

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 09/12/2027.



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

Lucas Francisco Zanusso Cunha

**Efeito antitumoral e anti-inflamatório da nanopiperina em células de
câncer de cabeça e pescoço**

São José do Rio Preto
2025

Lucas Francisco Zanusso Cunha

Avaliação da atividade antitumoral e anti-inflamatória da nanopiperina em células de câncer de cabeça e pescoço

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

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

São José do Rio Preto
2025

Cunha, Lucas Francisco Zanusso

Avaliação da atividade antitumoral e anti-inflamatória da
nanopiperina em células de câncer de cabeça e pescoço/
Lucas Francisco Zanusso cunha. -- São José do Rio
Preto, 2025

44p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Flavia Cristina Rodrigues Lisoni

1. Biologia molecular. 2. Câncer. 3. Inflamação. I. Título.

CDU C972a

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta pesquisa pode contribuir para o desenvolvimento de um tratamento adjuvante para o câncer de cabeça e pescoço, baseado em um composto com propriedades anti-inflamatórias e menor toxicidade para as células saudáveis em comparação às terapias atualmente empregadas, o que pode resultar em menos efeitos colaterais. Os resultados obtidos indicam que a nanopiperina apresenta potencial terapêutico relevante ao modular vias inflamatórias e migratórias, reduzir a viabilidade e a proliferação celular e aumentar a taxa apoptótica de células tumorais, contribuindo para a diminuição da progressão tumoral. Esses achados fornecem uma base científica sólida para futuras investigações *in vivo* e abordagens translacionais, reforçando o potencial da nanotecnologia como aliada no tratamento de neoplasias resistentes.

POTENTIAL IMPACTS OF THIS RESEARCH

This research may contribute to the development of a complementary treatment for head and neck cancer, based on a compound with anti-inflammatory properties and lower toxicity to healthy cells compared to currently used therapies, which may result in fewer side effects. The results obtained indicate that nanopipeline has relevant therapeutic potential by modulating inflammatory and migratory pathways, reducing cell viability and proliferation, and increasing the apoptotic rate of tumor cells, contributing to the reduction of tumor progression. These findings provide a solid scientific basis for future *in vivo* investigations and translational approaches, reinforcing the potential of nanotechnology as an ally in the treatment of resistant neoplasms.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida, pela sabedoria e pela força concedida em todos os momentos desta jornada. Agradeço por mais essa vitória!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e aos professores que o compõem, pela oportunidade concedida e por possibilitarem a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela bolsa permanência, que foi crucial para a finalização deste projeto em suas etapas finais.

Ao Departamento de Ciências Biológicas deste instituto, aos técnicos que o compõem e a todos os funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação, pela atenção, apoio e colaboração.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, pela orientação, paciência, confiança e por sempre incentivar o pensamento crítico e científico.

Ao Prof. Dr. Fernando Lucas Primo, da UNESP de Araraquara, e a todos os colaboradores de seu laboratório, pela dedicação na síntese e concessão da nanopiperina utilizada neste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Fátima Pereira de Souza, do Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, e a todos os integrantes de seu laboratório, pela gentileza em ceder as alíquotas da linhagem celular HEP-2 utilizadas neste estudo.

A todos os colegas do Laboratório de Imunomorfologia, pela ajuda nas longas horas de experimentos, pelas discussões produtivas e por contribuírem com um ambiente colaborativo e acolhedor.

À minha família, pelo amor incondicional, pela paciência nos momentos de estresse e por acreditarem em mim mesmo quando eu duvidava. Aos amigos de infância, pela leveza e apoio em todos os momentos, essenciais para recarregar as energias.

A todos os colegas que conheci ao longo desses anos no IBILCE, pelo incentivo, pelas trocas e por contribuírem com a minha formação de diferentes maneiras.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) é uma doença genética causada por mutações em células somáticas, cujo desenvolvimento é influenciado por fatores ambientais e inflamatórios. O gene da prostaglandina endoperóxido sintetase 2 (*PTGS2*) é um dos principais reguladores inflamatórios e frequentemente encontra-se superexpresso em tumores de HNSCC resistentes e reincidentes, mesmo em pacientes tratados com a quimioterapia convencional, estando associado com metástase e progressão tumoral. A piperina é um agente regulador dessa via inflamatória, com perfil mais seguro em relação aos anti-inflamatórios convencionais, aminoalcaloide natural com conhecida atividade antitumorigênica e antimetastática. No entanto, a piperina é altamente hidrofóbica e por isso possui baixa biodisponibilidade, o que pode ser melhorado com a utilização de nanotecnologia. Assim, o objetivo do estudo foi analisar o efeito de nanopartículas de poli ácido lático-co-ácido glicólico (PLGA), carregadas com piperina (nanopiperina), como um possível agente antitumoral e anti-inflamatório, em linhagens celulares de HNSCC. Para isso, linhagens de células tumorigênicas HEP-2 e CAL27 foram tratadas com nanopiperina, isoladamente ou em combinação com cisplatina, por 4, 24 e 48 horas e submetidas às análises celulares e moleculares, incluindo ensaios de avaliação da morfologia, proliferação, viabilidade, migração celular, citotoxicidade apoptose e expressão gênica. Os resultados obtidos sugerem que a nanopiperina promoveu alterações morfológicas, a partir de 85 μ M, com redução de citoplasmas e aumento do núcleo, além de um efeito antiproliferativo após 24 horas de tratamento, inclusive em conjunto com a cisplatina. Foram observados sinais morfológicos de morte celular, como formação de bolhas na membrana (*blebs*) e diminuição do tamanho celular, e confirmada por citômetro de fluxo, com até 20% das células em apoptose final. Os resultados também sugerem uma diminuição no processo de migração celular quando as células foram tratadas com a nanopiperina, associada a redução na expressão dos genes *MMP-2* e *PTGS2*. Em conjunto, nossos dados mostram que a nanopiperina tem efeito antiproliferativo, antimigratório e anti-inflamatório, podendo ser um fármaco com potencial para o tratamento complementar do carcinoma de cabeça e pescoço, abrindo novas possibilidades para terapias inovadoras nessa doença.

