



Leilane Bernardes Freitas

**Efeito antitumorigênico da piperina em câncer de colo de útero modulado
pela via inflamatória MAPK/ERK**

Ilha Solteira
2022

Leilane Bernardes Freitas

**Efeito antitumorigênico da piperina em câncer de colo de útero modulado
pela via inflamatória MAPK/ERK**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Engenharia, Campus de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas.

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

Ilha Solteira
2022

Leilane Bernardes Freitas

**Efeito antitumorigênico da piperina em câncer de colo de útero modulado
pela via inflamatória MAPK/ERK**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Engenharia, Campus de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel e Licenciatura em Ciências Biológicas.

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Maria Fernanda Alves Martin
UNESP – Câmpus de Ilha Solteira

Prof^ª. Patricia Fernanda Rosalem
UNESP – Câmpus de Ilha Solteira

Ilha Solteira
06 de Dezembro de 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

F866e Freitas, Leilane Bernardes.
Efeito antitumorigênico da piperina em câncer de colo de útero modulado pela via inflamatória MAPK/ERK / Leilane Bernardes Freitas. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2022
36 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2022

Orientador: Flávia Cristina Rodrigues Lisoni

Inclui bibliografia

1. Via MAPK/ERK. 2. Fitoterápicos. 3. Piper. 4. Câncer cervical.


Raiane da Silva Santos
Supervisora Técnica de Seção
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
CRB/8 - 9999

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**"EFEITO ANTITUMORIGÊNICO DA PIPERINA EM CÂNCER DE COLO DE ÚTERO MODULADO PELA VIA INFLAMATÓRIA MAPK/ERK"****LEILANE BERNARDES FREITAS****REGULAMENTO SOBRE A AVALIAÇÃO:**

Artigo 25º - § 2º A apresentação pública do trabalho de TCC deverá ser de no mínimo 20 (vinte) minutos e máxima de 40 (quarenta) minutos. Após um intervalo de 5 (cinco) minutos, haverá a arguição do Trabalho pelos examinadores. O tempo de arguição, será de até 15 (quinze) minutos para cada examinador, e até 15 (quinze) minutos o tempo para a resposta do(a) aluno(a) a cada examinador ou no caso de se optar pelo diálogo o tempo conjunto entre examinador e acadêmico(a) será de no máximo 30 (trinta) minutos.

Artigo 24º - No julgamento do TCC, a banca examinadora deverá avaliar a apresentação oral, escrita e a defesa do trabalho durante a arguição. O conceito final será APROVADO(A) ou REPROVADO(A).

COMISSÃO EXAMINADORA**1ª EXAMINADORA (Orientadora-Presidente)**

Nome: Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni

**2ª EXAMINADORA**

Nome: Profa. Dra. Maria Fernanda Alves Martin

**3ª EXAMINADORA**

Nome: Doutoranda Patrícia Fernanda Rosalem

**CONCEITO**

(X) Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Ilha Solteira-SP, 06 de dezembro de 2022.

A Deus que me sustentou com garra e fê todos os dias; meu marido Allan de Souza que me deu todo suporte para que eu pudesse desenvolver este projeto; a todas as pessoas que já foram acometidas com o câncer, que eu possa estar contribuindo o mínimo que seja para que em um futuro próximo essa doença não seja tão danosa.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dessa jornada tive muitas pessoas presentes ao meu lado, me ajudando a caminhar, a trilhar meu sonho. Finalizo essa etapa com o sentimento de gratidão por tudo e por todos, saibam que essa vitória é nossa, **NENHUMA BATALHA É VENCIDA SOZINHA!**

Primeiramente, agradeço a meu bom Deus, que com sua infinita bondade me sustentou com saúde mental e física; com força e muita dedicação e por ter iluminado todos meus passos. Nunca foi sorte, sempre foi Deus!

A minha orientadora Prof^a Dr^a Flávia Lisoni, por toda paciência e por me permitir aprender um pouco do que tanto sabes. Por todos os momentos de compreensão, pelas valiosas e incontáveis horas dedicadas ao projeto. Você me inspira!

Ao meu marido Allan, por me apresentar esta cidade, por me apoiar, pelo investimento financeiro, incentivando-me a não desistir com suas palavras de carinho e amor. Te amo!

Aos meus pais Zilanda e Veneir, por todos os ensinamentos e pelo meu caráter. Vocês são tudo para mim!

A minha sogra Zélia, pela disponibilidade do seu tempo para me ajudar fazendo minha comidinha, me dando apoio moral e pelos momentos de lazer. Gratidão!

As minhas amigas Jéssica, Érica, Daniele, Bianca, que estão sempre presentes ao longo desses 5 anos. Amo vocês!

A minha amiga Leticia Ferreira, por me ouvir infinitas vezes falando sobre a pesquisa, me apoiando. Você é luz!

A minha colega de laboratório Luana Cardoso, por me incentivar a continuar nesta jornada. Você é um grande exemplo de pesquisadora!

A UNESP pela possibilidade de fazer parte dessa grande família.

Desde já, agradeço a banca examinadora que disponibilizaram tempo para contribuir com a minha formação.

"Being strong doesn't mean exercising your muscles. It means finding your own shine without running away, actively living with wild nature in your own way. It means being able to learn, being able to defend what we know. It means holding on and living. [Ser forte não significa exercitar os músculos. Significa encontrar seu próprio brilho sem fugir, vivendo ativamente com a natureza selvagem de uma maneira própria. Significa ser capaz de aprender, ser capaz de defender o que sabemos. Significa se manter e viver.]" Clarissa Pinkola (1992)

"Não olhe apenas para quão longe terá de ir, mas para quão longe já chegou".
Joyce Meyer (2011, p. 189)

"Sede fortes e corajosos, não temais, nem vos atemorizeis diante deles, porque o Senhor, vosso Deus, é quem vai convosco; não vos deixará, nem vos desampará"
Deuteronômio 31:6

RESUMO

O câncer cervical é uma neoplasia maligna considerada um sério problema de saúde pública, acometendo principalmente mulheres de nível socioeconômico baixo e na faixa etária reprodutiva. A mais recente estimativa mundial aponta que ocorrerão no mundo 18 milhões de casos novos de câncer. Para o Brasil, a estimativa para cada ano de 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer, sendo que destes, 16.590 de colo de útero. A maioria dos casos e mortes ocorrem nos países de baixa e média renda, propiciadas pela infecção persistente do papiloma vírus humano (HPV), que acarretam em um aumento de processos inflamatórios e consequente aumento na susceptibilidade do câncer cervical. Sabendo que a inflamação é um mecanismo de proteção do organismo e que o câncer surge em áreas de inflamação crônica, as células tumorais e inflamatórias secretam inúmeras citocinas e quimiocinas que ativam a via MAPK, responsável pela síntese de ERKs, JNKs e p38. Assim, o uso de anti-inflamatórios se torna um alvo terapêutico no câncer, como o alcaloide piperina derivado da *Piper nigrum*, que demonstrou atuar na ativação da p38 fosforilada, JNK e AP-1. Apesar dessas evidências, a via inflamatória por ação da piperina foi pouco investigada em casos de neoplasias, portanto o objetivo deste trabalho foi investigar *in vitro* o efeito antitumoral de piperina em câncer cervical e determinar se esse efeito é modulado pela via inflamatória da MAPK/ERK. Para tanto foram avaliadas a morfologia e a expressão das proteínas p38 e ERK, da via MAPK por imunocitoquímica, buscando compreender como a piperina modula essa via. Os resultados evidenciaram, na linhagem de células não tumorais (HaCaT) e nas linhagens tumorais (HeLa; SiHa e CaSki), que a piperina foi capaz de alterar a morfologia celular e modulou a via inflamatória. Nas células HaCaT, a p38 teve um aumento significativo tanto no citoplasma quanto no núcleo, porém o processo de translocação nuclear foi reduzido. Em relação à proteína ERK, a piperina modulou negativamente sua expressão em todos os compartimentos celulares das linhagens de câncer cervical. Deste modo, a piperina reduz a evolução neoplásica *in vitro* por atuar sobre a via MAPK, que por sua vez modula a expressão de ERK e p38, evidenciando ser um potencial fitoterápico para o tratamento auxiliar no câncer cervical.

