonstraram um papel fundamental na descoberta de drogas, onde 50% dos medicamentos aprovados pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) são de origem natural (NEWMAN et al., 2012).

A propriedade antitumorigênica da piperina foi evidenciada em função da indução da parada do ciclo celular, aumento da autofagia e apoptose, bem como desequilíbrio redox da

homeostase. Além disso, piperina inibe a angiogênese e a degradação da matriz extracelular (MEC), afeta direta e indiretamente a sobrevivência das células tumorais e extingue os processos de invasão e metástase, sem efeitos tóxicos significativos nas células normais (SUNILA; KUTTAN, 2004; KUMAR et al., 2011; PAARAKH et al., 2015).

Foram realizados vários estudos com diferentes linhagens celulares, em que foi demonstrado os mecanismos moleculares de ação da piperina em cada tipo celular que serão revisados a seguir. Em carcinoma de cólon, a piperina atuou causando parada do ciclo celular na fase G1 associada à diminuição da expressão de ciclinas D1 e D3 e de seus parceiros quinase dependente de ciclina 4 (CDK4) e 9 (CDK9), além disso, piperina desencadeou a apoptose pelo estresse do retículo endoplasmático (YAFFE et al., 2015). Em fibrosarcoma, a piperina teve efeitos anti-invasivos em função da inibição da fosforilação de PKC α e ERK e pela redução da ativação do fosforilado, do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e do ativador da proteína-1 (AP-1), levando à regulação negativa da expressão de MMP-9 (HWANG et al., 2011). Em carcinoma hepatocelular, a piperina provocou a apoptose mediada por mitocôndrias, além da inibição da enzima catalase e da expressão proteica da tirosina quinase que levou por consequência a mitigação da progressão do câncer (GUNASEKARAN; ELANGOVAN; DEVARAJ, 2017).

Em leucemia, a piperina provocou a indução da apoptose, mediada pelas mitocôndrias e pelo aumento da expressão de Bax, conjuntamente provocou a parada na fase S do ciclo celular e supressão da migração e invasão celular (LI et al., 2020). Em câncer de mama, piperina reduziu a proliferação e a migração celular, levou a apoptose junto a ativação da caspase 3, além disso, piperina provocou a parada das células na fase G2 / M com uma redução na expressão da ciclina B1 e redução da expressão de MMP9, MMP13 (LAI et al., 2012).

Em células troncos de câncer de mama, a piperina inibiu a formação de mamosfera, pela sinalização Wnt (KAKARALA et al., 2010). Em melanoma, piperina mediou a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que ocasionou a indução de danos ao DNA e ativação do ponto de verificação quinase 1 (Chk1) conduzindo à parada das células na fase G1 do ciclo celular e a apoptose (FOFARIA; KIM; SRIVASTAVA, 2014). Em carcinoma oral, a piperina induziu a morte celular pela diminuição da liberação de MMP e ERO seguido pela ativação da caspase-3 e parada do ciclo celular (SIDDIQUI et al., 2017). Em osteosarcoma, a piperina inibiu a proliferação celular, provocando a parada do ciclo celular na fase G2 / M e reduziu a migração, via expressão aumentada de TIMP1/2 e diminuída de MMP2 /9 (ZHANG et al., 2015).

Em carcinoma de ovário, a piperina suprimiu a proliferação celular via indução da apoptose, seguida pela liberação do citocromo c mitocondrial para o citosol e ativação da caspase 3 e 9 e da PARP clivada, além disso, piperina diminuiu a fosforilação de JNK e

p38/MAPK (SI et al., 2018). Em câncer de próstata, piperina inibiu a proliferação e migração celular, induziu a apoptose por meio da ativação da caspase 3 e clivagem de proteínas PARP-1, piperina também interrompeu a expressão do receptor de andrógeno e redução dos níveis de antígeno específico da próstata, além disso, a piperina levou a expressão reduzida de fatores de transcrição de STAT-3 fosforilado e NF-kB (SAMYKUTTY et al., 2013). Em câncer de pulmão, a piperina também atua na modulação da tumorigênese, inibindo as vias de sinalização de TGF e interrompendo eventos relacionados a transição epitélio mesenquimal (EMT) (FONSECA et al., 2020). Em adenocarcinoma retal, a piperina reduziu o crescimento celular, inibiu a atividade metabólica e a progressão do ciclo celular, conjuntamente, piperina causou a morte celular por apoptose, alterou a morfologia celular e levou ao aumento da produção de ERO (YAFFE et al., 2013).

Quanto ao câncer de colo de útero, é pouco relatado o efeito da piperina, entretanto quando a linhagem celular de adenocarcinoma de colo de útero (HeLa) é exposta à piperina ocorre a inibição do crescimento de células com um aumento na geração de ERO, condensação nuclear e cicatrização de ferida tardiamente. Além disso, a piperina estimula a morte celular por apoptose pela perda de MMP, fragmentação de DNA, ativação da caspase 3 e inibição do crescimento celular devido a parada das células na fase G2/M (JAFRI et al., 2019).

Podemos verificar que os estudos sobre a piperina se baseiam no envolvimento de vias genéticas relacionadas com o ciclo celular e apoptose, entretanto a via inflamatória ainda não foi investigada, mesmo sabendo-se que a infecção persistente por HPV é a principal causa do câncer de colo de útero. Sendo assim, criamos a hipótese que o efeito antitumorigênico da piperina em câncer de colo de útero pode ser modulado pelas vias inflamatórias da cicloxigenase prostaglandina.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Investigar *in vitro* o efeito antitumoral de piperina em câncer cervical e determinar se esse efeito é modulado pelas vias inflamatórias associada ao câncer.

2.2 Objetivo específico

Investigar o efeito antitumoral da piperina nas linhagens celulares HeLa, SiHa, CaSki e HaCaT (não tumoral) pelas análises relacionadas às transformações neoplásicas, sendo elas morfologia celular, proliferação celular, citotoxicidade, migração celular, formação de colônias, genotoxicidade, apoptose e ciclo celular.

Além de explorar o efeito de piperina sobre a modulação das vias inflamatórias associada ao câncer a partir de análises de expressão dos genes *PTGS2*, *PTGER2*, *PTGER3*, *PTGER4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *HPV16-E6* e *HPV16-E7*, das proteínas PTGS2, MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2, p38/MAPK e ERK/MAPK, e da secreção de interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 8 (IL-8), e proteína quimiotática para monócitos (MCP-1).

3. PIPERINE REDUCES NEOPLASTIC PROGRESSION IN CERVICAL CANCER CELLS BY DOWNREGULATING CYCLOOXYGENASE 2 PATHWAY

Luana Pereira Cardoso¹, Stefanie Oliveira de Sousa¹, Juliana Prado Gusson Zanetoni¹, Laura Luciana de Melo Moreira Silva¹, Barbara Maria Frigieri¹, Tiago Henrique², Sonia Maria Oliani¹, Flávia Cristina Rodrigues-Lisoni^{1,3*}

1 São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Science (IBILCE), Department of Biology, Campus São José do Rio Preto SP, Brazil;

2 School of Medicine of Sao José do Rio Preto (FAMERP), Department of Molecular Biology, Sao José do Rio Preto, Brazil;

3 São Paulo State University (UNESP), School of Engineering (FEIS), Department of Biology and Animal Science, Campus Ilha Solteira, Brazil.

Artigo será submetido à revista Pharmaceuticals. Fator de impacto: 5,2. Qualis A2

Citation: Cardoso, L. P.; Sousa, S. O.; Gusson-Zanetoni, J. P.; Silva, L. L. M. M.; Frigieri, B. M.; Henrique, T.; Oliani, S. M.; Rodrigues-Lisoni, F. C. Piperine reduces neoplastic progression in cervical cancer by downregulating cyclooxygenase 2 pathway. *Pharmaceuticals* 2022, 15, x.

*Correspondence: flavia.lisoni@unesp.br; Tel.: (+55 017 981141860)

RESUMO

O câncer cervical é o quarto tipo de câncer que mais causa morte em mulheres no mundo, sendo principalmente decorrente da infecção persistente pelo vírus do HPV que desencadeia um processo inflamatório crônico. Por isso, o uso de anti-inflamatórios se torna uma opção de tratamento, como é o caso da piperina, um amino alcaloide derivado da *Piper nigrum*, que é pouco compreendida na inflamação do câncer cervical, tornando um alvo de pesquisa. Assim, esse trabalho objetivou investigar o efeito antitumoral de piperina *in vitro* em câncer cervical e determinar se esse efeito é modulado pela via PTGS2. Para isso, as células HeLa, SiHa, CaSki, HaCaT foram avaliadas quanto a morfologia, proliferação, viabilidade e migração celular, formação de colônias, apoptose e ciclo celular, visando compreender o efeito de piperina sobre a transformação neoplásica, bem como foram realizados os ensaios de qPCR e Western Blot das vias PTGS2 e MMPs, ELISA das citocinas IL-1 β , IL-8 e MCP-1 e imunocitoquímica das

MAPKs (p38 e ERK), visando compreender como piperina modula essas vias inflamatórias. Os resultados mostraram que piperina alterou a morfologia das células, reduziu a proliferação e viabilidade celular. Piperina também reduziu a formação de colônia, conduziu a parada das células na fase G1/G0 e G2/M do ciclo celular, com posterior indução a apoptose. Quanto a modulação das vias inflamatórias, piperina reduziu a expressão de PTGS2 e dos receptores 3 e 4 da PGE2 (*PTGER2*, *PTGER3* e *PTGER4*), o que refletiu na redução da secreção das citocinas IL-1 β , IL-8 e MCP-1, junto a redução da expressão de p38 e ERK. Além disso, a piperina inibiu a migração celular, por reduzir a expressão de MMP2 e MMP9 e aumentar a expressão de TIMP1 e TIMP2. Portanto, a piperina reduz parâmetros associados a evolução neoplásica *in vitro* por atuar sobre a via PTGS2, que por sua vez regula a secreção de citocinas e a expressão de MAPKs, MMPs e TIMPs, demonstrando ser um potencial fitoterápico para tratamento complementar de câncer de colo de útero.

Palavras chaves: câncer ginecológico, fitoterápicos, alcaloide, piperina.

INTRODUÇÃO

O câncer cervical é classificado como o quarto câncer mais frequentemente diagnosticado e a quarta principal causa de morte por câncer em mulheres no mundo no ano de 2020. Em termos globais, a maioria dos casos (58,5%) e mortes (70,4%) ocorrem em áreas com menores níveis de desenvolvimento humano (SUNG et al., 2021). Isso ocorre porque a maioria dos casos de câncer cervical são causados por infecção persistente com genótipos carcinogênicos do vírus do papiloma humano (HPV) (CHEN et al., 2017; SUNG et al., 2021) com prevalência mundial em aproximadamente 90% dos carcinomas cervicais (ARBYN et al., 2020).

A infecção persistente pelos HPV 16 e 18, considerados de alto risco, aceleraram a progressão do câncer do colo do útero, revogando os principais inibidores da proliferação celular e acentuadores da apoptose (WERNESS; LEVINE; HOWLEY, 1990; GHITTONI, et al., 2010). Isso ocorre por mecanismos regulatórios nos quais a oncoproteína E7 se liga aos membros da família de proteínas do retinoplastoma, pRB (p105, p107, p130) promovendo sua degradação, enquanto a oncoproteína E6 se liga e inativa o p53, por uma via dependente de ubiquitina, resultando em progressão descontrolada do ciclo celular e perda dos mecanismos de reparo do DNA, com o consequente acúmulo de mutações criando instabilidade genômica (SENBA; MORI, 2012).

Além disso, a inflamação é desencadeada na presença do vírus, porém quando a infecção persiste a inflamação que antes era pra conter o vírus se torna crônica, sendo responsável por progredir para uma neoplasia (LIU et al., 2013; CHEN et al., 2018). A inflamação crônica está presente em cerca de 20% dos cânceres humanos e é a principal responsável pela malignidade por propiciar metástase e angiogênese (SINGH et al., 2019; YE et al., 2020).

Acredita-se que a via transdutora de sinais dos receptores da cicloxigenase-2-prostaglandina E2 (PTGS2-PGE2-PTGERs) é a via central envolvida na inflamação crônica associada a transformações oncológicas nas carcinogêneses ginecológicas. Dados demonstram uma regulação positiva dessa via em câncer cervical induzida por HPV (YE et al., 2020). Essa regulação ocorre a partir da liberação de citocinas e de anfirregulina pelo vírus, o que estimula a cascata das proteínas quinase (MAPK), esta por sua vez ativa fatores de transcrição AP-1 e NFκ-B responsáveis por ativar a transcrição de cicloxigenase 2 (PTGS2) (HAGLUND; RUSTEN; STENMARK, 2007; SUBBARAMAIAH; DANNENBERG, 2007; KIM et al., 2013). A cicloxigenase 2 é uma enzima que catalisa a síntese de prostaglandina E2 (PGE2) e suas funções ocorrem pela ligação aos seus respectivos receptores acoplados a proteína G presente na membrana, sendo eles PTGER1, PTGER2, PTGER3 e PTGER4, em que cada qual sinaliza uma resposta (O' CALLAGHAN; HOUSTON, 2015), sendo os receptores 2, 3 e 4 os mais envolvidos com o câncer cervical (PARIDA et al., 2016; SCHMOECKEL et al., 2020; SALES et al., 2001; SALES et al., 2002; OH et al., 2009). A ativação exacerbada da via PTGS2-PGE 2-PTGERs desencadeia o aumento da proliferação, sobrevivência celular, angiogênese e metástase (ADEFUYE; SALES, 2012; SINGH et al., 2019; YE et al., 2020).