Palavras-chave: Inflamação, Nanopartículas, Cultura de células, Piperina, HNSCC.

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a genetic disease, but environmental and inflammatory factors also play a role in its development. The prostaglandin endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene is the main inflammatory regulator and is often overexpressed in resistant and recurrent HNSCC tumors, even when treated with conventional chemotherapy, and is associated with metastasis and tumor progression. Another regulatory agent of this inflammatory pathway, with a safer profile than conventional anti-inflammatory drugs, is piperine, a natural aminoalkaloid with known antitumorigenic and antimetastatic activity. However, piperine is highly hydrophobic and therefore has low bioavailability, which can be improved with the use of nanotechnology. Thus, the objective of the study was to analyze the effect of PLGA nanoparticles loaded with piperine (nanopiperine) as a possible antitumor and anti-inflammatory agent in HNSCC. For this purpose, HEp-2 and CAL27 tumorigenic cell lines were treated with nanopiperine, alone or in combination with cisplatin, for 4, 24, and 48 hours and subjected to cellular and molecular analyses, including assays to evaluate morphology, proliferation, viability, and cell migration, cytotoxicity, and apoptosis. The results suggest that nanopiperine promoted morphological changes at concentrations above 85 μ M, with a reduction in cytoplasm and an increase in nucleus size, as well as an antiproliferative effect after 24 hours of treatment, including in combination with cisplatin. Morphological signs of cell death were observed, such as membrane blebbing and decreased cell size, and confirmed by flow cytometry, with up to 20% of cells in terminal apoptosis. The results also suggest a decrease in the cell migration process when cells were treated with nanopiperine, due to changes in *MMP-2* gene expression and anti-inflammatory activity through suppression of the *PTGS2* gene. Together, our data show that nanopiperine has antiproliferative, antimigratory, and anti-inflammatory effects and may be a herbal medicine with potential for the complementary treatment of head and neck carcinoma, opening up new possibilities for innovative therapies for this disease.

Keywords: Inflammation, Nanoparticles, Cell culture, Piperine, HNSCC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Via PTGS2 e receptores.

Figura 2 - Processo metastático.

Figura 3 - Método de obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação.

Figura 4 - Alteração na morfologia da linhagem celular HEp-2.

Figura 5 - Alteração na morfologia da linhagem celular CAL-27.

Figura 6 - Proliferação celular nas linhagens HEp-2 e CAL-27.

Figura 7 - Viabilidade celular nas linhagens HEp-2 e CAL-27.

Figura 8 - Migração Transwell na linhagem HEp-2.

Figura 9: Migração Transwell na linhagem CAL-27

Figura 9 - Apoptose nas linhagens celulares HEp-2 e CAL-27.

Figura 10 - Densitometria sobre apoptose nas linhagens celulares HEp-2 e CAL-27.

Figura 11: Gráficos sobre níveis de expressão gênica nas linhagens celulares HEp-2 e CAL-27, em relação a Nano Vazia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados na PCR em tempo real (RT-qPCR)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína Quinase B
ANXA5	Anexina A5
ARF3	Proteína G relacionada ao ARF
AP-1	Proteína Ativadora 1
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato Cíclico
BCL-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
BAX	Proteína X associada a BCL-2
CAL-27	Linhagem celular de células escamosas de língua
cDNA	DNA complementar
CO₂	Dióxido de Carbono
COX-2	Ciclooxigenase-2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EP4	Receptor 4 da Prostaglandina E2
ERK	Quinases Reguladas por Sinais Extracelulares
GSK-3B	Glicogênio Sintetase Quinase 3 beta
HEp-2	Linhagem celular de células escamosas de laringe
HeLa	Linhagem celular de adenocarcinoma de colo de útero
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
IFN-γ	Interferon gama
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-8	Interleucina 8
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional de Câncer
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
KB	Linhagem celular de adenocarcinoma de colo de útero
MAPK	Proteína quinase Ativada por Mitógeno
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos-1
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase de Matriz
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2