Palavras-chave: Via MAPK/ERK. Fitoterápicos. Piper. Câncer Cervical.

ABSTRACT

Cervical cancer is a malignant neoplasm considered a serious public health problem, affecting mainly women of low socioeconomic status and in the reproductive age group. The most recent global estimate indicates that 18 million new cases of cancer will occur in the world. For Brazil, the estimate for each year of 2020-2022 indicates that there will be 625,000 new cases of cancer, of which 16,590 will be cervical cancer. Most cases and deaths occur in low- and middle-income countries, caused by persistent human papilloma virus (HPV) infection, which leads to an increase in inflammatory processes and a consequent increase in susceptibility to cervical cancer. Knowing that inflammation is a protective mechanism of the body and that cancer arises in areas of chronic inflammation, tumor and inflammatory cells secrete numerous cytokines and chemokines that activate the MAPK pathway, responsible for the synthesis of ERKs, JNKs and p38. Thus, the use of anti-inflammatory drugs becomes a therapeutic target in cancer, such as the piperine alkaloid derived from *Piper nigrum*, which has been shown to act in the activation of phosphorylated p38, JNK and AP-1. Despite this evidence, the inflammatory pathway by the action of piperine has been little investigated in cases of neoplasms, therefore the objective of this work was to investigate in vitro the antitumor effect of piperine in cervical cancer and to determine whether this effect is modulated by the inflammatory pathway of MAPK/ERK. For this purpose, the morphology and expression of p38 and ERK proteins of the MAPK pathway were evaluated by immunocytochemistry, seeking to understand how piperine modulates this pathway. The results showed, in the non-tumor cell lineage (HaCaT) and in the tumor cell lines (HeLa; SiHa and CaSki), that piperine was able to change cell morphology and modulate the inflammatory pathway. In HaCaT cells, p38 had a significant increase both in the cytoplasm and in the nucleus, but the process of nuclear translocation was reduced. Regarding the ERK protein, piperine negatively modulated its expression in all cell compartments of cervical cancer cell lines. Thus, piperine reduces neoplastic evolution in vitro by acting on the MAPK pathway, which in turn modulates the expression of ERK and p38, proving to be a potential herbal medicine for the auxiliary treatment of cervical cancer.

Keywords: Via MAPK/ERK. Phytotherapy. Piper. Cervical Cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação do efeito da infecção pelo HPV na via MAPK	18
Figura 2 – Estrutura química da piperina	19
Figura 3 – Morfologia celular	23
Figura 4 – Imunocitoquímica da expressão proteica de p38/MAPK na célula HaCaT	25
Figura 5 – Imunocitoquímica da expressão proteica de p38/MAPK nas células tumorais	26
Figura 6 – Imunocitoquímica da expressão proteica de ERK/MAPK	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Proteína ativadora 1
ATCC	American Tissue Cell Culture
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CaSki	Linhagem de epidermoide cervical
CO₂	Gás Carbônico
DAPI	Corante fluorescente
DMEM	Médio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2	Oncoproteína do HPV E2
E6	Oncoproteína do HPV E6
E7	Oncoproteína do HPV E7
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ERK	Quinases reguladas por sinais extracelulares
G2/M	Fase G2 da mitose
HeLa	Linhagem de adenocarcinoma de colo de útero
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Vírus do Papiloma Humano
IFN	Interferons
IgG	Imunoglobina G
IL-1	Interleucina 1
JNK	Proteína
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MEM	Meio Essencial Mínimo
MMP9	Metaloproteinases de matriz 9
p38	Proteína de tumor
PBS	Tampão Fosfato Salino
PBST	PBS com tween
Ras	Proteína Ras
ROS	Espécie reativa de oxigênio
RPMI 1640	Meio Roswell Park Memorial Institute

SFB	Soro Fetal Bovino
SiHa	Linhagem celular de carcinoma epitelial de colo de útero
Th-Gly-Tyr	Tripeptídeo
TNF	Fator de necrose tumoral
USA	Estados Unidos da América

LISTA DE SÍMBOLOS

μM	Micromolar
μL	Microlitro
M	Molar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Câncer de colo de útero	13
1.2	Câncer cervical e inflamação	15
1.3	Papel da via MAPK (p38 e ERK) na inflamação associada ao câncer	16
1.4	Piperina no câncer	18
2	OBJETIVO	20
2.1	Objetivos gerais	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	Materiais e Métodos	21
3. 1	Materiais	21
3.1.1	Linhagens celulares	21
3.1.2	Piperina	21
3. 2	Métodos	21
3.2.1	Tratamento	21
3.2.2	Cultivo e análise da morfologia celular	21
3.2.3	Análise da morfologia celular pela microscopia de luz	22
3.2.4	Imunocitoquímica	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1	Piperina altera morfologia celular	22
4.2	Piperina modula a expressão de ERK e p38	23
5	CONCLUSÕES	28
	REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de colo de útero

A mais recente estimativa mundial, aponta que ocorrerão no mundo 18 milhões de novos casos de câncer. Para o Brasil, a estimativa para cada ano de 2020-2022 é que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer, sendo que destes, 16.590 novos casos de câncer de colo de útero (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER JOSÉ DE ALENCAR – INCA, 2019).

Em todo o mundo, o câncer de colo de útero é considerado um sério problema de saúde pública, sendo os países em desenvolvimento os portadores de 80% dos casos e ainda representam as altas taxas de incidência e mortalidade, podendo acometer principalmente mulheres de nível socioeconômico baixo e na faixa etária reprodutiva (INCA, 2011). Esta doença é classificada como a quarta neoplasia maligna mais frequente em mulheres, sendo que a taxa de mortalidade é 18 vezes maior em países de baixa e média renda, em comparação aos países mais ricos. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE – OMS, 2022). A maioria dos casos e mortes ocorrem nesses países pelo fato de terem os menores níveis de desenvolvimento humano, o que propicia que as infecções pelo vírus do papiloma humano (HPV) sejam persistentes, levando a uma maior susceptibilidade de câncer cervical (CHEN *et al.*, 2018).

O HPV é bem estável e a persistência da infecção com altas cargas virais está associada a alguns fatores, como: início precoce da vida sexual; uso prolongado de anticoncepcionais orais; imunossupressão; multiplicidade de parceiros; histórico de infecções sexualmente adquiridas como o vírus da imunodeficiência humana (HIV); falta de higiene pessoal adequada; tabagismo; deficiência de micronutrientes antioxidantes na alimentação, como a vitamina C (BRINGEL *et al.*, 2021).

Posto isto, os HPVs são ditos como epiteliotrópicos, ou seja, infectam o tecido epitelial, e com base em sua capacidade, pode ser dividido em 3 grupos: de alto risco; provavelmente de alto risco; e de baixo risco. Dois tipos de HPV (16 e 18) são responsáveis por quase 50% dos pré-cânceres cervicais de alto risco em todo o mundo (FREITAS, *et al.*, 2014).

A interação entre o HPV e o genoma da célula hospedeira é responsável por guiar eventos intracelulares de transformação maligna, estando associado a célula de duas maneiras: uma episomal ou integrada (STANLEY, 2002). Os tipos de HPV de alto risco estão presentes na forma integrada no genoma da célula hospedeira, fazendo com que ocorra o rompimento de uma região do vírus, que acarreta a perda funcional do gene E2, que é responsável pelo controle da transcrição dos genes virais E6 e E7, resultando então em elevado nível dessas

oncoproteínas, que é reconhecido como indutor da transformação maligna da célula hospedeira e no desenvolvimento dos tumores infectados por HPV (MOTOYAMA *et al.*, 2004).

