



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

Juliana Prado Gusson Zanetoni

Atividade da piperina na modulação de mediadores inflamatórios em células de
câncer de cabeça e pescoço

São José do Rio Preto
2024

Juliana Prado Gusson Zanetoni

Atividade da piperina na modulação de mediadores inflamatórios em células de
câncer de cabeça e pescoço

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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: CNPq – Proc.. 41072/2020-2

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sonia Maria Olini

São José do Rio Preto
2024

G982a Gusson Zanetoni, Juliana Prado
Atividade da piperina na modulação de mediadores inflamatórios
em células de câncer de cabeça e pescoço / Juliana Prado Gusson
Zanetoni. -- São José do Rio Preto, 2024
80 p. : il., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto
Orientadora: Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
Coorientadora: Sonia Maria Olini

1. Câncer. 2. Inflamação. 3. Fitoterápico. 4. Piper nigrum. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Juliana Prado Gusson Zanetoni

Atividade da piperina na modulação de mediadores inflamatórios em células de
câncer de cabeça e pescoço

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor 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: CNPq – Proc.. 41072/2020-2

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Flavia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Andreia Machado Leopoldino
USP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Prof^a. Dr^a. Marcia Pereira de Oliveira Duarte
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Cristiane Damas Gil
UNIFESP/EPM - Universidade Federal de São Paulo

São José do Rio Preto
07 de março de 2024

DEDICO

Aos meus amados e queridos pais, Silvana Butinhão Prado Gusson e Jesus Gusson (*In memoriam*), minha amada irmã Geovana Prado Gusson e meu amado esposo e companheiro de vida, Renato Alonso Zanetoni, que sempre estiveram ao meu lado e com todo o carinho me apoiaram e não mediram esforços para que eu chegasse até o presente momento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo sustento e por ter me guiado em toda a minha trajetória de vida, sendo meu amparo e fortaleza nos momentos mais adversos.

Aos meus amados pais e minha irmã pelo apoio e amor imensurável. Tenho por eles eterna gratidão, não só pela força nas situações difíceis, mas por toda a ajuda na realização dos meus sonhos e objetivos.

Ao meu amado esposo Renato Alonso Zanetoni pela paciência, companheirismo e amor incondicional comigo.

À minha querida orientadora Prof^a. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, obrigada pela dedicação e tempo despendido em meu auxílio na realização dessa pesquisa, o mundo precisa de mais professores como você. Agradeço pelos ensinamentos e orientações.

Agradeço as minhas amigas e companheiras de pesquisa Cíntia, Stefanie, Laura, Luana, Julia e Ingrid pela amizade, apoio e conversas do dia-a-dia. Vocês tornaram meus dias melhores.

Em especial agradeço a professora Dra. Sonia Maria Olini e ao professor Dr. Tiago Henrique pelo acesso, parceria e disponibilização de seus laboratórios e, principalmente pelos ensinamentos adquiridos.

Agradeço a todos os professores e ao programa da Pós-Graduação em Biociências por todos os ensinamentos.

Me direciono e agradeço a todos os funcionários desta Instituição, que de alguma maneira com a sua prestação de serviço, auxiliaram em meu desenvolvimento ao longo dos anos.

Ao IBILCE por toda a infraestrutura, tenho imenso orgulho dessa instituição.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Código de Financiamento 41072/2020-2, à qual agradeço.

RESUMO

Os produtos naturais têm motivado a humanidade a descobrir novos agentes terapêuticos para várias doenças, especialmente as cancerígenas. Os carcinomas escamosos de cabeça e pescoço consistem em um grupo de neoplasias malignas localizadas acima da clavícula e abaixo da base do crânio, que afetam o revestimento mucoso em diferentes regiões anatômicas do trato aerodigestivo superior, ocupando o sexto lugar em termos de novos casos e mortes. Nesse contexto, a piperina destaca-se por ser um componente bioativo isolado principalmente da pimenta preta (*Piper nigrum*), que contém diversas propriedades biológicas como anti-inflamatória, imunomoduladora e anticancerígena. Com estas considerações, o objetivo do trabalho foi avaliar os mecanismos celulares e moleculares relevantes para o efeito antitumoral da piperina na modulação da via inflamatória em células de câncer de cabeça e pescoço. As linhagens de câncer de cabeça e pescoço (HEp-2 e SCC-25) foram tratadas com diferentes concentrações de piperina (25- 300 μ M) para determinação da proliferação, viabilidade/citotoxicidade e formação de colônias. A invasão, apoptose e ciclo celular foram quantificadas pelo ensaio de Transwell e citometria de fluxo. Os níveis da expressão das citocinas IL-1 β , IL-8 and IFN- γ foram determinados por ensaio imunoenzimático. O PCRq, Western blot, e a imunocitoquímica foram realizados para quantificação da expressão de genes e proteínas envolvidas na sinalização de PTGS2, PTGER4, MMP2/9, ERK e p38. Nossos resultados evidenciaram que a piperina promoveu alteração da morfologia celular, redução da proliferação, viabilidade e formação de colônias celulares em mais de 50% de morte celular. A piperina também apresentou efeito citotóxico em altas concentrações (IC₅₀ = 157,3 para HEp-2 e 249,9 para SCC-25) e induziu danos ao material genético nas células HEp-2 (de 62.3% para 137.3%) e SCC-25 (de 78.6% para 159%), certamente por desencadear o processo apoptótico devido ao acúmulo de DNA, e consequente parada do ciclo celular nas fases G2/M e S. O fitoterápico diminuiu a invasão celular de 70.3 (HEp-2) e 24.6 (SCC-25), para 12.3 e 10.3, referente ao número de células, e também pela redução (2 vezes) da expressão dos genes relacionados com metástase (*MMP2/9*), além de alterar a expressão de mRNA e proteínas da via inflamatória da ciclooxigenase 2, com a diminuição do gene *PTGS2* em mais de 2 vezes. Piperina também regulou a secreção de citocinas pró-inflamatórias, provavelmente pela diminuição de mais de 50% da expressão de ERK e p38 (MAPK). Esses dados são inéditos na carcinogênese de cabeça e pescoço, evidenciando que a piperina atua diretamente nas moléculas e vias

promotoras da inflamação, em resposta às suas propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas, podendo originar um novo agente terapêutico para o câncer de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: Inflamação. Fitoterápico. Ciclooxigenase 2. MAPK. Citocinas.

ABSTRACT

Natural products have motivated humanity to discover new therapeutic agents for various diseases, especially cancerous ones. Head and neck squamous cell carcinomas are a group of malignant neoplasms located above the clavicle and below the base of the skull, which affect the mucosal lining in different anatomical regions of the upper aerodigestive tract, ranking sixth in terms of new cases and deaths. In this context, piperine stands out for being a bioactive component isolated mainly from black pepper (*Piper nigrum*), which contains various biological properties such as anti-inflammatory, immunomodulatory and anticancer properties. With these considerations in mind, the aim of this study was to evaluate the cellular and molecular mechanisms relevant to the anti-tumor effect of piperine in modulating the inflammatory pathway in head and neck cancer cells. Head and neck cancer cell lines (HEp-2 and SCC-25) were treated with different concentrations of piperine (25- 300 μ M) to determine proliferation, viability/cytotoxicity and colony formation. Invasion, apoptosis and cell cycle were quantified using the Transwell assay and flow cytometry. The expression levels of the cytokines IL-1 β , IL-8 and IFN- γ were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. PCRq, Western blot, and immunocytochemistry were performed to quantify the expression of genes and proteins involved in PTGS2, PTGER4, MMP2/9, ERK and p38 signaling. Our results showed that piperine altered cell morphology, reduced proliferation, viability and the formation of cell colonies in more than 50% of cell death. Piperine also had a cytotoxic effect at high concentrations (IC_{50} = 157.3 for HEp-2 and 249.9 for SCC-25) and induced damage to the genetic material in HEp-2 (from 62.3% to 137.3%) and SCC-25 cells (from 78.6% to 159%), certainly by triggering the apoptotic process due to the accumulation of DNA, and consequent arrest of the cell cycle in the G2/M and S phases. The herbal medicine decreased cell invasion from 70.3 (HEp-2) and 24.6 (SCC-25), to 12.3 and 10.3, referring to the number of cells, and also by reducing (2-fold) the expression of metastasis-related genes(*MMP2/9*), as well as altering the expression of mRNA and proteins of the cyclooxygenase 2 inflammatory pathway, with a decrease in the *PTGS2* gene by more than 2-fold. Piperine also regulated the secretion of pro-inflammatory cytokines, probably by decreasing the expression of ERK and p38 (MAPK) by more than 50%. These data are unprecedented in head and neck carcinogenesis, showing that piperine acts directly on inflammation-promoting molecules and pathways, in response to its anti-inflammatory and anti-cancer properties, and could lead to a new therapeutic agent for head and neck cancer.

Keywords: Inflammation. Herbal medicine. Cyclooxygenase 2. MAPK. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da biossíntese e da estrutura química da piperina	20
Figura 2 - Principais alvos moleculares da piperina	21
Figura 3 - Principais moléculas promotoras do processo inflamatório	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína quinase B
AP-1	Proteína ativadora 1
ATCC	American Tissue Cell Culture
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CCP	Câncer de cabeça e pescoço
cDNA	DNA complementar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Quinases reguladas por sinais extracelulares
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene
GSK3	Glicogênio sintase quinase 3
HPV	Vírus do Papiloma Humano
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IFN-γ	Interferon gama
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
MMP2	Metaloproteinase de matriz 2
MMP9	Metaloproteinase de matriz 9
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)
PBS	Tampão Fosfato Salino
PBST	PBS com tween
PGE2	Prostaglandina E2
PLA2	Fosfolipase A2
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
ROS	Espécies reativas de oxigênio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	Nanômetro
μM	Micromolar
μL	Microlitro
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
μm	Micrômetro
μg	Micrograma
M	Molar

PREFÁCIO

O trabalho em questão foi desenvolvido para elucidar alguns fundamentos da ação da piperina em células de câncer de cabeça e pescoço. Para isso foram realizadas diversas investigações celulares e moleculares em modelo *in vitro* de células de câncer epidermoide de laringe (HEp-2) e de língua (SCC-25). Esse estudo evidenciou que o câncer está intimamente relacionado com a inflamação, e que o processo inflamatório pode promover todos os estágios da tumorigênese.

Os resultados da tese mostram o efeito anti-inflamatório e antiproliferativo da piperina frente a inibição de vias de sinalização responsáveis pela promoção da inflamação mediada pela ciclooxygenase 2. A piperina também interfere na atividade de outras vias intermediárias, como de metaloproteinases (MMPs) e de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Nesse sentido, a piperina destaca-se como um agente terapêutico promissor para o câncer de cabeça e pescoço, tendo um papel regulador no processo inflamatório e funcionando como um produto integrativo para doenças cancerígenas, pela redução da evolução neoplásica.

O conteúdo do trabalho foi apresentado em formato de capítulo, e os dados da pesquisa gerados na tese foram submetidos para publicação em revista indexada internacional (Phytomedicine IF= 7,9), em modelo de artigo intitulado “Molecular aspects of piperine in signaling pathways associated with inflammation in head and neck cancer”. Esse estudo também propiciou a escrita de um manuscrito de revisão, voltado para o entendimento do microambiente tumoral do câncer de cabeça e pescoço, associado à aplicação de produtos naturais como terapêutica, que será futuramente submetido a revista especializada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Câncer de cabeça e pescoço	16
1.2 Produtos naturais: piperina.....	19
1.3 A inflamação relacionada ao câncer	22
1.4 Principais vias mediadoras da inflamação	24
2. OBJETIVO GERAL.....	32
2.1 Objetivos específicos.....	32
3. RESULTADOS	33
3.1 <i>CAPÍTULO 1: Molecular aspects of piperine in signaling pathways associated with inflammation in head and neck cancer</i>	34
4. DISCUSSÃO	61
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de cabeça e pescoço

O termo “câncer” é usado para se referir a um grande grupo de doenças determinadas pelo crescimento descontrolado de células anormais e que são causadas por uma ampla gama de fatores que incluem a desregulação de vias celulares. Qualquer célula do corpo é capaz de se tornar uma célula cancerosa (carcinogênese), uma vez que tenha sido submetida a sucessivas mutações genéticas (KUMARI; BANSAL, 2021; NAEEM *et al.*, 2022). Sua ocorrência está relacionada a uma variedade de fatores etiológicos, como instabilidade genômica e estresse ambiental. Entretanto, o desenvolvimento do câncer ainda é aceito como um processo multifacetado, durante o qual as alterações genéticas conferem tipos específicos de vantagens de crescimento; portanto, impulsiona a transformação progressiva de células normais em células cancerígenas malignas (SINGH *et al.*, 2019).

Uma célula normal e uma célula tumoral têm estados metabólicos muito distintos, pois uma das principais características da célula tumoral é um metabolismo celular alterado. Assim, o metabolismo modificado da célula tumoral suporta as características adquiridas pela célula tumoral durante o complexo processo canceroso, abrangendo: um ciclo celular desregulado com características antiapoptóticas aprimoradas, vias de morte celular desreguladas, potencial migratório aumentado e uma alta adaptabilidade ao microambiente tecidual (NEAGU *et al.*, 2019).

Dentre as diversas neoplasias existentes, podemos apontar o câncer de cabeça e pescoço como um dos principais tumores prevaletentes. Esse tipo de câncer consiste em um grupo de neoplasias malignas localizadas acima da clavícula e abaixo da base do crânio, que afetam o revestimento mucoso em diferentes regiões anatômicas do trato aerodigestivo superior, abrangendo também malignidades dos seios paranasais, cavidade nasal e glândulas salivares. O câncer de cabeça e pescoço (CCP) ocupa o sexto lugar em termos de novos casos de câncer e mortes, representando 2,5% dos novos casos de câncer e 1,9% das mortes por câncer em todo o mundo (HUANG; LIU, 2022). No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) em 2023 assinalaram, para a cavidade bucal, cerca de 14.700 casos novos por ano, 11.200 em homens e 3.500 em mulheres (INCA, 2023).

A cada ano, 450.000 mortes globais são atribuídas ao câncer de cabeça e pescoço. As taxas alarmantes de mortalidade relatadas nesse tipo de câncer são devido à alta prevalência de recorrência locorregional e/ou doença metastática. O processo metastático foi admitido

como um sistema complexo de várias etapas, combinado pela biologia do tumor e apoiado pelo microambiente tumoral, bem como por fatores ambientais externos envolvidos na invasão, intravasamento, circulação, colonização, extravasamento e metastização das células tumorais (MIRANDA-GALVIS; LOVELESS; KOWALSKI; TENG, 2021).

O microambiente tumoral é composto por grupos de células heterogêneas, incluindo células cancerígenas, células imunes e células estromais, como fibroblastos e células endoteliais. Essa diversidade e dinamismo entre diversos tipos de células, é estabelecido através do contato direto célula-célula ou fatores solúveis, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, criando nesse ambiente um nicho inflamatório para apoiar o desenvolvimento do câncer. O importante é que essas células são altamente plásticas; mudam continuamente suas características fenotípicas e funcionais para apoiar a progressão tumoral (HIBINO *et al.*, 2021). Essa complexidade do câncer torna-se evidente em exames microscópicos de tumores sólidos, que acabam revelando um microambiente tumoral altamente estruturado, e com uma matriz extracelular alterada (VISSER; JOYCE, 2023).

O entendimento por trás da alta recorrência do CCP metastático é provavelmente devido às interações da matriz tecidual circundante e células imunes que compõem o microambiente tumoral. O sistema imunológico do hospedeiro é capaz de reconhecer e eliminar células neoplásicas; no entanto, a imunovigilância comprometida gera um ambiente que acomoda a progressão e a sobrevivência das células tumorais. Curiosamente, os cânceres de cabeça e pescoço têm a capacidade de não apenas evitar o reconhecimento por células imunes, mas também são imunossupressores. O microambiente tumoral no CCP é determinado precisamente por diferentes subconjuntos de células, como fibroblastos estromais, células T e B, neutrófilos, macrófagos, células supressoras derivadas de mieloides, células natural killer (NK) e mastócitos. A respeito disso, os tumores muitas vezes escapam da vigilância imunológica do hospedeiro, suprimindo a função das células T citotóxicas ou ativando e expandindo as populações de células imunossupressoras (CHEN *et al.*, 2020).

Dessa forma, a paisagem imune do microambiente tumoral executa um papel fundamental na sentinela contra o desenvolvimento e avanço do CCP. Compreender o mecanismo de supressão do sistema imunológico no câncer é de extrema importância no desenvolvimento de novas terapias e para a melhoria dos resultados de diagnósticos dos pacientes (ELMUSRATI; WANG; WANG, 2021). Apesar do desenvolvimento do câncer em uma região anatômica acessível e visível para diagnóstico e do fato de o CCP ser geralmente precedido pela presença de lesões pré-cancerosas na cavidade oral, como leucoplasia,

eritroplasia e fibrose da submucosa oral, a maioria dos casos desse tipo de câncer são diagnosticados tardiamente, resultando em tratamentos insatisfatórios e por consequência alta mortalidade desses pacientes. Os principais fatores de risco mais importantes do câncer de cabeça e pescoço são os carcinógenos ligados ao tabagismo e ao abuso de álcool. Também é importante ressaltar que esse tipo de câncer está intimamente relacionada à infecção por cepas oncogênicas do papilomavírus humano (*human papillomavirus*, HPV), principalmente HPV-16 e HPV-18 (STARSKA-KOWARSKA, 2022).

O câncer de cabeça e pescoço positivo para HPV mostrou um prognóstico mais favorável do que o negativo para HPV, fato esse determinante para a diminuição da dose terapêutica de radiação e quimioterapia no tratamento da doença positiva para HPV. Contudo, ainda não existe uma estratégia de triagem disponível que se mostre eficaz, mas um exame físico cuidadoso tem sido apontado como uma abordagem primária para a detecção precoce (RAJ *et al.*, 2022).

Com relação a esse tipo de câncer temos diversos outros fatores de risco: como a exposição a poluentes atmosféricos cancerígenos, incluindo produtos químicos orgânicos e inorgânicos, bem como material particulado, especialmente em países/regiões em desenvolvimento com agravamento da poluição do ar. Outros fatores de risco compreendem envelhecimento, má higiene bucal e dietas carentes de vegetais. Meta-análises mostraram que polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo de carcinógenos e na imunidade estão associados a risco aumentado, como exemplo podemos citar polimorfismos no antígeno 4 do linfócito T citotóxico (*CTLA4*). Assim, uma capacidade reduzida de metabolizar carcinógenos e imunidade atenuada podem contribuir para o CCP. A diminuição do uso de produtos derivados do tabaco, a melhora da saúde bucal e a ampla vacinação contra o HPV devem ajudar a reduzir a incidência global do câncer de cabeça e pescoço (JOHNSON *et al.*, 2020).

Nesse sentido, o tratamento do câncer de cabeça e pescoço tem evoluído significativamente ao longo do último meio século, com melhorias na técnica cirúrgica, bem como avanços nos campos da oncologia médica e da radiação. Recentemente, uma compreensão mais detalhada da patogênese molecular do CCP foi possível com o sequenciamento completo do genoma desses tumores, revigorando o campo de quimioterápicos direcionados (HORTON *et al.*, 2019).

No entanto, essa doença ainda é diagnosticada em estágios avançados, perdendo o momento crítico do tratamento e dificultando a realização de operações cirúrgicas devido aos requisitos de comportamentos inalienáveis e essenciais à vida, podendo resultar em defeitos

teciduais, cicatrização excessiva e alterações na configuração anatômica e na função dos órgãos envolvidos (LI *et al.*, 2023). Contudo, os tratamentos mais comumente utilizados para essa doença envolvem procedimentos cirúrgicos, radioterapia e quimioterapia, porém, todas essas modalidades reduzem a qualidade de vida (ALSAHAFI *et al.*, 2019).

A ressecção cirúrgica é o tratamento escolhido para muitos cânceres em estágio inicial e até mesmo os considerados intermediários, e pode ser tratada pela remoção parcial ou total do local da lesão e do tecido circundante. No entanto, esse tipo de tratamento é geralmente aplicável à lesão primária, sendo incapaz de eliminar as células cancerígenas metastáticas e incapaz de atingir as células cancerígenas na circulação sanguínea. Já a radioterapia consiste em usar radiação para destruir o DNA das células cancerosas para a obtenção do tratamento local do câncer. A radioterapia geralmente tem um longo ciclo de tratamento, alto custo e produz uma variedade de complicações que incluem a função do corpo e imunidade prejudicadas. O tratamento químico envolve a utilização de medicamentos a nível sistêmico, não sendo assim seletivo, podendo afetar e comprometer as células normais, e até mesmo produzir resistência aos medicamentos. Embora os métodos tradicionais de tratamento de tumores mencionados possam conter temporariamente o desenvolvimento do câncer, eles não podem resolver fundamentalmente os problemas de recorrência e metástase do tumor (LIU; WANG; ZHANG; LI; ZHANG; LIU; ZHU; CHEN, 2022).