MMP-9	Metaloproteínase de matriz 9
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Alvo da Rapamicina em mamífero
MTS	CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay
NF-κB	Fator Nuclear Kappa Beta
P38	Proteína quinase ativada por mitógeno 38
p53	Proteína quinase ativada por mitógeno 53
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PKA	Proteína quinase A
PLA2	Fosfolipase A2
PGE2	Prostaglandina E2
PGH2	Prostaglandina H2
PI3K	fosfoinositol 3-quinase
PLGA	Poly (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PTGE2	Prostaglandina E2
PTGER1	Receptor 1 da Prostaglandina E2
PTGER2	Receptor 2 da Prostaglandina E2
PTGER3	Receptor 3 da Prostaglandina E2
PTGER4	Receptor 4 da Prostaglandina E2
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF-β	Fator de Transformação de Crescimento Beta
Src	Quinase intracelular
STAT3	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3
TIMP-1	Inibidor Tecidual de Metaloproteinases 1
TIMP-2	Inibidor Tecidual de Metaloproteinases 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VEGF	Fator de Crescimento Endotélial Vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
L	Litro
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mM	Micromolar
mV	Microvolts
μL	Microlitro
μm	Micrometros
μM	Micromolar
nm	Nanômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Nanopiperina	23
3.2 Tratamentos	24
3.3 Modelo in vitro para análises celulares e moleculares	24
3.4 Cultivo e análise da morfologia celular	24
3.4 Proliferação celular	24
3.4 Ensaio de Citotoxicidade e Viabilidade Celular	25
3.5 Ensaio de Migração Celular	25
3.6 Análise de Apoptose por Citometria de Fluxo	26
3.7. Extração e Quantificação de RNA e confecção de cDNA	26
3.8 Análise de Expressão Gênica por PCR Quantitativo	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Nanopiperina altera a morfologia celular	27
4.2 Nanopiperina altera a proliferação celular	29
4.3 Nanopiperina Diminui a Viabilidade Celular	29
4.4 Nanopiperina apresentou efeito anti-migratório	31
4.5 Nanopiperina levou as células à apoptose	32
4.6 Nanopiperina regulou a expressão gênica	34
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	44
7 REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE A - Características de encapsulamento da piperina	54

1 INTRODUÇÃO

O câncer engloba uma variedade de doenças causadas principalmente por mutações somáticas em genes que regulam processos celulares fundamentais, como a proliferação celular, apoptose (morte celular programada), reparo do DNA e alterações epigenéticas, incluindo a metilação do DNA e modificações nas histonas. Essas modificações alteram as funções normais das células, resultando no descontrole do ciclo celular, aumento da proliferação desordenada e inibição da apoptose, processos cruciais para o desenvolvimento e progressão de neoplasias (MBEMI, *et al.*, 2020). O desequilíbrio dos processos habituais de multiplicação e morte celular são viabilizados por mutações em genes responsáveis pela regulação do ciclo celular, como os oncogenes e os genes supressores de tumor (SHAIKH *et al.*, 2021). A função prejudicada dos transcritos gerados por esses genes resulta em instabilidade genômica, que se acumula e se propaga durante a divisão celular levando ao surgimento do fenótipo maligno das células tumorais e o mantém em células descendentes (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Embora o câncer seja uma doença intimamente relacionada a alterações genômicas e epigenéticas somáticas, a maior parte dos tumores deriva de eventos adquiridos ao longo da vida, frequentemente modulados por inflamação, exposições ambientais e fatores comportamentais (COUSSENS; WERB, 2002).

Cada célula de um neoplasma utiliza essas mutações herdadas para adquirir características malignas, tais como: sinalização contínua de proteínas proliferativas, inibição de supressores de crescimento, resistência à apoptose, replicação imortal, indução da angiogênese, ativação da invasão e metástase, desregulação metabólica e a capacidade de escapar da destruição mediada por células do sistema imunológico (GYORFFY *et al.*, 2024). À medida em que estas alterações fenotípicas se acumulam, o tumor pode adquirir a capacidade metastática, que se inicia com a invasão das células malignas aos tecidos adjacentes, encontrando vasos linfáticos e sanguíneos, a partir dos quais poderá migrar para regiões distantes do corpo, uma vez que estas células consigam se multiplicar e sobreviver nestes tecidos distintos completa-se o processo metastático (CUI, 2019).

Além da instabilidade genômica, que acelera o desenvolvimento do câncer ao modificar as células internamente, a inflamação crônica desempenha um papel crucial na alteração do microambiente tumoral por promover a síntese e secreção de fatores de crescimento e espécies reativas de oxigênio, contribuindo ainda mais para o progresso da doença (HANAHAHAN, 2022). Nesse contexto, a inflamação atua como uma ferida que não cicatriza, exigindo que as células

se renovem constantemente, acelerando a divisão celular, o que aumenta o risco de mutações e transformação neoplásica. Além disso, o ambiente inflamatório contém agentes que causam danos ao DNA, como detritos da fagocitose, incluindo as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. O ambiente inflamatório também pode contribuir para a progressão do tumor devido a ativação do estroma, liberação de fatores de crescimento, angiogênese e ativação de metaloproteinases de matriz (MMP), para a migração de células imunes ao local da inflamação, e esses efeitos favorecem a proliferação celular e metástase tumoral (NAHAND et al., 2019; COUSSENS, 2002).

Foi relatado que diferentes vias gênicas, mediadores e células inflamatórias são significativamente mais expressos em alguns tipos de câncer, como por exemplo no câncer de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), nesse sentido a resolução dessa inflamação exacerbada torna-se uma maneira de reduzir a progressão tumoral, por intervenção do microambiente (BONOMI et al., 2014; ROMA-RODRIGUES et al., 2019). Em meta-análises mais recentes foi observado que existe relação entre a diminuição de metástases, incidência e reincidência de tumores em pacientes tratados com anti-inflamatórios não esteroidais como terapias complementares ao tratamento convencional, aumentando a sobrevida total dos pacientes (ZHAO et al., 2018; ZAPPAVIGNA et al., 2020).