O vírus infecta o epitélio mucocutâneo produzindo partículas virais em células epiteliais amadurecidas (UNGER; BARR, 2004), o que o faz integrar-se ao genoma da célula hospedeira do colo do útero. À medida que há progressão desse processo causadas por lesões pré-cancerosas para o câncer de colo do útero, a frequência da integração do genoma viral aumenta (DE MIGUEL *et al.*, 2014).

A associação etiológica entre HPV e câncer cervical direcionou para novos métodos de rastreio do câncer de colo uterino, o que ocasionou uma redução da mortalidade para esse tipo de carcinoma em alguns países desenvolvidos, sendo um dos métodos o chamado exame de Papanicolau ou Colpocitologia. Este tem por objetivo detectar precocemente as alterações nas células de revestimento do colo uterino. Além disso, a aplicação de vacinas combinada ao rastreamento pelo exame, faz com que essa associação entre imunização, exame, reduza o risco de câncer (SHAO-MING *et al.*, 2015).

Em mulheres infectadas com HPV de alto risco, a vacinação tem uma eficácia limitada, e por esse motivo são necessárias estratégias alternativas. Assim, atualmente as vias de tratamento vão depender da extensão da doença no diagnóstico e dos recursos socioeconômicos disponíveis, envolvendo os tratamentos por histerectomia radical ou quimiorradiação, ou também uma combinação de ambas, porém nos casos avançados na maioria das vezes esses tratamentos são ineficazes (COHEN *et al.*, 2019).

As formas de tratamento podem também ser invasivas e causar efeitos colaterais durante o processo, o que contribui negativamente para a saúde dos pacientes (CHARI, 2008). Ademais, a doença causa um impacto psicossocial muito grande, que junto a esse dano físico leva a uma deterioração da qualidade de vida (YE *et al.*, 2020).

Com o contínuo desenvolvimento da biologia molecular, cada vez mais as formas de tratamentos vão sendo direcionadas para um alvo eficaz, específico e com baixas reações adversas. Assim, três linhagens celulares de carcinoma cervical infectadas (com HPV) ganham destaque em projetos de pesquisas científica, que são: SiHa, HeLa e CaSki, sendo também avaliadas nessa pesquisa (YAFFE *et al.*, 2015).

Dentre elas, 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). É sabido que, 70% dos tipos mais comuns de câncer de colo

de útero é o escamoso e 25% é o adenocarcinoma, na qual SiHa e CaSki são escamosas e a HeLa é adenocarcinoma (SMALL *et al.*, 2017).

Diante disto, há uma necessidade urgente em elucidar mecanismos moleculares subjacentes e explorar potenciais marcadores biológicos para desenvolver novas opções para o diagnóstico precoce e tratamento do câncer cervical.

1.2 Câncer cervical e inflamação

A inflamação é um mecanismo de proteção do organismo que visa cessar a causa e as consequências iniciais de uma lesão celular, tendo como principais sintomas: calor, rubor, dor, inchaço e perda da função. Por sua vez, ela envolve células do Sistema Imunológico, produzindo no local um aumento de fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, proporcionando o recrutamento de alguns mediadores químicos pró inflamatórios, como as citocinas (TNF; IL-1 e IL-6) e quimiocinas (MCP-1; MIP). A partir de então, a primeira linha de defesa do hospedeiro é ativada, sendo esta a Imunidade Inata, que causa no local da inflamação uma intensa atividade dos mediadores, porém com duração limitada para não prejudicar o indivíduo (ABBAS; LITCHTMAN; PILLAI, 2016).

Após a eliminação dos agentes agressores, a inflamação deve ser finalizada a partir da desativação e destruição dos mediadores que foram secretados, caso contrário, os estímulos nos mediadores continuam e a inflamação que era aguda, passa a ser do tipo crônica (LIU *et al.*, 2016).

A ideia de que a inflamação está envolvida no carcinoma, é justamente porque o câncer surge em áreas de inflamação crônica. Dos cânceres humanos, aproximadamente 20% estão associados a inflamação crônica por agentes infecciosos ou lesões, devido a exposição a agentes nocivos, como é o caso do câncer cervical, no qual após infecção persistente por HPV, há o surgimento de uma inflamação crônica que contribui para a gênese e progressão tumoral (SINGH; REEM; WIEBEL, 1994).

O surgimento então do tumor tem grande contribuição da inflamação crônica, pois esta induz o processo de mutações gênicas, criando um ambiente propício para a não cicatrização da ferida, o que estimula o processo neoplásico, acelera a divisão celular aumentando o risco de mutações. Além disso, esse ambiente estimula a proliferação de agentes que são capazes de degradar o DNA como detritos da fagocitose e geram espécies reativas de oxigênio (FERNANDES *et al.*, 2015).

Pela ativação do estroma, é possível estimular a progressão do tumor, a liberação de fatores de crescimento, angiogênese e a migração de células imunes ao local da inflamação pela ativação de metalproteinases de matriz (MMP), e esses efeitos favorecem a proliferação celular e metástase tumoral. Tudo isso ocorre devido aos fatores produzidos pelas células inflamatórias presentes no tumor (FERNANDES *et al.*, 2015).

Com essas considerações, células tumorais e inflamatórias secretam inúmeras citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, que agem de forma autócrina/parácrina para regular a função de algumas células, além de estimular a proliferação, inibir a apoptose, induzir a morfogênese (ABBAS; LITCHTMAN; PILLAI, 2016). As citocinas são proteínas ou glicoproteínas que atuam em curtas distâncias com função principal de fazer comunicação célula a célula, tendo tempo de ação curto e decorrente desta ligação a receptores transmembrânicos específicos localizados na superfície celular, estimulam fatores de transcrição nuclear, ocasionando a gênese de proteínas e proliferação celular, produção de mediadores presentes na indução de sinais e sintomas da inflamação (VILCEK, 1998).

A liberação das citocinas se dá a diversos tipos de estresses celulares, incluindo lesão induzida por carcinógeno, infecção e inflamação. E as alterações celulares que dão origem ao câncer, provocam alterações na expressão local de citocinas (DRANOFF *et al.*, 2004).

Tratando-se do HPV, as citocinas chaves para a regulação da infecção são as interleucinas 1 (IL-1); interferons (IFN) e fator de necrose tumoral (TNF), estas vão ativar as células apresentadoras de antígenos, para a regulação e estimulação de uma resposta do indivíduo visando controlar a inflamação e minimizar os danos celulares, mas se a infecção for persistente esse processo se torna contínuo, com altos níveis de citocinas, resultando uma angiogênese, progressão tumoral, diminuição da apoptose e da vigilância imunológica local (VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012). A persistências da infecção vai depender muito da resposta imune do hospedeiro, contribuindo ou não para a tumorigênese e a permanência do vírus no microambiente tumoral (HEMMAT *et al.*, 2018).