A respeito disso, o conceito de “medicina integrativa” vem ganhando atenção, por se tratar de uma nova estratégia para a terapia tumoral. Este conceito se concentra em uma aplicação colaborativa para o cuidado do paciente com HNSCC, que envolve estratégias com abordagens convencionais e complementares de forma coordenada. Entre as diferentes terapias integrativas, a Fitoterapia Tradicional pode ser a terapia de base biológica mais comum usada para pacientes com câncer de cabeça e pescoço (LAN *et al.*, 2020).

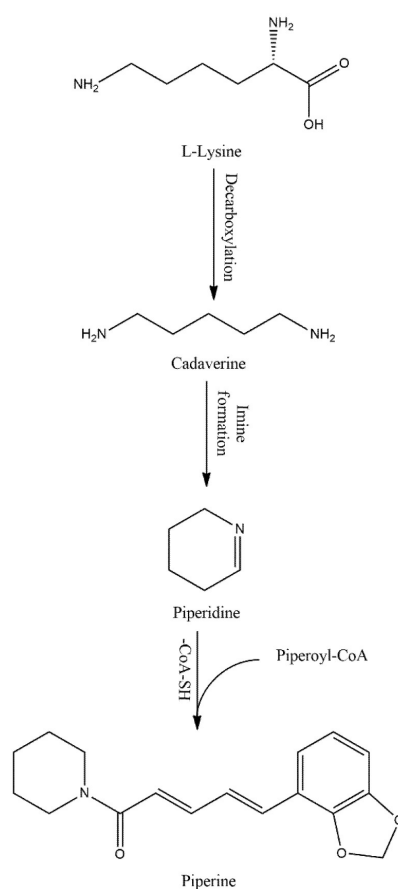
1.2 Produtos naturais: piperina

O reino vegetal é um reservatório ainda pouco conhecido de uma riqueza de compostos naturais bioativos (EKIERT; SZOPA, 2020). Os produtos naturais têm motivado a humanidade a descobrir novos agentes terapêuticos para diversas doenças, sobretudo as cancerígenas. Este fato é determinado por estatísticas que mostram que os produtos naturais representam a maioria dos quimioterápicos e antibióticos clinicamente conhecidos. Dentre esses fitoterápicos, uma das moléculas bioativas de grande interesse é a piperina. Piperina

apresenta uma infinidade de propriedades biológicas como anti-inflamatória, imunomoduladora, antioxidante, antidiabética e anticancerígena. Além disso, ela é amplamente utilizada para aumentar a biodisponibilidade de vários medicamentos, devido à sua capacidade de modular os sistemas de glicoproteína P e citocromo P450. Esse mecanismo acontece justamente pela versatilidade da estrutura química da piperina, que lhe confere a capacidade de interagir com várias vias envolvidas na patogênese de doenças (ELIMAM *et al.*, 2021).

A piperina é um componente fenólico bioativo isolado principalmente da pimenta preta (*Piper nigrum*) e a pimenta longa (*Piper longum*), mas também encontrado em outras espécies de Piper. Este composto é biosintetizado a partir da L-lisina e do precursor cinamoil-CoA como metabólito secundário (Figura 1). Após uma série de reações, o composto bioativo da piperina é obtido a partir da piperonil-CoA. Embora estudos anteriores a tenham relatada com baixa biodisponibilidade devido à sua natureza lipofílica, ela pode aumentar a biodisponibilidade oral mediante nanoformulação (AZAM; PARK; KIM; CHOI, 2022).

Figura 1: Representação da biossíntese e da estrutura química da piperina.

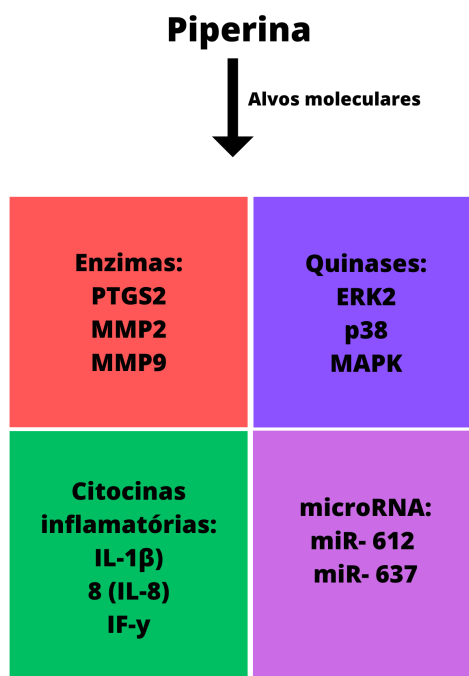


Fonte: (AZAM; PARK; KIM; CHOI, 2022).

Os efeitos quimiopreventivo e citotóxico são exercidos pela piperina pela indução de várias proteínas efetoras envolvidas na apoptose. Em células cancerígenas, a piperina desencadeia a parada do ciclo celular ativando a proteína p21, e a apoptose pela ativação por caspase (LIM *et al.*, 2022).

A eficiência terapêutica da piperina também é observada em muitas doenças e distúrbios, incluindo hipertensão, diabetes, câncer, doenças neurológicas, cardiovasculares e reprodutivas, bem como contra infecções microbianas (virais, bacterianas e fúngicas). Nesse contexto, a piperina tem múltiplos alvos que podem modular várias moléculas de sinalização, como Wnt, NF- κ B, proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP, fator de transcrição de ativação-2, ciclooxigenase-2, microRNA, SARS CoV-2, Akt/mTOR/MMP-9, inflamassoma NLRP3 ativado por MAPK, e fator nuclear eritroide 2 (Nrf2). O mecanismo de ação da piperina é, portanto, atribuída à sua capacidade de interagir com um amplo espectro de alvos moleculares que incluem quinases, fatores de transcrição, proteínas do ciclo celular, citocinas inflamatórias, receptores e moléculas de sinalização, como mostra a Figura 2 (TRIPATHI; RAY; MISHRA, 2022).

Figura 2: Principais alvos moleculares da piperina.



Fonte: ELABORADA PELA AUTORA, 2023.

Entre outros alvos de atuação da piperina é a partir de sua interferência na proliferação do câncer inibindo a expressão de ciclinas, ciclinas dependentes de quinases (CDK) e outros reguladores moleculares do ciclo celular. Quanto ao efeito anti-migratório, anti-invasivo anti-metastático, ela bloqueia o sinal do Fator/Receptor de crescimento endotelial vascular (VEGF/VEGFRs) por meio da via das Metaloproteinases de Matriz (MMPs). Além disso, como composto antineoplásico, ela atua na regulação negativa oncogênica e interfere na via das espécies reativas de oxigênio (ROS), reduzindo o processo tumorigênico. Piperina seletivamente induz a morte de células tumorais (apoptose e autofagia) agindo na expressão e atividades de proteínas e sinais relacionados (ZADOROZHNA; TATARANNI; MANGIERI, 2019).

Estudos do nosso grupo de pesquisa apontam a ação da piperina na redução neoplásica em células de câncer cervical, na qual o composto atuou na diminuição da proliferação, viabilidade e da migração celular das linhagens tumorigênicas HeLa, SiHa e CaSki (CARDOSO *et al.*, 2023). Outro estudo também evidenciou o efeito da piperina na indução da apoptose, devido a formação de espécies reativas de oxigênio, em virtude da ativação da via mitocondrial pela caspase-3 em adenocarcinoma cervical humano (JAFRI *et al.*, 2019).

Apesar dos múltiplos alvos moleculares e da ampla atuação da piperina no câncer, pouco se sabe dos efeitos desse composto em específico no câncer de cabeça e pescoço, ainda mais no sentido das atividades antineoplásica, anti-inflamatória e antimetastática desse fitoterápico. Assim, os produtos naturais derivados de plantas são um recurso promissor para potenciais compostos terapêuticos no combate ao câncer e a inflamação (EVANS; STRATTON; FERGUSON, 2020).

1.3 A inflamação relacionada ao câncer

A inflamação é a resposta do corpo a um insulto, como infecções ou lesões, mecanismo esse fundamental e reconhecido há milhares de anos. O médico grego Hipócrates pode ter sido o primeiro a considerar a inflamação como o início de um processo de cura, introduzindo palavras como *edema* e *erisipela* para descrever seus sintomas. A primeira descrição abrangente dos sintomas inflamatórios pode ser encontrada em *De Medicina*, escrito por Aulus Celsus (~25 AC-38 DC), que descreveu os quatro sintomas da inflamação como *rubor*, *tumor*, *cor* e *dor* (vermelhidão, inchaço, calor e dor). O quinto sinal de inflamação, *functio laesa* (função prejudicada), foi adicionado por Galeno de Pérgamo cerca de 100 anos depois. A relação entre inflamação e câncer foi proposta pela primeira vez por

Rudolf Virchow em 1863, que observou a presença de leucócitos em tecidos neoplásicos (KOLAWOLE; KASHFI, 2022).

Esse processo envolve ativação, recrutamento e ação de células da imunidade inata e adaptativa. Assim, a inflamação é igualmente importante para o reparo, regeneração e remodelação tecidual e formas sutis desse mecanismo são essenciais para a regulação da homeostase tecidual. A inflamação, independentemente da sua ocorrência no contexto de uma doença inflamatória crônica ou no aparecimento de uma inflamação latente induzida por tumor, tem um grande impacto na composição do microambiente tumoral e particularmente na plasticidade das células tumorais e estromais. Dessa forma, a inflamação predispõe ao desenvolvimento do câncer e promove todos os estágios da tumorigênese (GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019).

A estimulação fundamentada da inflamação crônica pode causar tolerância imunológica no corpo e as células mutantes não podem ser identificadas e eliminadas a tempo, levando à ocorrência de tumores. A indução tumoral é o processo pelo qual uma única célula tumoral cresce em um tumor primário totalmente desenvolvido. O crescimento das células iniciais depende tanto da promoção da proliferação celular quanto da redução da morte celular (apoptose), ambas as quais podem ser estimuladas pela inflamação. As reações inflamatórias podem produzir alguns fatores químicos relacionados a citocinas que promovem o desenvolvimento do tumor, desempenhando assim um papel nas formas parácrina e autócrina, para garantir que as células inflamatórias sejam ativamente recrutadas e acionadas no microambiente do tumor (SONG; WANG; ZHANG; LIU, 2019).

As células mutantes são eficientes na geração de um microambiente inflamatório tumoral rico em macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, mastócitos e linfócitos que desempenham um papel elementar nos cânceres associados à inflamação. Em específico, os macrófagos associados ao tumor (*tumor-associated macrophages*, TAM) podem promover a progressão do tumor através da secreção de sinalizadores, como citocinas (IL-10) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que contribuem para a angiogênese e suprimem a resposta imune. Além disso, os TAMs produzem metaloproteinases de matriz (*MMP2* e *MMP9*) que degradam a membrana basal promovendo invasão celular e metástase. Isso pode transcorrer devido a presença de macrófagos e outros leucócitos em sítios inflamatórios, onde estes secretam grande quantidade de agentes mutagênicos que induzem um dano tecidual persistente e causam alterações no DNA. Contudo, a mudança de células mutantes para células malignas requer muitos eventos genéticos e epigenéticos que estão

diretamente relacionados à inflamação crônica (ZAPPAVIGNA *et al.*, 2020).

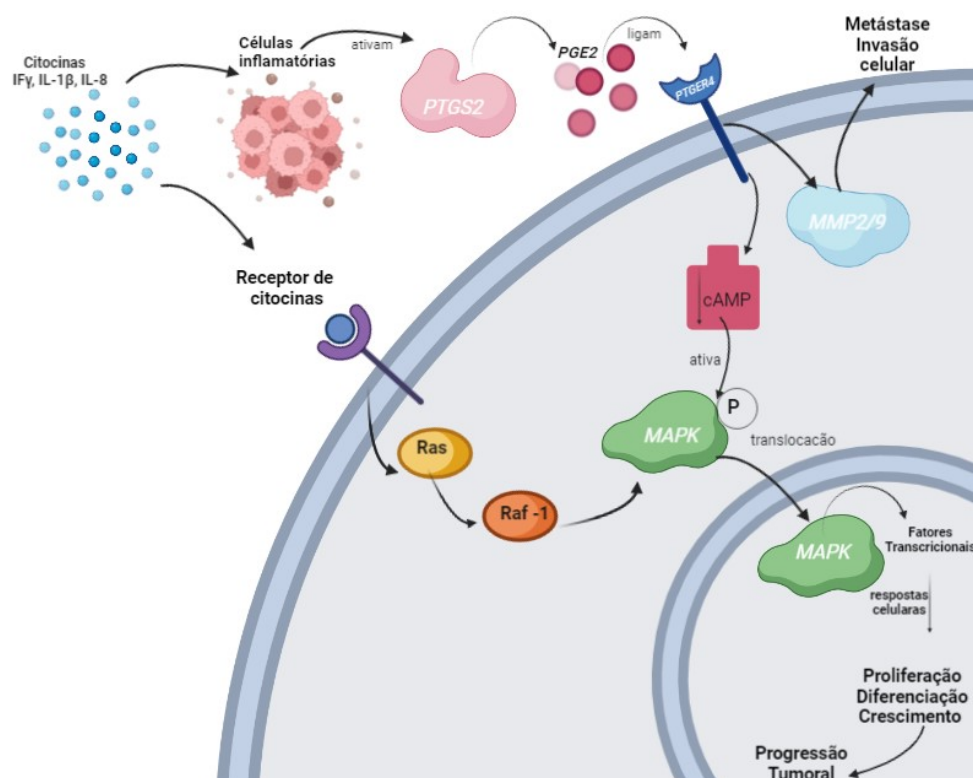
As alterações a nível de DNA também podem ser originadas pela liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), em consequência de lesão mitocondrial que induz a autofagia dessa organela e leva a defeitos funcionais celulares. A superexpressão de moléculas de sinalização inflamatória pode aumentar a capacidade anti-apoptose das células e promover o crescimento celular. Essa sinalização inflamatória promovida pelas espécies reativas de oxigênio possibilitam a ativação de pró-carcinógenos, como aflatoxina, estrogênio e hidrocarbonetos aromáticos, levando a danos ao DNA, o que intensifica o desenvolvimento do câncer (LI *et al.*, 2020).

Ainda, a inflamação pode ser regulada por muitas vias mediadas por receptores, tais como receptores do tipo *Toll*-Like e a via de proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen activated protein kinase*, MAPK). A cascata adicional de sinalização é realizada para atrair neutrófilos, que liberam prostaglandina E2 (*PGE2*) usando a enzima *PTGS1* ou *PTGS2*, citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e histaminas para induzir inflamação e dor. A desregulação dessas vias leva a diversos distúrbios inflamatórios, como proliferação vascular, destruição tecidual, fibrose e muitas outras doenças secundárias, como artrite, aterosclerose, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer, asma e câncer (AL-KHAYRI *et al.*, 2022).

1.4 Principais vias mediadoras da inflamação

A inflamação e a instabilidade genômica são as principais particularidades pelas quais os tumores se manifestam. Tumores constantemente secretam moléculas inflamatórias que garantem sua progressão, dando origem a um “efeito cascata”. Essas moléculas promotoras de inflamação são representadas principalmente por citocinas, quimiocinas e prostaglandinas (PGs) como demonstrado na Figura 3 (TUDOR *et al.*, 2020).

Figura 3: Principais moléculas promotoras do processo inflamatório.



Fonte: ELABORADA PELA AUTORA, 2023.

As ciclooxigenases (COXs) são membros de uma família de mieloperoxidases que catalisam a biossíntese de prostaglandinas (PGs), usando o ácido araquidônico (AA) como substrato. Em específico, podemos destacar o gene *PTGS2*, conhecido como *COX-2*, inicialmente. Esse gene tem baixa atividade em células de tecidos normais e pode ser induzido de forma provisória por estímulos como citocinas, fatores de crescimento, mitógenos, promotores de tumores e hormônios. Quando as células são estimuladas por esses fatores, o gene *PTGS2* pode promover a síntese de PGE₂. De fato, esse gene é altamente expresso em tecidos tumorais; e essa alta expressão pode afetar a ocorrência e o desenvolvimento de tumores por vários meios, desde a regulação de metabólitos e também na estimulação da proliferação e invasão de células tumorais (ZHANG *et al.*, 2019).

As ciclooxigenases são enzimas bifuncionais com atividades de ciclooxigenase e catalase, e são responsáveis pela conversão do ácido araquidônico em vários prostanóides, uma família de mediadores lipídicos com diversas funções biológicas. Essas enzimas estão ligadas à membrana, localizadas principalmente no lado luminal do retículo endoplasmático e no envelope nuclear das células (LI; JIANG; WANG; YU, 2020).

Existem três isoformas diferentes de COX expressas em humanos, a saber, *COX-1* (*PTGS1*), *COX-2* (*PTGS2*) e *COX-3* (*PTGS3*). *PTGS1* é expressa constitutivamente, e é

responsável pela manutenção de funções fisiológicas, como integridade gastrointestinal, função renal normal, homeostase vascular e biossíntese de tromboxano A₂ pró-agregado em plaquetas sanguíneas, enquanto a *PTGS2* é induzida por fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias e é responsável pela produção de prostaglandinas durante a inflamação. Já *PTGS3* é uma variante de *splicing* alternativo da *PTGS1*, encontrada no córtex cerebral e no coração (PRABHAKARAN; MOLOTKOV; MINTZ; MANN, 2021).

A superexpressão de mRNA de *PTGS2* pode ser considerada um aspecto comum em muitos tumores sólidos, dentre esses tumores podemos citar: carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, mesotelioma, carcinoma hepatocelular, câncer gástrico e câncer de mama. A estimulação da expressão de *PTGS2* está envolvida à fatores de crescimento, como fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral (TNF), promotores tumorais e radiação ultravioleta B (BERBECKA *et al.*, 2021).

Prostaglandinas (PGs) derivadas de *PTGS2* podem contribuir para o desenvolvimento do tumor através de vários mecanismos, incluindo a inibição da apoptose e podem atuar nos receptores que são acoplados a proteína G, por exemplo, *PTGER1*, *PTGER2*, *PTGER3* e *PTGER4* para induzir a cascata de sinal da PGE₂, levando a alterações do cálcio intracelular, cAMP e alguns fatores inflamatórios (SHENG; SUN; YU; LI; ZHANG; ZHU, 2020).

Em específico, a regulação positiva do receptor *PTGER4* contribui para a patologia de muitas malignidades humanas, e a sua sinalização está relacionada a diversas particularidades e características de células malignas, incluindo proliferação, migração, invasão, metástase, angiogênese, evasão imune, transição epitelial para mesenquimal e propriedades de células-tronco cancerígenas (CHING; READER; FULTON, 2020). Ainda, a sinalização do receptor *PTGER4* ativada por *PTGS2*-PGE₂ também está envolvida diretamente na geração da inflamação. Isso em grande parte é determinado pelo fato de receptores (*PTGER1-4*) regularem posteriormente a expressão de metaloproteinases de matrix (MMPs) (VIANA *et al.*, 2020).

As MMPs são um grupo de endopeptidases de zinco críticas para a degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) e da membrana basal (BM). As MMPs, portanto, exercem papéis fundamentais em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo morfogênese, cicatrização de feridas, inflamação, invasão do câncer e metástase. As MMPs são estruturalmente divididas em vários subtipos, dentre as quais *MMP2* e *MMP9* pertencem à família das gelatinases que degradam principalmente gelatina, colágenos IV e V na matriz

extracelular mediante função proteolítica. Assim, no câncer, o aumento da atividade de *MMP2/9* leva à degradação da MEC, na qual desencadeia a invasão e metástase celular. Contudo, a superexpressão de *MMP2* e *MMP9* está associada a mau prognóstico em câncer oral, retinoblastoma, câncer de bexiga e câncer epitelial de ovário (JIANG; LI, 2021).

Nesse contexto de invasão e metástase celular, uma das vias que podem estar diretamente relacionada com a ativação da expressão de MMPs é a via das MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitogênio). As quinases da família MAPK estão envolvidas nos processos de sinalização que regulam as MMPs, incluindo a *MMP9*, que por sua vez regulam negativamente a fosforilação de quinases que compõem as MAPKs, diminuindo assim, o processo metastático de células cancerígenas (IDIIATULLINA; AL-AZAB; WALANA; PAVLOV; LIU, 2021).

As proteínas MAPKs pertencem à família serina-treonina quinase. A via de sinalização MAPK está envolvida principalmente na proliferação celular desde a superfície da célula até o núcleo. As vias de sinalização MAPK são estimuladas em resposta a gatilhos externos, como fatores de crescimento, mitógenos, citocinas e estresse. As MAPKs afetam a proliferação celular, diferenciação, apoptose, inflamação e metabolismo, invasão e metástase, desempenhando assim, um papel crucial em muitas doenças humanas, incluindo o câncer. A via de sinalização MAPK é ativada em muitos tumores, e seus vários componentes foram identificados como oncogenes (WANG; FENG; TANG, 2022).