O HNSCC é o sétimo tipo de câncer mais comum globalmente, contando com mais de 660 mil novos casos e 325 mil mortes anualmente (SUNG *et al.*, 2021). A doença compreende uma variedade de aproximadamente 90% dos tumores malignos que surgem na região da cabeça e pescoço, incluindo os neoplasmas originados na cavidade oral, faringe e laringe (RAO *et al.*, 2023). No tratamento convencional, os estágios iniciais são tratados com cirurgia ou radioterapia, dependendo do acesso e sensibilidade da região, entretanto, como ocorre em mais de 60% dos pacientes com estágios tardios, o tratamento pode incluir altas doses de cisplatina, que assim como outros quimioterápicos possui baixa especificidade atingindo células normais e tumorais, o que torna o tratamento altamente tóxico e com efeitos colaterais evidentes (ADELSTEIN et al. 2017; CHOW, 2020).

A cisplatina é um fármaco baseado em platina, que é capaz de induzir à parada do ciclo celular e consequentemente à apoptose por promover danos ao material genético e induzir ligações cruzadas de nucleotídeo (GHOSH, 2019). Apesar de essenciais para o tratamento do câncer, os quimioterápicos afetam significativamente as células saudáveis do organismo, pois o seu efeito é mais proeminente em células que possuem grande taxa de proliferação, independentemente de serem saudáveis ou não, o que prejudica principalmente células da medula óssea, sistema digestivo e folículos capilares (ALJAMALI et al., 2021), enquanto

outros órgão como rins, fígado e sistema nervoso são prejudicados pelo estresse oxidativo causado pelo tratamento (CAULI, 2021; FRANCISCO et al., 2019; SUN et al., 2019.).

De maneira geral, a toxicidade é causada pela atividade sistêmica e pouco específica dos quimioterápicos, os danos ao DNA e restos apoptóticos liberados afetam as células saudáveis, levando à inflamação (JUTHANI; PUNATAR; MITTRA, 2024). Os quimioterápicos acabam sendo responsáveis por ativar vias de sinalização inflamatórias como COX-2, recentemente chamada de PTGS2, promovendo liberação de citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (IL-1 β , IL-8, IL-6) (KLEIN & LEHMAN, 2021; MITTRA, 2017).

O mesmo ocorre no tratamento com cisplatina, que demonstra estar relacionado com o aumento da inflamação pela fosforilação e ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a partir da cascata de sinalização PI3K/Akt (OHTA et al. 2006). Curiosamente, ao mesmo tempo em que a cisplatina induz a apoptose de células cancerígenas ela também regula positivamente a via da PTGS2. O aumento de PTGS2, por sua vez, é capaz de promover a resistência das células tumorais ao fármaco, por aumentar a expressão de genes relacionados com o crescimento e proliferação celular como fator de crescimento semelhante ao epidermal ligado à heparina (HB-EGF) (YANG *et al.*, 2016). Outras evidências sugerem que existem efeitos sinérgicos entre os quimioterápicos e os agentes anti-inflamatórios não esteroidais (sobretudo celocoxib), que são inibidores da via PTGS2 e são capazes de diminuir a toxicidade dos quimioterápicos possivelmente regulando as enzimas responsáveis pela metabolização (YU *et al.*, 2011) ou sensibilizando as células tumorais para a ação do quimioterápico, pela inibição da via PTGS2 (MAJDAEEN *et al.*, 2015).

Dentre as alternativas de substâncias com potencial terapêutico para o câncer, temos moléculas originadas do metabolismo secundário de vegetais, que são vistas como opções atrativas para o tratamento. Algumas destas são capazes de induzir a parada do ciclo celular, apoptose e angiogênese (KUMAR et al., 2023) ou agir de forma coadjuvante e aliviar os efeitos colaterais dos quimioterápicos, reduzindo náuseas e outros efeitos tóxicos (KATOLKAR & SURANA, 2024), sendo geralmente mais seguros, acessíveis e com menor custo quando comparado com a terapia convencional (ULLAH et al., 2024), como é o caso da piperina.

A piperina (1-piperoilpiperidina) é um amino alcaloide derivado do fruto da *Piper nigrum* (pimenta do reino) e da *Piper longum* (pimenta longa), que vem demonstrando atividade antitumoral e anti-inflamatória (ZADOROZHNA; TATARANNI; MANGIERI, 2019).

A piperina pode ser ingerida sem apresentar efeitos adversos na dose de até cinco miligramas por quilogramas ao dia (EFSA, 2015). Apesar destes valores variarem de acordo