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

As cascatas de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) faz parte de uma grande família, na qual vários membros possuem papéis cruciais na sinalização intracelular, sendo um dos mais importantes a proteína reguladora extracelular quinase (ERK) e a p38 (DELIRE; STARKEL, 2015). A MAPK são vias de sinalizações principais que além de atuarem na proliferação celular, contribui para uma série de processos oncológicos, como aumento da

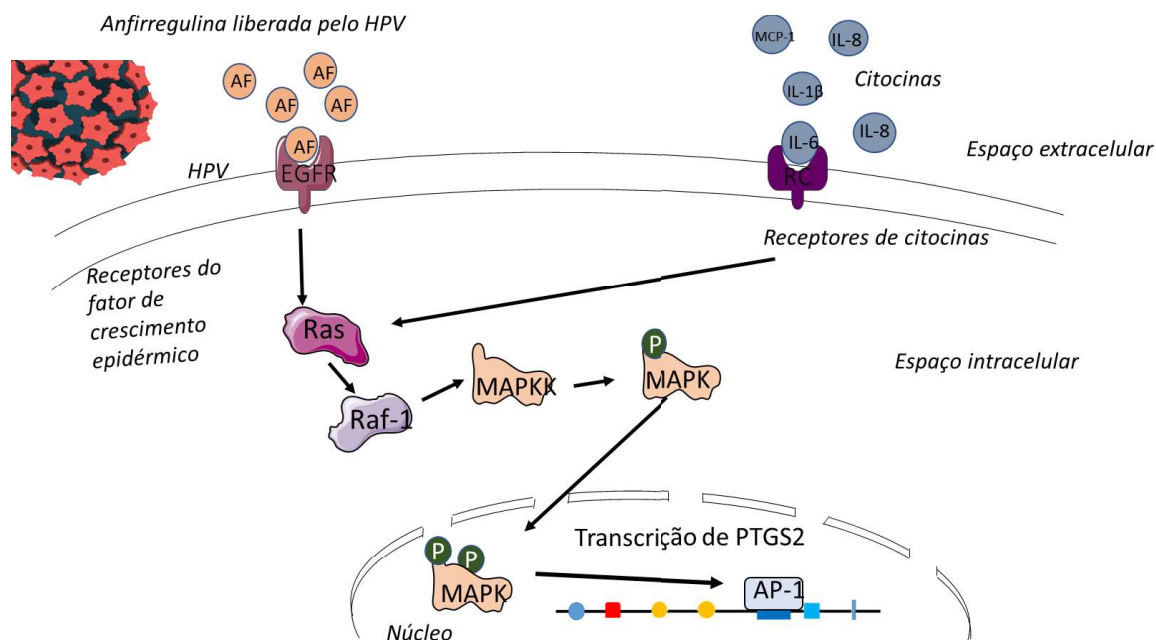
sobrevivência celular; metástase pelo remodelamento da matriz extracelular (MEC); angiogênese; apoptose e respostas ao estresse (SMALLEY *et al.*, 2010).

Alguns estímulos são responsáveis por ativar as glicoproteínas da família do receptor tirosina quinase, como os fatores de crescimento, citocinas e oncogenes, que posteriormente ativam a cascata de transdução de sinal por fosforilação e por intermediários citosólicos, que então no núcleo desencadeia a regulação da transcrição de genes efetores (BRAICU *et al.*, 2019).

A via MAPK possui processos bioquímicos complexos devido ao grande número de componentes e funções distintas realizada por cada cascata formada, assim existem três principais MAPKs clássicas com diferentes isoformas ERKs, JNKs e p38/MAPKs, ao serem ativadas levam a resposta ao núcleo e ativam fatores de transcrição que conduzem a expressão de genes (BRAICU *et al.*, 2019). Assim, permitem que as células interpretem vários sinais externos, tendo como respostas diferentes efeitos biológicos, porém quando ocorre uma ativação excessiva, induz várias doenças, incluindo câncer e inflamação (CUADRADO; NEBRED, 2010).

No caso do câncer cervical desencadeado pela infecção persistente por HPV, o reconhecimento do vírus ocorre pelo receptor do fator de crescimento epidérmico – EGFR – o que torna essas vias cruciais. A partir daí, ocorre a indução da cascata Ras→MAPK→AP-1, resultando em uma resposta inflamatória e proliferativa, representada na Figura 1 abaixo (BONAB *et al.*, 2021).

Figura 1: Representação do efeito da infecção pelo HPV na via MAPK



Fonte: Própria autora.

A via p38 é ativada por estresse com uma função primária de transdução de sinal extracelular, sendo que, quando essas proteínas são ativadas elas se translocam do citosol para o núcleo. Já associada ao câncer, a p38 demonstrou fosforilar diretamente, ativando os principais reguladores do ciclo celular, acarretando então sua parada; apoptose; produção de citocinas e diferenciação celular (OLSON *et al.*, 2004).

Além disso, a p38 é inativa na forma não fosforilada e torna-se rapidamente ativa pela fosforilação de duas estruturas de proteínas Thr-Gly-Tyr (OLSON *et al.*, 2004), sendo que, quando a fosforilação é longa, geralmente as proteínas estão associadas à indução de apoptose (COULTHARD *et al.*, 2011).

Em contrapartida as proteínas ERK respondem a fatores de crescimentos ou a outros sinais mitogênicos externos, promovendo a proliferação celular em controvérsia aos sinais de morte celular (OLSON *et al.*, 2004). Enquanto que, a ativação contínua da via de sinalização ERK pode ocasionar a transformação de células normais em células tumorais, a inibição da mesma 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).

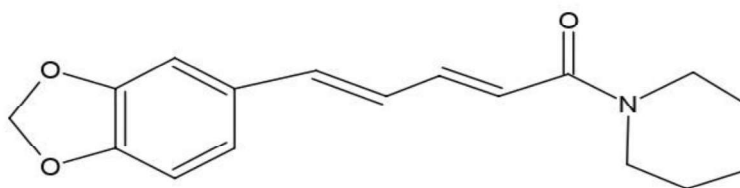
Portanto, a via p38/MAPK está relacionada principalmente ao estresse e apoptose das células, enquanto a via de sinalização ERK/MAPK, está intimamente relacionada à proliferação e diferenciação celular (BRAICU *et al.*, 2019).

1.4 Piperina no câncer

Produtos naturais, como as plantas, têm desempenhado um importante papel no desenvolvimento de vários agentes antineoplásicos (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010), tendo como ponto de partida o final de 1930, quando foi introduzida a quimioterapia e desde então mais de 75% dos compostos são produtos naturais ou derivados destes (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Estudos da literatura evidenciaram que o alcaloide amida piperina – amida piperidinil do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2(E)-4(E)-pentadienoico – foi a primeira amida isolada do gênero *Piper*, sendo de frutos da pimenta preta (*Piper nigrum*) e da pimenta longa (*Piper longum*) (MADHAVI *et al.*, 2009), apresentando potente atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* inibe metástases pulmonares e a expressão de MMP-9, interferindo na invasão e migração de células tumorais (SEBOLT-LEOPOLD *et al.*, 1999). A estrutura química da piperina pode ser observada na Figura 2.

Figura 2: Estrutura química da piperina



Fonte: Própria autora.

Além disso, estudos de mecanismos de ação mostraram que em relação a citotoxicidade a piperina induziu nas células tumorais por meio de ROS e produziu efeito antiproliferativo por indução da parada do ciclo celular (WANG *et al.*, 2014). Já em relação a cascata ERK, que pode ser regulada por anti-inflamatórios e entre eles se destaca piperina, mostrou que teve inibição da via ERK em câncer de mama, pulmão e em células do músculo liso (LEE *et al.* 2015).

Assim, sabendo da eficiência da inflamação como alvo terapêutico no câncer, os agentes anti-inflamatórios passam a ser frequentemente investigados, como o alcaloide piperina. Esse agente demonstrou atuação na ativação de p38 fosforilado, JNK e AP-1, 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.

Ademais, a piperina também causa uma degradação da MEC que afeta de certa forma a sobrevivência das células tumorais e suprime os processos de metástase e invasão, sem efeitos tóxicos significativos nas células normais e ainda inibe a angiogênese (SUNILA; KUTTAN, 2004).