A função biológica da via de transdução de sinal MAPK ocorre mediante a fosforilação contínua de MAPKKK, MAPKK e MAPK. Após a ativação da MAPK, a translocação para o núcleo pode fosforilar alguns fatores de transcrição, e essa fosforilação inicia a transcrição e tradução de genes de resposta primária e secundária, regulando a atividade de algumas proteínas quinases. A inativação da MAPK é causada pela fosforilação da treonina e da tirosina por um grupo de proteínas quinases bispectrais (MKPs), retornando-a ao seu estado inicial (FAN; WANG; LIU; WANG; LI, 2022). Nesse cenário, três grupos principais de MAPKs foram identificados: as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), Jun N-terminal quinase (JNK) e as diferentes isoformas de p38 (α , β , γ , δ) (FENG *et al.*, 2022).

A resposta das células à estimulação mitogênica ou oncogênica resulta na ativação de várias vias de sinalização, incluindo principalmente a via ERK. Uma das particularidades dessas estimulações é a translocação nuclear rápida e robusta dos componentes MAPK de cada uma das vias. Isso é fundamental para a ativação de fatores de transcrição e

modificadores da cromatina e, consequentemente, para a regulação de processos celulares. Dessa maneira, uma vez que a translocação nuclear é um regulador primordial da cascata de sinalização de ERK, a desregulação da translocação e o acúmulo de ERK ativo ou de outros componentes da via de sinalização no núcleo desempenham um papel crucial em patologias como o câncer (MAIK-RACHLINE; HACHOEN-LEV-RAN; SEGER, 2019).

Outra via de sinalização muito importante no estudo do câncer é a p38. A via p38 (MAPK) desempenha um papel fundamental na regulação da progressão do ciclo celular em diferentes pontos por mecanismos que podem depender da maquinaria de transcrição. Além disso, pode modular programas celulares antagônicos para sobrevivência celular, diferenciação ou indução de morte celular, resultando em efeitos significativos na progressão de vários tipos de câncer. Também, essas enzimas regulam a atividade e a expressão de alguns mediadores inflamatórios, como diferentes proteases e citocinas, que contribuem para o desenvolvimento e progressão do câncer. Em suma, os diferentes efeitos da ativação e regulação da via p38 podem depender de diferenças no tipo celular, juntamente com a duração, qualidade e intensidade do estímulo e da sua comunicação e interação com outras vias de sinalização (GARCÍA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021).

A via MAPK pode ser acionada ou acionar vários mediadores inflamatórios e citocinas. As citocinas são uma família diversificada de proteínas de baixo peso molecular implicadas na mediação da comunicação entre as células. Essas proteínas exibem papéis diversos e complexos na imunidade, defesa, inflamação e imunobiologia do tumor, agindo por meio de mecanismos autócrinos, parácrinos e/ou endócrinos. As citocinas abrangem interleucinas, interferons, quimiocinas, bem como fatores de necrose tumoral, e são produzidos como proteínas secretadas ou ligadas à membrana. As citocinas provocam seus efeitos interagindo de forma redundante e exibindo semelhanças funcionais, e se comunicam com membros de uma família de receptores de citocinas que inclui receptores tipo I, tipo II, superfamília de imunoglobulinas, TNF, proteína G acoplada (quimiocina), TGF β e IL-17. Após a ligação a receptores nas células-alvo, as citocinas ativam uma sequência de proteínas a jusante que resulta na alteração dos padrões de expressão gênica e na indução de respostas nas células-alvo (ADEKOYA; RICHARDSON, 2020).

Citocinas pró-inflamatórias estão envolvidos em uma ampla gama de funções na inflamação, resposta imune, microambiente tumoral e homeostase. As citocinas IL-8, IL-1 β e IFN- γ são mediadores inflamatórios de grande relevância, e estão intrinsecamente associados a inflamação e câncer. Em específico as citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-1 β são

mediadores da resposta de fase aguda, frequentemente associada à indução de uma situação de estresse oxidativo. Suas funções multifatoriais foram descritas em vários sistemas de órgãos e doenças. A secreção dessas citocinas pró-inflamatórias no sangue está associada a uma resposta imune que pode ser observada em alguns pacientes com câncer de cabeça e pescoço antes do início do tratamento. Pacientes com os níveis mais altos de citocinas pró-inflamatórias foram relatados como tendo o pior prognóstico (ASTRADSSON *et al.*, 2019).

A interleucina-8 (IL-8) é um fator quimiotático que desempenha um papel fundamental nos processos inflamatórios e de angiogênese e têm importantes funções imunológicas. A expressão aumentada de IL-8 foi detectada em células e tecidos cancerígenos e no sangue periférico de pacientes com câncer. IL-8 é responsável pelo crescimento e proliferação de células tumorais e está associado com a agressividade do carcinoma escamoso oral. Já a interleucina-1 β (IL-1 β) atua como mediadora da resposta imune, e também é conhecida por suas propriedades pirogênicas e por sua capacidade de ativar linfócitos. Sua produção é mediada por um complexo de inflamassoma e desempenha um papel importante na ativação de várias cascatas de sinalização intracelular. A secreção de IL-1 β promove inúmeros efeitos metabólicos, fisiológicos e inflamatórios, e um excesso dessa citocina pode produzir dano tecidual associado a múltiplas doenças inflamatórias e autoimunes. As concentrações de IL-1 β em amostras de saliva são marcadamente mais altas em pacientes com carcinoma espinocelular oral, do que em pacientes saudáveis, e sua expressão elevada, também é encontrada em tecido neoplásico de pacientes, principalmente nos estágios iniciais, indicando o potencial valor diagnóstico desse biomarcador (MANZANO-MORENO *et al.*, 2021).

No que se refere a citocina interferon-gama (IFN- γ), é um mediador secretado por células T ativadas e por células natural killer. Essa citocina tem uma variedade de efeitos imunomoduladores em uma variedade de células. Os interferons pró-inflamatórios desempenham papéis essenciais no desenvolvimento de doenças autoimunes, pela ativação de macrófagos. Existem relatos sobre o papel do IFN- γ na patogênese da doença autoimune e seu impacto nas comorbidades associadas e efeitos colaterais de intervenções terapêuticas na ausência ou presença de câncer. Estudos relatam que durante o crescimento e disseminação de tumores, citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IFN- γ e TNF- α induzem quimiocinas que atraem neutrófilos, que são fatores-chave na geração de espécies reativas de oxigênio e carcinogênese. Além disso, as citocinas pró-inflamatórias induzem moléculas de adesão e metaloproteinases que permitem mecanismos específicos para a invasão tumoral. Dessa

forma, o controle e a regulação de respostas pró-inflamatórias excessivas precisam ser promovidas, caso contrário, podem resultar em estados patológicos relacionados à expressão aberrante de mediadores imunológicos (LIU *et al.*, 2021).

Considerando a relação do processo inflamatório na indução do câncer, associado com as vias e moléculas que regulam essa inflamação, o estudo de produtos naturais como a piperina se faz de grande importância para melhor compreensão da sua ação na biologia do câncer de cabeça e pescoço e também na saúde humana. Assim, a hipótese desse estudo é que a piperina, devido ao seu efeito antitumoral, atue inibindo eventos moleculares e vias de sinalização associadas ao processo inflamatório e por consequência, impeça estágios de desenvolvimento das células cancerígenas de cabeça e pescoço. Assim, ao desvendar os seus diversos mecanismos e potencial terapêutico, pretendemos demonstrar o papel promissor da piperina no tratamento do câncer.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação da piperina nas vias de sinalizações celulares e moleculares relacionadas ao processo tumorigênico/inflamatório em células de câncer de cabeça e pescoço.

2.1 Objetivos específicos

Analisar nas linhagens tumorigênicas de cabeça e pescoço (HEp-2 e SCC-25) tratadas com piperina os seguintes aspectos:

- 1) morfologia celular;
- 2) proliferação celular;
- 3) viabilidade e citotoxicidade celular;
- 4) invasão celular;
- 5) formação de colônias celulares;
- 6) apoptose e ciclo celular;
- 7) genotoxicidade;
- 8) níveis de expressão das citocinas IL-1 β , IL-8 e IFN- γ ;
- 9) expressão dos genes *PTGS2*, *PTGER4*, *MMP2* e *MMP9*;
- 10) expressão das proteínas PTGS2, MMP2, ERK e p38 MAPK.

3. RESULTADOS

3. CAPÍTULO 1

3.1 Molecular aspects of piperine in signaling pathways associated with inflammation in head and neck cancer

Juliana Prado Gusson-Zanetoni^a, Luana Pereira Cardoso ^a, Stefanie Oliveira de Sousa^a, Laura Luciana de Melo Moreira Silva^a, Tiago Henrique^b, Sonia Maria Oliani^a, Flávia Cristina Rodrigues-Lisoni^a.

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

^b School of Medicine of São José do Rio Preto (FAMERP), Department of Molecular Biology, São José do Rio Preto, Brazil.

Article submitted to the journal Phytomedicine, Impact factor: 7.9. Qualis A1

Citations: Gusson-Zanetoni, J.P., Cardoso, L.P., Sousa, S.O., Silva, L.L.M.M., Henrique, T., Oliani, S.M., Rodrigues-Lisoni, F.C. Molecular aspects of piperine in signaling pathways associated with inflammation in head and neck cancer. Phytomedicine 2024.

* Correspondence: flavia.lisoni@unesp.br ; Tel: (+55 017 3221-2407)

ABSTRACT

Background: Piperine, an active plant alkaloid from black pepper (*Piper nigrum*), has several pharmacological effects: antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory. Piperine's multifaceted role involves inhibiting molecular events and signaling pathways associated with various stages of cancer development. Consequently, there is great interest in the application of piperine as an alternative therapy in the treatment of head and neck cancer.

Purpose: The aim of this study was to investigate the molecular mechanisms of action of piperine in relation to its potential anticancer effect on head and neck cancer cells.

Methods: Parameters related to neoplastic potential including proliferation, cytotoxicity, migration, apoptosis, cell cycle, clonogenicity, genotoxicity were verified in the head and neck cancer lines (HEp-2 and SCC-25) treated with piperine. In addition, analysis of the

cytokines IL-1 β , IL-8 and IFN- γ (by ELISA), the proteins PTGS2, MMP2 (by Western blotting), ERK and p38 (by immunocytochemistry) and the genes *PTGS2*, *PTGER4*, *MMP2* and *MMP9* (by PCRq) were investigated to understand how piperine modulates these inflammatory pathways.

Results: The results of the tests indicated that piperine modified morphology, inhibited growth/viability and the formation of cell colonies. Piperine promoted genotoxicity by triggering apoptosis and cell cycle arrest in G2/M and S. A decrease in cell migration was also observed, probably due to a significant decrease in the expression of *MMP2/9* genes. Piperine also reduced the expression of inflammation-related molecules such as PTGS2 and PTGER4, regulated the secretion of pro-inflammatory cytokines (IFN- γ and IL-8) and modulated the expression of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) ERK and p38.

Conclusion: These results suggest that piperine exerts anticancer effects on head and neck tumor cells, and could be a promising natural treatment by regulating signaling pathways associated with head and neck cancer.

Key words: Inflammation, Herbal medicine, PTGS2, MAPK, MMPs, Cytokines.

Abbreviations: DMSO, Dimethylsulfoxide; IC₅₀, 50% inhibitory concentration; PBS, Phosphate buffer solution; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *MMP2*, Metalloproteinase 2; *MMP9*, Metalloproteinase 9; MTS, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboximethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium); *PTGS2*, Cyclooxygenase 2; ROS, Reactive oxygen species.

Introduction

Cancer is promoted by genomic instability that affects cell growth, metabolism and inflammation, and this has been associated with higher rates of recurrence and mortality in head and neck cancer (HNC) (MOODY *et al.*, 2020). These tumors are malignant and develop in the facial, oral and neck regions, affecting the upper aerodigestive tract, salivary glands and thyroid. This type of cancer ranks sixth among the most common cancers worldwide, and is associated with high mortality due to intervening in vital life functions such as phonation, swallowing, breathing, taste and smell (ABRAHAM; MCHELE; KAHINGA,

2023).

Each year, 450,000 global deaths are associated with HNC, and it is considered a clinically heterogeneous disease that involves different risk factors and molecular pathogenesis. In addition to the two major risk factors, tobacco and alcohol consumption, oncogenic viruses, the human papillomavirus (HPV), the microbiome and diet have also been established in recent decades as contributing sources for the development of this disease (MIRANDA-GALVIS *et al.*, 2021). Treatment for patients with HNC depends on the site of origin of the tumor, and generally includes surgical resection, radiotherapy, chemotherapy, molecular therapy, immunotherapy and the use of natural products as an adjuvant modality (ZHANG *et al.*, 2022).

Several natural products affect various oncogenic signaling pathways simultaneously, modulating the activity or expression of their molecular targets. These include cell death by apoptosis, proliferation, migration/invasion and angiogenesis. Thus, natural products are capable of generating intracellular signals that trigger events leading to the death of cancer cells. One of the most important sources of biologically active compounds is the plant kingdom, so there is a large list of phytochemicals (chemical compounds produced by plants) with therapeutic activity, including terpenes, alkaloids, essential oils, flavonoids and primary and secondary metabolites (NAEEM *et al.*, 2022). Among these phytochemicals we can mention piperine (1-piperoylpiperidine), which is an alkaloid derived from plants of the Piperaceae family, which can be isolated mainly from the fruits or roots of black pepper (*Piper nigrum*) and long pepper (*Piper longum*) (DIEHL; HILDEBRANDT; MANDA, 2022).

The attention given to the study of this molecule is mainly due to its biological properties, such as: anti-inflammatory, antioxidant, immunomodulatory and anticancer, properties which allow this compound to chemically interact with various molecular targets. Specifically, in relation to piperine's anticancer activity, recent observations have shown that its mechanism of action is multiple and involves the activation of cell signaling pathways, such as cell proliferation, programmed cell death, decreased migration and invasion of cancer cells (RAMOS *et al.*, 2023).

In this context, studies indicate that piperine can modulate various molecular targets, such as: receptors and enzymes (prostaglandin E2 receptors, cyclooxygenase 2 and matrix metalloproteinases MMPs), kinases (including the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, ERK1/2 and p38), inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-8 and IF- γ), inflammatory mediators such as JNK, AP-1 (activator protein 1), iNOS (nitric oxide synthase)

and gene expression modulators (miRNAs) (TUDOR *et al.* , 2020; TRIPATHI; RAY; MISHA, 2022; BENAYAD *et al.*, 2023).

However, the anticancer effect of piperine on head and neck carcinoma has yet to be elucidated. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of piperine on the signaling pathways that modulate the molecular mechanisms of cancer-associated inflammation, which could be used as a therapeutic alternative in this type of cancer.

Materials and Methods

Cell lines and treatment with piperine

The HEp-2 cell line (laryngeal squamous cell carcinoma) was seeded in MEM-Earle medium and the SCC-25 cell line (tongue squamous cell carcinoma) in DMEM-HAM-F12 (Cultilab), both supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab), 1% antibiotic/antimycotic (Invitrogen), 1% L-glutamine 200 μ M, 1% non-essential amino acids 10mM and 1% sodium pyruvate 100 mM (Sigma Aldrich), cultivated under standard conditions (37°C, 5% CO₂), and sourced from the American cell line bank (ATCC). For initial experiments, piperine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, P49007) was used for the cells at concentrations of 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 250 μ M, 300 μ M, diluted in 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO-Sigma, D8418 - negative control), at times of 4, 24, 48 and 72 hours. After being considered functional for the cells, without presenting a high degree of cytotoxicity, only one concentration (150 μ M) and one incubation time (24 hours) of piperine treatments were chosen. All tests were carried out in triplicates and in three individual experiments.

Cell proliferation, viability/cytotoxicity assay

HEp-2 and SCC-25 cells were evaluated by the growth curve, in 24-well culture plates, density 5×10^4 , in 500 μ L of complete medium. The concentrations of each treatment used were 100, 200 and 300 μ M at 4, 24, 48 and 72 hours. Subsequently, the cells were trypsinized, stained with Trypan Blue and counted in the automated cell counter (Countess Automated Cell Counter II, Life Technologies). The viability of the tumor cells was assessed using the MTS reagent (PROMEGA, USA). The cells (5×10^3) were seeded in a 96-well plate. Different concentrations of piperine were prepared (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 250 μ M, 300 μ M). Each experimental condition received 20 μ l of MTS solution (Promega). The optical

density was measured at 490 nm in a microplate reader (BioRad, Hercules, CA, USA) at 4, 24, 48 and 72 hours. The IC₅₀ was defined as the concentration of the sample that reduced the absorbance by 50% compared to the control, using the function in the GraphPad Prism 8.0.1 software. For cell viability, two-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's test were applied.

Transwell Invasion Assay

The invasion test on HEP-2 and SCC-25 cells was carried out in 24-well transwell chambers containing polycarbonate filters with 8 µm pores (BD Biosciences San Jose, CA, USA). After the experimental conditions had elapsed, the cells were trypsinized and counted in order to insert them into the inserts. Around 5×10^4 cells were added to the upper chamber of the inserts along with 200 µL of serum-free medium, and 750 µL of complete medium containing 10% serum was added to the lower compartment. The cells were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24 hours and then fixed in 4% paraformaldehyde for 30 minutes. They were then stained in 0.1% crystal violet for 15 minutes. After this period, the crystal violet on the surface was removed with cotton buds and the cells that had crossed the membrane were counted and photographed under a microscope (100x magnification). The experiment was repeated three times and five images were taken for each sample. The numbers of cells that crossed the membrane were counted for statistical analysis using the t-test.

Clonogenic assay

The cells (8×10^2) were seeded in 6-well plates and incubated under the experimental conditions (DMSO control and piperine at a concentration of 150 µM). After 24 hours the medium was changed and the treatment added, and every two days this condition was renewed over a period of 14 days. The cells (colonies) were then fixed with methanol, stained with crystal violet and counted by visual inspection, and the results were analyzed using the t-test.

Determination of apoptosis and cellular DNA content

Cells (1×10^6) after treatment with piperine were analyzed by flow cytometry (Guava Easy Cyte, MILLIPORE), and incubated with fluorochrome-conjugated ANXA5 monoclonal antibody (PE, BD Pharmingen, San Diego, USA) and with 7-ADD. Cell cycle arrest was assessed using the Guava® Cell Cycle Reagent kit (MILLIPORE, USA), using the protocol

proposed by the manufacturer. Tumor cells (1×10^6) were washed with PBS and fixed in 70% ethanol and resuspended in the Cell Cycle kit solution, and evaluated by flow cytometer (Guava Easy Cyte, MILLIPORE).

Genotoxicity test (Alkaline Comet)

Cell sediments (5×10^4) were mixed with low melting point agarose and placed on slides containing a mixture of PBS and normal melting point agarose. These slides were subjected to the lysis step and electrophoresed. The slides were then neutralized and fixed in 100% ethyl alcohol. The slides were stained with a solution of Gel Red 10000x, 1M NaCl and distilled water, and analyzed under a fluorescence microscope. The cell nuclei (100 cells per group) were classified into a damage class (0 to 4) and subjected to a formula to determine the total damage index. The statistics were based on the Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance, and the means were compared using the Mann-Whitney test.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The expression patterns for each cytokine/chemokine tested (IL-1 β , IL-8 and IFN- γ) were analyzed according to the manufacturer BD Biosciences. The supernatant of the cells was collected from each experimental group, and then the analyses were read on a spectrophotometer at a wavelength of 450 nm. The data was plotted and analyzed using the t-test.

Immunocytochemistry analysis

The cells were cultured at a concentration of 1×10^5 on culture slides (Nunc, Naperville, IL, USA) and fixed (4% paraformaldehyde), permeabilized in Triton X, washed with PBS-T and subjected to blocking (PBS+Normal goat serum +BSA). Immunolabeling was done with primary mouse monoclonal antibodies (Ab) anti-p38/MAPK (BD Bioscience, USA) and anti-ERKpan (BD Biosciences, USA) diluted 1:200, and secondary goat anti-mouse IgG antibody conjugated to Alexa Fluor 546 (Dako, Glostrup, Denmark), for about 1 hour. The slides were then mounted (DAPI) for analysis under an Axioskop 2 fluorescence microscope (Zeiss, GR). Ten digital images of each replicate were captured using AxioVision software (Zeiss, GR), where six cells from each image were evaluated by densitometry obtained using image J. Statistical analysis was performed using the t-test.