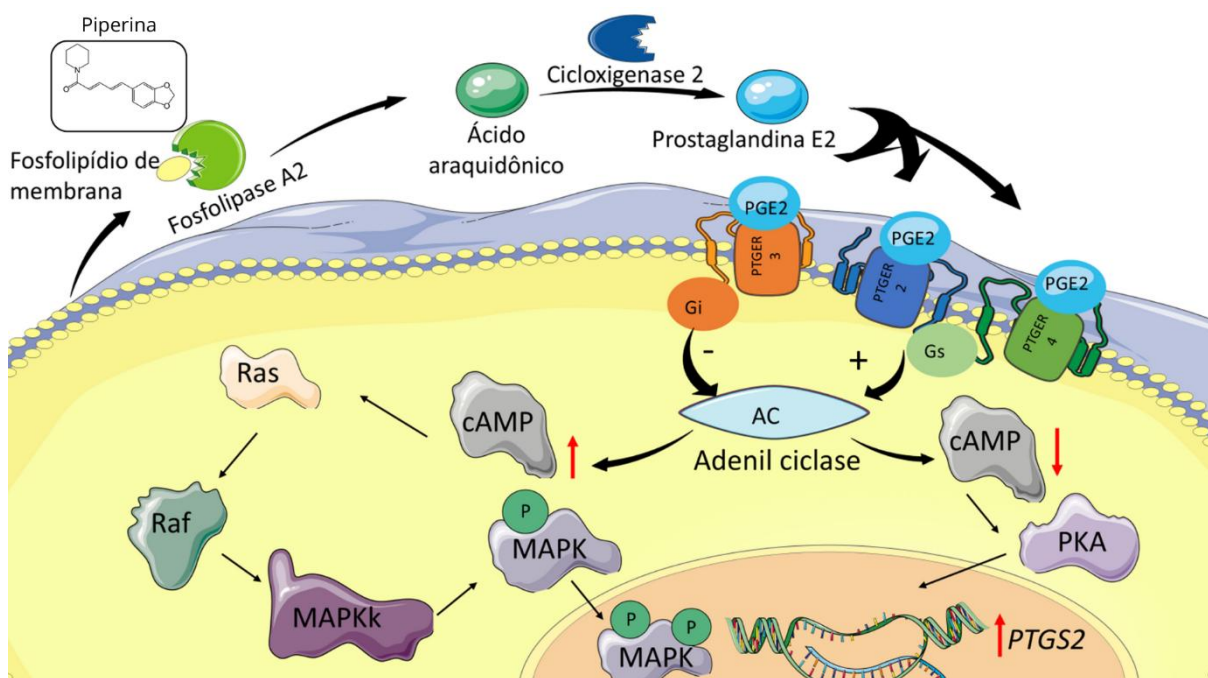
com o mecanismo de entrega do fármaco, os limites de segurança para obter os benefícios farmacêuticos já estão estabelecidos. (HAQ et al. 2020).

Estudos apontam que a piperina pode modular a via de biossíntese da prostaglandina E₂ (PGE₂), que está envolvida em processos de inflamação e progressão tumoral (YING et al., 2013). Além disso, evidências provenientes de modelos de câncer de mama sugerem que a piperina pode potencializar os efeitos da cisplatina, favorecendo a ativação de vias pró-apoptóticas, como o aumento de caspases 3 e 9, p53 e BAX, e a redução de proteínas da família BCL-2 (FATTAH et al., 2019). Embora esses achados não tenham sido amplamente explorados em tumores de cabeça e pescoço, eles indicam um possível mecanismo biológico para investigar combinações semelhantes em HNSCC.

Acredita-se que a piperina tenha propriedades anti-inflamatórias por meio da inibição da enzima fosfolipase A2 (PLA2), que é responsável pela hidrólise de fosfolípidios de membrana, produzindo ácido araquidônico. O ácido araquidônico é convertido em prostaglandina H2 pela enzima cicloxigenase 2 (PTGS2) e, em seguida, é convertido por isomerases específicas em diferentes prostaglandinas, incluindo a prostaglandina E2 (PGE2). A inibição da PLA2 pela piperina pode reduzir a produção de PGE2, resultando em efeitos anti-inflamatórios (YE et al., 2020; COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994). A via PTGS2 aparenta ser regulada negativamente por piperina, em diferentes modelos inflamatórios, como câncer de colo de útero (CARDOSO et al., 2023), isquemia-reperfusão cerebral, condrócitos de osteoartrite humano (YING et al., 2013) e células de queratinócitos humanos após irradiação de UV-B (JAISIN et al., 2020).

A prostaglandina E2 (PGE2), que é o produto dessa biossíntese é um mediador chave na inflamação, suas funções ocorrem a partir de ligação aos seus respectivos receptores acoplados à proteína G presente na membrana, sendo eles PTGER1, PTGER2, PTGER3 e PTGER4, e cada qual sinaliza uma resposta (O'CALLAGHAN; HOUSTON, 2015). Os receptores PTGER2, PTGER3 e PTGER4 quando recebem a ligação de PGE2 contribuem para a tumorigênese mediando aumento da proliferação celular, metástase e angiogênese, na qual PTGER3 atua pela redução de cAMP que ativa a cascata de MAPK, enquanto que PTGER2 e PTGER4 aumenta os níveis de cAMP ativando Adenil ciclase que ativa a proteína quinase A (PKA), tanto a mediação por MAPK quanto por PKA ativam fatores de transcrição no núcleo (NF-κB e AP-1), que desencadeia a transcrição de PTGS2 (PARIDA et al., 2016; SCHMOECKEL et al., 2020), como pode ser observada na Figura 1.

Figura 1: Via PTGS2 e receptores.