Sabendo do papel da inflamação no câncer, o efeito anti-inflamatório sobre a via PTGS2 se mostra bastante promissor como um alvo terapêutico no câncer (TASLEEM et al., 2014). Evidências demonstram que a ingestão diária de aspirina ou outros anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), produziu redução de risco de desenvolvimento de vários tipos de câncer, inclusive do cervical, onde essa redução foi de 54% (FRIEL et al., 2015), além do mesmo reduzir a angiogênese e induzir a apoptose (JOHARAT-NAM-HOGAN et al., 2020). O mecanismo subjacente a ação anti-inflamatórias da aspirina é pela inibição irreversível por acetilação da enzima PTGS1 e PTGS2 em células plaquetárias (GUILLEM-LLOBAT et al., 2017; JOHARATNAM-HOGAN et al., 2020).

Em vista da eficiência da inflamação como alvo terapêutico no câncer, outros agentes anti-inflamatórios estão sendo investigado, como o alcaloide piperina. Esse alcaloide demonstrou efeito inibidor de PTGS2, e um melhor valor de afinidade (-7,8 kcal mol⁻¹) e ligação

de energia ($-85,08 \text{ kcal mol}^{-1}$) do que aspirina e celecoxibe (ZAKERALI; SHAHBAZI, 2018). Outros dados apontam o efeito anti-inflamatório de piperina por suprimir a via PTGS2 em condrócitos de osteoartrite humano (YING et al., 2013), inflamação induzida por isquemia-reperusão cerebral e em células de queratinócitos humanos após irradiação de UV-B (JAISIN et al., 2020). Entretanto, vias inflamatórias por ação de piperina foi pouco investigada em casos de neoplasias.

A piperina (1-piperoilpiperidina) é um amino alcaloide considerado o principal metabólito derivado do fruto da *Piper nigrum* (pimenta do reino) e da *Piper longum* (pimenta longa), ela possui além da atividade anti-inflamatória outras propriedades farmacológicas e bioquímicas incluindo a antitumoral (ZADOROZHNA; TATARANNI; MANGIERI, 2019). Nas últimas décadas, os fitomedicamentos demonstraram um papel fundamental na descoberta de drogas, onde 50% dos fármacos aprovados pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) são de origem natural (NEWMAN et al., 2012).

A propriedade antitumorígenica da piperina foi evidenciada em diferentes tipos de câncer, onde demonstrou alvejar vias envolvidas com o ciclo celular e apoptose (ZADOROZHNA; TATARANNI; MANGIERI, 2019), porém pouco se sabe sobre o papel de piperina na inflamação do câncer, e em especial no câncer cervical, sendo um importante mecanismo a se investigar. Portanto, o objetivo dessa pesquisa foi investigar *in vitro* o efeito antitumoral de piperina em câncer cervical e determinar se esse efeito é modulado negativamente pelas vias inflamatórias associada ao câncer.

RESULTADOS

Piperina altera morfologia, viabilidade e proliferação celular.

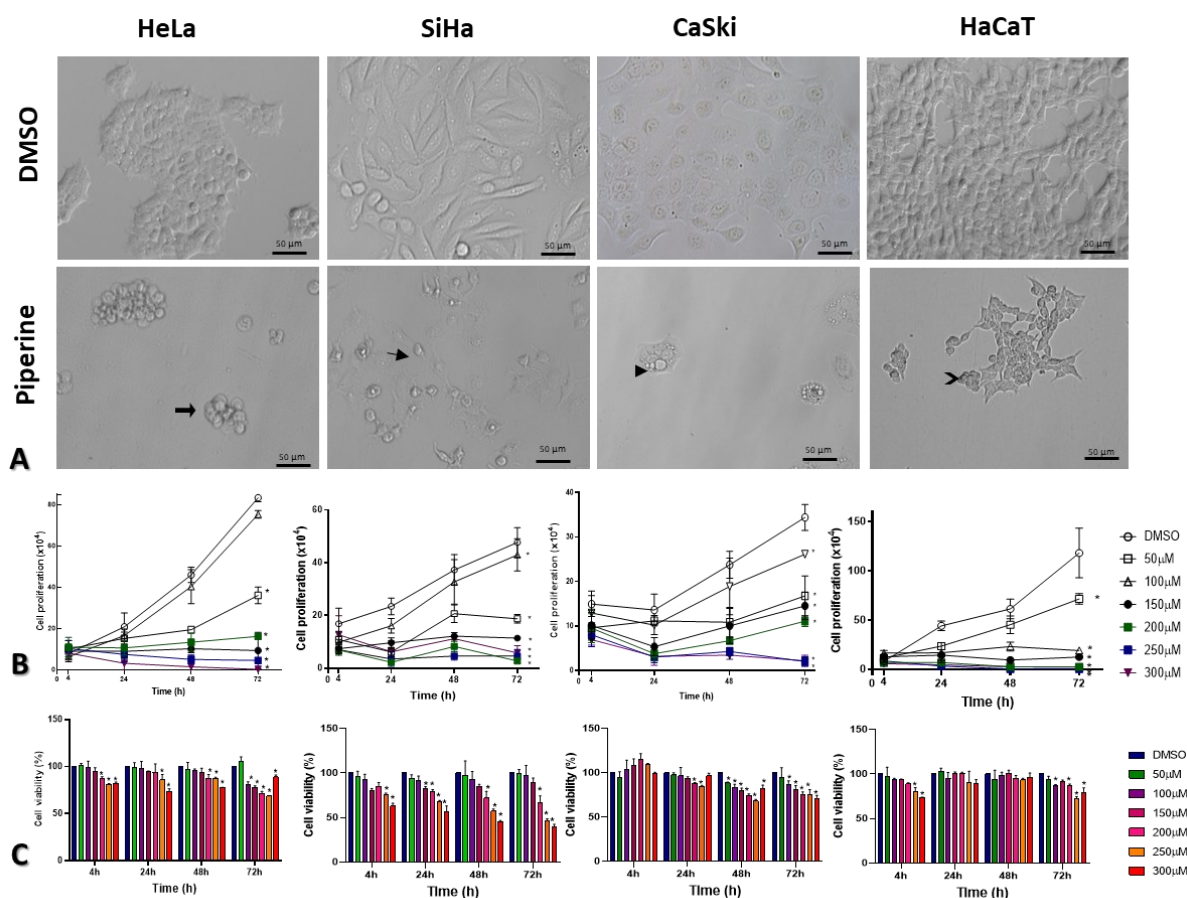
Nossos resultados mostraram que piperina alterou a morfologia de todas as linhagens celulares estudadas. Na linhagem HeLa e HaCaT, a piperina reduziu o tamanho celular, as células antes fusiformes e estreladas adquiriram um formato arredondado e com vacúolos na membrana (blebs) como demonstrado na seta grossa e na seta divisa da Figura 1A. Na linhagem celular SiHa, as células antes fusiformes se tornaram arredondadas e amorfas, devido a remoção do contorno celular, causado provavelmente pela ruptura da membrana plasmática apontada pela seta pequena. Já na linhagem CaSki foi observado formação de vesículas intracelulares (ponta de seta na Figura 1A) após tratamento com piperina.

Quanto a proliferação celular, a piperina em altas concentrações, a reduziu significativamente. Conforme demonstrado na Figura 1B, a piperina reduziu a proliferação

celular, a partir da concentração de 50 μ M, em todas as células, excetuando as células HeLa onde a concentração de 100 μ M não alterou essa propriedade.

Em relação a viabilidade celular, a piperina reduziu em altas concentrações nas linhagens tumorigênicas a partir do tempo de 24h, porém na linhagem não tumorigênica (HaCaT), piperina só teve esse efeito no tempo de 72h, demonstrando que os tempos de 24h e 48h seriam melhores a fim de evitar efeito citotóxico em células não tumorais (Figura 1C).

Figura 1 - Piperina altera morfologia, viabilidade e proliferação celular.



Subtítulo: (A) Fotomicrografia da morfologia das linhagens celulares HeLa, SiHa CaSki e HaCaT após 24h de tratamento com controle (DMSO) e piperina [150 μ M]. Seta grossa e seta divisa apontando os blabs, ponta de seta mostrando as vesículas intracelulares e seta fina mostrando rompimento da membrana. (B) Gráfico representativo da proliferação celular das células após tratamento com piperina nas concentrações de 50, 100, 150, 200 e 300 μ M, após, 4, 24, 48 e 72h de tratamento. (C) Viabilidade das células tratadas com piperina nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 μ M e após 24, 48 e 72h de tratamento. * vs controle, p <0.05.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022.

O IC₅₀ de piperina variou conforme a linhagem celular estudada, compreendendo valores entre 42,92 e 218,4 μ M, conforme demonstrado na tabela 1. Estudos evidenciaram que a dose de tratamento em outras linhagens de diferentes tipos de células tumorais varia de 75 a 200 μ M nos tempos de incubação de 24 e 48h (ZADOROZHNA; TATARANNI; MANGIERI,

2019), corroborando com os IC₅₀ em câncer de colo de útero nesses tempos. É interessante notar que na HaCaT o IC₅₀ no tempo de 24h é o mais alto, sendo 218μM, mostrando que concentrações inferiores a essa não causariam citotoxicidade. Portanto, em função da rápida biodisponibilidade de piperina (ZHANG et al., 2021), foi escolhido o tempo de 24h de tratamento e a concentração de 150 μM por ser bem inferior ao IC₅₀ das não tumorais ser uma concentração bioativa nas células tumorais.

Tabela 1. Índice de citotoxicidade de piperine nas células HeLa, SiHa, CaSki e HaCaT nos tempos de 24, 48 e 72h

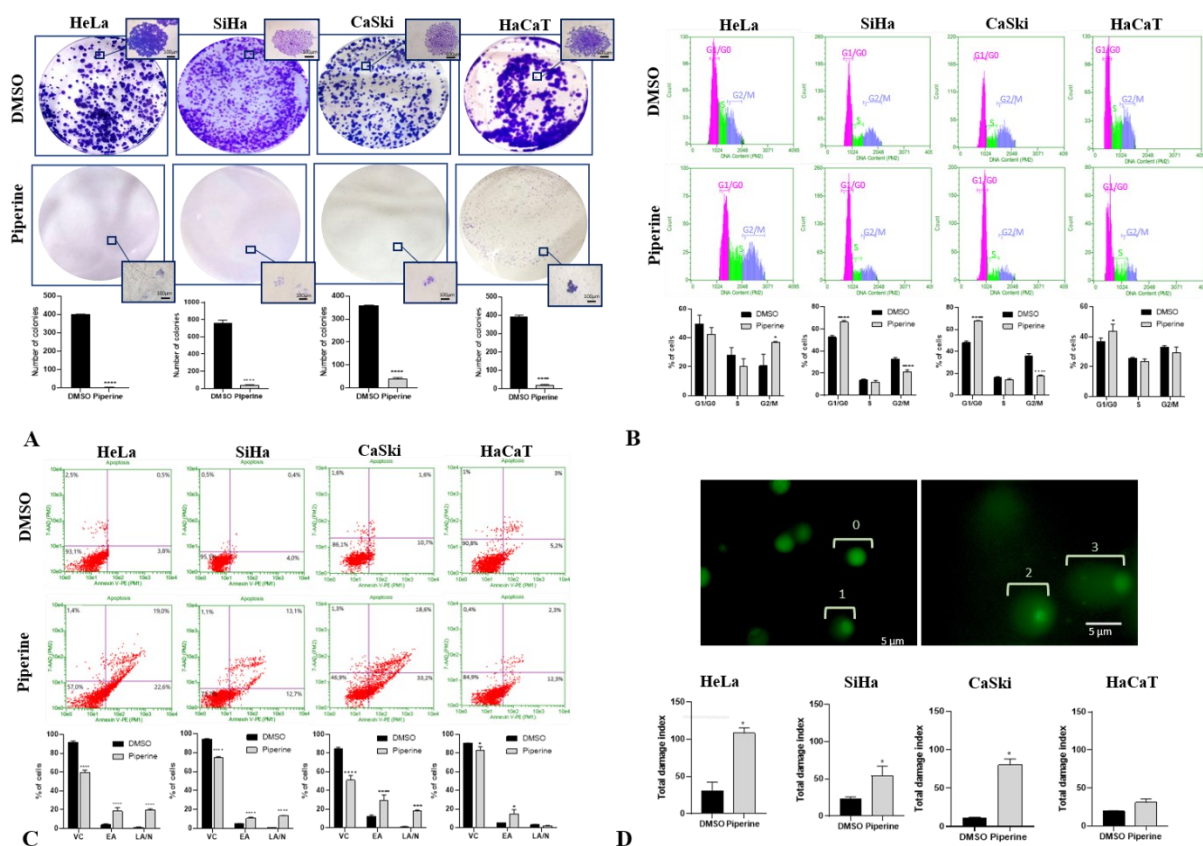
	24h	48h	72h
HeLa	208,0	151,0	69,97
SiHa	182,3	190,7	187,7
CaSki	167,8	83,36	104,2
HaCaT	218,4	162,5	181,7

Piperina inibe a formação de colônias, prejudica a progressão do ciclo celular e induz a apoptose por fragmentação do DNA

Os resultados mostraram que a piperina suprimiu a proliferação celular das células HeLa, SiHa, CaSki e HaCaT, impedindo a formação de colônias, como representado pela Figura 2A. A piperina regulou esse processo pela parada das células em pontos de verificação do ciclo celular, em que nas células CaSki, SiHa e HaCaT isso ocorreu na fase G1/G0 como representado na Figura 2B e nas células HeLa, que se difere das demais por ser células epiteliais glandulares secretoras, piperina conduziu a parada das células na fase G2/M.