RNA isolation, target genes and real-time PCR analysis

Initially, total RNA was extracted using Trizol, followed by reverse transcription in cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA), as described by the manufacturer. The reaction for the *PTGS2*, *PTGER4*, *MMP2* and *MMP9* genes was carried out in a 7500 Fast Real-Time PCR System thermal cycler (Applied Biosystems), prepared in triplicate and processed in a final volume of 20uL containing 50 ng of cDNA, SYBR® Green PCR Master Mix and 100nM of each primer, according to the Applied Biosystems protocol. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used for relative quantification of gene expression, with the levels of the GAPDH gene used as internal controls. The primers used were: *PTGS2* (f: 5'ATTCCCTTCCTTCGAAATGC3'; r: 5'AGAAGGCTTCCCAGCTTTTG3'); *PTGER4* (f: 5' CGAGATCCAGATGGTCATCTTAC 3'; r: 5' CCAAACCTTGGCTGATATAACTGG 3'); *MMP2* (f: 5' AAGTCTGGAGCGATGTGACC 3'; r: 5' CCGTCAAAGGGGTATCCATC 3'); *MPP9* (f: 5' TTGTGCTCTTCCCTGGAGAC 3'; r: 5' ATTCGACTCTCCACGCATC 3') e *GAPDH* (f: 5' CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT 3', r: 5' ACCCACTCCTCCACCTTTGA 3').

Expression of protein levels (Western Blotting)

Protein concentrations were quantified using the BCA protein assay kit (Termo Scientific, Wilmington, DE, USA). The expression of PTGS2 (1:500 Abcam, Cambridge, UK) and MMP2 (1:500 ABclonal, Woburn, USA) were examined, and equal amounts of proteins (30µg) were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (Bio-Rad, Hercules, Usa), and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% powdered milk diluted in TBS-T and incubated with the specific primary and secondary antibodies (anti-rabbit IgG - 1:1000 Abcam, Cambridge, UK). The endogenous control beta-actin was simultaneously detected in the reaction by the mouse monoclonal anti-igG antibody (Abcam, Cambridge, MA, USA) at a concentration of 1:2000. The protein expression levels obtained were calculated and presented as the mean $\pm$ SEM of the mean optical density and subjected to the t-test.

Results

Piperine in high concentrations modifies morphology, reduces viability and causes cytotoxicity in head and neck cancer cell lines

Cell morphology changes were observed in HEP-2 and SCC-25 cells after treatment with piperine. Photomicrographs of the control groups showed morphology typical of HEP-2 and SCC-25 cells (Fig. 1A, C), while the shape of the cells treated with piperine showed changes such as: shrinkage and decreased cell-to-cell contact (Fig. 1B), and the formation of clusters, detachment from the surface and decreased cell density, respectively (Fig. 1D).

With regard to cell viability analysis, it was evident in HEP-2 cells (Fig. 1E) that treatment with piperine at concentrations of 150, 200, 250 and 300 μM decreased viability at 24, 48 and 72 hours. For SCC-25 cells, a reduction in cell viability was observed at 48 hours, specifically at concentrations of 100, 150, 200 and 250 μM of piperine, while at the other times of 4, 24 and 72 hours piperine did not reduce the viability of these cells when compared to the DMSO control group (Fig. 1F).

As for cytotoxicity, the IC_{50} of piperine varied according to the exposure time of the compound in the cells studied, with the HEP-2 cell (102.8 to 176.0 μM) and the SCC-25 (121.0 to 249.9 μM), as shown in Figure 8 in the supporting material. Together, the proliferation and viability/cytotoxicity tests revealed that the effective concentration and treatment time of the compound in the cells was 150 μM in 24 hours of action, since at higher concentrations piperine is considered highly toxic to cells.

Piperine has an antiproliferative and cytostatic effect on head and neck cancer cell lines

The results showed that in comparison with untreated cells, piperine inhibited the growth of HEP-2 and SCC-25 cells, with the concentrations of 200 and 300 μM showing the greatest effect after 24 hours of treatment in the two cell lines evaluated (Fig. 2A). In relation to the colony formation assay of HEP-2 and SCC-25 cells, it was observed that piperine decreased the ability to multiply the growth of cell colonies and also the potential related to the number of cells per colony, when compared to the DMSO control group (Fig. 2B).

Piperine induces head and neck tumorigenic cells to apoptosis and cell cycle arrest through genotoxicity

Our results indicated that piperine induced significant apoptosis in both cell lines studied. Treatment of HEP-2 and SCC-25 cells with piperine resulted in approximately 26.5% and 22% of early and late apoptosis, respectively (Fig. 3A).

With regard to verifying cell cycle arrest, the results showed that piperine caused a significant accumulation of cells in the G2/M phase in the HEP-2 lineage, and in parallel there

was a decrease in these cells in the G0/G1 and S phases. For the SCC-25 cells, this retention mechanism occurred in the S phase of the cycle, thus promoting cell DNA synthesis (Fig. 3B).

Figure 4 shows the migration of fragmented DNA caused by treatment with piperine. The average damage index of the control groups of HEp-2 and SCC-25 cells was 62.3 and 78.6 respectively, and after treatment with piperine this damage jumped to 137.3 and 159, thus showing that the treatment generated genotoxicity for the cells analyzed.

Piperine decreases cell invasion by reducing the expression of metastasis-related genes in head and neck cancer cells

Our findings indicate that piperine decreases the invasion capacity of HEp-2 and SCC-25 cells (Fig. 5A), which suggests piperine's anti-invasive activity in head and neck carcinoma cells. The HEp-2 cells in the control group had an average migration rate of 70.3, and in the group of cells treated with piperine, this figure was 12.3. For the SCC-25 lineage, piperine also reduced this migratory mechanism, as the group of treated cells had numerical indications of 10.3, while in the control group, this average was 24.6.

In view of piperine's action against cell invasion, we sought molecular proof of the expression of genes related to metastasis. The genes analyzed were *MMP2* and *MMP9* using the PCRq technique in the HEp-2 and SCC-25 cell lines (Fig. 5B). Treatment with piperine in HEp-2 cells significantly decreased the expression of the *MMP2* and *MMP9* genes. However, for the SCC-25 strain, the significant decrease only occurred for the *MMP2* gene, and the *MMP9* gene was not differentially expressed in this strain. We also checked the expression of the *MMP2* protein in HEp-2 and SCC-25 cells (Fig. 5C) and the results showed no statistically significant difference in the expression of this protein in the two strains evaluated. We only observed a downward trend in *MMP2* protein expression for the SCC-25 cell. In this respect, piperine did not modulate this enzyme at the gene translation level.

Piperine regulates the expression of genes, cytokines and proteins associated with inflammation

The inflammatory response of the cells was evaluated according to the expression levels of *PTGS2* and *PTGER4* after treatment with piperine (Fig. 6A). Piperine reduced the expression levels of *PTGS2* and *PTGER4* in HEp-2 cells. For the SCC-25 strain, *PTGS2* expression was also reduced, while the *PTGER4* gene was not modulated and was not

differentially expressed.

The concentrations of the cytokines IL-8, IL-1 β , IFN- γ released in the culture supernatants were measured by ELISA. The release of IL-8 and IFN- γ was considerably decreased in response to piperine treatment compared to cells from the DMSO control group in the HEp-2 strain (Fig. 6B). However, treatment with piperine did not significantly alter IL-1 β expression compared to control cells in this cell type. For SCC-25 cells, the secretion of the cytokines IL-8, IL-1 β , IFN- γ was significantly reduced after treatment with piperine when compared to untreated cells.

In addition, the protein activity of PTGS was observed; our results indicated a significant decrease in the expression of this protein after treatment with piperine in the SCC-25 strain, and in HEp-2 cells no significant results were found for the expression of this enzyme (Fig. 6C).

Piperine modulates the expression of the ERK/p38 MAPK pathway in head and neck cancer cells

To better determine piperine's anti-inflammatory mechanism, MAPKs (ERK and p38) were examined in HEp-2 and SCC-25 cells. The results showed that piperine inhibited the expression of ERK and p38, indicating a significant reduction in these proteins compared to the control group. It is important to note that the inhibition of ERK and p38 expression occurred at the cytoplasmic level in both strains evaluated (Fig. 7).

Discussion

The identification of new anticancer therapeutic agents is a fundamental issue for the study and development of drugs aimed at treating this disease. Among these agents, we can highlight piperine, an alkaloid derived from *Piper nigrum*, which has anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects (TURRINI; SESTILI; FIMOGNARI, 2020). One of the main biological characteristics involving inflammatory/carcinogenic processes is the capacity for increased cell proliferation. In the present study, the antiproliferative action of piperine was verified, including inhibiting the multiplication of colonies (cytostatic effect) in the cells studied. Other *in vitro* studies have also shown this antiproliferative effect of piperine in colon, lung, breast and hepatocellular adenocarcinoma cell lines, as a result of inducing cell

cycle arrest in the G1 phase and regulating the expression of p21/WAF1 and p27/KIP1 (YAFFE *et al.*, 2014; FONSECA *et al.*, 2020).

Cell viability and cytotoxicity are other important indicators in the *in vitro* toxicological evaluation of a given compound (WANG *et al.*, 2022). Our analyzes indicated that piperine decreases cell viability upon application of the treatment, and it was even pointed out that the main biological effects of piperine *in vitro* occur at specific doses (75-200 μ M) and incubation time between 24 and 48 hours (ZADOROZHNA; TATARANNI; MANGIERI, 2019). This cytotoxicity effect is described as piperine promoting inhibition of NADH-oxidoreductase, an enzyme that stimulates cell activity and proliferation, as well as disruption of mitochondrial membrane permeability (DIAS *et al.*, 2021).

Piperine also induced apoptosis and cell cycle arrest in the G2/M and S phases in the cells studied. These mechanisms have also been described in several studies, such as in DU145 prostate cancer lines and SNU-16 and GES-1 gastric cancer lines, probably due to a decrease in the expression of anti-apoptotic proteins (Bcl-2 and Bcl-xl), which initiate caspase signaling that is responsible for the destruction of cell structure and consequent apoptotic death. Therefore, the induction of apoptosis, as well as the arrest of the cell cycle, are the main mechanisms of studies related to the discovery of compounds with possible activities against cancer (CHEN *et al.*, 2020; JEONG *et al.*, 2020).

Furthermore, many chemotherapeutic drugs are genotoxic agents and induce apoptosis, due to the generation of DNA damage, as does piperine in high concentrations (FERREIRA *et al.*, 2020). The antioxidant capacity of tumor cells can be deregulated by an increase in reactive oxygen species (ROS). Alkaloids, such as piperine, with pH-dependent ionizable groups, can bind and interact with DNA, and this interaction generates breaks in the DNA chain, compromising the integrity of genetic information (GRINEVICIUS *et al.*, 2016). So, in our study, we analyzed the damage index generated by the treatment, and thus confirmed that piperine caused DNA fragmentation in the cells studied.

In addition to the antiproliferative and genotoxic activity of piperine, the anti-metastatic effect is another efficiency observed in some studies with this herbal medicine. This action of piperine is seen in triple negative breast cancer cells (MDA-MB-468, T-47D and MCF-7) and colorectal cancer cells (SW480 and HCT-116), by decreasing the mRNA expression of metalloproteinase 2 and 9 (GREENSHIELDS *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2020). In our experiments, we found that this invasive mechanism in HEp-2 and SCC-25 cells was significantly inhibited after treatment with piperine, probably suggested by the discovery of

the modulation of MMP2 and MMP9 mRNA expression in these cells.

In order to better understand the mechanisms of cancer progression, some mediators (PTGS2 and PTGER4) that help cells to grow constantly have been verified, as it is known that arachidonic acid derivatives participate in inflammation and are also closely linked to tumor development, with PTGS2 being highly expressed in hyperplastic tissues (OZKAN; BAKAR-ATES, 2020). Our results on gene expression indicate that piperine significantly reduced *PTGS2* levels in the cells studied. The significant decrease in *PTGER4* expression occurred in the HEP-2 lineage, and this result was not observed in the SCC-25 cells. In terms of protein expression, our findings showed that the treatment reduced PTGS2 in both cells studied, indicating that piperine modulates gene and protein expression in our cancer model. Thus, our data corroborate the results of Kim and collaborators (2012), who also found a marked decrease in the expression levels of PTGS2 genes and proteins in mouse macrophage cells after treatment with piperine.

Among the main mediators of inflammation are cytokines and proteins belonging to the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family. Interfering with chronic inflammation means interfering with the function of these mediators and the signal transduction dependent on these molecules (FLOEGE *et al.*, 2012). In this respect, the secretion of the cytokines studied IL-8, IL-1 β , IFN- γ , and the expression of MAPKs (ERK and p38) were reduced following treatment with piperine, thus indicating a further mediating effect of this compound on HEP-2 and SCC-25 cells. Thus, our data corroborates other results from our research group, in which a decrease in cytokine levels (IL-8, IL-1 β) and ERK and p38 was also observed in HeLa, SiHa and CaSki cervical cancer cells after treatment with piperine (CARDOSO *et al.*, 2023). Other studies also mention this action of piperine in decreasing of ERK and p38 in breast cancer cells (ZHAI *et al.*, 2016), in addition, Western blot results confirmed that piperine decreased the expression of JNK and p38 in human ovarian cancer cells (WOJTOWICZ *et al.*, 2021).

Thus, piperine exerts its effects by modulating inflammation-mediating molecules such as genes, cytokines and proteins (MAPK, MMPs, PTGS2) via cyclooxygenase 2. In addition, this study provides a new understanding of the role of piperine in molecular events and signaling pathways that are directly related to the development of head and neck cancer.

Considering the use of piperine as an adjuvant product for the treatment of inflammation and tumorigenesis, it would be preferable for this compound to also be studied in animal models, in order to verify its action at a systemic level. Thus, our study has some

limitations, such as the lack of experiments with non-tumor cells, as we had great difficulty finding a lineage of the same histological type as the cancer cells. Given the above considerations, we suggest that further research be carried out to elucidate the effects of piperine as a natural and integrative treatment for patients with head and neck cancer.

Conclusion

Piperine exhibits strong anticancer activity due to its anti-inflammatory and antiproliferative properties, and could be a prospective and integrative therapeutic option for patients with head and neck cancer.

References

- Abraham, Z.S., Mchele, K., Kahinga, A.A., 2023. Awareness of head and neck cancer among patients attended at a regional referral hospital in Tanzania. *BMC public health*, 23, 1544. <https://doi.org/10.1186/s12889-023-16333-z>.
- Benayad, S., Wahnou, H., El Kebbjaj, R., Liagre, B., Sol, V., Oudghiri, M., Saad, E.M., Duval, R.E., Limami, Y., 2023. The Promise of Piperine in Cancer Chemoprevention. *Cancers*. 15, 5488. <https://doi.org/10.3390/cancers15225488>.
- Cardoso, L.P., de Sousa, S.O., Gusson-Zanetoni, J.P., de Melo Moreira Silva, L.L., Frigieri, B.M., Henrique, T., Tajara, E.H., Oliani, S.M., Rodrigues-Lisoni, F.C., 2023. Piperine Reduces Neoplastic Progression in Cervical Cancer Cells by Downregulating the Cyclooxygenase 2 Pathway. *Pharmaceuticals*. 16, 103. <https://doi.org/10.3390/ph16010103>.
- Chen, S.M.Y., Krinsky, A.L., Woolaver, R.A., Wang, X., Chen, Z., Wang, J.H., 2020. Tumor immune microenvironment in head and neck cancers. *Molecular carcinogenesis*. 59, 766–774. <https://doi.org/10.1002/mc.23162>.
- Diehl, S., Hildebrandt, G., Manda, K., 2022. Pepper Alkaloid Piperine Increases Radiation Sensitivity of Cancer Cells from Glioblastoma and Hypopharynx In Vitro. *International journal of molecular sciences*. 23, 8548. <https://doi.org/10.3390/ijms23158548>.
- Ferreira, R.C., Batista, T.M., Duarte, S.S., Silva, D.K.F., Lisboa, T.M.H., Cavalcanti, R.F.P., Leite, F.C., Manguera, V.M., Sousa, T.K.G., Abrantes, R.A., Trindade, E.O.D., Athayde-Filho, P.F., Brandão, M.C.R., Medeiros, K.C.P., Farias, D.F., Sobral, M.V., 2020. A novel piperine analogue exerts in vivo antitumor effect by inducing oxidative, antiangiogenic and immunomodulatory actions. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 128, 110247. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110247>.

Floege, J., Lüscher, B., Müller-Newen, G., 2012. Cytokines and inflammation. *European journal of cell biology*. 91, 6-7, 427. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.01.003>.

Greenshields, A.L., Doucette, C.D., Sutton, K.M., Madera, L., Annan, H., Yaffe, P.B., Knickle, A.F., Dong, Z., Hoskin, D.W., 2015. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. *Cancer letters*. 357, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.017>.

Grinevicius, V.M.A.S., Kviecinski, M.R., Mota, N.S.R.S., Ourique, F., Castro, L.S.E.P.W., Andregueti, R.R., Correia, J.F.G., Wilhem Filho, D., Pich, C.T., Pedrosa, R.C., 2016. Piper nigrum ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. *Journal Of Ethnopharmacology*, 189, 139-147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.020>.

Jeong, S., Jung, S., Park, G.S., Shin, J., Oh, J.W., 2020. Piperine synergistically enhances the effect of temozolomide against temozolomide-resistant human glioma cell lines. *Bioengineered*. 11, 791–800. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1794100>.

Kim, H.G., Han, E.H., Jang, W.S., Choi, J.H., Khanal, T., Park, B.H., Tran, T.P., Chung, Y.C., Jeong, H.G., 2012. Piperine inhibits PMA-induced cyclooxygenase-2 expression through downregulating NF- κ B, C/EBP and AP-1 signaling pathways in murine macrophages. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 50, 2342–2348. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.024>.

Marques da Fonseca, L., Jacques da Silva, L.R., Santos Dos Reis, J., Rodrigues da Costa Santos, M.A., de Sousa Chaves, V., Monteiro da Costa, K., Sa-Diniz, J.N., Freire de Lima, C.G., Morrot, A., Nunes Franklin, T., de Alcântara-Pinto, D.C., Freire de Lima, M.E., Previato, J.O., Mendonça-Previato, L., Freire-de-Lima, L., 2020. Piperine Inhibits TGF- β Signaling Pathways and Disrupts EMT-Related Events in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Medicines*. 7, 19. <https://doi.org/10.3390/medicines7040019>.

Miranda-Galvis, M., Loveless, R., Kowalski, L.P., Teng, Y., 2021. Impacts of Environmental Factors on Head and Neck Cancer Pathogenesis and Progression. *Cells*. 10, 389. <https://doi.org/10.3390/cells10020389>.

Moody, L., Crowder, S. L., Fruge, A. D., Locher, J.L., Demark-Wahnefried, W., Rogers, L.Q., Delk-Licata, A., Carroll, W. R., Spencer, S. A., Black, M., 2020. Epigenetic stratification of head and neck cancer survivors reveals differences in lycopene levels, alcohol consumption, and methylation of immune regulatory genes. *Clinical Epigenetics*. 12, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1186/s13148-020-00930-5>.

Naeem, A., Hu, P., Yang, M., Zhang, J., Liu, Y., Zhu, W., Zheng, Q., 2022. Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives. *Molecules*. 27, 8367. <https://doi.org/10.3390/molecules27238367>.

Ozkan, E., Bakar-Ates, F., 2020. The Trinity of Matrix Metalloproteinases, Inflammation, and Cancer: A Literature Review of Recent Updates. *Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry*. 19, 206–221. <https://doi.org/10.2174/1871523018666191023141807>.

Ramos, I.N.F., da Silva, M.F., Lopes, J.M.S., Cruz, J.N., Alves, F.S., do Rego, J.A.R., Costa, M.L.D., Assumpção, P.P., Barros Brasil, D.D.S., Khayat, A.S., 2023. Extraction, Characterization, and Evaluation of the Cytotoxic Activity of Piperine in Its Isolated form and in Combination with Chemotherapeutics against Gastric Cancer. *Molecules*. 28, 5587. <https://doi.org/10.3390/molecules28145587>.

Song, L., Wang, Y., Zhen, Y., Li, D., He, X., Yang, H., Zhang, H., Liu, Q., 2020. Piperine inhibits colorectal cancer migration and invasion by regulating STAT3/Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Biotechnology letters*. 42, 2049–2058. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02923-z>.

Tripathi, A.K., Ray, A.K., Mishra, S.K., 2022. Molecular and pharmacological aspects of piperine as a potential molecule for disease prevention and management: evidence from clinical trials. *Beni-Suef University journal of basic and applied sciences*. 11, 16. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00196-1>.

Tudor, D.V., Bâldea, I., Lupu, M., Kacso, T., Kutasi, E., Hopârtean, A., Stretea, R., Gabriela Filip, A., 2020. COX-2 as a potential biomarker and therapeutic target in melanoma. *Cancer biology & medicine*. 17, 20–31. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0339>.

Turrini, E., Sestili, P., Fimognari, C., 2020. Overview of the Anticancer Potential of the "King of Spices" *Piper nigrum* and Its Main Constituent Piperine. *Toxins*. 12, 747. <https://doi.org/10.3390/toxins12120747>.