A ação da piperina previne carcinogênese de estômago e fígado, por meio de carcinógenos químicos (KHAJURA *et al.*, 1998). Pesquisas também evidenciaram seu efeito inibitório na metástase de pulmão induzida por células melanoma em camundongos, na estimulação, proliferação e diferenciação de melanócitos (PRADEEP; KUTTAN, 2002). Em carcinoma hepatocelular, a piperina foi responsável por provocar apoptose mediada por mitocôndrias assim como em leucemias, inibiu a enzima catalase e a expressão de tirosina quinase (GUNASEKARAN; ELANGO VAN; DEVARAJ, 2017).

Em câncer de mama, a piperina reduziu a proliferação e a migração celular, levou a apoptose junto a ativação da caspase 3, além de provocar a parada das células na fase G2 / M (LAI *et al.*, 2012). Já carcinogênese de ovário, esta afetou a proliferação celular, diminuiu a fosforilação de JNK e da p38/MAPK (SI *et al.*, 2018).

Em relação ao câncer de colo de útero, é pouco sabido o efeito da piperina, mas quando a linhagem celular de adenocarcinoma de colo de útero (HeLa) é submetida à piperina ocorre a parada das células na fase G2/M, o que inibe o crescimento das células aumentando a geração de ERO; ocorre também a condensação nuclear e consequentemente a ferida não consegue se cicatrizar (JAFRI *et al.*, 2019).

Diante de toda atividade biológica que as substâncias antitumorigênicas estão envolvidas, é necessário que seja conhecido seu potencial farmacológico tendo como objetivo descobrir uma molécula nova que seja guia no tratamento do câncer. Os vários estudos sobre a piperina, as relacionam com as vias genéticas pertinentes ao ciclo celular e a apoptose, sendo um potencial antitumoral. Portanto, o presente trabalho tem como hipótese de que o efeito antitumorigênico da piperina pode ser pela via inflamatória MAPK, em câncer de colo útero.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Em função da importância do efeito anti-inflamatório da piperina em células carcinogênicas, o presente trabalho teve como objetivo investigar *in vitro* o efeito antitumoral de piperina em câncer cervical e determinar se esse efeito é modulado pela via inflamatória da MAPK/ERK.

2.2 Objetivo específico

Investigar o efeito antitumoral da piperina nas linhagens celulares tumorais HeLa, SiHa e CaSki, e na linhagem não tumoral HaCaT pelas análises relacionadas às transformações neoplásicas:

- ✓ Morfologia, pela análise em microscopia de luz;
- ✓ Expressão das proteínas p38/MAPK e ERK/MAPK por imunocitoquímica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 *Linhagens celulares*

Foram utilizadas três linhagens de tumores cervicais – carcinoma epidermoide de colo de útero (SiHa), adenocarcinoma de colo de útero (HeLa) e carcinoma epidermoide de colo de útero (CaSKi); e uma linhagem de queratinócitos humanos não tumorigênica – HaCat. Todas as linhagens estudadas são da American Tissue Cell Culture (ATCC).

3.1.2 *Piperina*

Foi utilizado o composto piperina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na concentração de 150 μ M, diluída em DMSO na concentração de 0,5%, por 24 horas.

3.2 Métodos

3.2.1 *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, de modo que todas permanecessem na mesma etapa do ciclo celular. Finalmente, após 24h, o tratamento foi inserido nas células com meio completo.

A piperina foi aplicada na concentração de 150 μ M e o DMSO foi utilizado como controle negativo (veículo), por 24 horas de tratamento.

3.2.2 *Cultivo celular*

As linhagens celulares foram semeadas em meio MEM (E) para HeLa e SiHa, a linhagem CaSKi em RPMI 1640 e a HaCaT em DMEM, todos suplementados com 10% de soro fetal bovino, 10mM aminoácidos não essenciais, 100mM piruvato de sódio e 1mM antibiótico/antimicótico e foram mantidas a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas,

até se fixarem no substrato. Após esse período, o meio foi trocado a cada dois ou três dias, até que a concentração de células se tornou confluentes. Diariamente o crescimento e a morfologia celular foram avaliados em microscópio invertido e, quando a densidade celular se mostrou alta, o material foi submetido à tripsinização e subdividido em três réplicas.

3.2.3 Análise da morfologia celular pela microscopia de luz

As células foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços, semeadas na concentração de 1×10^4 em 1000 μL de meio completo, como descrito acima. Após 24h de tratamentos, as análises morfológicas foram avaliadas em microscópio de luz LABOMED (TCM400), em diferentes objetivas (4x, 10x, 20x e 40x) e as imagens das áreas de cada região da placa foram fotografadas na câmera Moticam 3.

3.2.4 Imunocitoquímica

Em lâminas de cultura – Nunc, Naperville, IL, EUA – as células (10×10^4) foram cultivadas e após os procedimentos de tratamento foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 10 min. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com 1% de albumina bovina e 3% de soro normal em PBST para bloquear as ligações não específicas. As células foram imunocoradas com anticorpos monoclonais primários de camundongo (Ab) ERKpan (BD Biosciences, EUA) diluído a 1:200 em PBST a 0,2%, posteriormente incubado durante a noite a 4°C. Após repetidas lavagens em PBST a 1%, foi adicionado um 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), seguido de 1 hora incubação à temperatura ambiente. Em seguida, com bastante cuidado as células foram lavadas em PBS e as lâminas montadas com meio de montagem com DAPI (Sigma Aldrich, EUA). Por fim, a análise foi realizada usando um microscópio de fluorescência Axioskop 2 – Zeiss, GR – equipado com uma câmera digital e as imagens digitais foram capturadas usando o software AxioVision (Zeiss, GR).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

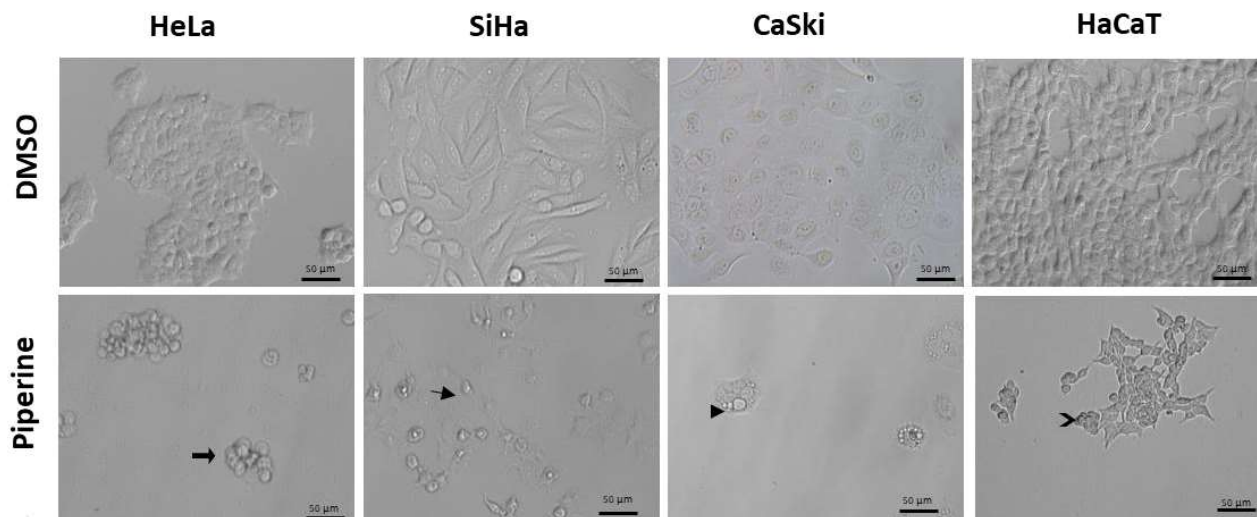
4.1 Piperina altera a morfologia celular

Quanto à morfologia, as células foram analisadas em microscopia de luz onde foi observado uma alteração morfológica em todas as linhagens celulares após o tratamento com piperina. Por exemplo, a mudança morfológica causada pela piperina na linhagem HeLa (tumoral) e HaCaT (não-tumoral) foi no tamanho celular reduzindo-o, sendo que, antes as células eram fusiformes e estreladas e depois passaram a ter um formato arredondado com vacúolos na membrana – blebs – como demonstrado pelas setas na Figura 3.