Durante a parada na fase G1/G0 e G2/M, as células passam por processos moleculares para escolha do melhor destino: se autorrenovar, se diferenciar ou morrer (MASSAGUÉ, 2004; KASTAN; BARTEK, 2004). Nesse caso as células foram destinadas a morrer através de um mecanismo programado de morte celular, a apoptose. Os resultados mostram que piperina causou morte celular programada apoptótica nas quatro células investigadas como mostra a Figura 2C, porém nas células não tumorais piperina não levou a apoptose tardia tendo efeitos menos significativos. A fragmentação do DNA é um processo presente na apoptose, que pode ser notado pelo ensaio cometa, em que o tratamento com piperina causou fragmentação do DNA nas células tumorais, mas não foi genotóxico as células não tumorais (Figura 2D).

Figura 2 – Piperina inibe a formação de colônias, prejudica a progressão do ciclo celular e induz a apoptose por fragmentação do DNA



Subtítulo: (A) Fotografia da formação de colônias e número de células por colônias nas linhagens SiHa, HeLa, CaSki e HaCaT após 14 dias de tratamento com controle (DMSO) e com piperina [150 μ M]; (B) Análise do ciclo celular na linhagem SiHa, HeLa, CaSki e HaCaT após o tratamento com controle (DMSO) e com piperina [150 μ M]. (C) Gráficos representativos da morte celular apoptótica avaliada pela fluorescência de Anexina V-PE em citometria de fluxo, em que Anexina V-PE (-) e 7-AAD (-) representa células viáveis (VC), Anexina V-PE (+) e 7-AAD (-) representa apoptose inicial (EA), Anexina V-PE (+) e 7-AAD (+) representa apoptose final (LA) ou necrose (N); (D) Fotomicrografias de fluorescência de núcleos das células CaSki com diferentes tipos de danos avaliados pelo ensaio cometa em que (0) sem danos aparente, (1) dano 1, com uma vez o tamanho do núcleo, (2) dano 2, duas vezes o tamanho do núcleo e (3) dano 3, de duas ou mais vezes o tamanho do núcleo. E gráficos representativos do índice de dano nas células linhagem SiHa, HeLa, CaSki e HaCaT da estatística após tratamento com controle (DMSO) e [150 μ M], * vs controle $p < 0,05$, ** vs controle, $p < 0,01$, **** vs controle, $p < 0,0001$.
Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022

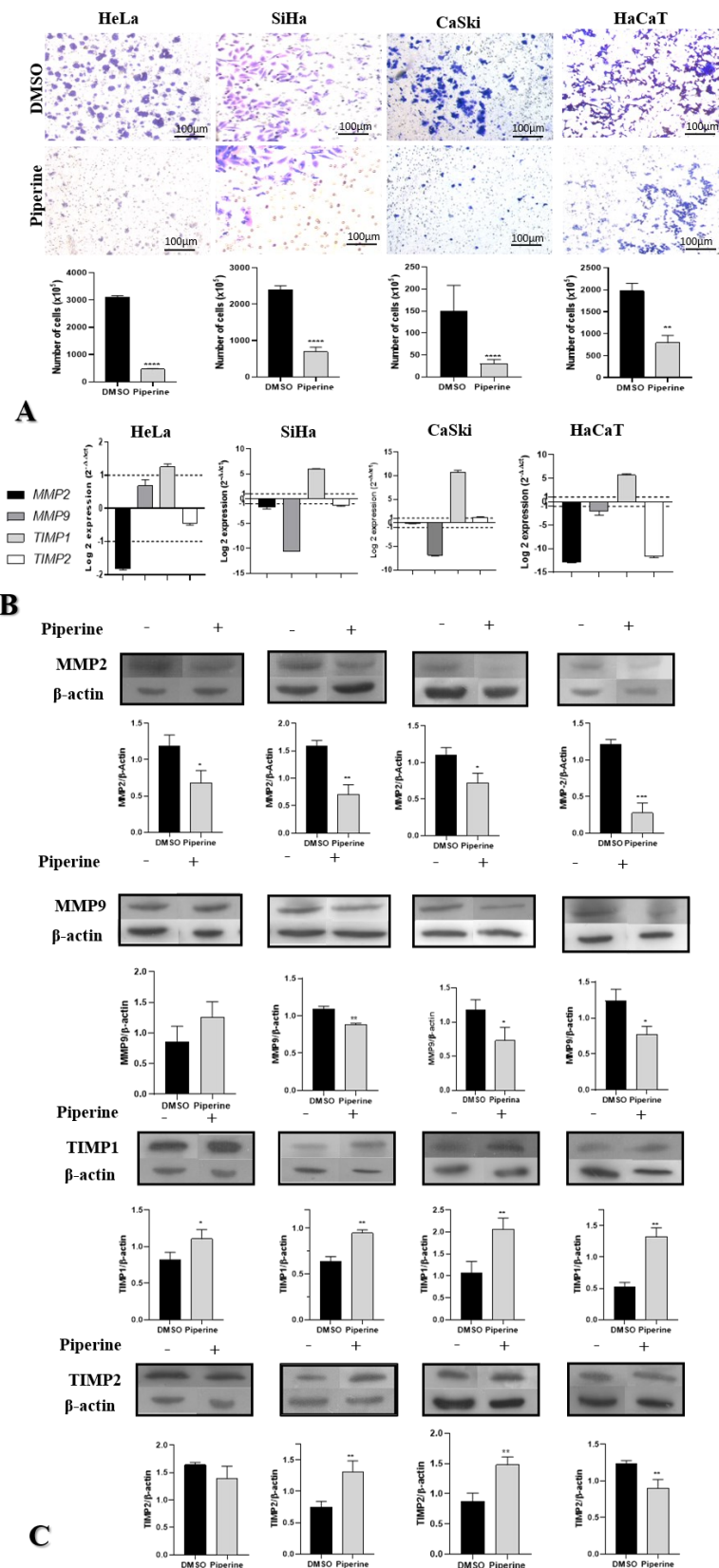
Piperina reduz migração celular em câncer cervical por meio da regulação de metaloproteinases de matriz e seus antagonistas

Nas três linhagens tumorais, HeLa, SiHa e CaSki, a piperina reduziu significativamente a migração celular, enquanto que na linhagem não tumorigênica, HaCaT (Figura 3A), essa redução foi menos intensa, sendo assim um ponto positivo do fitoterápico que se mostrou seletivo.

A piperina demonstrou regular MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 em células de câncer cervical a nível gênico e proteico. O gene da *MMP9*, bem como sua respectiva proteína foi

regulado negativamente nas células SiHa, CaSki e HaCaT. Nas células HeLa, SiHa e HaCaT a piperina provocou redução da expressão de RNA mensageiro de *MMP2*, já a proteína codificada por esse RNA foi regulada negativamente por piperina em todas as células analisadas. A nível gênico e proteico o TIMP1 foi superexpresso nas quatro células investigadas por ação de piperina. No caso do TIMP2, piperina regulou a expressão genica positivamente nas células CaSki e negativamente nas células não tumorais (HaCaT), no caso da expressão proteica, houve aumento da sua expressão nas células CaSki e SiHa e diminuição da expressão nas células HaCaT após o tratamento com piperina (Figura 3B e 3C).

Figura 3 – Piperina reduz migração celular em câncer cervical por meio da regulação de metaloproteinases de matriz e seus antagonistas.



Subtítulo: (A) Fotomicrografia da migração das células HeLa, SiHa, CaSki e HaCaT na câmara inferior do transwell, após 24h de tratamento com controle (DMSO) e com piperina [150 μ M] e os respectivos gráficos estatísticos. (B) Gráficos das expressões

do mRNA de *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2* que foram analisadas após o tratamento com piperina, em relação ao controle nas células HeLa SiHa, CaSki e HaCaT. A linha pontilhada ($\geq 1,0$ ou $\leq -1,0$) equivale à diferença da expressão significativa, baseada no logaritmo 2. (C) Gráficos de expressão proteica de MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 por Western Blot em células HeLa SiHa, CaSki e HaCaT após tratamento com controle (DMSO) e piperina [150 μ M]. * vs controle, $p < 0,05$, ** vs controle, $p < 0,01$, *** vs controle, $p < 0,001$.

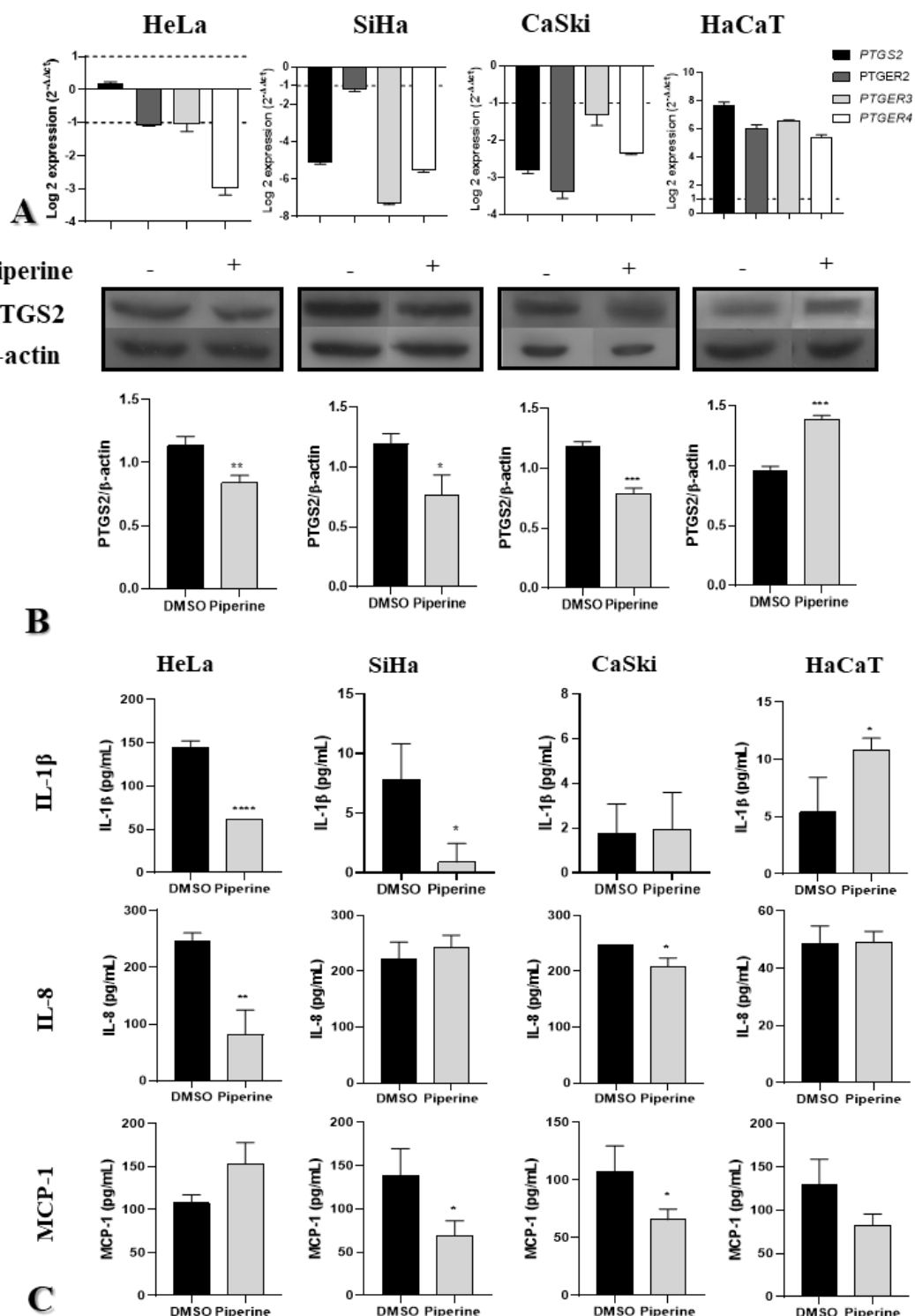
Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022.

Piperina reduz a tumorigênese por regular a via inflamatória PTGS2 e a secreção de citocinas

Os resultados mostraram que piperina regulou negativamente a expressão gênica e proteica de PTGS2 nas células CaSki e SiHa e apenas a nível proteico na linhagem HeLa. Os receptores, *PTGER2*, *PTGER3* e *PTGER4*, tiveram expressão gênica reduzida em todas as células tumorais, indicando redução da atuação da prostaglandina E2 sobre eles (Figura 4A e 4B). Já nas células não tumorais (HaCaT), o efeito foi inverso tendo uma regulação positiva de PTGS2 e seus receptores (*PTGER2*, *PTGER3* e *PTGER4*) (Figura 4A e 4B), mostrando efeito pro-inflamatório em células não tumorais.

Quanto à secreção de citocinas, os resultados indicam que piperina reduziu a secreção de IL-1 β nas células HeLa e SiHa, não variou em relação ao controle nas células CaSki e aumentou sua secreção na célula não tumoral (HaCaT). A citocina IL-8 teve sua secreção reduzida nas células HeLa e CaSki, mas não teve variação nas células SiHa e HaCaT, após tratamento com piperina. Em relação a quimiocinas MCP-1, a piperina reduziu seus níveis nas células SiHa e CaSki, porém não variou nas células HaCaT e HeLa (figura 4C).