Wang, Q., Feng, J., Tang, L., 2022. Non-Coding RNA Related to MAPK Signaling Pathway in Liver Cancer. *International journal of molecular sciences*. 23, 11908. <https://doi.org/10.3390/ijms231911908>.

Wojtowicz, K., Sterzyńska, K., Świerczewska, M., Nowicki, M., Zabel, M., Januchowski, R., 2021. Piperine Targets Different Drug Resistance Mechanisms in Human Ovarian Cancer Cell Lines Leading to Increased Sensitivity to Cytotoxic Drugs. *International Journal Of Molecular Sciences*. 22, 8, 4243. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22084243>.

Yaffe, P.B., Power Coombs, M.R., Doucette, C.D., Walsh, M., Hoskin, D.W., 2015. 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*. 54, 1070–1085. <https://doi.org/10.1002/mc.22176>.

Zadorozhna, M., Tataranni, T., Mangieri, D., 2019. Piperine: role in prevention and

progression of cancer. *Molecular biology reports.* 46, 5617–5629. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04927-z>.

Zhai, W.,J., Zhang, Z.B., Xu, N.N., Guo, Y.F., Qiu, C., Li, C.Y., Deng, G.Z., Guo, M.Y., 2016. Piperine Plays an Anti-Inflammatory Role in *Staphylococcus aureus* Endometritis by Inhibiting Activation of NF- κ B and MAPK Pathways in Mice. *Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine.* 1-10. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8597208>.

Zhang, W., Li, S., Li, C., Li, T., Huang, Y., 2022. Remodeling tumor microenvironment with natural products to overcome drug resistance. *Frontiers in immunology.* 13, 1051998. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1051998>.

Author contributions

Juliana Prado Gusson-Zanetoni: Conceptualization, Methodology, Analysis, Research, Writing. Luana Pereira Cardoso: Methodology. Stefanie Oliveira de Sousa: Methodology. Laura Luciana de Melo Moreira Silva: Methodology. Tiago Henrique: Methodology. Sonia Maria Oliani: Appeal and Review. Flávia Cristina Rodrigues-Lisoni: Conceptualization, Review, Editing, Supervision and Resources.

Funding

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (141072/2020-2).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Photomicrographs of the morphology of control (A) and piperine-treated (B) HEP-2 cells. Control SCC-25 cells (C), and cells treated with piperine (D), at a concentration of 150 μ M, over 24 hours, with black arrows pointing to cell shrinkage and the formation of blabs (cellular vesicles). Graphs of cell viability (E) HEP-2 and (F) SCC-25, using the 7 concentrations tested (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 250 μ M, 300 μ M), at 4, 24, 48 and 72 hours. * with $p < 0.05$. Bars: 40 μ m.

Figure 2. Growth curve of HEP-2 and SCC-25 cell lines (A), treated with piperine at three concentrations (100, 200 and 300 μ M) for 4, 24, 48 and 72 hours. * $p < 0,05$. Photomicrograph of the colony formation assay in HEP-2 and SCC-25 strains (B), after treatment with piperine [150 μ M], after 24 hours, and graphs statistically representing colony formation, with comparisons of the control and piperine groups . *** vs control, $p < 0.0001$.

Figure 3. Detection and statistical analysis of apoptosis (A). Treatment with piperine at a concentration of 150 μ M, and a time of 24 hours, significantly increased the rate of apoptosis in HEP-2 laryngeal cancer cells and SCC-25 tongue cancer cells, as CV (Viable Cells), AI (Initial Apoptosis), AT (Late Apoptosis) and N (Necrosis). Comparison between groups, * $p < 0.05$. Cell cycle analysis (B). Treatment with piperine (150 μ M over 24 hours) promoted cell cycle arrest in the Hep-2 and SCC-25 cancer cell lines. Comparison between groups, * $p < 0.05$.

Figure 4. Evaluation of the genotoxicity assay, with fluorescence photomicrographs and nuclear damage index of HEP-2 and SCC-25 cells treated with 150 μ M of piperine in 24 hours, with damage from 0 to 3, where (0) no apparent damage, (1) damage 1, with one times the size of the nucleus, (2) damage 2, twice the size of the nucleus and (3) damage 3, of two or more times the size of the nucleus. Graphs depicting comet assay statistics, with ** statistically significant difference between treatment and controls, with $p \leq 0.05$. Bars: 10 μ m.

Figure 5. Transwell migration assay of Hep-2 and SCC-25 cells (A). Photomicrographs of cell migration of the control group of cells and those treated with piperine (150 μ M), after 24 hours, and graphs representing densitometry. 200X magnification, 20 μ m scale. * with $p < 0.05$. Graphs of MMP2 and MMP9 mRNA expression after piperine treatment compared to control in HEP-2 and SCC-25 cells (B). The dotted line (≥ 1.0 or ≤ -1.0) is equivalent to the significant expression difference based on log 2. Graphs of MMP2 protein expression (C) assessed by Western Blot in HEP-2 and SCC-25 cells, after treatment with piperine [150 μ M], at 24 hours in both assays. Bars: 20 μ m.

Figure 6. Graphs of PTGS2 and PTGER4 mRNA expression after piperine treatment compared to control in HEP-2 and SCC-25 cells (A). The dotted line (≥ 1.0 or ≤ -1.0) is equivalent to the significant expression difference based on log 2. Graphs of the colorimetric ELISA assay for the analysis of cytokines/chemokines IL-8, IL-1 β , IFN- γ secreted by HEP-2 and SCC-25 cells, after treatment with piperine (150 μ M), at the 24-hour time point in both conditions (B). * vs. control, $p < 0.05$. Graphs of PTGS2 protein expression (C) evaluated by Western Blot in HEP-2 and SCC-25 cells, after treatment with piperine [150 μ M], at 24 hours.

Figure 7. Immunocytochemistry of ERk/MAPK protein expression is indicated by a yellow arrow in the cytoplasm and a pink arrow in the nucleus. The graphs show the densitometry in each cell of the control (DMSO) and piperine [150 μ M] treatment groups, at the 24-hour time point. * vs. control, $p < 0.05$, ** vs. control, $p < 0.01$, *** vs. control, $p < 0.001$. Immunocytochemistry of p38/MAPK protein expression is indicated by a yellow arrow in the cytoplasm and pink in the nucleus. The graphs show the densitometry in each cell of the control (DMSO) and piperine [150 μ M] treatment groups, at the 24-hour time point. * vs. control, $p < 0.05$, ** vs. control, $p < 0.01$, *** vs. control, $p < 0.001$, **** vs. control, $p < 0.001$. Bars: 10 μ m.

Figure 8. Effect of piperine on cytotoxicity in HEp-2 and SCC-25 cells (A) at 4, 24, 48 and 72 hours, with IC₅₀ showing the cytotoxicity index at 50% (Complementary material). Table with piperine inhibitory concentration values in HEp-2 and SCC-25 cells (B).

Figura 1

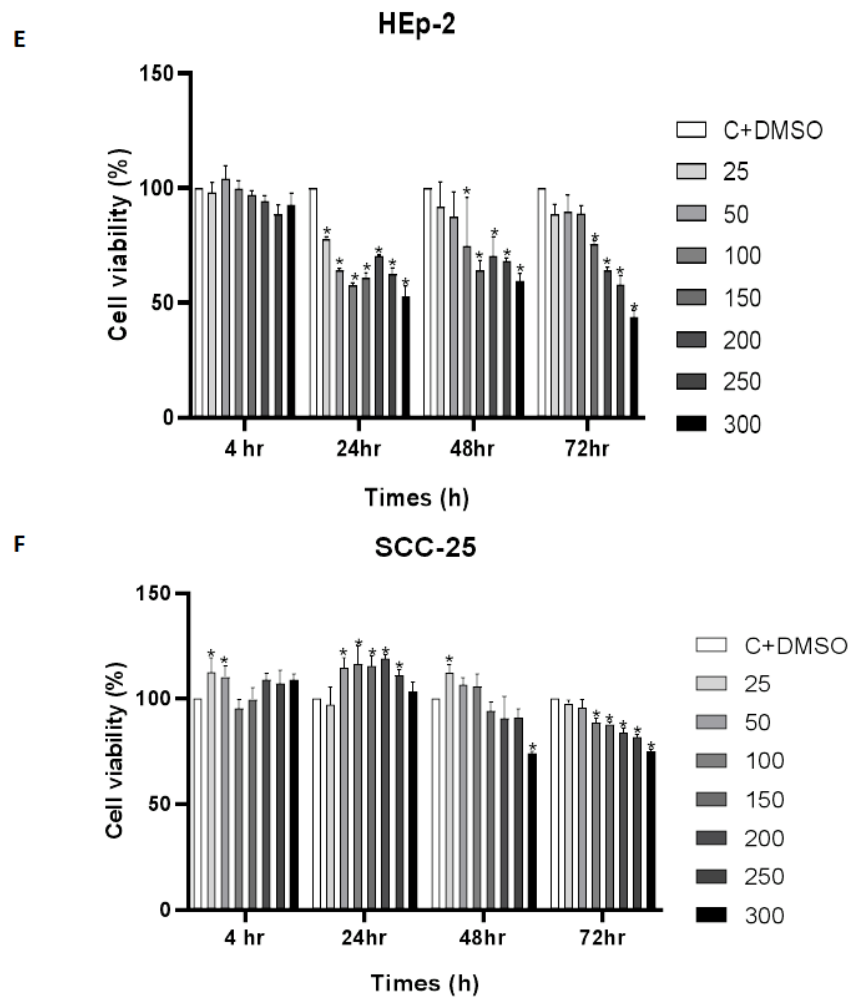
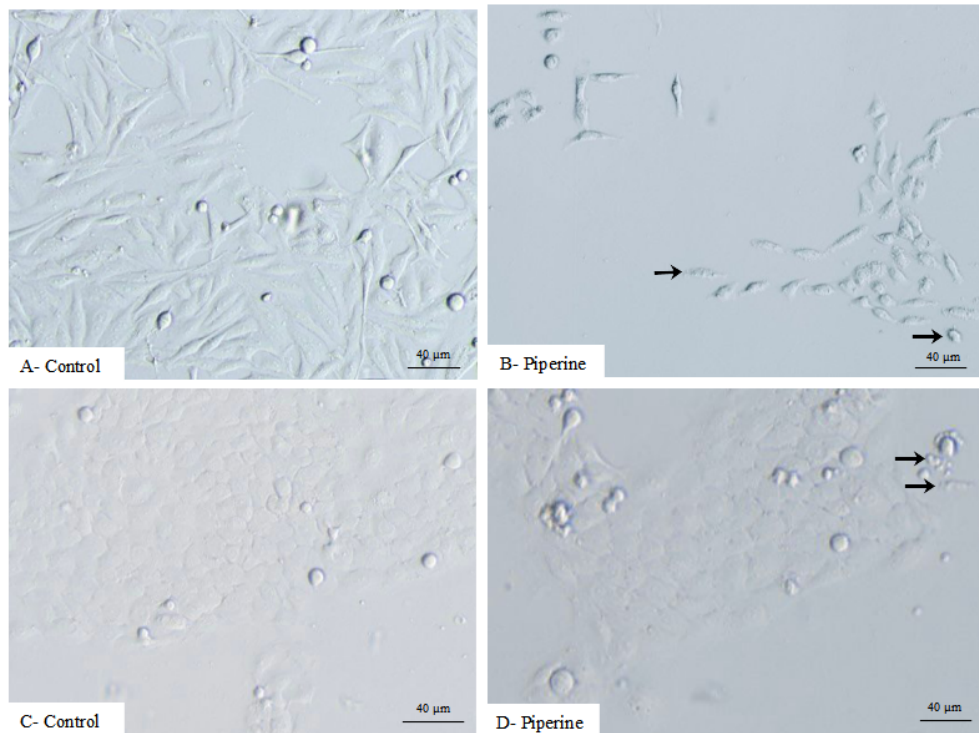


Figura 2

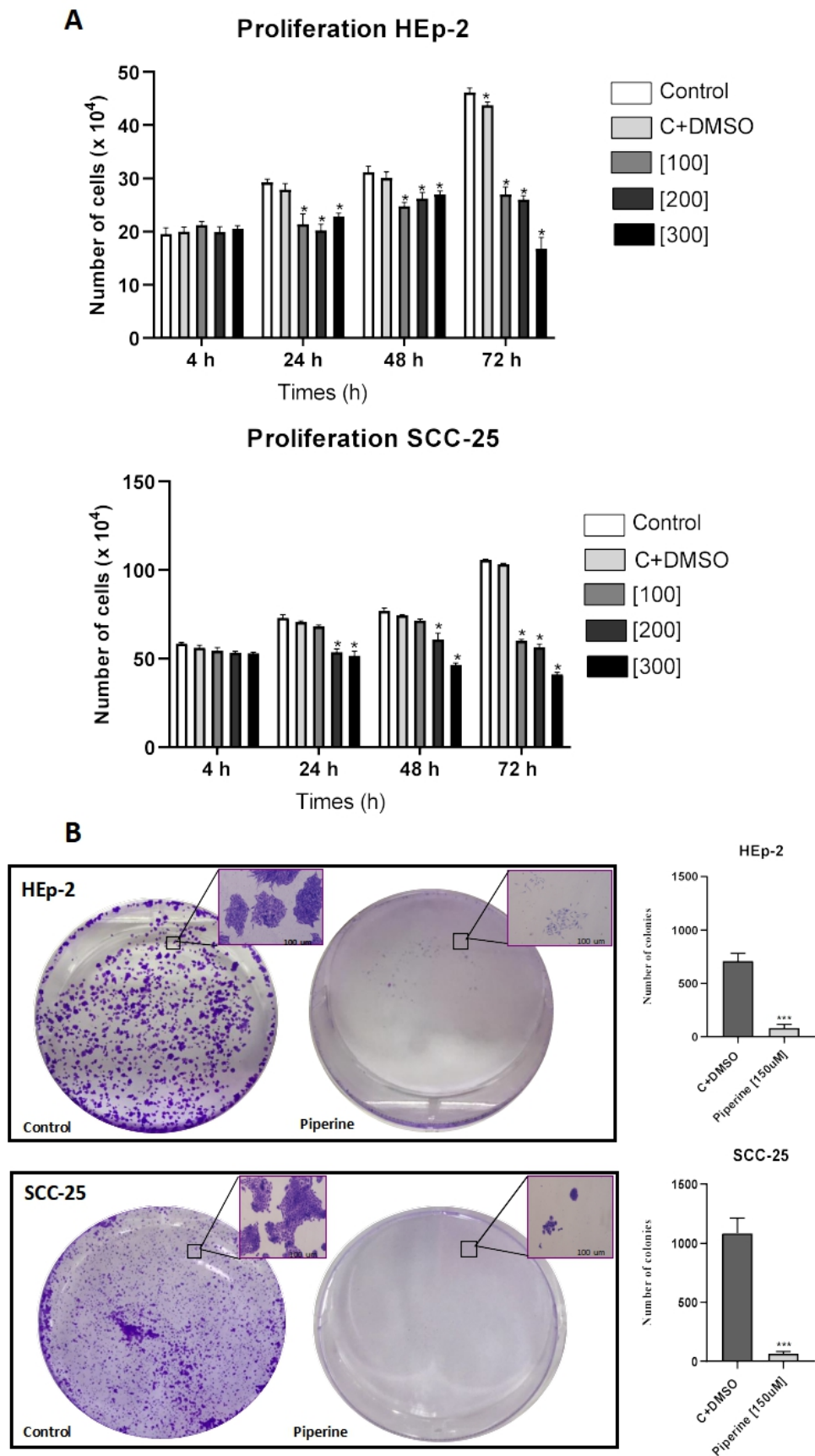
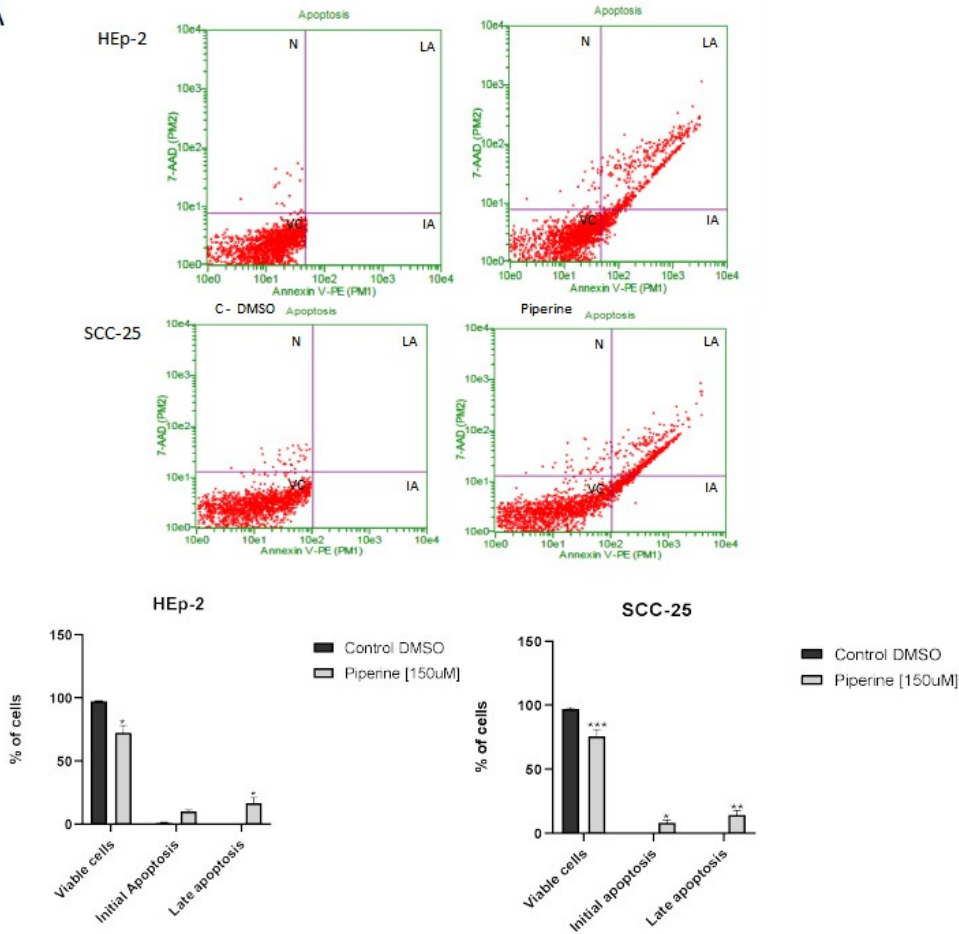