Segundo a literatura, essas aparências são típicas de morfologia apoptótica que ocorrem em eventos moleculares que levam ao encolhimento celular, perda de organelas, fragmentação do DNA e a formação de vacúolos na membrana (blebs) (YAN *et al.*, 2020). Já na linhagem celular SiHa, as células antes do tratamento com a piperina eram fusiformes, após o tratamento sua morfologia celular foi modificada se tornando com formato arredondado e amorfo, e ainda a ruptura da membrana plasmática provavelmente levou a remoção do contorno celular, representado na Figura 3 pela seta pequena. É sabido que, essa caracterização morfológica é típica em morte celular ou em apoptose tardia (YAN *et al.*, 2020).

Por outro lado, a linhagem CaSki após tratamento com piperina demonstrou formação de vesículas intracelulares (Figura 3), caracterizando possivelmente autofagia, que é representada por essas formações de vesículas intracelulares e vacúolos citoplasmáticos (YAN, *et.al*; 2015). Como a piperina é um agente citotóxico (MANAYI *et al.*, 2018) ela desencadeia esta autofagia na célula como um mecanismo de defesa (DIKIC; ELAZAR, 2018).

Figura 3- Morfologia celular: fotomicrografia da morfologia das linhagens celulares HeLa, SiHa CaSki e HaCaT após 24h de tratamento com controle (DMSO) e piperina [150µM]. Seta grossa e seta divisa apontando os blebs, ponta de seta mostrando as vesículas intracelulares e seta fina mostrando rompimento da membrana.



Fonte: Própria autora.

4.2 Piperina modula a expressão de ERK e p38

As cascatas de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) são vias de sinalização que participam da indução, manutenção e progressão do carcinoma, tendo sua hiperativação evidenciada em diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer cervical (GUO *et al.*, 2020).

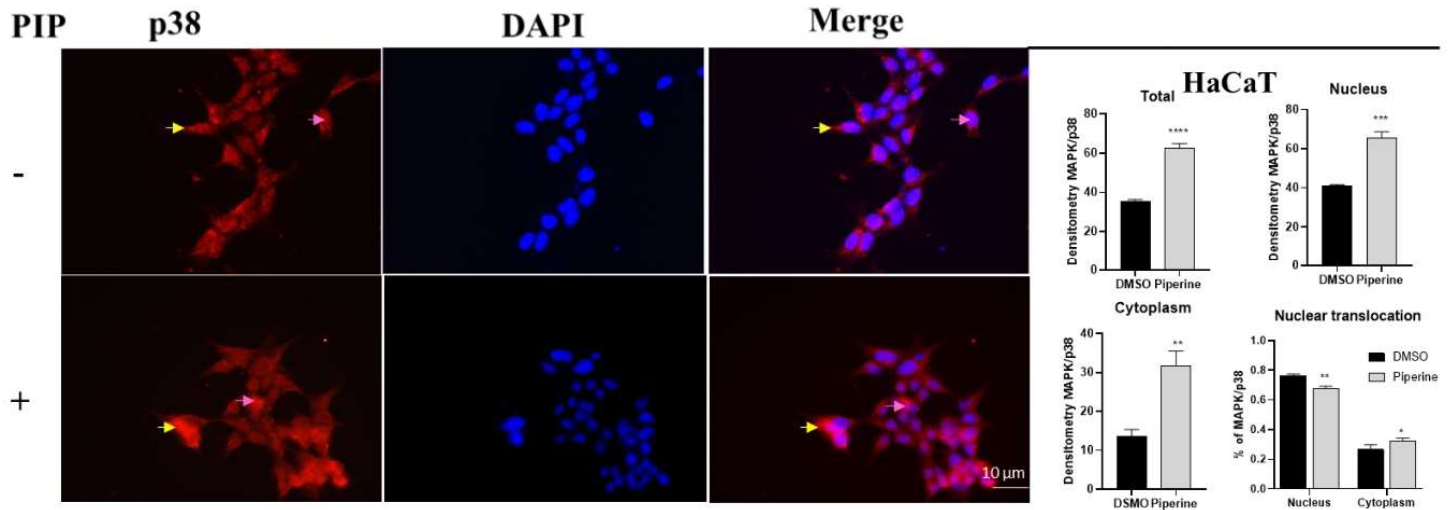
Produtos desta via, tem a capacidade de serem fosforilados ao atingirem o núcleo de uma célula e ativar diferentes fatores importantes de transcrição, evidenciados em vários mecanismos celulares. Como exemplo de produtos provenientes da via MAPK temos a ERK e a p38 (GUO *et al.*, 2020).

A fim de compreender a ação da piperina sobre essas proteínas (ERK e p38), foram avaliadas a expressão destas por imunocitoquímica em sua totalidade no núcleo e no citoplasma, e também a translocação nuclear dessas proteínas do citoplasma para o núcleo.

Como resultado, obtivemos que nas células não tumorais – HaCaT – a expressão de p38 teve um aumento significativo tanto no citoplasma quanto no núcleo, revelando que o efeito da p38 frente a piperina está relacionado ao estresse celular, desencadeando uma resposta inflamatória, já que a p38 é um tipo de MAPK que mais responde a estímulos inflamatórios e estresse ambiental (LEE; RAUCH; KOLCH, 2020). Mesmo a piperina tendo aumentado a expressão de p38 nessas células, no processo de translocação nuclear ela o reduziu a uma porcentagem inferior de p38 ativa no núcleo relação ao citoplasma. Portanto, a piperina atuou

como um estímulo para a cascata MAPK, aumentando a síntese de p38, mas sua translocação teve resultado inferior se comparado ao controle.