Figura 4 - Piperina reduz a tumorigênese por regular a via inflamatória PTGS2 e a secreção de citocinas



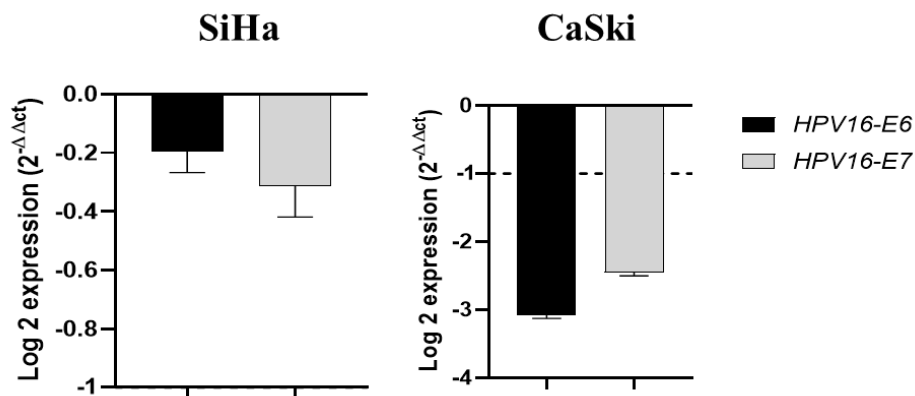
Subtítulo: (A) Gráficos das expressões do mRNA de *PTGS2*, *PTGER2*, *PTGER3* e *PTGER4* que foram analisadas após o tratamento com piperina, em relação ao controle nas células HeLa SiHa, CaSki e HaCaT. A linha pontilhada ($\geq 1,0$ ou $\leq -1,0$) equivale à diferença da expressão significativa, baseada no logaritmo 2. (B) Gráficos de expressão proteica de PTGS2 por Western Blot em células HeLa SiHa, CaSki e HaCaT após tratamento com controle (DMSO) e piperina [150 μ M]. (C) Gráficos do ensaio colorimétrico ELISA para análise das citocinas/quimiocinas IL-1 β , IL-8 e MCP-1 secretadas pelas células SiHa, HeLa, CaSki e HaCaT após tratamento com controle (DMSO) e piperina (150 μ M). * vs controle, $p < 0,05$, ** vs controle, $p < 0,01$, *** vs controle, $p < 0,001$ **** vs controle, $p < 0,0001$.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022.

Piperina reduz a expressão de oncogenes do HPV16 nas células CaSki

Conforme demonstrado na figura 5, piperina reduziu a expressão significativamente (de 4 a 6 vezes menos) das oncogenes E6 e E7 nas células CaSki, mas não modificou os níveis de expressão nas células SiHa.

Figura 5: Piperina reduz a expressão de oncogenes do HPV16 nas células CaSki



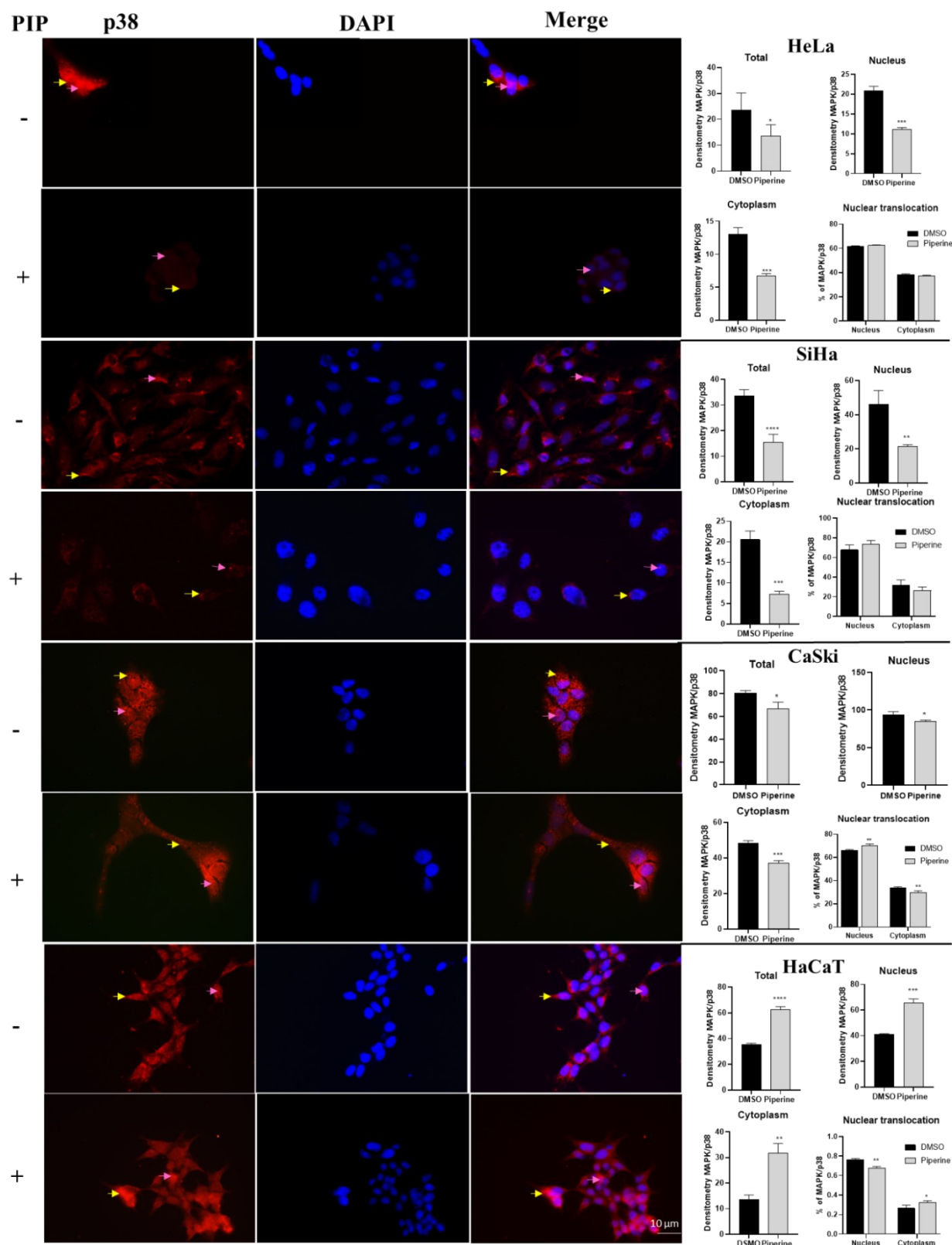
Subtítulo: Gráficos das expressões do mRNA de *HPV16-E6* e *HPV16-E7* que foram analisadas após o tratamento com piperina, em relação ao controle nas células SiHa e CaSki. A linha pontilhada ($\geq 1,0$ ou $\leq -1,0$) equivale à diferença da expressão significativa, baseada no logaritmo 2.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022

Piperina modula a expressão de p38 e ERK (MAPKs)

Nossos resultados mostraram que houve uma redução da expressão de p38, nas células tumorais (HeLa, SiHa e CaSki) em todos os compartimentos celulares analisados (células em sua totalidade, núcleo e citoplasma). Além disso piperina aumentou a translocação nuclear de p38 nas células CaSki exclusivamente (Figura 6). De modo contrário, nas células não tumorais, HaCaT, a expressão de p38 aumentou significativamente tanto no núcleo quanto no citoplasma. Apesar de piperina ter aumentado a expressão de p38 nessas células, ela reduziu o processo de translocação nuclear, tendo uma porcentagem inferior de p38 ativa no núcleo em relação ao citoplasma.

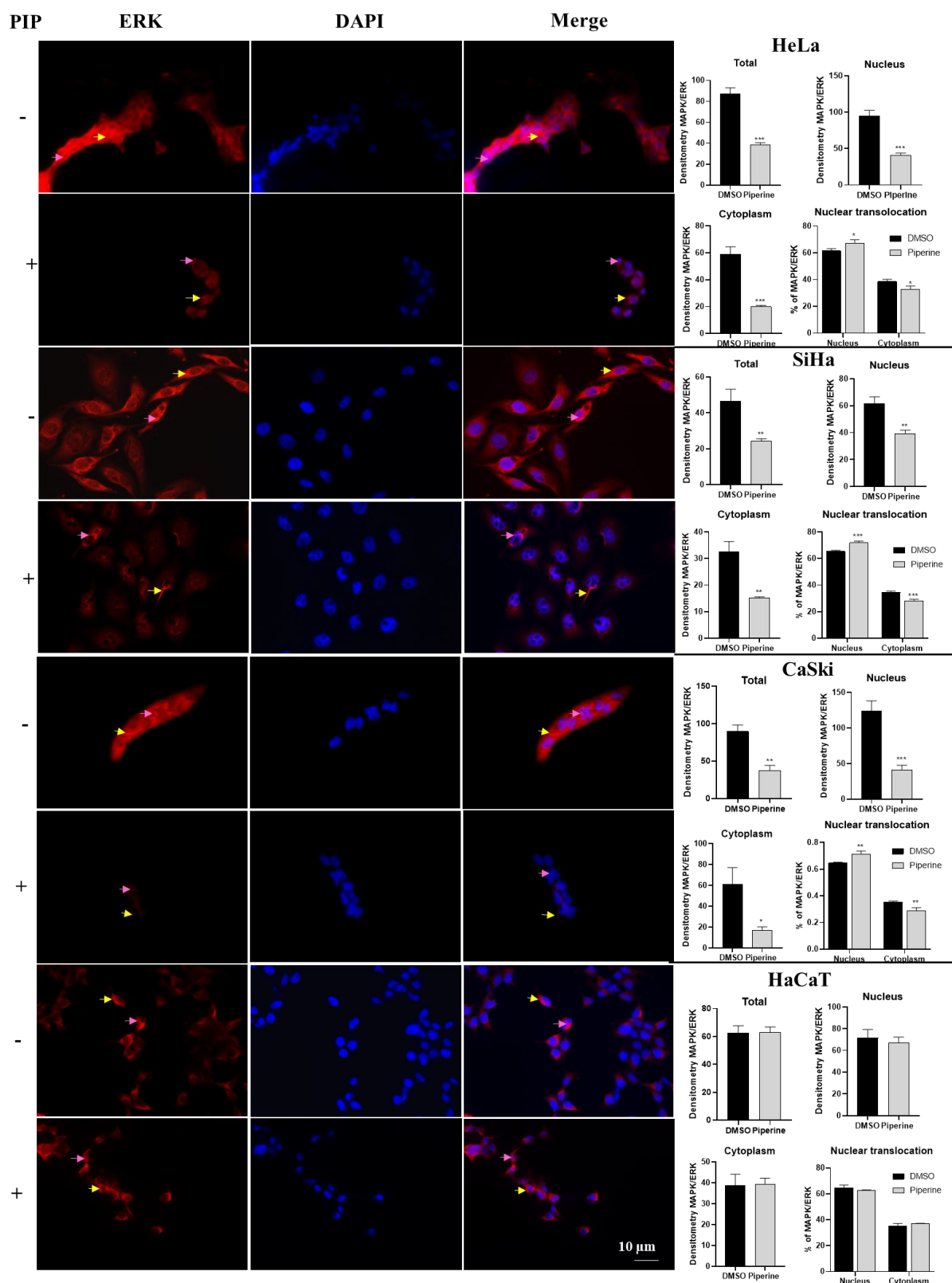
Figura 6 - Piperina modula a expressão de p38



Subtítulo: Imunocitoquímica da expressão proteica de p38/MAPK: apontada pela seta amarela no citoplasma e pela rosa no núcleo. Gráficos demonstrando a densitometria em cada compartimento celular e de translocação nuclear após tratamento com controle (DMSO) e piperina [150µM]. * vs controle, $p < 0.05$, ** vs controle, $p < 0.01$, *** vs controle, $p < 0.001$.
 Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022

A expressão de ERK foi reduzida em todos os compartimentos celulares das linhagens de câncer cervical, como evidente na Figura 7. Entretanto, apesar da piperina ter reduzido a expressão de ERK houve um aumento da translocação nuclear dessa proteína após o tratamento com piperina. Enquanto nas células HaCaT a expressão de ERK e sua translocação não foi alterada pela ação de piperina, justificando os efeitos menos acentuados sobre o ciclo celular e proliferação dessas células.

Figura 7 – Piperina modula a expressão de ERK.



Subtítulo: Imunocitoquímica da expressão proteica de ERK/MAPK: apontada pela seta amarela no citoplasma e pela rosa no núcleo. Gráficos demonstrando a densitometria em cada compartimento celular e de translocação nuclear após tratamento com controle (DMSO) e piperina [150µM]. * vs controle, $p < 0.05$, ** vs controle, $p < 0.01$, *** vs controle, $p < 0.001$.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022

DISCUSSÃO

A proliferação celular aumentada constitui o principal mecanismo que desencadeia a carcinogênese, sendo um importante alvo das terapias contra o câncer (FEITELSON et al., 2015). Os resultados mostraram ótimos efeitos da piperina sobre a proliferação celular, na qual foi reduzida significativamente em diferentes concentrações na curva de crescimento e na formação de colônias. O mecanismo desencadeado pela piperina que diminuiu essa propriedade foi a parada das células em diferentes fases do ciclo celular, em que nas células epidermóides foi na fase G1/G0 e nos adenocarcinomas na fase G2/M.

Esse mecanismo em termos moleculares foi regulado pela proteína ERK, a qual teve sua expressão modulada negativamente pela piperina. A via ERK quando excessivamente ativada, aumenta a proliferação das células, por ativar fatores de transcrição como CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP), c-Myc (regulador transcricional Myc-like), AP-1 e NF- κ B que desempenham ações sobre genes que induzem a proliferação celular (GUO et al., 2020; SUN et al., 2015).

Outros mediadores moleculares associados a proliferação celular são as citocinas IL-1 β e IL-8 que são excessivamente secretadas em câncer cervical contribuindo também para metástase, angiogênese e sobrevivência celular (APTE et al., 2006; VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; RÉBÉ; GHIRINGHELLI, 2020; JIA et al., 2018; PARADKAR et al., 2014; VAHEDPOUR et al., 2021). As oncogenes E6 e E7 do HPV16 também estão associadas a esses mecanismos, pois degradam mediadores envolvidos no controle da proliferação das células e apoptose (SENBA; MORI, 2012). Assim, a baixa expressão dessas citocinas e de E6 e E7 por ação de piperina demonstram ser responsáveis pela redução desses eventos celulares.