Figura 3

A



B

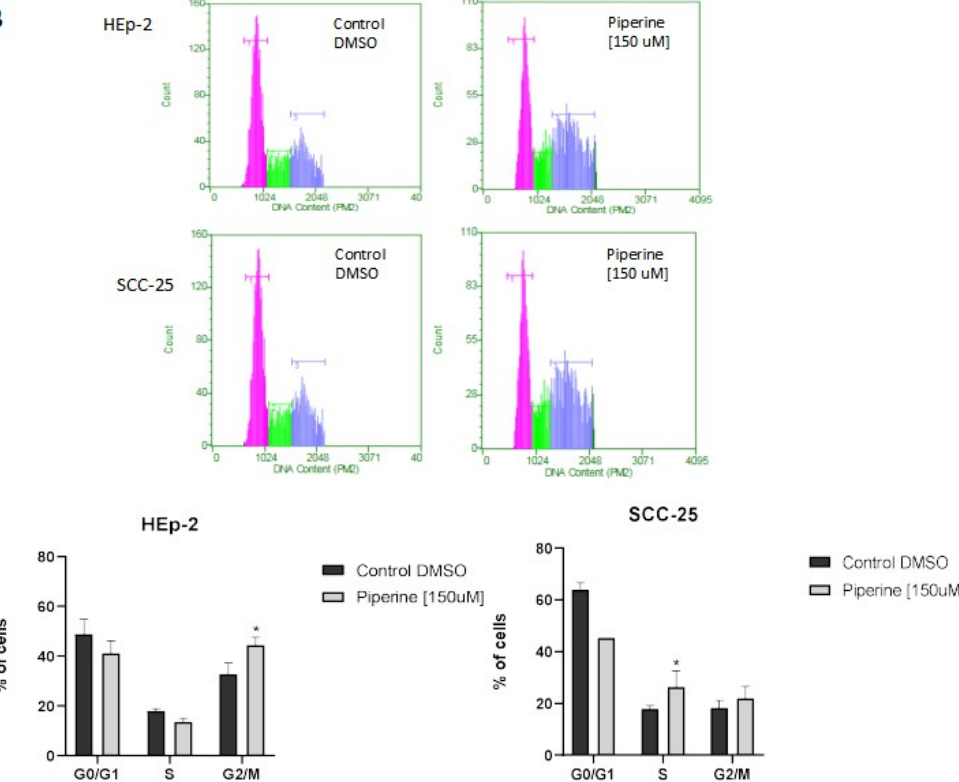


Figura 4

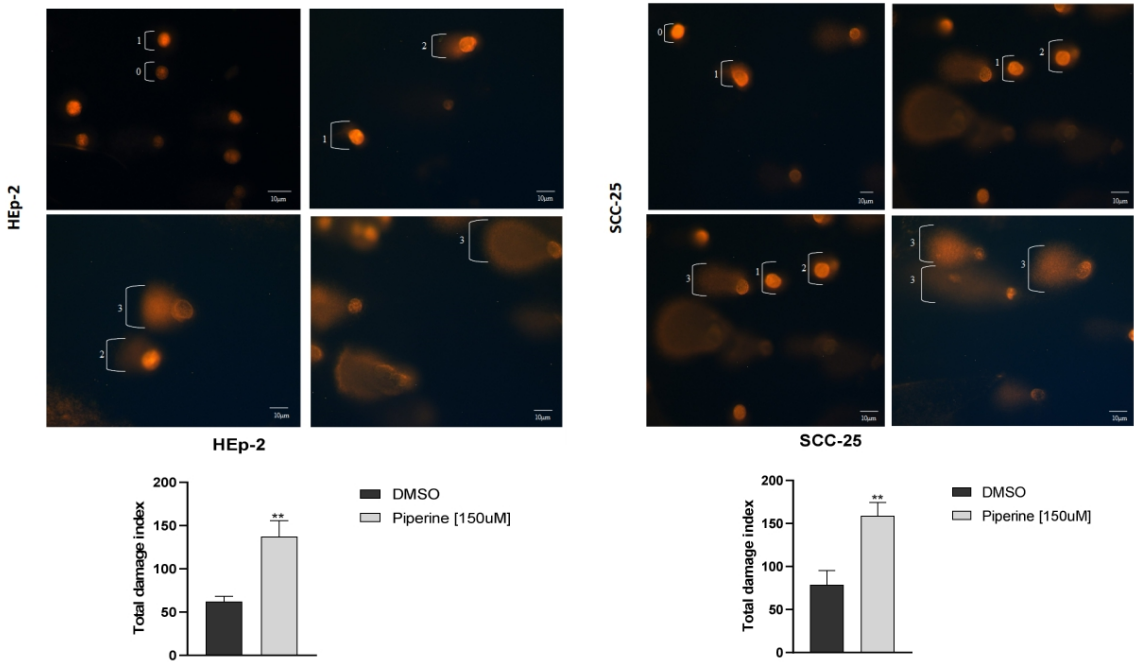


Figura 5

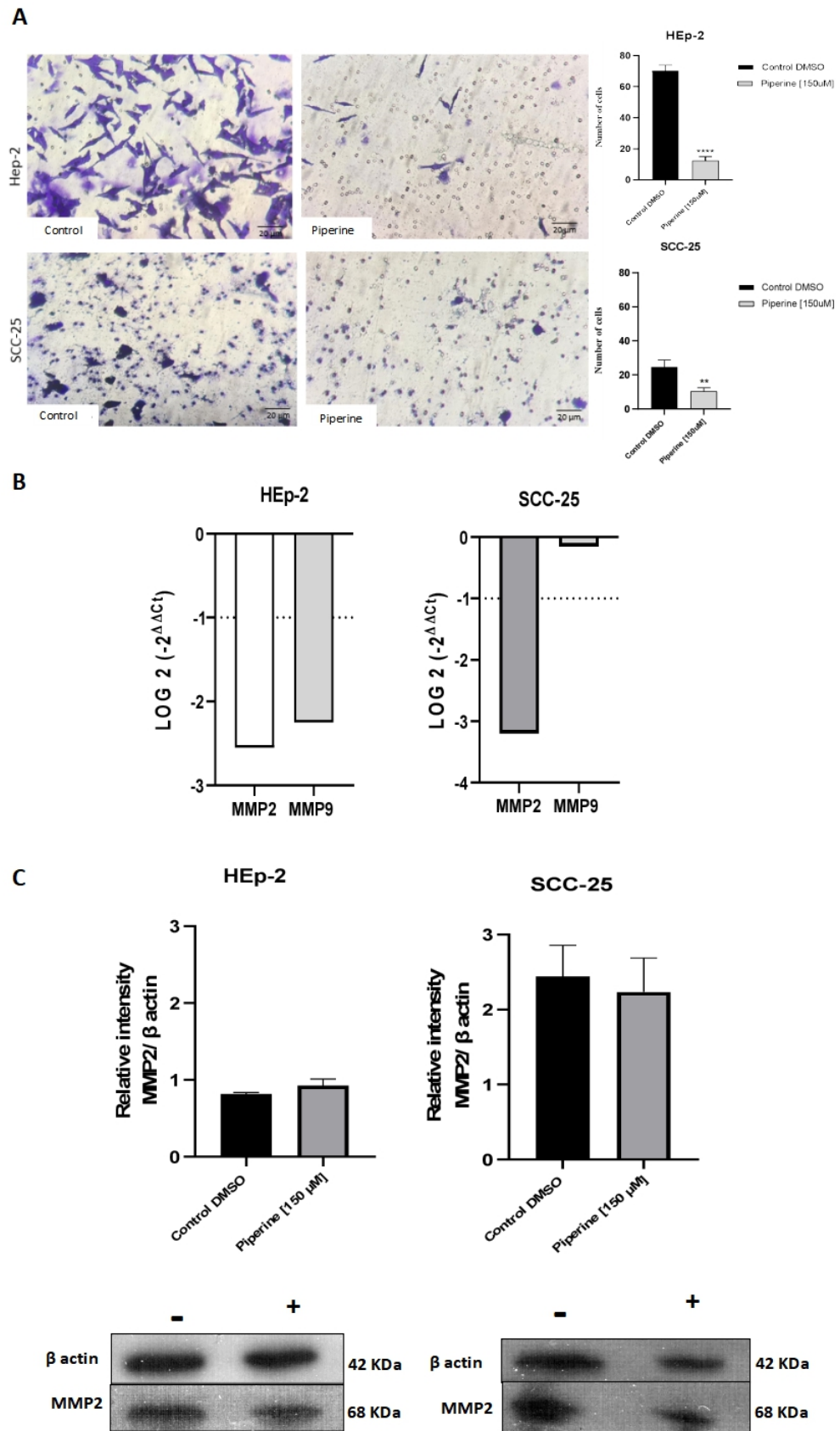


Figura 6

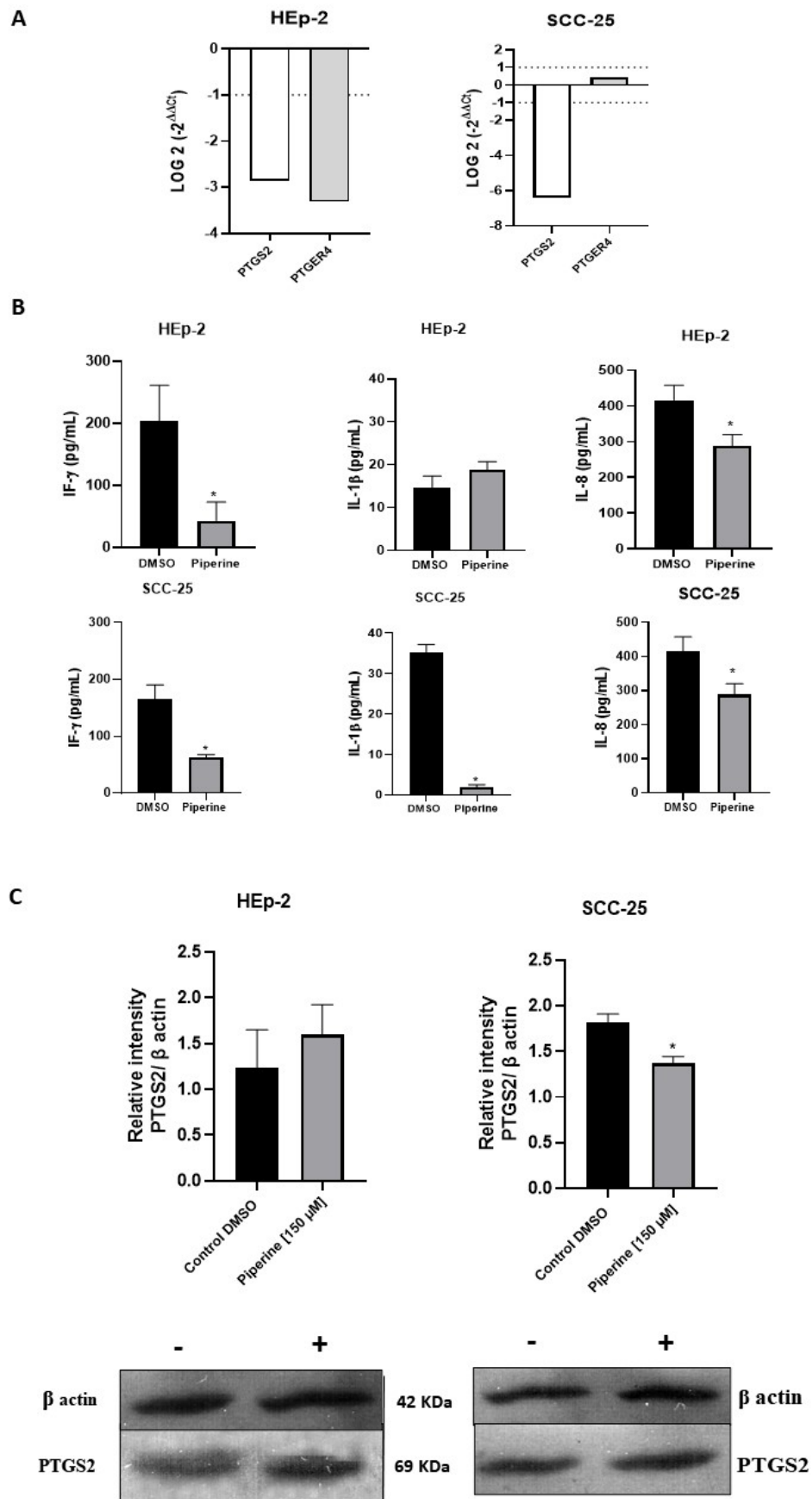


Figura 7

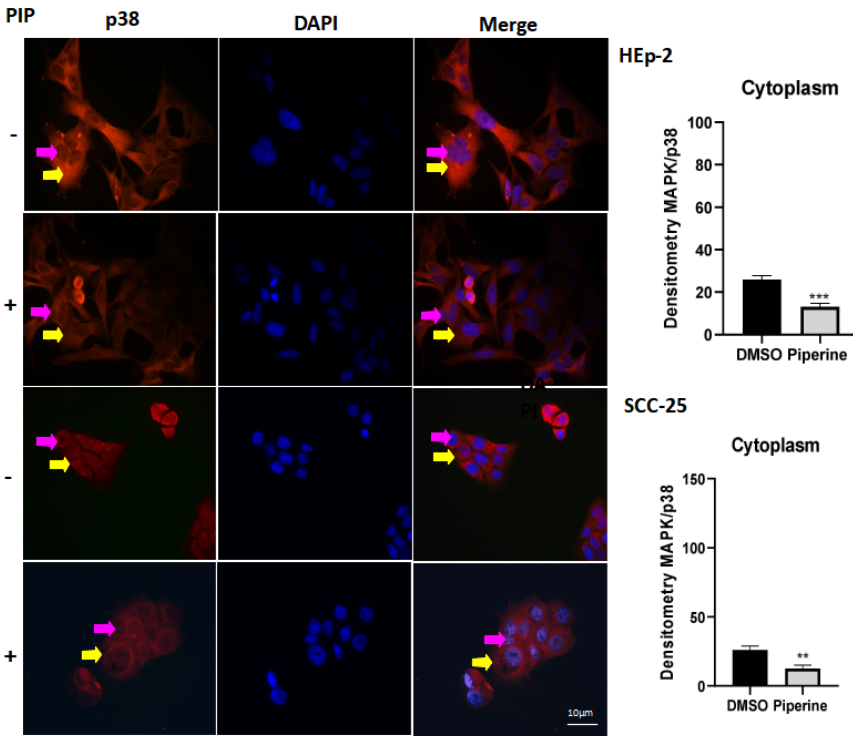
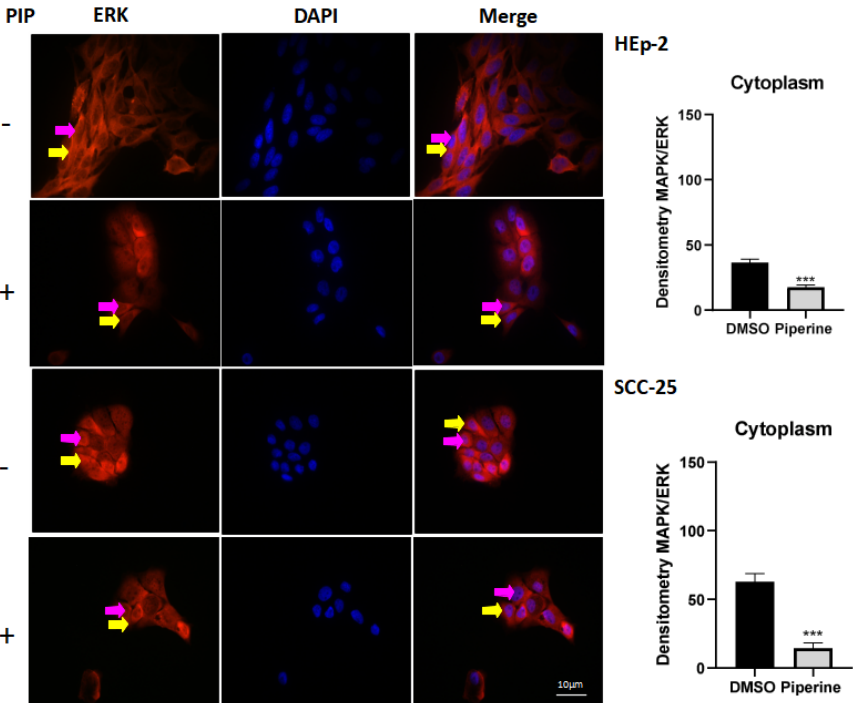
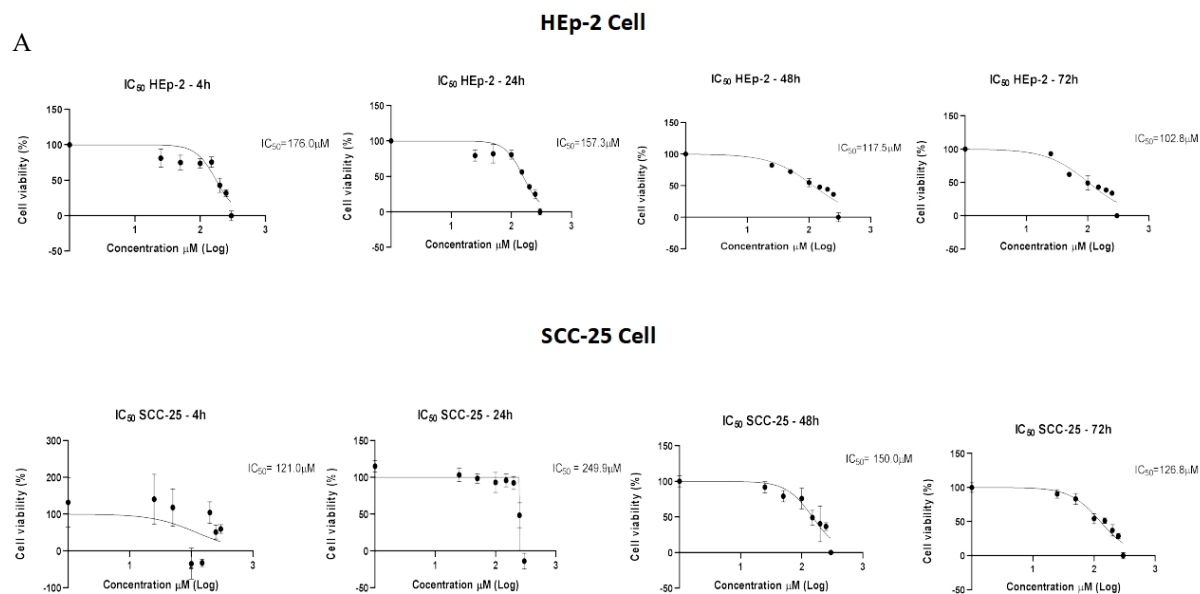


Figura 8



B

Concentration of compound that induces 50% cell death				
	4h	24h	48h	72h
HEp-2	176,0	157,3	117,5	102,8
SCC-25	121,0	249,9	150,0	126,8

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Ao longo dos últimos anos, inúmeros progressos vêm ocorrendo no campo do conhecimento do câncer, apoiados por pesquisas e tecnologias avançadas para seu diagnóstico e tratamento. Identificar novos agentes terapêuticos anticancerígenos é um tema fundamental na pesquisa para o desenvolvimento de medicamentos e para o tratamento dessa doença. Numerosos fitoterápicos isolados de plantas medicinais ganharam atenção devido à sua capacidade de atingir e regular as principais vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento do câncer. Entre esses fitoquímicos podemos destacar a piperina, alcaloide derivado da *Piper nigrum*, que exerce efeitos anti-inflamatórios e anticancerígenos (TURRINI; SESTILI; FIMOIGNARI, 2020).

Uma das principais características biológicas que envolvem os processos inflamatórios e carcinogênicos é a capacidade de proliferação celular desordenada e/ou aumentada. Esse mecanismo de sobrevivência e progressão das células tumorais compartilham diversas vias de sinalização e alvos moleculares para a sua ocorrência (LANDSKRON *et al.*, 2014). Proliferação autossuficiente, insensibilidade aos sinais antiproliferativos, evasão da apoptose e potencial replicativo ilimitado, são propriedades fundamentais para o desenvolvimento da carcinogênese (RAKOFF-NAHOUM, 2006).

No presente estudo, verificou-se que a ação da piperina frente a capacidade de inibição da proliferação de células de câncer de cabeça e pescoço HEP-2 e SCC-25, por meio dos ensaios de curva de crescimento celular e de formação de colônias. Os resultados mostraram que a piperina diminuiu significativamente o crescimento das células analisadas, assim como inibiu a capacidade de multiplicação de colônias celulares, indicando seu efeito antiproliferativo. Outros estudos *in vitro*, também apontam esse efeito antiproliferativo da piperina em diversas células, como em linhagens de adenocarcinoma do cólon; pulmão, mama e hepatocelular, por consequência da indução da parada do ciclo celular na fase G1, associada à diminuição da expressão de ciclinas D1 e D3, bem como redução da fosforilação das proteínas AKT e Rb (retinoblastoma), e regulação da expressão de p21/WAF1 e p27/KIP1 (YAFFE *et al.*, 2014; FONSECA *et al.*, 2020).

A atividade citostática da piperina foi observada em nossa pesquisa nas células de câncer de cabeça e pescoço, e em correlação aos nossos achados, é relatada a eficiência da piperina em promover a redução da formação de colônias celulares (efeito citostático), ou seja, a clonogenicidade (capacidade das células em gerar clones idênticos) em células de câncer de cólon e de mama (YAFFE *et al.*, 2014; RAJARAJAN *et al.*, 2021).

A viabilidade celular e a citotoxicidade são um dos indicadores mais importantes na avaliação toxicológica *in vitro* de um determinado composto (WANG *et al.*, 2022). Diante desse aspecto, foi investigado a toxicidade da piperina na viabilidade das células HEP-2 e SCC-25, como também observamos possíveis alterações na morfologia dessas células. As análises indicaram que a piperina diminui a viabilidade celular mediante aplicação do tratamento em altas concentrações, valor esse mensurado a partir de 100 μ M, e ainda causou mudança morfológica nas linhagens analisadas. Nessa perspectiva, dados da literatura mostram que os principais efeitos biológicos celulares da piperina *in vitro*, ocorrem em doses específicas (75–200 μ M) e tempo de incubação entre 24 e 48 horas (ZADOROZHNA; TATARANNI; MANGIERI, 2019). Esse efeito de citotoxicidade é descrito devido a piperina promover inibição da NADH-oxidoreductase, enzima essa que estimula a atividade e a proliferação celular, como também a ruptura da permeabilidade da membrana mitocondrial (DIAS *et al.*, 2021).

Por meio das análises de microscopia de luz, foi detectado algumas alterações morfológicas nas células de câncer de cabeça e pescoço. Essas alterações incluíram o desenvolvimento do processo inicial característico da apoptose, que compreenderam o encolhimento celular, devido a diminuição do tamanho dessas células, e por consequência compactação das organelas (ELMORE, 2007).