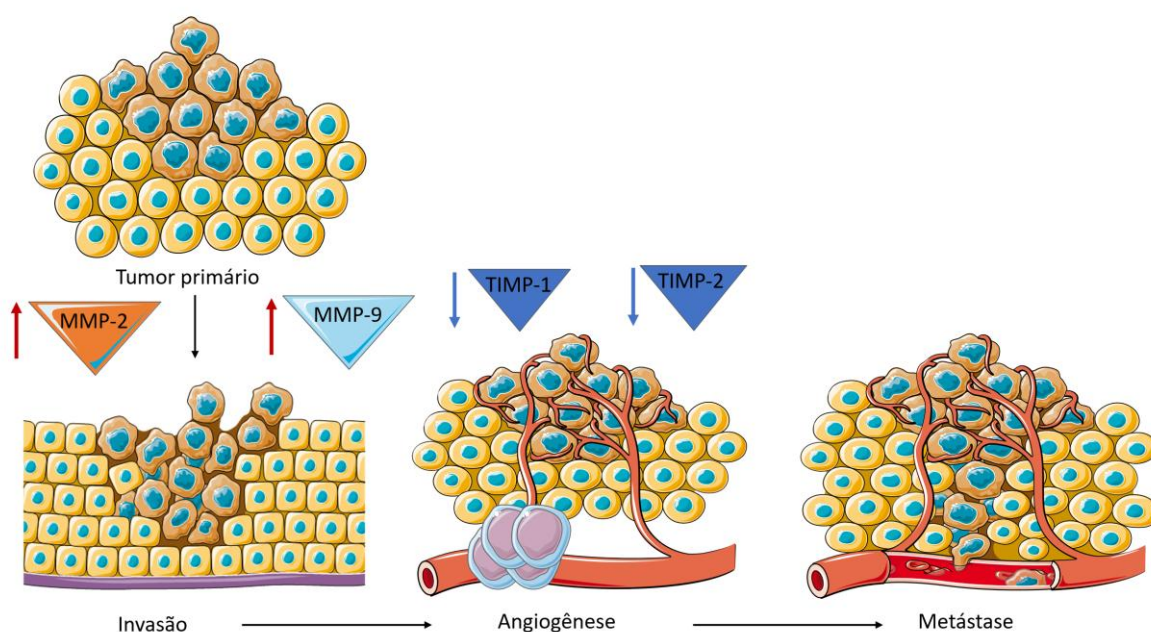


Os fosfolípidios presentes na membrana plasmática são degradados pela ação da enzima fosfolipase A2, formando ácido araquidônico. Este ácido é convertido em prostaglandina E2 (PGE2) pela enzima ciclooxigenase 2 (COX-2). A PGE2 liga-se aos receptores acoplados à proteína G, desencadeando respostas celulares. Quando a ligação ocorre com o receptor PTGER3, há uma diminuição da atividade da Adenil ciclase, reduzindo os níveis de AMP cíclico (cAMP) o que promove a ativação da via MAPK, estimulando fatores de transcrição associados à expressão de genes pró-tumorais. A interação da PGE2 com os receptores PTGR 2 e 4 eleva a concentração de cAMP que ativa a proteína quinase A (PKA) e, consequentemente, de fatores de transcrição que também induzem a expressão de genes pró-tumorais. A ativação desses genes resulta em proliferação celular aumentada, sobrevivência celular, metástase e angiogênese. Entretanto a piperina pode modular toda essa cascata, regulando a expressão desses genes. Fonte: ELABORADO PELO AUTOR: 2025.

Há também uma ligação significativa entre a expressão de PTGS2 e metaloproteinases da matriz (MMPs) em alguns tipos de câncer, que mostram que a expressão diminuída de PTGS2 resulta no nível reduzido de MMPs (LIU *et al.*, 2015). Dentre esta classe de proteínas duas estão fortemente relacionadas com os processos de invasão e metástase tumoral, a MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B). Ambas são encontradas em abundância nos tecidos

cancerígenos e seu papel na progressão tumoral é evidenciado pela expressão dos genes que as transcrevem e a produção dos inibidores teciduais de metaloproteinasas, TIMP-1 e TIMP-2 (GIANNELLI et al., 1997; FERNANDES et al., 2008). No ambiente inflamatório estas proteínas são responsáveis pela remodelação da matriz extracelular (MEC), que como consequência, converte a vascularização, permitindo o extravasamento das células imunes e angiogênese (LIBRA et al., 2009; ADEFUYE et al., 2012). Adicionalmente, a ativação da vascularização e o aumento significativo na migração de neutrófilos para o tecido são impulsionados pela formação do complexo inibidor da elastase de leucócitos, juntamente com a regulação negativa dos inibidores TIMP, assim como a superexpressão e ativação das MMPs. Isso facilita o processo de diapedese dos neutrófilos nos locais de inflamação (CARDEAL et al., 2006; KOLACZKOWSKA et al., 2009). Concomitantemente, as MMPs desempenham um papel no processo metastático, que envolve a progressão sequencial de proliferação celular descontrolada, estímulo da angiogênese, desprendimento, motilidade, invasão na corrente sanguínea e interação com os elementos do novo microambiente, incluindo células parenquimatosas, estromais e inflamatórias (NOGUTI et al., 2012). Essa via de metástase tem sido associada a diversas vias oncogênicas em diferentes tipos de câncer, como o câncer oral (MK et al., 2016), podendo ser observado na figura 2.