O controle da sobrevivência celular é uma propriedade que mantém a homeostase fisiológico das células, pois quando uma célula está danificada ou geneticamente alterada sem que seja possível ocorrer o reparo, essas são enviadas para a morte celular programada. No câncer, ocorre um descontrole desse mecanismo que permite a sobrevivência de células mutadas para progressão tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000; KASTAN; BARTEK, 2004). Nossos resultados apontam que piperina conteve a viabilidade celular em diferentes concentrações e que o mecanismo de morte responsável foi a morte celular programada apoptótica.

A apoptose é caracterizada por eventos moleculares que provoca o encolhimento celular, perda de organelas, formação de vacúolos na membrana (blebs) e fragmentação do DNA (YAN; ELBADAWI; EFFERTH, 2020), esses caracteres morfológicos estão bem

evidentes no nosso ensaio de morfologia e em especial a fragmentação do DNA foi demonstrada pelo ensaio cometa, onde a cauda do cometa é proporcional a quantidade de DNA fragmentado (MUGANDA, 2016; YAN; ELBADAWI; EFFERTH, 2020; GONTIJO et al., 2003). Os resultados apoptóticos e genotóxicos demonstram efeitos menos intenso nas células HaCaT, em que não houve apoptose tardia ou necrose e nem efeito genotóxico sobre o DNA, sendo muito positivo, pois é a apoptose tardia e necrose que causa toxicidade as células normais em tratamentos quimioterápicos (SADRI-NAHAND et al., 2020).

Resultados semelhantes a esses foram obtidos em outras linhagens celulares. Em câncer de cólon, de mama, retal e melanoma, piperina reduziu a proliferação e viabilidade celular a partir da parada das células na fase G1/G0 do ciclo celular com consequente indução a apoptose (YAFFE et al., 2015; YAFFE et al., 2013; DE ALMEIDA et al., 2020; DO et al., 2013; DOUCETTE et al., 2013; YOO et al., 2019; FOFARIA; KIM; SRIVASTAVA, 2014). Já em células de leucemia humana, o mesmo ocorreu, mas dessa vez com acúmulo das células na fase S do ciclo celular (LI et al., 2020) e em câncer oral, de ovário e osteossarcoma na fase G2/M (SIDDIQUI et al., 2017; QIU et al., 2019; ZHANG et al., 2015).

A metástase é um processo biológico celular com várias etapas que envolvem cascatas que induzem a migração e invasão, permitindo a disseminação de células cancerosas em outros tecidos e órgãos (VALASTYAN; WEINBERG, 2012; JING et al., 2011). Quando o câncer evolui para metástase reduz significativamente a sobrevivência dos pacientes, em que cerca de 90% vão a óbito (ZEESHAN; MUTAHIR, 2017). Conforme nossos resultados, piperina demonstrou reduzir a migração celular por regular MMP2 e MMP9 a partir de sua ação sobre os seus respectivos antagonistas, pois TIMP1 e TIMP2 inativam as metaloproteinases e impedem sua ação, desencadeando assim a redução da migração das células tumorais (CALDEIRA; LARANHA, 2020).

As MMPs são proteínas proteolíticas que degradam a matriz extracelular (MEC), contribuindo para a metástase, angiogênese, reparo tecidual e processos inflamatórios. As MMP2 e MMP9 atuam na degradação proteolítica de componentes da matriz extracelular, o que permite o desprendimento das células da matriz e do próprio tecido, favorecendo sua migração pela corrente sanguínea até outros tecidos e órgãos. As MMPs têm sua atividade contida por inibidores de metaloproteinases de matriz (TIMPs), estudos demonstram que níveis elevados de TIMP2 foi associado a uma melhor evolução clínica em pacientes com tumores sólidos (BRAICU et al., 2014; CALDEIRA; LARANHA, 2020; CUI et al., 2017), demonstrando que o efeito de piperina sobre esse mediador é de grande impacto para o controle do avanço da tumorigênese. A superexpressão de MMP2 e MMP9 foi observado em amostras teciduais e

plasmáticas cervicais e demonstra estar relacionado ao mal prognóstico na doença. (LIBRA et al., 2009; BRAICU et al., 2014; ZAJKOWSKA et al., 2018), portanto a ação da piperina sobre essas MMPs representa uma excelente resposta para o controle da migração celular.

As citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-8 e MCP-1 quando exageradamente secretadas sinalizam para a síntese de metaloproteinasas e consequente acentuação da migração (VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; VAHEDPOUR et al., 2021; SHIAU et al., 2013; APTE et al., 2006; RÉBÉ; GHIRINGHELLI, 2020; YANG et al., 2020), portanto, assim como piperina modulou negativamente as MMPs ela também reduziu os níveis de secreção dessas citocinas, tendo uma resposta dupla sobre o controle metastático.

Em outros estudos foi demonstrando o mesmo efeito, em que piperina controlou a redução metastática por regulação de MMPs e TIMPs. Em osteosarcoma, piperina inibiu a migração celular por redução da expressão de MMP2 e MMP9 e aumento da expressão de TIMP1 e TIMP2 (ZHANG et al., 2015). De maneira semelhante, em câncer de mama triplo negativo piperina inibiu a migração celular por regulação negativa da expressão de MMP2 e MMP9 (GREENSHIELDS et al., 2015;). Em câncer e próstata metastático piperina regulou a via de sinalização Akt / mTOR / MMP-9 e reduziu a metástase (ZENG; YANG, 2018).

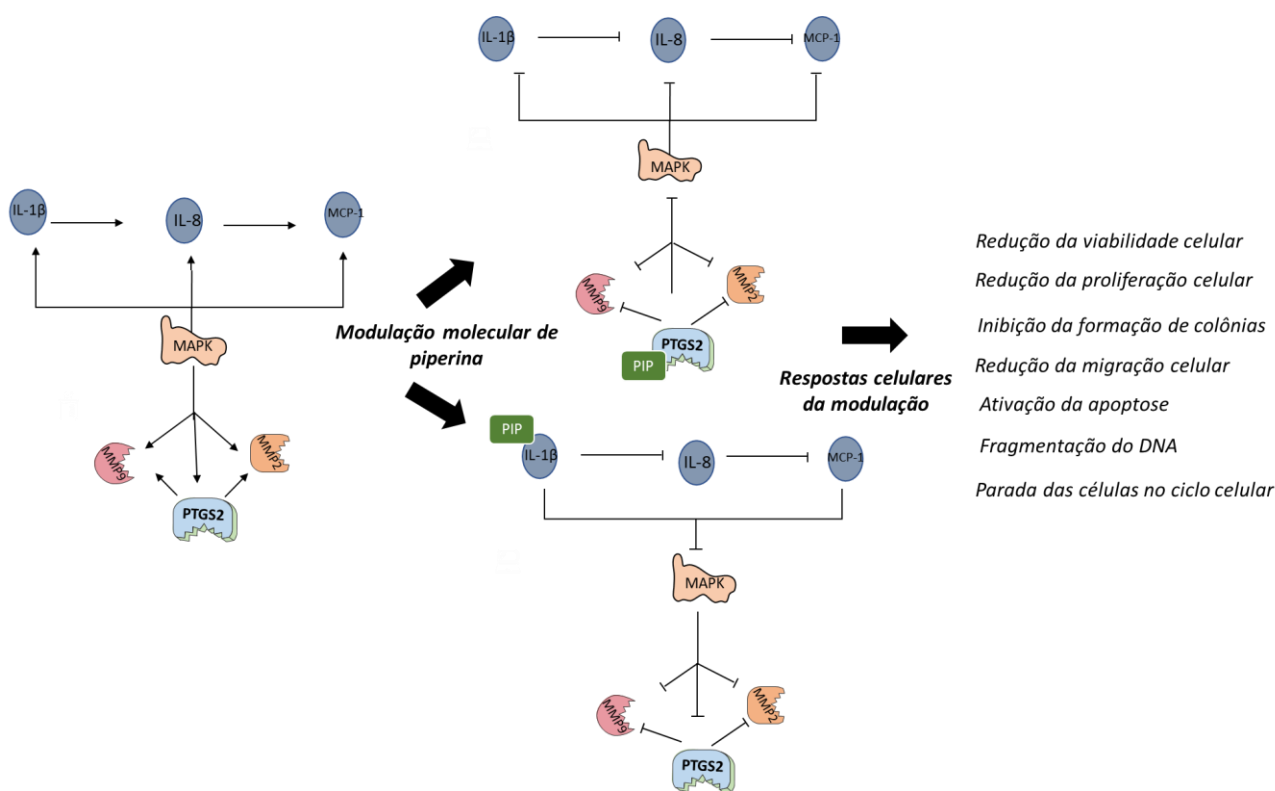
A inflamação está intimamente relacionada a gênese e progressão neoplásica, principalmente no câncer cervical que é em sua maioria originado por infecção persistente por HPV. Expressão da enzima PTGS2, do seu produto PGE2, bem como de seus receptores emitem a resposta inflamatória, que resulta em proliferação celular aumentada, sobrevivência celular e metástase (ADEFUYE; SALES, 2012; SINGH et al., 2019; YE et al., 2020). Processo esses contidos pela ação de piperina no nosso trabalho em função da redução da expressão de PTGS2 e seus respectivos receptores, impedir, portanto, a ligação de prostaglandina e consequentemente a transdução de sinais para a ocorrência desses eventos.

A via PTGS2 regula e é regulada pelos mediadores aqui investigados, estudos mostraram que PTGS2 e PTGER4 quando superexpressas induzem a expressão de MMP2 e MMP9, e por consequência acentuam a migração celular (YANG et al., 2006; GAN et al., 2016), ambos os mediadores no nosso trabalho foram expressos negativamente, bem como a migração foi reduzida. A PGE2 produzida por PTGS2 regula a expressão de IL-1 β , IL-8 e MCP-1 (VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; TAO et al., 2021) e tem sua regulação mediada por essas citocinas a partir de um feedback positivo, tendo como intermédio as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), ERK e p38 (GAN et al., 2016; FUTAGAMI et al., 2008; GONZALEZ MAGLIO, 2011; HUANG et al., 2014). Todos esses mediadores

foram negativamente regulados por piperina nas células tumorais cervicais, indicando efeito anti-inflamatório de piperina partindo de PTGS2.

Podemos sugerir que piperina pode ter regulado a via PTGS2 se ligando a essa proteína, porque estudos de encaixe molecular (docking) demonstraram ligação direta de piperina à PTGS2 com pontuação de 5042 kcal/mol (KIRUBHANAND et al., 2020). Por outro lado, piperina também tem grande afinidade de ligação à IL-1 β , que revelou a presença de um sítio de ligação para piperina com uma constante de afinidade de $14,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ a 298 K , e interação espontânea entre essas moléculas ($\Delta G = -25 \text{ kJ/mol}$) (ZAZERI et al., 2020). Essas evidências junto aos resultados desse trabalho instiga a hipótese de que piperina possa ter se ligado nesses mediadores, impedindo a conexão de IL-1 β ao seu receptor, bem como a síntese de PGE2, resultando em efeito anti-inflamatório e antitumoral de piperina nas células tumorais, conforme podemos observar na figura 8.

Figura 8: Representação gráfica da modulação de piperina sobre IL-1 β e PTGS2



Subtítulo: Representação gráfica da relação entre as vias estudadas e os resultados obtidos: as citocinas IL-1 β induz a expressão de IL-8 que por sua vez estimula a expressão de MCP-1. Todas essas citocinas são reguladas por PTGS2 que conjuntamente a partir de um feedback positivo as regula, tendo como intermediária a via MAPK. As MMPs também são estimuladas pelas citocinas e pela PTGS2. Quando piperina se liga a PGS2 todos os envolvidos na via são regulados negativamente, e o mesmo ocorre havendo a ligação de piperina na IL-1 β . As respostas moleculares da modulação de piperina resultam em redução da viabilidade, proliferação, migração e formação de colônia, bem como a ativação da apoptose, fragmentação do DNA e parada das células no ciclo celular. Fonte: ELABORADO PELA AUTORA, 2022

Porém, diferente do observado nas células tumorais, nas células HaCaT, a expressão de IL-1 β , PTGS2 e seus receptores foi positivamente regulado por piperina, indicando ação pró inflamatório das células não tumorais, frente a essa molécula, considerada um estímulo de estresse. Isso porque p38 é a principal responsável pela resposta ao estresse, e a mesma também foi positivamente regulada por piperina resultando na expressão aumentada de IL-1 β e PTGS2 que respondem a esse estímulo a partir da inflamação (LEE; RAUCH; KOLCH, 2020), podendo justificar as respostas menos intensa de piperina sobre a apoptose, ciclo celular e migração das células no nosso trabalho.

A inflamação é considerada um processo contraditório no câncer, pois quando a inflamação é crônica, a resposta piora a progressão tumoral, porém em células saudáveis, a inflamação é uma resposta positiva visando eliminar um agente estranho ou estressor (MEDZHITOV, 2008; HAGEMANN; BALKWILL; LAWRENCE, 2007). Nesse último caso, considerando o organismo como um todo, a inflamação nas células não tumorais poderia ser uma forma de reduzir os efeitos citotóxicos da piperina nessas células.