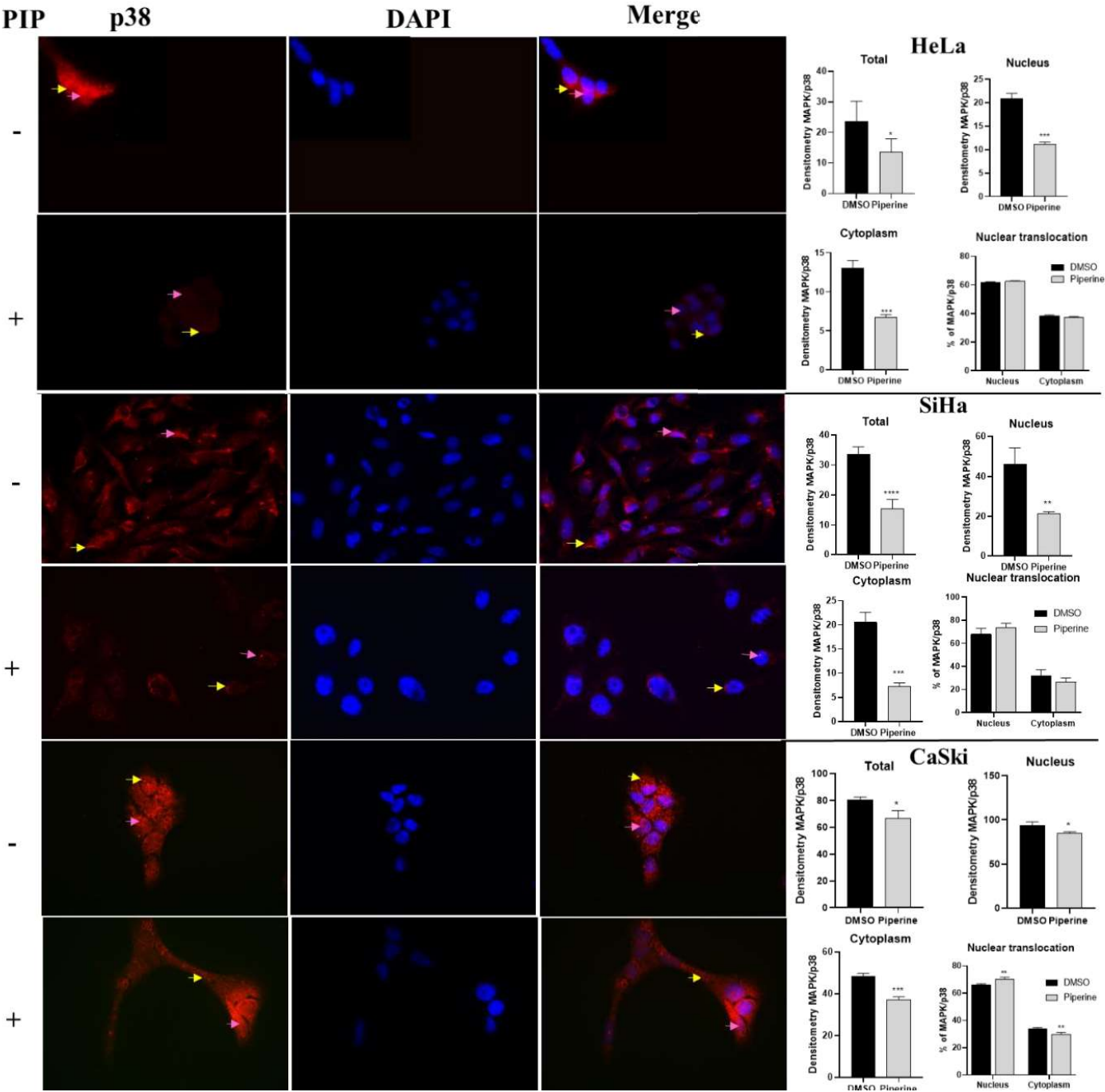
Figura 4 – Imunocitoquímica da expressão proteica de p38/MAPK na célula HaCaT: apontada pela seta amarela no citoplasma e pela rosa no núcleo. Gráficos demonstrando a densitometria em cada compartimento celular e de translocação nuclear.



Fonte: Própria autora.

Nas células tumorais – SiHa; HeLa e CaSki – a expressão de p38 foi reduzida em todos os compartimentos analisados, não apresentando papel da piperina sobre a translocação nuclear (Figura 4) evidenciada pela igualdade na concentração da proteína expressa no núcleo da célula controle e da tratada com piperina. Também na CaSki a piperina aumentou a translocação nuclear de p38.

Figura 5 – Imunocitoquímica da expressão proteica de p38/MAPK nas células tumorais: apontada pela seta amarela no citoplasma e pela rosa no núcleo. Gráficos demonstrando a densitometria em cada compartimento celular e de translocação nuclear.



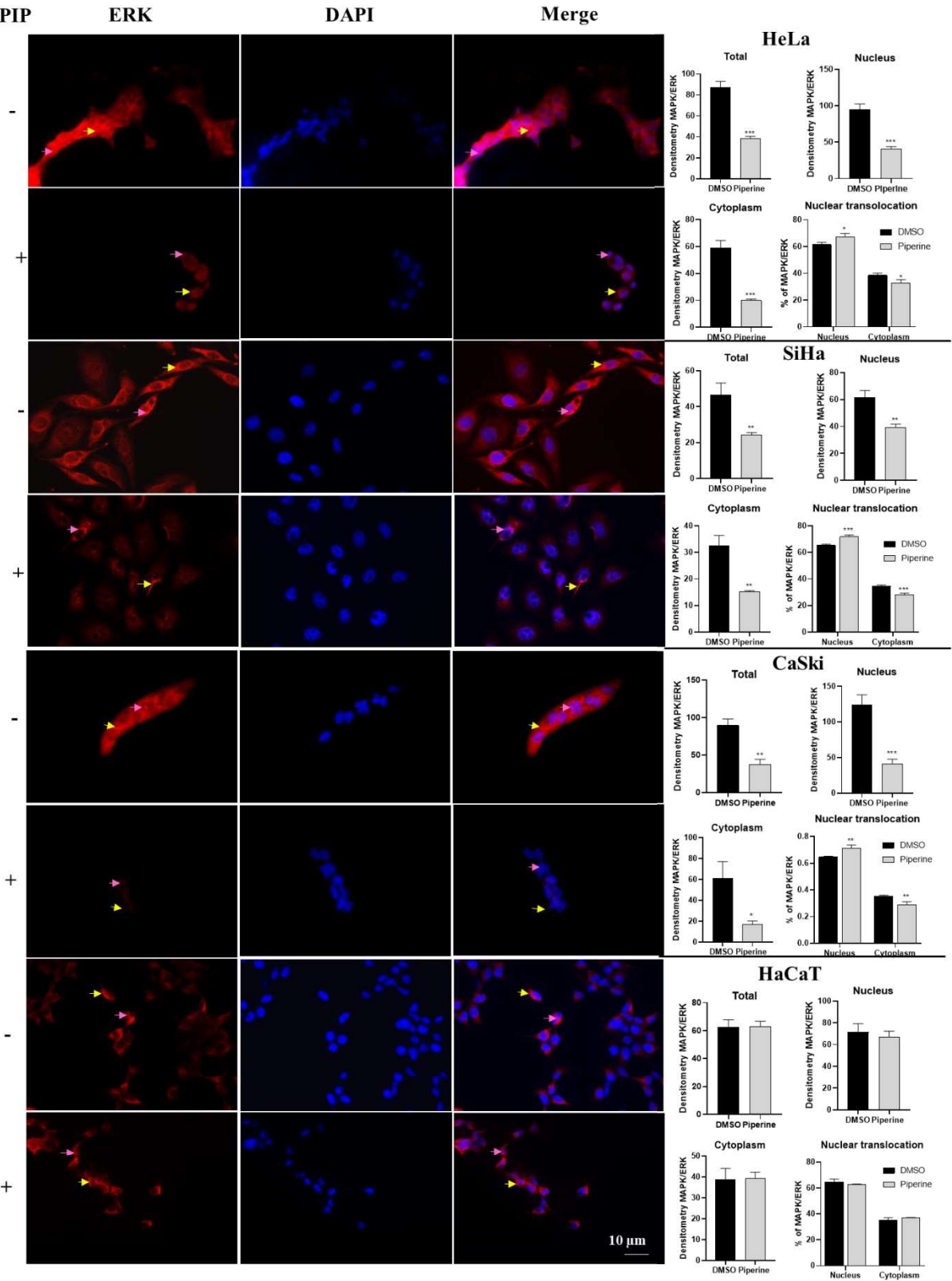
Fonte: Própria autora.

Já a via ERK está diretamente relacionada a progressão neoplásica, que sendo demasiadamente 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 exercem ação sobre genes que induzem a proliferação celular (GUO *et al.*, 2020).

Em todos os compartimentos celulares das linhagens de câncer cervical, a expressão de ERK foi reduzida, como mostra a Figura 6. Uma justificativa plausível é que a piperina regulou negativamente a expressão de ERK, refletindo na redução da proliferação, na formação de colônia e no ciclo celular, sendo todos esses processos diretamente regulados por ERK. E ainda, após o tratamento com a piperina houve também um aumento da translocação nuclear, por outro, nas células HaCaT a expressão de ERK e sua translocação não foi alterada, o que é evidenciado os efeitos menos acentuados sobre o ciclo e proliferação celular.

Figura 6 - Imunocitoquímica da expressão proteica de ERK, apontada pela seta amarela no citoplasma e pela rosa no núcleo. Gráficos demonstrando a densitometria em cada compartimento celular e de translocação nuclear.