A apoptose ou morte celular programada exerce papel fundamental no controle do crescimento celular fisiológico e na homeostase tecidual. Qualquer proliferação celular descontrolada pode acarretar um acúmulo de genes com alterações genéticas relativos ao processo de morte celular. Portanto, a indução da apoptose tornou-se o principal foco da maioria dos agentes anticancerígenos (SI *et al.*, 2018). Assim, em função da importância do entendimento da ação da piperina referente ao mecanismo responsável pela supressão do crescimento das células, foi realizado os ensaios de apoptose e ciclo celular pela técnica de citometria de fluxo.

Os resultados indicaram que a porcentagem de células apoptóticas nos estágios iniciais e tardias aumentaram drasticamente nas linhagens estudadas, após o tratamento com piperina, apontando assim, esse composto como um agente capaz de induzir as células a apoptose. O conteúdo de DNA celular também foi determinado, e observou-se que a piperina promoveu a parada do ciclo celular na linhagem HEP-2 na fase G2/M, e na linhagem SCC-25, essa parada ocorreu na fase S do ciclo. Nesse sentido, o efeito preciso da piperina em relação a atividade inibidora do crescimento tumoral na progressão do ciclo celular, é específico, e

isso é dependente do tipo de célula cancerígena investigada (YAFFE *et al.*, 2013).

Diversos estudos descrevem o efeito pró-apoptótico da piperina em células de câncer de próstata DU145 (ZENG; YANG, 2018), células SNU-16 de câncer gástrico humano e células epiteliais gástricas GES-1, efeito esse atribuído à diminuição da expressão das proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-xl), pois qualquer alteração na relação Bax/Bcl-2 pode iniciar a sinalização de caspases e, quando as caspases são ativadas, podem destruir a estrutura celular e, eventualmente, levar à morte apoptótica dessas células (CHEN *et al.*, 2020). Já com relação a parada do ciclo celular pelo tratamento com a piperina, foi observado em outros trabalhos que esse composto causou a parada do ciclo celular em células de câncer ovariano (OVACAR-3) (QIU *et al.*, 2019) e em células cancerígenas de leucemia (HL-60) (Li *et al.*, 2020). Deste modo, a piperina regula a parada do ciclo celular, visto que o desenvolvimento do câncer é frequentemente associado à perda da regulação desse “checkpoint”. Logo, a indução da apoptose, bem como a parada do ciclo celular, são os principais mecanismos de estudos relacionados a descobertas de compostos com possíveis atividades contra o câncer (JEONG *et al.*, 2020).

Ainda, se tratando da apoptose e sua maquinaria de execução, investigamos qual a possível causa de sua iniciação. A capacidade antioxidante das células tumorais podem ser desregulada pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS). Assim, estratégias terapêuticas que aumentam a geração de ROS e/ou diminuem a defesa antioxidante, podem induzir as células tumorais a ativar diferentes vias de morte celular, como a apoptose. Muitas drogas quimioterápicas são agentes genotóxicos e induzem a apoptose, devido a geração de danos ao DNA, assim como a piperina em altas concentrações (FERREIRA *et al.*, 2020). Com essas considerações, foi verificado se o tratamento com a piperina causou danos no material genético nas células de câncer de cabeça e pescoço. Então, o índice de danos gerado pelo tratamento, confirmou que a piperina causa fragmentação do DNA nas células estudadas, em comparação as células que não foram tratadas com o composto. O dano ao DNA é estabelecido como uma alteração na estrutura química do DNA genômico, que pode ocasionar à parada do ciclo celular e à apoptose para limitar a progressão do câncer. A avaliação quantitativa do dano ao DNA durante a terapia experimental do câncer é um passo fundamental para justificar a eficácia de um agente genotóxico (LU; LIU; YANG, 2017).

Alcaloides como a piperina, com grupos ionizáveis dependentes de pH podem se ligar e interagir com o DNA, e dessa forma competem com o GelRed (reagente utilizado no experimento) mostrando assim fragmentação no DNA. Essa fragmentação são quebras

geradas na cadeia de DNA que comprometem a integridade da informação genética e, diminuem a viabilidade celular. Contudo, a piperina exerce efeito genotóxico, resultando em apoptose de células tumorais, uma vez que podem induzir dano oxidativo atingindo o DNA que se encontra fragmentado (GRINEVICIUS *et al.*, 2016).

Além da atividade antiproliferativa da piperina, o efeito anti-metastático é mais uma eficiência observada em alguns estudos com esse fitoterápico. Essa ação da piperina é identificada em células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-468, T-47D e MCF-7) e em células de câncer colorretal (SW480 e HCT-116), pela diminuição da expressão de mRNA das metaloproteinase 2 e 9 (GREENSHIELDS *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2020). Entretanto, o papel da piperina frente a migração de células de câncer de cabeça e pescoço, continua desconhecido. Portanto, foi investigado a influência da piperina em relação as propriedades metastáticas associada a capacidade de invasão celular, e assim, foi constatado que a piperina inibiu significativamente o mecanismo invasivo das células HEp-2 e SCC-25.

A metástase se origina com uma fase de espalhamento de células cancerígenas do tumor primário para locais regionais e distais. Entender as origens, características e fragilidades das células cancerígenas progenitoras com capacidade de iniciar metástases em órgãos distantes, e os microambientes do hospedeiro que sustentam a capacidade dessas células de escapar da vigilância imunológica e regenerar o tumor, é crucial para o desenvolvimento de estratégias para melhorar a prevenção e tratamento do câncer avançado (MASSAGUÉ; GANESH, 2021). Para a biologia celular experimental, existem diferenças entre os termos invasão e migração celular. A invasão é definida como movimento celular disruptivo, proteolítico, através de barreiras tridimensionais (3D), distinto da migração, que é definida como movimento não disruptivo e não proteolítico de células através dos tecidos. A invasão é essencial para a metástase no câncer de cabeça e pescoço, e nesse tipo de câncer, essa especificidade de invasão ocorre principalmente via degradação proteolítica da matriz extracelular usando metaloproteases da matriz (MMPs) (INGLEHART; SCANLON; D'SILVA, 2014).

Para entendermos os resultados obtidos neste estudo sobre a diminuição da invasão das células HEp-2 e SCC-25, foi realizado análises da expressão gênica de *MMP2* e *MMP9*. A superexpressão das MMPs, em especial, *MMP2* e *MMP9* estão associadas ao desenvolvimento de câncer, incluindo CCP (ZHANG *et al.*, 2013). Assim, foi constatado em nosso estudo, que a motilidade diminuída das células de câncer de cabeça e pescoço na presença de piperina é sugerida pela descoberta da modulação da expressão de mRNA de

MMP2 e *MMP9* em células HEp-2 e SCC-25. Os níveis da expressão da proteína *MMP2* não foi modulado de forma significativa nas células estudadas, mas em específico na linhagem SCC-25, observamos uma tendência a diminuição dessa expressão.

Com a finalidade de entendermos os mecanismos de progressão do câncer, verificamos alguns fatores e mediadores que ajudam as células a crescer constantemente. Entre esses fatores, a inflamação é um mecanismo intimamente relacionado com o câncer, e pode mediar e influenciar essa doença. Sabe-se que os derivados do ácido araquidônico participam da inflamação e também estão intimamente ligados ao desenvolvimento do tumor, sendo a *PTGS2* altamente expressa em tecidos hiperplásicos (OZKAN; BAKAR-ATES, 2020). *PTGS2* é uma enzima ligada à membrana, responsável pela geração de prostanoídes como a prostaglandina E2 (PGE2) que contribuem para a modulação de múltiplos efeitos carcinogênicos. Certamente, o microambiente tumoral é um indutor para a superexpressão de *PTGS2*. Essa alta expressão acontece devido ao controle desregulado sobre seus níveis transcricionais ou pós-transcricionais (GORADEL *et al.*, 2018).

As prostaglandinas controlam os processos celulares ligando-se a receptores acoplados à proteína G na superfície celular. Esses receptores de superfície celular são denominados EP (PTGER1, PTGER2, PTGER3 e PTGER4). Cada receptor EP interage com sua proteína G única para ativar vias de sinalização a jusante específicas, que têm várias funções no comportamento biológico e patológico. Especificamente, PTGER4 é um receptor de alta afinidade e é apontado como um mediador pró-câncer em muitos tipos diferentes de malignidades devido à sua alta expressão (JIN *et al.*, 2023). Contudo, nossos resultados sobre a expressão gênica apontam que a piperina reduziu significativamente os níveis de expressão de *PTGS2* nas células HEp-2 e SCC-25. A diminuição significativa da expressão de *PTGER4* ocorreu na linhagem HEp-2, sendo esse resultado não observado nas células SCC-25. Em se tratando da expressão a nível proteico, nossos achados, demonstram a ação do tratamento em diminuir *PTGS2* na linhagem SCC-25, indicando a piperina como modulatória da expressão gênica e proteica em nosso modelo de câncer, atuando especialmente em mediadores diretamente associados ao mecanismo inflamatório, como a enzima *PTGS2*. A inibição específica de *PTGS2* é uma abordagem promissora para prevenir ou direcionar o câncer e a inflamação, assim nossos dados corroboram com os resultados de Kim e colaboradores (2012), que também verificaram uma diminuição acentuadamente dos níveis de expressão de genes e proteínas *PTGS2* em células de macrófagos de camundongo, após o tratamento com piperina.

Dentre os principais mediadores da inflamação, evidenciamos as citocinas, como sendo pequenas glicoproteínas liberadas por uma célula e reconhecidas por outras células que expressam os receptores correspondentes. Como exemplo dessa grande família de citocinas, podemos apontar: interferons, interleucinas, fatores de crescimento e quimiocinas pertencentes à grande família das citocinas. Esses mediadores desencadeiam cascatas de sinalização em células responsivas, e promovem respostas celulares como: proliferação, diferenciação ou liberação de enzimas e outros mediadores que moderam o ambiente celular e fornecem meios para propagar os efeitos das citocinas. Em doenças inflamatórias, a rede de citocinas geralmente bem equilibrada é seriamente afetada, levando a inflamação persistente e danos teciduais. Interferir na inflamação crônica significa interferir na função da citocina e na transdução de sinal dependente de citocina (FLOEGE *et al.*, 2012). A respeito disso, foi avaliado as concentrações das citocinas IL-8, IL-1 β , IFN- γ liberadas no sobrenadante de células HEp-2 e SCC-25 em cultura. De modo geral, a secreção das citocinas estudadas IL-8, IL-1 β , IFN- γ foi reduzida a partir do tratamento com a piperina, indicando mais um efeito mediador desse composto nas células de câncer de cabeça e pescoço. Assim nossos dados corroboram com os resultados de outro estudo do grupo de pesquisa, em que também foi observado a diminuição dos níveis das citocinas IL-8, IL-1 β em células de câncer cervical HeLa, SiHa e CaSki, após tratamento com piperina (CARDOSO *et al.*, 2023).

Outros mediadores de sinalização celular, associados também a uma variedade de atividades celulares, são os pertencentes a família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (KIM; CHOI, 2010). A via de sinalização MAPK é uma cascata de sinalização complexa que é controlada pela fosforilação e desfosforilação sequencial de proteínas relevantes. A fosforilação é essencial para os processos celulares normais, no entanto, a fosforilação anormal é uma das principais causas de alteração de muitas proteínas estruturais, funcionais e reguladoras em condições de doenças relacionadas ao desenvolvimento da inflamação, e a fosforilação desordenada de proteínas é relevante para a manifestação do câncer (SINGH *et al.*, 2017). Desta maneira, foi investigado a expressão das MAPKs (ERK e p38), e constatamos que a piperina modulou a expressão da via MAPK ERK/p38 em células de câncer de cabeça e pescoço, diminuindo de forma significativa a expressão de ERK e p38 nas células HEp-2 e SCC-25, e por consequência interrompeu o processo fosforilativo dessas proteínas.

Assim, nossos resultados são consistentes com os de outros estudos, onde foi observado que a fosforilação de ERK e p38 foi significativamente diminuída pela piperina,

em recorrência da inibição da expressão de ERK e p38, em células de câncer de mama (ZHAI *et al.*, 2016), além disso, resultados de Western blot confirmaram que a piperina diminuiu a expressão de JNK e p38 MAPK em células de câncer de ovário humano (WOJTOWICZ *et al.*, 2021). Ademais, a redução da expressão de ERK e p38 foi altamente favorável para o impedimento de outras vias intermediárias, como PTGS2, MMPs e citocinas.

Em síntese, as nossas análises *in vitro* indicam que a piperina apresenta grande relevância na regulação do câncer de cabeça e pescoço, inibindo múltiplos aspectos do processo tumorigênico, como diminuição da proliferação, da viabilidade e da formação de colônias celulares. Essa propriedade antiproliferativa da piperina acontece devido a capacidade de promover a apoptose e a parada do ciclo celular mediante citotoxicidade e genotoxicidade, sendo esses fatores importantes na redução da progressão tumoral. Outra característica importante do tratamento com a piperina diz respeito a atividade anti-invasiva, devido a motilidade reduzida das células estudadas, pela diminuição da expressão e/ou atividade das metaloproteinases (MMP2/9).

No presente estudo, também foi constatado o efeito anti-inflamatório da piperina, mediante redução de moléculas responsáveis por esse mecanismo. Assim, verificamos a diminuição da expressão das enzimas PTGS2 e PTGER4, das citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-1 β , IFN- γ) e da via de sinalização MAPK (ERK e p38). Consequentemente, a presente pesquisa fornece evidências de que a piperina atua diretamente em mediadores inflamatórios/cancerígenos, possuindo papel significativo no tratamento do câncer de cabeça e pescoço. Entretanto, o nosso estudo apresenta algumas limitações, como a falta de uma célula normal de cabeça e pescoço do mesmo tipo histológico das linhagens cancerígenas estudadas, para uma comparação mais adequada dos sítios celulares em questão. Ademais, consideramos que o estudo da piperina em nível sistêmico com a utilização de modelo animal, seria mais preciso e enriquecedor. Assim, futuras aplicações e pesquisas serão fundamentais para o melhor entendimento da ação da piperina e proporcionará uma visão mais precisa da terapia com o uso de produtos naturais contra o câncer e doenças inflamatórias.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Compreender o mecanismo de formação do câncer e como ele se desenvolve é a chave para encontrar abordagens revolucionárias na terapia. Uma estratégia para melhorar as ofertas de tratamento contra o câncer é a utilização de compostos naturais. Dessa maneira, foi avaliado a ação da piperina diante dos mecanismos celulares e moleculares no câncer de cabeça e pescoço, e nossos resultados obtidos, nas condições experimentais propostas permitem concluir:

- Redução da proliferação, viabilidade celular e formação de colônias celulares.
- Indução de danos ao material genético por apresentar efeito citotóxico em altas concentrações.
- Promoção da apoptose devido ao acúmulo de DNA celular nas fases G2/M e S, e consequente parada do ciclo.
- Diminuição da invasão celular pela redução da expressão de genes relacionados com metástase.
- Alteração dos níveis de expressão de mRNA e proteínas da via inflamatória PTGS2.
- Regulação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IFN- γ .
- Modulação da via de sinalização MAPK, pela redução da expressão das proteínas ERk e p38.

Assim, a piperina exerce seus efeitos via modulação de várias moléculas mediadoras da inflamação, como citocinas, quimiocinas e genes/proteínas, propiciando uma nova compreensão dessa ação, frente aos mecanismos moleculares do desenvolvimento do câncer.

Em geral, a piperina exibe considerável atividade antitumoral, devido as suas propriedades anti-inflamatória, podendo ser uma opção terapêutica prospectiva e integrativa para pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

REFERÊNCIAS

- ADEKOYA, Timothy O.; RICHARDSON, Ricardo M.. Cytokines and Chemokines as Mediators of Prostate Cancer Metastasis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 12, p. 4449, 23 jun. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21124449>.
- AL-KHAYRI, Jameel M.; SAHANA, Gandasi Ravikumar; NAGELLA, Praveen; JOSEPH, Biljo V.; ALESSA, Fatima M.; AL-MSSALLEM, Muneera Q.. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: a review. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 9, p. 2901, 2 maio 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27092901>.
- ALSAHAFI, Elham; BEGG, Katheryn; AMELIO, Ivano; RAULF, Nina; LUCARELLI, Philippe; SAUTER, Thomas; TAVASSOLI, Mahvash. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. **Cell Death & Disease**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 1-11, 15 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-1769-9>.
- ASTRADSSON, Thorsteinn; SELLBERG, Felix; BERGLUND, David; EHRSSON, Ylva Tiblom; LAURELL, Göran Frans Emanuel. Systemic Inflammatory Reaction in Patients With Head and Neck Cancer—An Explorative Study. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 9, p. 1177, 5 nov. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2019.01177>.
- AZAM, Shofiul; PARK, Ju-Young; KIM, In-Su; CHOI, Dong-Kug. Piperine and Its Metabolite's Pharmacology in Neurodegenerative and Neurological Diseases. **Biomedicines**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 154, 12 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines10010154>.
- BERBECKA, Monika; FORMA, Alicja; BAJ, Jacek; FURTAK-NICZYPORUK, Marzena; MACIEJEWSKI, Ryszard; SITARZ, Robert. A Systematic Review of the Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression in Rectal Cancer Patients Treated with Preoperative Radiotherapy or Radiochemotherapy. **Journal Of Clinical Medicine**, [S.L.], v. 10, n. 19, p. 4443, 27 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jcm10194443>.
- CARDOSO, Luana Pereira; SOUSA, Stefanie Oliveira de; GUSSON-ZANETONI, Juliana Prado; SILVA, Laura Luciana de Melo Moreira; FRIGIERI, Barbara Maria; HENRIQUE, Tiago; TAJARA, Eloiza Helena; OLIANI, Sonia Maria; RODRIGUES-LISONI, Flávia Cristina. Piperine Reduces Neoplastic Progression in Cervical Cancer Cells by Downregulating the Cyclooxygenase 2 Pathway. **Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 103, 10 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph16010103>.
- CHEN, Hanyu; SHENG, Hongqing; ZHAO, Yushuo; ZHU, Guanghui. Piperine Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis of Human Gastric Cancer Cells by Downregulating Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt Pathway. **Medical Science Monitor**, [S.L.], v. 27, p. 1, 23 nov. 2020. International Scientific Information, Inc.. <http://dx.doi.org/10.12659/msm.928403>.
- CHEN, Samantha M. Y.; KRINSKY, Alexandra L.; WOOLAVER, Rachel A.; WANG, Xiaoguang; CHEN, Zhangguo; WANG, Jing H.. Tumor immune microenvironment in head and neck cancers. **Molecular Carcinogenesis**, [S.L.], v. 59, n. 7, p. 766-774, 3 fev. 2020.

Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mc.23162>.

CHEN, Hanyu; SHENG, Hongqing; ZHAO, Yushuo; ZHU, Guanghui. Piperine Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis of Human Gastric Cancer Cells by Downregulating Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt Pathway. **Medical Science Monitor**, [S.L.], v. 27, p. 1, 23 nov. 2020. International Scientific Information, Inc.. <http://dx.doi.org/10.12659/msm.928403>.

CHING, Mc Millan; READER, Jocelyn; FULTON, Amy M.. Eicosanoids in Cancer: prostaglandin e2 receptor 4 in cancer therapeutics and immunotherapy. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 11, n. 819, p. 1-6, 29 maio 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2020.00819>.

Dias, M.S.; P.V. Junior, E., Santos, B.C.dos., Martins, F.A., Almeida, P.M. de; Peron, A.P., 2021. Cytogenotoxicity and protective effect of piperine and capsaicin on meristematic cells of *Allium cepa* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 93, 15-2021. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765202120201772>.

EKIERT, Halina Maria; SZOPA, Agnieszka. Biological Activities of Natural Products. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 23, p. 5769, 7 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25235769>.

ELIMAM, Diaaeldin M.; ELGAZAR, Abdullah A.; EL-SENDUNY, Fardous F.; EL-DOMANY, Ramadan A.; A BADRIA, Farid; ELDEHNA, Wagdy M.. Natural inspired piperine-based ureas and amides as novel antitumor agents towards breast cancer. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 39-50, 11 dez. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14756366.2021.1988944>.

ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 495-516, jun. 2007. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1080/01926230701320337>.

ELMUSRATI, Areeg; WANG, Justin; WANG, Cun-Yu. Tumor microenvironment and immune evasion in head and neck squamous cell carcinoma. **International Journal Of Oral Science**, [S.L.], v. 13, n. 1, 2 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41368-021-00131-7>.

EVANS, Levi W.; STRATTON, Matthew S.; FERGUSON, Bradley S.. Dietary natural products as epigenetic modifiers in aging-associated inflammation and disease. **Natural Product Reports**, [S.L.], v. 37, n. 5, p. 653-676, 2020. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c9np00057g>.

FAN, Yangyang; WANG, Ying; LIU, Feifei; WANG, Haili; LI, Qiumin. SEC61G Promotes Cervical Cancer Proliferation by Activating MAPK Signaling Pathway. **Disease Markers**, [S.L.], v. 2022, p. 1-8, 31 ago. 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/7016079>.