Figura 2: Processo metastático



O aumento da expressão de MMPs 2 e 9 permite que células do tumor primário invadam o tecido adjacente, induzindo a angiogênese. Adicionalmente, a formação do complexo inibidor da elastase de leucócitos diminui a expressão dos inibidores

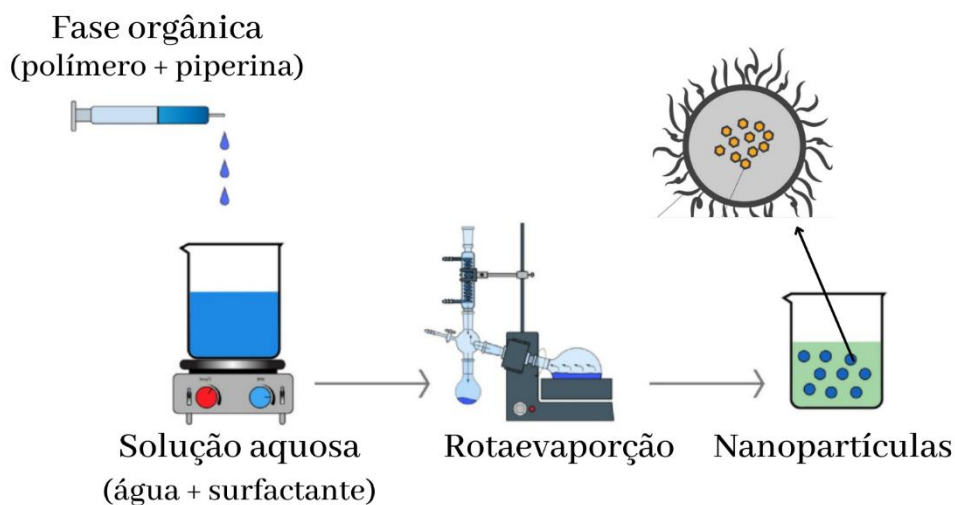
TIMP-1 e TIMP-2, o que somado com o aumento de expressão de MMPs, permite a entrada de células malignas na corrente sanguínea, iniciando o processo metastático. Fonte: ELABORADO PELO AUTOR: 2025

Os resultados recentemente obtidos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram efeitos antitumorais e anti-inflamatórios da piperina isolada devido a regulação negativa de PTGS2, que consequentemente reduziu a expressão de outros mediadores associados ao processo neoplásico (CARDOSO et al., 2023). No entanto, assim como outros produtos naturais, a piperina possui baixa biodisponibilidade devido à baixa dissolução em água, características essas que dificultam ensaios laboratoriais e limitam sua capacidade terapêutica (SHAO et al. 2015). Para superar esta barreira, estudos mais recentes utilizam a nanotecnologia como ferramenta para contornar estes desafios, devido a sua capacidade de melhorar a entrega celular de compostos hidrofóbicos (GANESAN et al. 2021).

A nanotecnologia compreende a produção de cápsulas ou esferas com poucas centenas de nanômetros, obtidas em diversos tamanhos, formatos, composições e modificados para determinadas características de acordo com a substância ativa que será carregada ou o órgão alvo (SARKER e NAHAR, 2017). Em nosso estudo foram utilizadas nanocápsulas poliméricas de Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA, um biopolímero composto por monômeros de ácido lático e ácido glicólico, na proporção de 50% de ácido lático e 50% de ácido glicólico, que são utilizados em etapas do ciclo de Krebs (o ácido glicólico pela rota do glicolato converge no ciclo de Krebs), portanto o produto final de sua degradação será gás carbônico e água, considerado assim um polímero atóxico (SADAT et al. 2014).

As nanocápsulas carregadas com piperina podem ser obtidas a partir de nanoprecipitação, método que permite a formação espontânea de gotas do óleo circundadas por uma membrana polimérica (SIQUEIRA-MOURA, et al. 2013). A técnica consiste na formação da fase solvente que compreende o biopolímero e o fármaco diluídos, que em seguida é adicionada à fase não solvente, na qual deve ser imiscível, neste caso a fase não solvente é constituída por água e surfactantes, visto que a fase solvente é hidrofóbica, quando a fase solvente é adicionada à fase não solvente ocorre a precipitação e dispersão do polímero na solução, que acaba por incorporar o fármaco (PINTO et al. 2022) como mostra a Figura 3. A utilização da nanotecnologia na entrega da piperina pode acelerar sua dissolução em até três vezes e aumentar sua biodisponibilidade em até dezesseis vezes, portanto, com a utilização da nanopiperina espera-se aumentar a biodisponibilidade e aperfeiçoar o estudo da mesma (REN. et al. 2019).

Figura 3: Método de obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação



A fase orgânica composta pelo polímero de PLGA e a piperina é depositada em uma solução aquosa contendo água e surfactante, a mistura passa por rotaevaporação e o polímero hidrofílico incorpora a molécula de piperina hidrofóbica. Fonte: ELABORADO PELO AUTOR: 2025

Portanto, considerando os efeitos benéficos e sinérgicos dos medicamentos anti-inflamatórios que regulam negativamente a via PTGS2 no tratamento de diversos tipos de câncer, bem como as limitações decorrentes da toxicidade dos quimioterápicos e dos anti-inflamatórios convencionais, além da baixa biodisponibilidade dos fitoterápicos, as nanopartículas carregadas com piperina (nanopiperina) surgem como um candidato promissor para a terapia do câncer de cabeça e pescoço tratado usualmente com cisplatina. A razão disso se justifica frente a capacidade potencial da nanopiperina de aprimorar o tratamento convencional, regulando a via da PTGS2, oferecendo um perfil de segurança mais favorável, mesmo em doses elevadas e durante períodos prolongados de exposição e poder melhorar significativamente a sua biodisponibilidade devido à nanotecnologia.