Quanto ao efeito anti-inflamatório de piperina na literatura, foi demonstrado que esse alcaloide reduziu a expressão de PTGS2, PGE2 e IL-1 β em modelos de osteoartrite (YING et al., 2013), inflamação após irradiação UV-B (JAISIN et al., 2020) e a inflamação induzida por isquemia-reperusão cerebral (VAIBHAV et al., 2012). Em células epiteliais gástricas infectadas por *H. pylori*, piperina prejudicou a expressão genica e a secreção de IL-8 (THARMALINGAM et al., 2016). Em câncer gástrico, piperina reprimiu a expressão de IL-1 β resultando na inibição da ativação de p38/MAPK e STAT3 (XIA et al., 2015). Em modelo de camundongos com doença inflamatória intestinal pré tratadas com piperina, os níveis de MCP-1 e IL-1 β também foram diminuídos (HU et al., 2015).

Portanto, esses estudos apontam o papel anti-inflamatório de piperina a partir dessas vias gênicas, porém como demonstrado há uma lacuna na literatura sobre a função de piperina associada ao câncer, demonstrando a contribuição desse trabalho para a compreensão dos mecanismos de ação desse alcaloide na inflamação do câncer cervical. A qual evidenciamos nesse estudo um efeito modulador da progressão neoplásica pela piperina atuando a partir de PTGS2 e IL-1 β , que resultou na modulação negativa de p38 e ERK, outras citocinas (IL-8 e MCP-1) e de MMP9 e MMP2. Assim, esses mediadores uma vez negativamente expressos desencadearam a diminuição da viabilidade, migração, proliferação celular, formação de colônia, parada do ciclo celular e apoptose.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Linhagens celulares

Foram utilizadas três linhagens tumorigênicas e uma linhagem não tumorigênica. As linhagens são da American Tissue Cell Culture (ATCC): carcinoma epidermoide de colo de útero (SiHa), adenocarcinoma de colo de útero (HeLa) e carcinoma epidermoide de colo de útero (CaSKi). Já a linhagem tumorigênica estudada foi a linhagem celular de queratinócitos derivados de pele humana (HaCaT).

Piperina

Foi utilizado o composto piperina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na concentração de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 μM , diluídas em DMSO em concentrações inferiores a 0,85% nos ensaios de viabilidade e proliferação celular e nos ensaios posteriores em concentrações inferiores a 0,5%, concentrações essas não tóxicas às células estudadas (SIENIAWSKA et al., 2019).

MÉTODOS

Tratamento

Para todos os experimentos, as células foram cultivadas em placas de cultura em concentrações de células adequadas para cada experimento, no plaqueamento foi utilizado o meio completo com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 24h, o meio foi substituído por meio sem soro a fim de sincronizar as células, e após 24h, o tratamento foi inserido nas células com meio completo. Nos ensaios iniciais piperina foi aplicada nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 μM , o DMSO foi utilizado como controle negativo e os tempos de tratamento nas células foram de 4, 24, 48 e 72 horas. A partir do ensaio de migração celular foi escolhido um tempo e concentração de tratamento com melhor desempenho e seletividade as células tumorais. As células dos experimentos foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Todos os ensaios foram realizados em três experimentos independentes e em triplicatas e os dados foram analisados estatisticamente pelo GraphPad Prism 8. 0. 1.

Cultivo e análise da morfologia celular

As linhagens celulares HeLa e SiHa foram semeadas em meio MEM (E), a linhagem CaSKi em RPMI 1640 e a HaCaT em DMEM, todos suplementados com 10% de soro bovino, 10mM aminoácidos não essenciais, 100mM piruvato de sódio e 1mM antibiótico/antimicótico. O crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente em microscópio invertido e fotografadas, quando a densidade celular se mostrou alta (entre 70 e 90%), o material foi submetido à tripsinização e subdividido em réplicas.

Proliferação celular

As células (5×10^4) foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços, semeadas em 300 μ L de meio completo. As células foram tripsinizadas, coradas com Azul de Tripán e contadas no contador de células Countess Automated Cell Counter II (Life Technologies). Para analisar o índice de proliferação foi realizada uma curva de crescimento para cada concentração a ser testada após 4, 24, 48 e 72 horas de tratamento. Após, as curvas de crescimento foram analisadas estatisticamente pela análise de variância a dois critérios (ANOVA) e teste de Dunnett's (GraphPad Prism 8.0.1.), sendo $p < 0,05$ considerado diferença significativa.

Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular

O ensaio foi realizado utilizando o reagente MTS – CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (PROMEGA, USA), segundo normas do fabricante. As células (5×10^3) foram colocadas em placas de 96 poços contendo 100 μ L de meio completo. Após os tempos de tratamento as células receberam 20 μ L da solução de MTS e após 3h de reação foi feita a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm (Thermo Plate, Tp-Reader Basic).

Para determinação do IC₅₀ (Concentração Inibitória para 50% das Células), utilizando a função no aplicativo GraphPad Prism 8.0.1. Para análise de viabilidade celular foi aplicado a análise de variância a dois critérios (ANOVA) e o teste de Dunnett's (GraphPad Prism 8.0.1.), sendo $p < 0,05$ considerado diferença significativa.

Ensaio de Migração Celular

As células (5×10^4) foram adicionadas ao compartimento superior dos insertos transwell com membrana de poros de 8 μ M de diâmetro (BD - Biosciences San Jose, CA, USA) contendo 200 μ L de meio sem soro e tratamentos. No compartimento inferior foi adicionado 750 μ L de meio completo com soro fetal bovino. Após, as células foram incubadas em estufa por 24h para que ocorresse a migração seguida por fixação em paraformaldeído e coloração em

cristal violeta. Os insertos foram analisados e fotografados em cinco diferentes campos. Os resultados foram analisados utilizando o teste t, sendo $p < 0,05$ considerado diferença significativa.

Ensaio de formação de colônias em meio líquido

As células (8×10^2) foram cultivadas em placas de 6 poços contendo meio completo. Após 12 h de cultura, foi adicionado o tratamento e a cada dois dias o meio e o tratamento foram substituídos. Após 14 dias de cultura, as células foram fixadas em metanol e coradas com cristal violeta. As colônias foram fotografadas e contadas por inspeção visual e o assim como o número de células por colônias, porém por microscopia. Por fim os dados submetidos a análise estatística pelo teste t, sendo $p < 0,05$ considerado diferença significativa.

Ensaio Cometa Alcalino

O “pellet” das células (5×10^4) foram misturadas a agarose Low Melting de baixo ponto de fusão e adicionadas sob lâminas contendo agarose de ponto de fusão normal. Foi realizado a etapa de lise para o rompimento das membranas e sequencialmente uma corrida em eletroforese por 20 minutos a 25V e 300Kva em solução tampão alcalina. Por fim as células foram neutralizadas e fixadas em álcool etílico 100%. As lâminas foram coradas com uma solução de Gel Red 1x, e analisadas em microscópio de fluorescência no 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 e submetidos a formula para determinar o índice de danos, seguindo o protocolo de KOBAYASHI (1995).

Análise de Apoptose e Ciclo Celular

As células foram analisadas pela citometria de fluxo (Guava Easy Cyte, MILLIPORE). Para a análise de Apoptose e Necrose celular, as suspensões de células (1×10^6) foram incubadas com anticorpo monoclonal ANXA5 conjugado com fluorocromo PE (BD Phar-migen, San Diego, USA) e com 7-ADD seguindo o protocolo do fabricante. Para a análise de Ciclo celular, as células (1×10^6) foram fixadas com etanol 70% e ressuspensas na solução Guava® Cell Cycle Reagent (MILLIPORE, USA) seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida as células analisadas por citometria de fluxo (Guava Easy Cyte, MILLIPORE) e os dados submetidos a análise de variância a dois critérios (ANOVA) e o teste Sidak.

Extração e quantificação de RNA

O RNA das células controle e tratadas com a piperina foi extraído com o RNeasy® Mini Kit (QIAGEN Group, USA) seguindo o protocolo do fabricante e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) e avaliada quanto à integridade pela presença das duas bandas ribossômicas 18S e 28S, em gel de agarose 1%. O cDNA (DNA complementar) foi obtido pela reação de transcrição reversa com o sistema High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguindo o protocolo do fabricante.

Os genes estudados neste projeto estão evidentes na tabela 2 com suas respectivas sequências. Os genes foram previamente selecionados por estarem relacionados ao processo tumoral do colo de útero (HEMMAT; BAGHI, 2018), juntamente a nossa hipótese da ação anti-inflamatória de piperina mediada por essa via genética (YING et al., 2013).

Tabela 2. Primers utilizados na PCR em tempo real

Oligonucleotídeos	Sequência
<i>HPV16-E6</i> anti-sense	5' CTACGTGTTCTTGATGATCTG 3'
<i>HPV16-E6</i> sense	5' CTTACCACAGTTATGCACAGAG 3'
<i>HPV16-E7</i> anti-sense	5' TGCCCATTAACAGGTCTTCC 3'
<i>HPV16-E7</i> sense	5' ACAAGCAGAACCGGACAGAG 3'
<i>PTGS2</i> anti-sense	5' AGAAGGCTTCCCAGCTTTTG 3'
<i>PTGS2</i> sense	5' ATTCCCTTCCTTCGAAATGC 3'
<i>PTGER2</i> anti-sense	5' AGGTCCCATTTTTCTTTTCG 3'
<i>PTGER2</i> sense	5' CCACCTCATTCTCCTGGCTA 3'
<i>PTGER3</i> anti-sense	5' TCTCCGTGTGTGTCTTGCAG 3'
<i>PTGER3</i> sense	5' AGCTTATGGGGATCATGTGC 3'
<i>PTGER4</i> anti-sense	5' CCAAACCTGGCTGATATAACTGG 3'
<i>PTGER4</i> sense	5' CGAGATCCAGATGGTCATCTTAC 3'
<i>MMP2</i> anti-sense	5' CCGTCAAAGGGGTATCCATC 3'
<i>MMP2</i> sense	5' AAGTCTGGAGCGATGTGACC 3'
<i>MMP9</i> anti-sense	5' ATTTGACTCTCCACGCATC 3'
<i>MMP9</i> sense	5' TTGTGCTCTCCCTGGAGAC 3'
<i>TIMP1</i> anti-sense	5' TTTTCAGAGCCTTGGAGGAG 3'
<i>TIMP1</i> sense	5' ACTGTTGGCTGTGAGGAATG 3'
<i>TIMP2</i> anti-sense	5' CTATATCCTTCTCAGGCCCTTTG 3'
<i>TIMP2</i> sense	5' AGAAGGAAGTGGACTCTGGAAAC 3'
<i>GAPDH</i> anti-sense	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3'
<i>GAPDH</i> sense	5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'

Análise de PCR 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 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), beta actina (ACTB) e beta tubulina (TUBB), que foram utilizados como normalizadores, e processadas em volume final de 20µL contendo 200 ng 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 dos genes constitutivos (GAPDH, ACTB e TUBB) como controle endógeno. Para escolha do melhor controle endógeno foi utilizado o Software DataAssist (Life Technologies). Finalmente, os valores de expressão gênica obtidos nas análises foram normalizados pelo resultado da quantificação da amostra controle, escolhida como calibrador de todas as amostras. Foi utilizado o método de Pfaffl, 2001 para os cálculos de análise comparativa.

Extração e quantificação de proteínas

As proteínas foram extraídas utilizando tampão de lise RIPA pH 7.4 (Sigma cod R0278), inibidor de protease (Sigma cod P8340) e de fosfatase Na₃VO₄ (Sigma cod 450243), seguindo protocolo do fabricante. Alíquotas dessas amostras foram submetidas a quantificação utilizando o Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Western Blotting

A amostra lisada foi diluída e normalizadas em H₂O para obtenção de 30µg de proteínas, foram adicionados junto as amostras β-mercapto (Sigma cod M6250) e SDS 10%. Essa solução foi fervida em banho seco a 100°C por 5 minutos. As proteínas (30µg) foram separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 12%, de acordo com o protocolo MiniPROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, USA), e transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, USA). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó diluído em TBS-T (Bio-Rad Reagent, Hercules, USA), e mantidas por 1 a 12 hora à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas over-night com os anticorpos PTGS2 (1:500 µL Abcam, Cambridge, UK) MMP2 (1:500 µL, AB-clonal, Woburn, EUA), MMP9 (1:1000 µL, AB-clonal, Woburn, EUA), TIMP1 e TIMP2 (1:500 µL, BD Bioscience, EUA). Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com peroxidase horseradish (HRP) (1:1000 µL Abcam,

Cambridge, UK). A β -actina foi detectada simultaneamente como controle da reação, pelo anticorpo mouse monoclonal anti-IgG; 1:2000 (Abcam, Cambridge, MA, USA).

Os produtos da reação HRP foram visualizados em filme fotográfico Hyperfilme (Amersham, Little Chalfont, UK) após a aplicação do kit quimioluminescente ECL (Bio-Rad, Hercules, USA). A densitometria quantitativa dos níveis das proteínas foi realizada no image J. Os níveis de expressão das proteínas obtidos foram calculados e demonstrados como média \pm S.E.M. da densidade óptica média e submetidos ao teste t, sendo $p < 0,05$ considerado diferença significativa.

ELISA

O sobrenadante das células dos diferentes grupos experimentais foi recolhido ao longo dos outros ensaios realizados. Foi seguido o protocolo do fabricante BD Biosciences para cada citocinas/quimiocinas analisada, sendo elas IL-1 β , IL-8 e MCP-1. Após, a análise foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Os dados foram analisados pelo teste t.