Fonte: Própria autora.

Em outros trabalhos também, os resultados obtidos foram bem relacionados com o deste trabalho, evidenciando que a piperina reduziu a fosforilação de p38 em células de músculo liso e câncer de ovário e inibiu a via ERK em câncer de mama, pulmão e células de músculo liso (KIM *et al.*, 2013).

5 CONCLUSÕES

Desta forma a piperina:

- Altera a morfologia celular;
- Altera a expressão de p38 e ERK em células de carcinogênese cervical;
- reduz a evolução neoplásica *in vitro* por atuar sobre a via MAPK;
- modula a expressão de ERK e p38, evidenciando ser um potencial fitoterápico para tratamento complementar de câncer de colo de útero.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LITCHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Basic immunology**: functions and disorders of the immune system. 5 ed. London: Elsevier, 2016. p. 355.
- BONAB, F. R. *et al.* Molecular pathways in the development of hpv-induced cervical cancer. **EXCLI Journal**, Dortmund, v. 20, p. 320–337, 2021.
- BRAICU, C. *et al.* A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. **Cancer**, Hoboken, v. 11, p. 1–25, 2019.
- BRINGEL, K.A. *et al.* Fatores associados à infecção pelo HPV entre mulheres vivendo com HIV. **Brazilian Journal of Health Review**, Salvador, v. 4, n. 4, p. 17802-17819, 2021.
- CHARI, R. V. J. Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs. **Accounts of Chemical Research**, Washington, 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**, London, v. 393, n. 10167, p. 169–182, 2019.
- COSTA-LOTUFO, L.V. *et al.* A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticancer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev.Virtual Quim.**, [s. l.], v.2, n.1, p. 47-58, 2010.
- COULTHARD, L. R. *et al.* p38 MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. **Europe PMC Funders Group**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 369–379, 2011.
- CUADRADO, A.; NEBRED, A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. **Biochemical Journal**, London, v. 429, n. 3, p. 403–417, 2010.
- DELIRE, B.; STÄRKEL, P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. **Eur J Clin Invest**, [s. l.], v. 45, p. 609-623, 2015.
- DE MIGUEL F. J. *et al.* Identification of alternative splicing events regulated by the oncogenic factor SRSF1 in lung cancer. **Cancer Res**, [s. l.], v. 74, p. 1105–1115, 2014.
- DIKIC, I.; ELAZAR, Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 19, n. 6, p. 349–364, 2018.
- DRANOFF, G. Citocinas na patogênese do câncer e terapia do câncer. **Nat Rev Cancer**, [s. l.], v. 4, p. 11–22, 2004.
- FERNANDES, J. V. *et al.* Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review). **Oncology Letters**, Athens, v. 9, n. 3, p. 1015–1026, 2015.
- FREITAS, L.B. *et al.* Human Papillomavirus 16 Non-European variants are preferentially associated with High-Grade cervical lesions. **Plos One**, San Francisco, v. 9, 2014.

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**, Athens, p. 1997–2007, 2020.

HEMMAT, N.; BAGHI, H. B. Human papillomavirus E5 protein, the undercover culprit of tumorigenesis. **Infect Agent Cancer**, [s. l.], v. 13, n.1, p. 31, 2018

JAFRI, A. *et al.* Induction of apoptosis by piperine in human cervical adenocarcinoma via ROS mediated mitochondrial pathway and caspase-3 activation. **EXCLI J**, [s. l.], 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**, The Hague, v. 263, p. 118607, 2020.

KHAJURA, A. *et al.* Piperine modulation of carcinogen induced oxidative stress in intestinal mucosa. **Mol.Cell.Biochem.**, New York, v. 189, p.113-118, 1998.

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.

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**, London, v. 33, n. 4, p. 523–530, 2012.

LEE, K. P. *et al.*, 2015. Piperine inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced proliferation and migration in vascular smooth muscle cells. **J Med Food**, New Rochelle, v. 18, n. 2, p. 208–215, 2015.

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.

LIU, J.; CAO, X. Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 13, n. 6, p. 711–721, 2016.

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.

MADHAVI, B.B. *et al.* Extraction, identification, formulation and evaluation of piperine in alginate beads, **Int.J.Pharm.Sci**, v.1, p.156-161,2009.

MANAYI, A. *et al.* Piperine as a Potential Anti-cancer Agent: A Review on Preclinical Studies. **Curr Med Chem**, v. 25, n. 37, p. 4918-4928, 2018.

Ministério da saúde (BR). INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ DE ALENCAR, INCA. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: 2011a. Disponível em https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//diretrizes_para_o_rastre

amento_do_cancer_do_colo_do_uterio_2016_corrigido.pdf . Acesso em 18 de novembro de 2022.

Ministério da saúde (BR). INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ DE ALENCAR, INCA. Estimativas 2020: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em 18 de novembro de 2022.

MOTOYAMA, S. et.al., The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. **J Med Sci**, v.50, vp.9-19, 2004.

NEWMAN, D.J., Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years. **J. Nat. Prod.** v. 75, p. 311–335, 2012.

OLSON, J.M.; HALLAHAN, A.R.p38 MAP Kinase: a convergence point in cancer therapy. **TRENDS in Molecular Medicine**, v.10, n.3, p. 125-129, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, OMS. Papilomavírus Humano (HPV) e cancer cervical. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/> . Acesso em 18 de novembro de 2022.

PRADEEP, C. R.; KUTTAN, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. **Clin. Exp. Metastasis**, Dordrecht, v. 19, p. 703-708, 2002.

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

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

SHAO-MING W., YOU-LIN Q. Implementation of cervical cancer screening and prevention in China challenges and reality. **Jpn. J. Clin. Oncol**, Oxford, v. 45, n.1, p. 7-11, 2015.

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**, London, v. 38, p. 1-11, 2018.

SING, J.; REEM, R.K. & WIEBEL, F.J. Piperine, a major ingredient of black and long peppers protects against AFB1-induced cytotoxicity and micronuclei formation in H4IIEC3 rat hepatoma cells. **Cancer Lett.**, Shannon, v.86, p. 195-200, 1994.

SMALL, W. *et al.* Cervical cancer: A global health crisis. **Cancer**, Hoboken, v. 123, n. 13, p. 2404–2412, 2017.

SMALLEY KS. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. **J Invest Dermatol**, Oxford, v. 130, p.28-37, 2010.

STANLEY, M. A. Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. **Virus Res**, Amsterdam, v. 89, p. 241-248, 2002.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 90, n. 2, p. 339–346, 2004.

UNGER, E. R.; BARR, E. Papilomavírus humano e câncer cervical. **Emerg Infect Dis**, Atlanta, v. 10, n.11, p. 2031-2032, 2004.

VENDRAMINI-COSTA, D.; E. CARVALHO, J. Molecular Link Mechanisms between Inflammation and Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, v. 18, n. 26, p. 3831–3852, 2012.

VILCEK, J. The Cytokines: an overview. In: Thomson AW, editor. The cytokine handbook. 3 ed. London: Academic Press, 1998. p. 1-20.

WANG, Z. *et al.* Cyclin B1/Cdk1 Coordinates Mitochondrial Respiration for Cell-Cycle G2/M Progression. **Developmental Cell**, St. Louis, v. 29, p.217-232, 2014.

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**, Hoboken, 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**, Clifton Walk, p. 39–48, 2020.

YANG, L. *et al.* Cancer-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities mediated by the prostaglandin EP2 receptor. **Journal of Clinical Investigation**, London, v. 111, n. 5, p. 727–735, 2003.

YANG, L. *et al.* Host and direct antitumor effects and profound reduction in tumor metastasis with selective EP4 receptor antagonism. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 66, n. 19, p. 9665–9672, 2006.

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**, Heidelberg, v. 146, n. 9, p. 2189–2203, 2020a.