FENG, Xiaojia; SONG, Zaozhi; HUANG, Qihui; JIA, Jianguang; ZHANG, Lingmei; ZHU, Mengqi; QIAN, Jun. AIM2 Promotes Gastric Cancer Cell Proliferation via the MAPK Signaling Pathway. **Journal Of Healthcare Engineering**, [S.L.], v. 2022, p. 1-9, 7 abr. 2022.

Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/8756844>.

FERREIRA, Rafael Carlos; BATISTA, Tatianne Mota; DUARTE, Sâmia Sousa; SILVA, Daiana Karla Frade; LISBOA, Thaís Mangeon Honorato; CAVALCANTI, Raquel Fragoso Pereira; LEITE, Fagner Carvalho; MANGUEIRA, Vivianne Mendes; SOUSA, Tatyanna Kélvia Gomes de; ABRANTES, Renata Albuquerque de. A novel piperine analogue exerts in vivo antitumor effect by inducing oxidative, antiangiogenic and immunomodulatory actions. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 128, p. 110247, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110247>.

FLOEGE, Jürgen; LÜSCHER, Bernhard; MÜLLER-NEUEN, Gerhard. Cytokines and inflammation. **European Journal Of Cell Biology**, [S.L.], v. 91, n. 6-7, p. 427, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.01.003>.

FONSECA, Leonardo Marques da; SILVA, Lucas Rodrigues Jacques da; REIS, Jhenifer Santos dos; SANTOS, Marcos André Rodrigues da Costa; CHAVES, Victoria de Sousa; COSTA, Kelli Monteiro da; SA-DINIZ, Julliana de Nazareth; LIMA, Celio Geraldo Freire de; MORROT, Alexandre; FRANKLIN, Tatiany Nunes. Piperine Inhibits TGF- β Signaling Pathways and Disrupts EMT-Related Events in Human Lung Adenocarcinoma Cells. **Medicines**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 19, 8 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/medicines7040019>.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, Laura; GARCÍA-ORTEGA, María Belén; RUIZ-ALCALÁ, Gloria; CARRILLO, Esmeralda; MARCHAL, Juan Antonio; GARCÍA, María Ángel. The p38 MAPK Components and Modulators as Biomarkers and Molecular Targets in Cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 370, 29 dez. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23010370>.

GORADEL, Nasser Hashemi; NAJAFI, Masoud; SALEHI, Eniseh; FARHOOD, Bagher; MORTEZAEE, Keywan. Cyclooxygenase-2 in cancer: a review. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 234, n. 5, p. 5683-5699, 20 out. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.27411>.

GREENSHIELDS, Anna L.; DOUCETTE, Carolyn D.; SUTTON, Kimberly M.; MADERA, Laurence; ANNAN, Henry; YAFFE, Paul B.; KNICKLE, Allison F.; DONG, Zhongmin; HOSKIN, David W.. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 357, n. 1, p. 129-140, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.017>.

GRETEN, Florian R.; GRIVENNIKOV, Sergei I.. Inflammation and Cancer: triggers, mechanisms, and consequences. **Immunity**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 27-41, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>.

GRINEVICIUS, Valdelúcia Maria Alves de Souza; KVIECINSKI, Maicon Roberto; MOTA, Nádia Sandrini Ramos Santos; OURIQUE, Fabiana; CASTRO, Luiza Sheyla Evanni Porfirio Will; ANDREGUETTI, Rafaela Rafognato; CORREIA, João Francisco Gomes; WILHEM FILHO, Danilo; PICH, Claus Tröger; PEDROSA, Rozangela Curi. Piper nigrum ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 189, p. 139-147, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.020>.

HIBINO, Sana; KAWAZOE, Tetsuro; KASAHARA, Hidenori; ITOH, Shinji; ISHIMOTO, Takatsugu; SAKATA-YANAGIMOTO, Mamiko; TANIGUCHI, Koji. Inflammation-Induced Tumorigenesis and Metastasis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 11, p. 5421, 21 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22115421>.

HORTON, Joshua D.; KNOCHELMANN, Hannah M.; DAY, Terry A.; PAULO, Chrystal M.; NESKEY, David M.. Immune Evasion by Head and Neck Cancer: foundations for combination therapy. **Trends In Cancer**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 208-232, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trecan.2019.02.007>.

HUANG, Chunli; LIU, Jifeng. Identification of the Immune Cell Infiltration Landscape in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSC) for the Exploration of Immunotherapy and Prognosis. **Genetics Research**, [S.L.], v. 2022, p. 1-15, 28 dez. 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/6880760>.

IDIIATULLINA, Elina; AL-AZAB, Mahmoud; WALANA, Williams; PAVLOV, Valentin; LIU, Bingrong. EnDuo, a novel derivative of Endostar, inhibits the migration of colon cancer cells, suppresses matrix metalloproteinase-2/9 expression and impedes AKT/ERK activation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 134, p. 111136, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111136>.

INGLEHART, Ronald C.; SCANLON, Christina S.; D'SILVA, Nisha J.. Reviewing and reconsidering invasion assays in head and neck cancer. **Oral Oncology**, [S.L.], v. 50, n. 12, p. 1137-1143, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.09.010>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>. Acesso em: 25 outubro de 2023.

JAFRI A, SIDDIQUI S, RAIS J, AHMAD MS, KUMAR S, JAFAR T, AFZAL M, ARSHAD M. Induction of apoptosis by piperine in human cervical adenocarcinoma via ROS mediated mitochondrial pathway and caspase-3 activation. **EXCLI J**. 2019 Mar 13;18:154-164. doi: 10.17179/excli2018-1928. PMID: 31217779; PMCID: PMC6558508.

JEONG, Somi; JUNG, Seunghwa; PARK, Gyun-Seok; SHIN, Juhyun; OH, Jae-Wook. Piperine synergistically enhances the effect of temozolomide against temozolomide-resistant human glioma cell lines. **Bioengineered**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 791-800, 1 jan. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21655979.2020.1794100>.

JIANG, Hanfang; LI, Huiping. Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Bmc Cancer**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-13, 10 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-021-07860-2>.

JIN, Kaipeng; QIAN, Chao; LIN, Jinti; LIU, Bing. Cyclooxygenase-2-Prostaglandin E2 pathway: a key player in tumor-associated immune cells. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 13, 27 jan. 2023. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2023.1099811>.

JOHNSON, Daniel E.; BURTNESS, Barbara; LEEMANS, C. René; LUI, Vivian Wai Yan; BAUMAN, Julie E.; GRANDIS, Jennifer R.. Head and neck squamous cell carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 6, n. 1, 26 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>.

KFOURI, S. A. *et al.* Fraction of head and neck cancer attributable to tobacco and alcohol in cities of three Brazilian regions. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, v. 21, p. e180005, 2018.

KIM, Eun Kyung; CHOI, Eui-Ju. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) – Molecular Basis Of Disease**, [S.L.], v. 1802, n. 4, p. 396-405, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>.

KIM, Hyung Gyun; HAN, Eun Hee; JANG, Woo-Seok; CHOI, Jae Ho; KHANAL, Tilak; PARK, Bong Hwan; TRAN, Thu Phuong; CHUNG, Young Chul; JEONG, Hye Gwang. Piperine inhibits PMA-induced cyclooxygenase-2 expression through downregulating NF- κ B, C/EBP and AP-1 signaling pathways in murine macrophages. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 50, n. 7, p. 2342-2348, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.024>.

KOLAWOLE, Oluwafunke R.; KASHFI, Khosrow. NSAIDs and Cancer Resolution: new paradigms beyond cyclooxygenase. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 1432, 27 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23031432>.

KUMARI, Neha; BANSAL, Saurabh. Arginine depriving enzymes: applications as emerging therapeutics in cancer treatment. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, [S.L.], v. 88, n. 4, p. 565-594, 26 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-021-04335-w>.

LAN, Xiang-Yun; CHUNG, Tzu-Ting; HUANG, Chien-Ling; LEE, Yi-Jang; LI, Wan-Chun. Traditional Herbal Medicine Mediated Regulations during Head and Neck Carcinogenesis. **Biomolecules**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1321, 15 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom10091321>.

LANDSKRON, Glauben; LAFUENTE, Marjorie de; THUWAJIT, Peti; THUWAJIT, Chanitra; HERMOSO, Marcela A.. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. **Journal Of Immunology Research**, [S.L.], v. 2014, p. 1-19, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/149185>.

LI, Guangxing; DING, Kaiyue; QIAO, Yanling; ZHANG, Liu; ZHENG, Luping; PAN, Taowen; ZHANG, Lin. Flavonoids Regulate Inflammation and Oxidative Stress in Cancer. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 23, p. 5628, 30 nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25235628>.

LI, Jiang; WU, Tan; SONG, Kai; ZHU, Lina; WANG, Yijuan; CHEN, Tingting; WANG, Xin. Integrative network analysis reveals subtype-specific long non-coding RNA regulatory mechanisms in head and neck squamous cell carcinoma. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, [S.L.], v. 21, p. 535-549, 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2022.12.030>.

LI, Shuangshuang; JIANG, Min; WANG, Lu; YU, Shuwen. Combined chemotherapy with cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in treating human cancers: recent advancement. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 129, p. 110389, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110389>.

LIM, Jae Sung; LEE, Da Young; LIM, Ju Hyeon; OH, Won Keun; PARK, Jun Tae; PARK, Sang Chul; A CHO, Kyung. Piperine: an anticancer and senostatic drug. **Frontiers In Bioscience-Landmark**, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 137, 20 abr. 2022. IMR Press. <http://dx.doi.org/10.31083/j.fbl2704137>.

LIU, Chang; WANG, Min; ZHANG, Haiyang; LI, Chunyan; ZHANG, Tianshou; LIU, Hong; ZHU, Song; CHEN, Jie. Tumor microenvironment and immunotherapy of oral cancer. **European Journal Of Medical Research**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 197-198, 8 out. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40001-022-00835-4>.

LIU, Chao; CHU, Dewei; KALANTAR-ZADEH, Kourosh; GEORGE, Jacob; YOUNG, Howard A.; LIU, Guozhen. Cytokines: from clinical significance to quantification. **Advanced Science**, [S.L.], v. 8, n. 15, p. 2004433, 10 jun. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/advs.202004433>.

LU, Yanxin; LIU, Yang; YANG, Chunzhang. Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. **Journal Of Visualized Experiments**, [S.L.], n. 128, 11 out. 2017. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/56450>.

MAIK-RACHLINE, Galia; HACOHEEN-LEV-RAN, Avital; SEGER, Rony. Nuclear ERK: mechanism of translocation, substrates, and role in cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 1194, 8 mar. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20051194>.

MANZANO-MORENO, Francisco Javier; COSTELA-RUIZ, Victor J.; GARCÍA-RECIO, Enrique; OLMEDO-GAYA, Maria Victoria; RUIZ, Concepción; REYES-BOTELLA, Candelaria. Role of Salivary MicroRNA and Cytokines in the Diagnosis and Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 22, p. 12215, 11 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222212215>.
MASSAGUÉ, Joan; GANESH, Karuna. Metastasis-Initiating Cells and Ecosystems. **Cancer Discovery**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 971-994, 1 abr. 2021. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-0010>.

MIRANDA-GALVIS, Marisol; LOVELESS, Reid; KOWALSKI, Luiz Paulo; TENG, Yong. Impacts of Environmental Factors on Head and Neck Cancer Pathogenesis and Progression. **Cells**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 389, 13 fev. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells10020389>.

NAEEM, Abid; HU, Pengyi; YANG, Ming; ZHANG, Jing; LIU, Yali; ZHU, Weifeng; ZHENG, Qin. Natural Products as Anticancer Agents: current status and future perspectives. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 23, p. 8367, 30 nov. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27238367>.

NEAGU, Monica; CONSTANTIN, Carolina; POPESCU, Iulia Dana; ZIPETO, Donato; TZANAKAKIS, George; NIKITOVIC, Dragana; FENGA, Concettina; STRATAKIS,

Constantine A.; SPANDIDOS, Demetrios A.; TSATSAKIS, Aristidis M.. Inflammation and Metabolism in Cancer Cell—Mitochondria Key Player. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 9, p. 1-15, 14 maio 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2019.00348>.

OZKAN, Erva; BAKAR-ATES, Filiz. The Trinity of Matrix Metalloproteinases, Inflammation, and Cancer: a literature review of recent updates. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 206-221, 3 set. 2020. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1871523018666191023141807>.

PRABHAKARAN, Jaya; MOLOTKOV, Andrei; MINTZ, Akiva; MANN, J. John. Progress in PET Imaging of Neuroinflammation Targeting COX-2 Enzyme. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 11, p. 3208, 27 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26113208>.

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**. 2019 Nov-Dec;24(6):2316-2321.

RAJ, Sibi; KESARI, Kavindra Kumar; KUMAR, Arun; RATHI, Brijesh; SHARMA, Ashok; GUPTA, Piyush Kumar; JHA, Saurabh Kumar; JHA, Niraj Kumar; SLAMA, Petr; ROYCHOUDHURY, Shubhadeep. Molecular mechanism(s) of regulation(s) of c-MET/HGF signaling in head and neck cancer. **Molecular Cancer**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-16, 26 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-022-01503-1>.

RAJARAJAN, Dheeran; NATESH, Jagadish; PENTA, Dhanamjai; MEERAN, Syed Musthapa. Dietary Piperine Suppresses Obesity-Associated Breast Cancer Growth and Metastasis by Regulating the miR-181c-3p/PPAR α Axis. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 69, n. 51, p. 15562-15574, 15 dez. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05670>.

RAKOFF-NAHOUM S. Why cancer and inflammation? **Yale J Biol Med**. 2006 Dec;79(3-4):123-30. PMID: 17940622; PMCID: PMC1994795.

SHENG, Juan; SUN, Hong; YU, Fu-Bing; LI, Bo; ZHANG, Yuan; ZHU, Ying-Ting. The Role of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Cancer. **International Journal Of Medical Sciences**, [S.L.], v. 17, n. 8, p. 1095-1101, 2020. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/ijms.44439>.

SI, Lihui; YANG, Ruiqi; LIN, Ruixin; YANG, Shuli. Piperine functions as a tumor suppressor for human ovarian tumor growth via activation of JNK/p38 MAPK-mediated intrinsic apoptotic pathway. **Bioscience Reports**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 1, 31 maio 2018. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bsr20180503>.

SINGH, Vishakha; RAM, Mahendra; KUMAR, Rajesh; PRASAD, Raju; ROY, Birendra Kumar; SINGH, Kaushal Kumar. Phosphorylation: implications in cancer. **The Protein Journal**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 1-6, 20 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10930-017-9696-z>.

SINGH, Nitin; BABY, Deepak; RAJGURU, Jagadishprasad; PATIL, Pankajb; THAKKANNAVAR, Savitas; PUJARI, Veenabhojaraj. Inflammation and cancer. **Annals Of African Medicine**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 121, 2019. Medknow. http://dx.doi.org/10.4103/aam.aam_56_18.

SONG, Xin-Da; WANG, Ya-Ni; ZHANG, Ai-Li; LIU, Bin. Advances in research on the interaction between inflammation and cancer. **Journal Of International Medical Research**, [S.L.], v. 48, n. 4, p. 030006051989534, 29 dez. 2019. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0300060519895347>.

SONG, Lingyu; WANG, Yan; ZHEN, Yunhuan; LI, Dengke; HE, Xidong; YANG, Hong; ZHANG, Huayang; LIU, Qi. Piperine inhibits colorectal cancer migration and invasion by regulating STAT3/Snail-mediated epithelial–mesenchymal transition. **Biotechnology Letters**, [S.L.], v. 42, n. 10, p. 2049-2058, 4 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-020-02923-z>.

STARSKA-KOWARSKA, Katarzyna. Dietary Carotenoids in Head and Neck Cancer—Molecular and Clinical Implications. **Nutrients**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 531, 26 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu14030531>.

TRIPATHI, Amit Kumar; RAY, Anup Kumar; MISHRA, Sunil Kumar. Molecular and pharmacological aspects of piperine as a potential molecule for disease prevention and management: evidence from clinical trials. **Beni-Suef University Journal Of Basic And Applied Sciences**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-24, 28 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s43088-022-00196-1>.

TUDOR, Diana Valentina; BÂLDEA, Ioana; LUPU, Mihai; KACSO, Teodor; KUTASI, Eniko; HOPÂRTEAN, Andreea; STRETEA, Roland; FILIP, Adriana Gabriela. COX-2 as a potential biomarker and therapeutic target in melanoma. **Cancer Biology And Medicine**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 20-31, 2020. China Anti-cancer Association. <http://dx.doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0339>.

TURRINI, Eleonora; SESTILI, Piero; FIMOIGNARI, Carmela. Overview of the Anticancer Potential of the “King of Spices” Piper nigrum and Its Main Constituent Piperine. **Toxins**, [S.L.], v. 12, n. 12, p. 747, 26 nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins12120747>.

VIANA, Mariana N.; LEIGUEZ, Elbio; GUTIÉRREZ, José M.; RUCAVADO, Alexandra; MARKUS, Regina P.; MARÇOLA, Marina; TEIXEIRA, Catarina; FERNANDES, Cristina M.. A representative metalloprotease induces PGE2 synthesis in fibroblast-like synoviocytes via the NF-κB/COX-2 pathway with amplification by IL-1β and the EP4 receptor. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-15, 24 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-59095-z>.

VISSER, Karin E. de; JOYCE, Johanna A.. The evolving tumor microenvironment: from cancer initiation to metastatic outgrowth. **Cancer Cell**, [S.L.], v. 41, n. 3, p. 374-403, mar. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>.

WANG, Qiuxia; FENG, Jianguo; TANG, Liling. Non-Coding RNA Related to MAPK Signaling Pathway in Liver Cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v.

23, n. 19, p. 11908, 7 out. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms231911908>.

WOJTOWICZ, Karolina; STERZYŃSKA, Karolina; ŚWIERCZEWSKA, Monika; NOWICKI, Michał; ZABEL, Maciej; JANUCHOWSKI, Radosław. Piperine Targets Different Drug Resistance Mechanisms in Human Ovarian Cancer Cell Lines Leading to Increased Sensitivity to Cytotoxic Drugs. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 8, p. 4243, 19 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22084243>.

YAFFE, Paul B.; COOMBS, Melanie R. Power; DOUCETTE, Carolyn D.; WALSH, Mark; HOSKIN, David W.. 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**, [S.L.], v. 54, n. 10, p. 1070-1085, 13 maio 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mc.22176>.

YAFFE, Paul B.; DOUCETTE, Carolyn D.; WALSH, Mark; HOSKIN, David W.. Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. **Experimental And Molecular Pathology**, [S.L.], v. 94, n. 1, p. 109-114, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.10.008>.

ZADOROZHNA, Mariia; TATARANNI, Tiziana; MANGIERI, Domenica. Piperine: role in prevention and progression of cancer. **Molecular Biology Reports**, [S.L.], v. 46, n. 5, p. 5617-5629, 4 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-019-04927-z>.

Zhai, W.,J., Zhang, Z.B., Xu, N.N., Guo, Y.F., Qiu, C., Li, C.Y., Deng, G.Z., Guo, M.Y., 2016. Piperine Plays an Anti-Inflammatory Role in Staphylococcus aureus Endometritis by Inhibiting Activation of NF- κ B and MAPK Pathways in Mice. Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine. 1-10. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8597208>.

ZAPPAVIGNA, Silvia; COSSU, Alessia Maria; GRIMALDI, Anna; BOCCHETTI, Marco; FERRARO, Giuseppe Andrea; NICOLETTI, Giovanni Francesco; FILOSA, Rosanna; CARAGLIA, Michele. Anti-Inflammatory Drugs as Anticancer Agents. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 7, p. 2605, 9 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21072605>.

ZENG, Yuan; YANG, Ying. Piperine depresses the migration progression via downregulating the Akt/mTOR/MMP-9 signaling pathway in DU145 cells. **Molecular Medicine Reports**, [S.L.], p. 1, 28 fev. 2018. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2018.8653>.

ZHANG, Caiyun; LI, Chao; ZHU, Minhui; ZHANG, Qingzhou; XIE, Zhenghua; NIU, Gang; SONG, Xicheng; JIN, Lei; LI, Guojun; ZHENG, Hongliang. Meta-Analysis of MMP2, MMP3, and MMP9 Promoter Polymorphisms and Head and Neck Cancer Risk. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 1, 24 abr. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0062023>.

ZHANG, Xiao; YAN, Keqin; DENG, Lin; LIANG, Jing; LIANG, Haiyan; FENG, Dingqing; LING, Bin. Cyclooxygenase 2 Promotes Proliferation and Invasion in Ovarian Cancer Cells via the PGE2/NF- κ B Pathway. **Cell Transplantation**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 1-13, dez. 2019. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0963689719890597>.