Imunocitoquímica

As células (1×10^5) foram cultivadas em lâminas de cultura (Nunc, Naperville, IL, EUA) e foram fixadas em paraformaldeído 4%, permeabilizadas em Triton X, lavadas com PBS-T e submetida a bloqueio das ligações não específicas em BSA (1%) e soro normal goat (3%). As células foram imunocoradas com anticorpos monoclonais primários de camundongo (Ab) anti-p38/MAPK (BD Bioscience, EUA) e anti-ERKpan (BD Biosciences, EUA) diluído a 1:200 seguido de incubação durante a noite a 4°C. Após lavagens repetidas em PBST (1%), o anticorpo IgG anti-camundongo de cabra (específico do fragmento Fc, Dako, Glostrup, Dinamarca) conjugado com Alexa flúor 546 na proporção de 1:200 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) foi adicionado, seguido de 1 hora incubação à temperatura ambiente. Por fim, as células foram lavadas e as lâminas foram montadas com meio de montagem com DAPI (Sigma Aldrich, EUA). A análise foi realizada usando um microscópio de fluorescência Axioskop 2 (Zeiss, GR) equipado com uma câmera digital. Foram capturadas 10 imagens digitais de cada réplica usando o software AxioVision (Zeiss, GR) onde 6 células de cada imagem foram analisadas por densitometria obtida no image J que foi estatisticamente analisada pelo teste t, sendo $p < 0,05$ considerado diferença significativa.

CONCLUSÕES

Nossos resultados *in vitro* demonstram que a piperina diminui a progressão tumoral nas células de câncer cervical comprovada pela redução da viabilidade, proliferação celular e formação de colônia, processos esses desencadeados pela parada das células no ciclo celular e apoptose. Esses efeitos foram mediados por piperina a partir da redução da expressão de ERK, IL-1 β e IL-8. Ainda, piperina reduz a migração celular pela regulação da expressão gênica e proteica de MMPs e TIMPs e da secreção de MCP-1.

Portanto, piperina reduz a evolução neoplásica *in vitro* por atuar sobre a via PTGS2, que por sua vez regula a secreção de citocinas e a expressão de MMPs, MAPKs e TIMPs, demonstrando ser um potencial fitoterápicos para tratamento complementar de câncer de colo de útero, mas, ensaios funcionais se fazem necessários frente às novas tecnologias e visando as aplicações clínicas.

4. CONCLUSÕES

Nossos resultados permitem aceitar nossa hipótese de que o efeito antitumoral da piperina em câncer de colo de útero é modulado pelas vias inflamatórias da ciclooxigenase prostaglandina, nos permitindo chegar nas seguintes conclusões:

1. Piperina diminui a progressão tumoral *in vitro* nas células de câncer cervical, evidente pela redução da proliferação, viabilidade celular e formação de colônias, a partir de mecanismos de parada das células nos pontos de verificação G1/G0 e G2/M do ciclo celular e consequente indução das células a morte apoptótica.
2. Piperina reduz a migração celular pela regulação da expressão gênica e proteica de MMPs e TIMPs.
3. Piperina tem efeito menos intenso na linhagem HaCaT, na qual apresenta maior IC₅₀, conduz poucas células a apoptose e a parada do ciclo celular, não apresenta genotóxicidade, provando ser menos invasiva nas células não tumorais, devido ao efeito pró-inflamatório pela regulação positiva de p38, PTGS2 e seus receptores.
4. Piperina reduz a secreção de citocinas IL-1 β , IL-8 e MCP-1 nas células tumorais, o que reflete na regulação da expressão de PTGS2 e dos receptores de PGE2, uma vez que ocorre um feedback positivo entre esses mediadores.
5. A expressão de p38 e ERK é reduzida por ação de piperina, sendo essas vias intermediárias para a ativação da transcrição de PTGS2, MMPs e das citocinas.

Portanto, piperina reduz a evolução neoplásica *in vitro* por atuar sobre a via PTGS2, que por sua vez regula a secreção de citocinas e a expressão de MMPs, MAPKs e TIMPs, demonstrando ser um potencial fitoterápicos para tratamento complementar de câncer de colo de útero.

REFERÊNCIAS

- ADEFUYE, A.; SALES, K. Regulation of inflammatory pathways in cancer and infectious disease of the cervix. **Scientifica**. p. 1-8, 2012
- AINOUZE, M. et al. Human papillomavirus type 16 antagonizes IRF6 regulation of IL-1 β . **PLoS Pathog**, v. 14, n. 8, p. 1–27, 2018.
- AL-TAHHAN, M. A.; ETEWA R. L.; EL BEHERY, M. M. Association between circulating interleukin-1 beta (IL-1 β) levels and IL-1 β C-511T polymorphism with cervical cancer risk in Egyptian women. **Mol Cell Biochem**, v. 353, n. 1-2, p. 159 – 165, 2011
- APTE, R. N. et al. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 3, p. 387–408, 2006.
- ARBYN, M. et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. **The Lancet Global Health**, v. 8, n. 2, p. e191–e203, 2020.
- ARCHIVE, T. G: "Ode on a Distant Prospect of Eton College", 1972
- BONAB, F. R. et al. Molecular pathways in the development of hpv-induced cervical cancer. **EXCLI Journal**, v. 20, p. 320–337, 2021.
- BOUVARD, V., et al., A review of human carcinogens—Part B: biological agents. **The lancet oncology**, v. 10, n. 4, p. 321-322, 2009.
- BRAICU, C. et al. A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer Cornelia. **Cancer**, v. 11, p. 1–25, 2019.
- BRAICU, E. I. et al. Role of serum VEGFA, TIMP2, MMP2 and MMP9 in monitoring response to adjuvant radiochemotherapy in patients with primary cervical cancer - Results of a companion protocol of the randomized NOGGO-AGO phase III clinical trial. **Anticancer Research**, v. 34, n. 1, p. 385–391, 2014.
- BRANCA, M. et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) are prognostic factors in cervical cancer, related to invasive disease but not to high-risk human papillomavirus (HPV) or virus persistence after treatment of CIN. **Anticancer Research**, v. 26, n. 2 B, p. 1543–1556, 2006.
- BUSKWOFIE, A. A Review of Cervical Cancer: Incidence and Disparities. **J Natl Med**, v. 112, n. 2, 2020
- CALDEIRA, J.; LARONHA, H. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. **Cell**, p. 1–18, 2020.
- CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 1, p. 50–83, 2011.

- CHARI, R. V. J. Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n.1, p. 98-107, 2008.
- CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 2018.
- COHEN, P. A. et al. Cervical cancer. **The Lancet**, v. 393, n. 10167, p. 169–182, 2019.
- COLEMAN, R. A.; SMITH, W. L.; NARUMIYA, S. VIII. International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacological Reviews**, v. 46, n. 2, p. 205–229, 1994.
- COULTHARD, L. R. et al p38 MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. **Europe PMC Funders Group** v. 15, n. 8, p. 369–379, 2011.
- COUSSENS, L. M.; FINGLETON, B.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. **Science**, v. 295, n. 5564, p. 2387–2392, 2002.
- CUADRADO, A.; NEBREDA, A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. **Biochemical Journal**, v. 429, n. 3, p. 403–417, 2010.
- CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 147, p. 1-73, 2017.
- DE ALMEIDA, G. C. et al. Piperine suppresses the Wnt/ β -catenin pathway and has anti-cancer effects on colorectal cancer cells. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.
- DE MIGUEL F. J. et al. Identification of alternative splicing events regulated by the oncogenic factor SRSF1 in lung cancer. **Cancer Res** v. 74, p. 1105–1115, 2014
- DO, M. T. et al. Antitumor efficacy of Piperine in the treatment of human HER2-overexpressing breast cancer cells. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2591–2599, 2013.
- DOUCETTE, C. D. et al. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 231–239, 2013.
- DRANOFF, G. Citocinas na patogênese do câncer e terapia do câncer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 11–22, 2004
- DUEÑAS-GONZÁLEZ, A., et al. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. **Molecular cancer**. v. 4, n. 1, p. 38, 2005.
- EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 342–348, 2001.
- FEITELSON, M. A. et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. 25–54, 2015.
- FERNANDES T., et al. Stromal cells play a role in cervical cancer progression mediated by MMP-2 protein. *Eur J Gynaecol Oncol* v. 29, p. 341-344, 2008.

- FERNANDES, J. V. et al. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review). **Oncology Letters**, v. 9, n. 3, p. 1015–1026, 2015.
- FERRANDINA, G., et al., Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in tumour and stroma compartments in cervical cancer: clinical implications. **Br J Cancer**, v. 87, n. 10, p. 1145-52, 2002
- FOFARIA, N. M.; KIM, S. H.; SRIVASTAVA, S. K. Piperine causes G1 phase cell cycle arrest and apoptosis in melanoma cells through checkpoint kinase-1 activation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014.
- FONSECA, L. M. et al. Piperine Inhibits TGF- β Signaling Pathways and Disrupts EMT-Related Events in Human Lung Adenocarcinoma Cells. **Medicines**, v. 7, n. 4, p. 19, 2020.
- FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. A matriz extracelular em resumo. **J Cell Sci**, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 2010.
- FRIEL, G. et al. Aspirin and Acetaminophen Use and the Risk of Cervical Cancer. **J Low Genit Tract Dis**, v. 19, n. 3, p. 189–193, 2015.
- FUTAGAMI, S, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 and CD40 ligation have a synergistic effect on vascular endothelial growth factor production through cyclooxygenase 2 upregulation in gastric cancer. **J Gastroenterol**, v. 43, n. 3, p. 216–124, 2008.
- FUTAGAMI, S. et al. COX-2 and CCR2 induced by CD40 ligand and MCP-1 are linked to VEGF production in endothelial cells. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 72, n. 2, p. 137 – 146, 2008.
- GAN, L. Cyclooxygenase-2 in tumor-associated macrophages promotes metastatic potential of breast cancer cells through Akt pathway. **Int J Biol Sci**. v. 26, n. 12, p. 1533-1543, 2016
- GEORGESCU, S.R., et al., New Insights in the Pathogenesis of HPV Infection and the Associated Carcinogenic Processes: The Role of Chronic Inflammation and Oxidative Stress. **J Immunol Res**. p. 531-581, 2018
- GHITTONI R. et al. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. **Virus Genes**, v. 40, p. 1–13, 2010.
- GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 173-200, 2003.
- GONZALEZ MAGLIO, D. H. et al. Cyclooxygenase-2 Overexpression in Non-Melanoma Skin Cancer: Molecular Pathways Involved as Targets for Prevention and Treatment. **Skin Cancers - Risk Factors, Prevention and Therapy**, n. June 2014, 2011.
- GREENSHIELDS, A. L. et al. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 129–140, 2015.
- GROSSI, V. et al. p38 α MAPK pathway: A key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 29, p. 9744–9758, 2014.
- GUERROUAHEN, B. S. et al. Reverting Immune Suppression to Enhance Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. January, 2020.

- GUILLEM-LLOBAT, P. et al. Aspirin prevents colorectal cancer metastasis in mice by splitting the crosstalk between platelets and tumor cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 32462–32477, 2016.
- GUNASEKARAN, V.; ELANGO VAN, K.; DEVARAJ, S. Targeting hepatocellular carcinoma with piperine by radical-mediated mitochondrial pathway of apoptosis: an in vitro and in vivo study. **Food Chem Toxicol.** v. 105, p. 106–118, 2017.
- GUO, Y. et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, p. 1997–2007, 2020.
- HAGEMANN, T; BALKWILL, F; LAWRENCE, T. Inflammation and cancer: a double-edged sword. **Cancer Cell**, v. 12, n. 4, 2007.
- HAGLUND, K.; RUSTEN, T. E.; STENMARK, H. Aberrant receptor signaling and trafficking as mechanisms in oncogenesis. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 13, n. 1, p. 39–74, 2007.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
- HARRIS, R. E. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: A critical review of non-selective COX-2 blockade (Review). **Oncol Rep**, v. 13, p. 559-583, 2005
- HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127–129, 2017.
- HEIDEGGER, H. et al. The prostaglandin EP3 receptor is an independent negative prognostic factor for cervical cancer patients. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1–10, 2017.
- HEMMAT, N.; BAGHI, H. B. Human papillomavirus E5 protein, the undercover culprit of tumorigenesis. **Infect Agent Cancer**. v. 13, n.1, p. 31, 2018
- HU, D. The protective effect of piperine on dextran sulfate sodium induced inflammatory bowel disease and its relation with pregnane X receptor activation. **J Ethnopharmacol**, v. 169, n. 1, p. 109–23, 2015.
- HUANG, Q. et al. IL-1 β -induced activation of p38 promotes metastasis in gastric adenocarcinoma via upregulation of AP-1/c-fos, MMP2 and MMP9. **Molecular Cancer**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2014.
- HUSSAIN, S.A. et al. Natural polyphenols in cancer chemoresistance **Nutr. Cancer**, v. 68, p. 879- 891, 2016.
- HWANG Y. P., et al. Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKC α /ERK1/2- dependent matrix metalloproteinase-9 expression. **Toxicol Lett** v. 203, p. 9–19, 2011.
- JAFRI, A. et al. Induction of apoptosis by piperine in human cervical adenocarcinoma via ROS mediated mitochondrial pathway and caspase-3 activation. **EXCLI J**, v. 18, p. 154-164,

2019.

JAISIN, Y. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of piperine on UV-B-irradiated human HaCaT keratinocyte cells. **Life Sciences**, v. 263, p. 118607, 2020.

JIA, L. et al. IL-8 is upregulated in cervical cancer tissues and is associated with the proliferation and migration of HeLa cervical cancer cells. **Oncology Letters**, v. 15, n. 1, p. 1350–1356, 2018.

JIN, X. et al. The p38 MAPK inhibitor BIRB796 enhances the antitumor effects of VX680 in cervical cancer. **Cancer Biology and Therapy**, v. 17, n. 5, p. 566–576, 2016.

JING, Y. et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment. **Cell and Bioscience**, v. 1, n. 1, p. 29, 2011.

JOHARATNAM-HOGAN, N. et al. The role of aspirin in the prevention of ovarian, endometrial and cervical cancers. **Women's Health**, v. 16, 2020.

KAKARALA, M. et al. Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. **Breast Cancer Res Treat.** v. 122, p. 777–785, 2010.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316–323, 2004.

KIRUBHANAND, C. Molecular docking data of piperine with Bax, Caspase 3, Cox 2 and Caspase 9. **Biomedical Informatics**, v. 16, n. 6, p. 458 – 461, 2020

KESANAKURTI, D, et al. Role of MMP-2 in the regulation of IL-6/Stat3 survival signaling via interaction with $\alpha 5\beta 1$ integrin in glioma. **Oncogene**, v. 32, n. 3, p. 327 – 340, 2013.

KIM, H. S. et al. Cyclooxygenase-1 and -2: Molecular Targets for Cervical Neoplasia. **Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 2, p. 123–134, 2013.

KLEINE-LOWINSKI, K. et al. Monocyte-chemo-attractant-protein-1 (MCP-1)-gene expression in cervical intra-epithelial neoplasias and cervical carcinomas. **Int J Cancer**, v. 82, n. 2, p. 6–11, 1999.

KOBAYASHI, H., et al. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gell electrophoresis. **MMS Comm**, v. 3, p. 103-115, 1995

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

LAI, L. H. et al. Piperine suppresses tumor growth and metastasis in vitro and in vivo in a 4T1 murine breast cancer model. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 4, p. 523–530, 2012.

LEE, S.; RAUCH, J.; KOLCH, W. Targeting MAPK signaling in cancer: Mechanisms of drug resistance and sensitivity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 1–29, 2020.

- LI, N. et al. Antiproliferative potential of piperine and curcumin in drug-resistant human leukemia cancer cells are mediated via autophagy and apoptosis induction, S-phase cell cycle arrest and inhibition of cell invasion and migration. **Journal of B.U.ON.**, v. 25, n. 1, p. 401–406, 2020.
- LI, X. W.; TUERGAN, M.; ABULIZI, G. Expression of MAPK1 in cervical cancer and effect of MAPK1 gene silencing on epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 11, p. 937–943, 2015.
- LIBRA, M., et al., Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases (review). **Int J Oncol**. v. 34, n. 4, p. 897-903, 2009
- LIU, J.; CAO, X. Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 13, n. 6, p. 711–721, 2016.
- LIU, Y.; LEVINE, B. Autosis and autophagic cell death: The dark side of autophagy. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 367–376, 2015.
- MACVILLE, M. et al. Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. **Cancer Research**, v. 59, n. 1, p. 141–150, 1999.
- MASSAGUÉ, J. A G1 engine of cyclins and kinases. **Nature**, v. 432, p. 298–306, 2004.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428–435, 2008.
- MEGHWAL, M.; GOSWAMI, T. K. *Piper nigrum* and piperine: An update. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1121–1130, 2013.
- MUGANDA, P. M. (ed): Apoptosis methods in toxicology. **Humana Press**, New York, NY, 2016.
- NAHAND, J. S. et al. microRNAs: New prognostic, diagnostic, and therapeutic biomarkers in cervical cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 10, p. 17064–17099, 2019.
- NEWMAN, D.J., Cragg, G.M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years. **J. Nat. Prod.** v. 75, p. 311–335, 2012.
- NUOVO, G.J., et al., Correlation of the in Situ Detection of Polymerase Chain Reaction-amplified Metalloproteinase Complementary DNAs and Their Inhibitors with Prognosis in Cervical Carcinoma. **Cancer research**, v. 55, n. 2, p. 267-275, 1995
- O'CALLAGHAN, G.; HOUSTON, A. Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: Possible therapeutic targets? **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 22, p. 5239–5250, 2015.
- OH, J. M. et al. Human papillomavirus E5 protein induces expression of the EP4 subtype of prostaglandin E2 receptor in cyclic AMP response element-dependent pathways in cervical cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 1, p. 141–149, 2009.
- PAARAKH, P. M. et al. In vitro cytotoxic and in silico activity of piperine isolated from *Piper nigrum* fruits Linn. **In Silico Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 3–9, 2015.

PARADKAR, P. H. et al. Role of cytokines in genesis, progression and prognosis of cervical cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 9, p. 3851–3864, 2014.

PARIDA, S. et al. GW627368X inhibits proliferation and induces apoptosis in cervical cancer by interfering with EP4/EGFR interactive signaling. **Cell Death and Disease**, v. 7, n. 3, p. 2154-13, 2016.

QIU M, XUE C, ZHANG L. Piperine alkaloid induces anticancer and apoptotic effects in cisplatin resistant ovarian carcinoma by inducing G2/M phase cell cycle arrest, caspase activation and inhibition of cell migration and PI3K/Akt/GSK3 β signalling pathway. **J BUON**, v. 24, n. 6, p. 2316-2321, 2019.

RÉBÉ, C. GHIRINGHELLI, F. Interleukin-1 β and Cancer. **Cancers (Basel)**, v. 12, n.7, p. 1791 – 17?? , 2020.

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

SADRI-NAHAND, J. et al. Pathogenic role of exosomes and microRNAs in HPV-mediated inflammation and cervical cancer: A review. **Int J Cancer**, v. 146, n. 2, p. 305-320, 2020.

SAGAN, C., O mundo assombrado pelos demônios. São Paulo: **Companhia das Letras**, 1996.

SALES, K. J. et al. Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis are up-regulated in carcinomas of the cervix: A possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 5, p. 2243–2249, 2001.

SALES, K. J. et al. Seminal plasma activates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor expression and signalling in cervical adenocarcinoma cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n. 12, p. 1065–1070, 2002.

SAMYKUTTY, A. et al. Piperine, a bioactive component of pepper spice exerts therapeutic effects on androgen dependent and androgen independent prostate cancer cells. **PLoS ONE**, 2013.

SCHMOECKEL, E. et al. The role of EP-2 receptor expression in cervical intraepithelial neoplasia. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 154, n. 6, p. 655–662, 2020.

SEBOLT-LEOPOLD, J. S. et al. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. **Nature Medicine**, v. 5, n. 7, p. 810–816, 1999.

SENBA, M.; MORI, N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. **Oncol Rev**, v. 6, n. 2, 2012.

SIENIAWSKA, E. et al. Microemulsions of essential oils – Increase of solubility and antioxidant activity or cytotoxicity? **Food Chem Toxicol**, n. 129, p. 115-129, 2019.

- SHIAU, M. Y. et al. Human Papillomavirus Up-Regulates MMP-2 and MMP-9 Expression and Activity by Inducing Interleukin-8 in Lung Adenocarcinomas. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- SI, L., et al. Piperine functions as a tumor suppressor for human ovarian tumor growth via activation of JNK/p38/MAPK-mediated intrinsic apoptotic pathway. **Biosci Rep**, v. 38, p. 1-11, 2018.
- SIDDIQUI, S. et al. Piperine Triggers Apoptosis of Human Oral Squamous Carcinoma Through Cell Cycle Arrest and Mitochondrial Oxidative Stress. **Nutrition and Cancer**, v. 69, n. 5, p. 791–799, 2017.
- SINGH, N. et al. Inflammation and cancer. **Ann Afr Med**, v. 18, n. 3, p. 121-126, 2019.
- SIMON, C. et al. PD 098059, an inhibitor of ERK1 activation, attenuates the in vivo invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 80, n. 9, p. 1412–1419, 1999.
- SIVULA, A., et al., Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in human breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**. v. 89, n. 3, p. 215-220, 2005
- SMALL, W. et al. Cervical cancer: A global health crisis. **Cancer**, v. 123, n. 13, p. 2404–2412, 2017.
- SPEED, N.; BLAIR, I. A. Cyclooxygenase- and lipoxygenase-mediated DNA damage. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 30, n. 3–4, p. 437–447, 2011.
- SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A. J. Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: Evidence of a corepressor/coactivator exchange. **Cancer Research**, v. 67, n. 8, p. 3976–3985, 2007.
- SUN, Y. et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 35, n. 6, p. 600–604, 2015.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.
- SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2, p. 339–346, 2004.
- TAO, L. et al. IL-1 β promotes cervical cancer through activating NF- κ B/CCL-2. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 15, n. 4, p. ? 2021.
- TASLEEM, F. et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 1, p. 461–468, 2014.
- THARMALINGAM, N. et al. Piperine treatment suppresses Helicobacter pylori toxin entry in to gastric epithelium and minimizes β -catenin mediated oncogenesis and IL-8 secretion in vitro. **Am J Transl Res**, v. 8, n. 2, p. 885 – 898, 2016

- UNGER, E. R.; BARR, E. Papilomavírus humano e câncer cervical. **Emerg Infect Dis** ; v. 10, n.11, p. 2031-2032, 2004.
- UMEBINYUO, I. 2016. Questions for Ada. Charleston South Carolina: CreateSpace. p.4.
- VAHEDPOUR, Z. Abedzadeh-Kalahroudi M, Sehat M, Piroozmand A, Memar M. Comparison of Cervical Levels of Interleukins-6 and -8 in Patients with and without Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 22, n. 4, p. 1225–1230, 2021.
- VAIBHAV, K. et al. Piperine suppresses cerebral ischemia-reperfusion-induced inflammation through the repression of COX-2, NOS-2, and NF- κ B in middle cerebral artery occlusion rat model. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 367, n. 1–2, p. 73–84, 2012.
- VALASTYAN, S, WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 275-92, 2011.
- VENDRAMINI-COSTA, D.; E. CARVALHO, J. Molecular Link Mechanisms between Inflammation and Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 26, p. 3831–3852, 2012.
- WERNES B. A, LEVINE, A. J., HOWLEY, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**. n. 248, p. 76–9, 1990.
- XIA, Y. Piperine inhibits IL-1 β -induced IL-6 expression by suppressing p38 MAPK and STAT3 activation in gastric cancer cells. **Mol Cell Biochem**, v. 398, p. 147-156, 2015.
- YAFFE, P. B. et al. Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 94, n. 1, p. 109–114, 2013.
- YAFFE, P. B. et al. Piperine, an alkaloid from black pepper, inhibits growth of human colon cancer cells via G1 arrest and apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, n. 10, p. 1070–1085, 2015.
- YAN, G.; ELBADAWI, M.; EFFERTH, T. Multiple cell death modalities and their key features (Review). **World Academy of Sciences Journal**, p. 39–48, 2020
- YANG, C. et al. Highly-expressed microRNA-21 in adipose derived stem cell exosomes can enhance the migration and proliferation of the HaCaT cells by increasing the MMP-9 expression through the PI3K/AKT pathway. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 681, p. 108-29, 2020.
- YANG, L. et al. Host and direct antitumor effects and profound reduction in tumor metastasis with selective EP4 receptor antagonism. **Cancer Research**, v. 66, n. 19, p. 9665–9672, 2006.
- YE, Y. et al. COX-2-PGE2-EPs in gynecological cancers. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 301, n. 6, p. 1365–1375, 2020b.
- YE, Y. et al. Prostaglandin E2 receptor 3 (EP3) signaling promotes migration of cervical cancer via urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR). **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 146, n. 9, p. 2189–2203, 2020a.

- YEE, C. et al. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. **American Journal of Pathology**, v. 119, n. 3, p. 361–366, 1985.
- YING, X. et al. Piperine inhibits IL- β induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocyte. **Int Immunopharmacol**, v. 17, n. 2, p. 293-9, 2013
- YOO, E. S. et al. Antitumor and Apoptosis-inducing Effects of Piperine on Human Melanoma Cells. **Anticancer Research**, v. 39, n. 4, p. 1883–1892, 2019.
- YOSHITAKE, R. et al. Aberrant expression of the COX2/PGE2 axis is induced by activation of the RAF/MEK/ERK pathway in BRAFV595E canine urothelial carcinoma. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- ZADOROZHNA, M.; TATARANNI, T.; MANGIERI, D. Piperine: role in prevention and progression of cancer. **Molecular Biology Reports**, n. 0123456789, 2019.
- ZAJKOWSKA, M. et al. Human Plasma Levels of Vascular Endothelial Growth Factor, Matrix Metalloproteinase 9, and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1 and Their Applicability as Tumor Markers in Diagnoses of Cervical Cancer Based on ROC Analysis. **Cancer Control**, v. 25, n. 1, p. 1 – 8, 2018
- ZAKERALI, T.; SHAHBAZI, S. Rational druggability investigation toward selection of lead molecules: Impact of the commonly used spices on inflammatory diseases. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 16, n. 7, p. 397–407, 2018.
- ZAZERI, G. et al. The cytokine il-1 β and piperine complex surveyed by experimental and computational molecular biophysics. **Biomolecules**, v. 10, n. 9, p. 1–16, 2020.
- ZEESHAN, R.; MUTAHIR, Z. Cancer metastasis - Tricks of the trade. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 172–182, 2017.
- ZENG, Y.; YANG, Y. Piperine depresses the migration progression via downregulating the Akt/mTOR/MMP-9 signaling pathway in DU145 cells. **Mol Med Rep**, v. 17, n. 5, p. 6363-6370, 2018.
- ZHANG, W. A review on the bioavailability, bio-efficacies and novel delivery systems for piperine. **Food Funct.**, v. 12, p. 8867–8881, 2021.
- ZHANG, J. et al. Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/-9 expression. **International Immunopharmacology**, v. 24, n. 1, p. 50–58, 2015.
- ZHANG, W. A review on the bioavailability, bio-efficacies and novel delivery systems for piperine. **Food & Function**, v. 12, p. 8867–8881, 2021
- ZUCKER, S.; CAO, J.; CHEN, W. T. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. **Oncogene**, v. 19, n. 56, p. 6642–6650, 2000.