A proposta deste estudo é superar as principais barreiras que impedem a utilização eficaz de medicamentos, que atuam na via PTGS2, no tratamento do câncer. Espera-se que a nanopiperina preserve a ação antitumoral e anti-inflamatória da piperina isolada, interferindo na capacidade proliferativa e migratória de células cancerígenas e que este efeito surja em doses menores do fármaco podendo desempenhar um papel significativo na pesquisa e abrir portas para terapias mais eficazes e seguras no tratamento do câncer de cabeça e pescoço.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados com células escamosas de câncer de cabeça e pescoço tratadas com a nanopiperina permitem concluir que:

1. A nanopiperina apresentou efeito antiproliferativo e citotóxico em células HEP-2 e CAL-27, de forma tempo e dose dependente, tanto isoladamente quanto em combinação com cisplatina. Estes resultados indicam atividade antitumoral *in vitro*
2. A diminuição na progressão tumoral é evidenciada pelas alterações morfológicas, diminuição da proliferação e viabilidade celular.
3. A nanopiperina reduziu a migração celular e a expressão de *MMP-2* em ensaios *in vitro*, sugerindo potencial para interferir em processos relacionados à invasão celular.
4. Os efeitos com nanopiperina sozinha são similares em ambas as linhagens, no entanto quando tratado em conjunto com cisplatina, a linhagem CAL-27 mostra maiores níveis apoptóticos e maior citotoxicidade do que a linhagem HEP-2.
5. A nanopiperina isolada reduziu a expressão dos genes *PTGS2* e *PTGER4*, sugerindo tendência a efeito anti-inflamatório. Este efeito não foi observado na presença de cisplatina, possivelmente devido a indução compensatória destes genes pelo fármaco. Ressalta-se que a análise foi limitada à expressão de mRNA, não sendo avaliadas proteínas ou atividade enzimática, o que limita a interpretação funcional do efeito anti-inflamatório.

Em conjunto, essas conclusões mostram a eficiência da nanopiperina como um potencial tratamento antitumoral, com ações antiproliferativas e antimigratórias, demonstrando ser um potencial agente para tratamento complementar do câncer de cabeça e pescoço.

7 REFERÊNCIAS

1. ABOUITAH, K. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of nanoformulations composed of metal-organic frameworks delivering rutin and/or piperine natural agents. **Drug delivery**, v. 28, n. 1, p. 1478–1495, 2021.
2. ADEFUYE, A.; SALES, K. Regulation of inflammatory pathways in cancer and infectious disease of the cervix..Scientifica (Cairo). p. 1–8, 2012.
3. ADELSTEIN, D. et al. NCCN Guidelines Insights: Head and Neck Cancers, version 2.2017. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN**, v. 15, n. 6, p. 761–770, 2017.
4. ALJAMALI, N. M. The effect of prepared biochemical compounds on cancer cells. **Research & Reviews: Journal of Oncology and Hematology**, v. 11, n. 1, p. 14–20, 2022.
5. ALSHEHRI, S. et al. Formulation of piperine-loaded nanoemulsion: In vitro characterization, ex vivo evaluation, and cell viability assessment. **ACS omega**, v. 8, n. 25, p. 22406–22413, 2023.
6. ALZATE-YEPES, T. et al. Mechanisms of action of fruit and vegetable phytochemicals in colorectal cancer prevention. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 11, 2023.
7. Ashrafizadeh, M., Zarrabi, A., Hushmandi, K., Kalantari, M., Mohammadinejad, R., Javaheri, T., & Sethi, G. (2020). Association of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) with cisplatin resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, 21(11), 4002. <https://doi.org/10.3390/ijms21114002>
8. BONOMI, M. et al. The role of inflammation in head and neck cancer. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 816, p. 107–127, 2014.
9. BOSTAN, M. et al. Cisplatin effect on head and neck squamous cell carcinoma cells is modulated by ERK1/2 protein kinases. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 18, n. 6, p. 5041–5051, 2019.
10. BRAICU, E. I. Role of serum VEGFA, TIMP2, MMP2 and MMP9 in monitoring response to adjuvant radiochemotherapy in patients with primary cervical cancer - Results of a companion protocol of the randomized NOGGO-AGO phase III clinical trial. **Anticancer Research**, n. 1, p. 385–391, 2014.
11. Bu, X., Zhao, C., & Dai, X. (2011). Involvement of COX-2/PGE(2) pathway in the upregulation of MMP-9 expression in pancreatic cancer. *Gastroenterology Research and Practice*, 2011, 214269. <https://doi.org/10.1155/2011/214269>
12. CALLAGHAN, O.; HOUSTON, G. Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: Possible therapeutic targets? **British Journal of Pharmacology**, v. 22, p. 5239–5250, 2015.
13. CARDEAL, L. B. D. S. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence. **Biochemistry and cell biology**. v. 84, n. 5, p. 713–719, 2006.
14. CARDOSO, L. P. Piperine reduces neoplastic progression in cervical cancer cells by downregulating the cyclooxygenase 2 pathway. *Pharmaceuticals*. **Pharmaceuticals**, n. 1, [s.d.].

15. CAULI, O. Oxidative stress and cognitive alterations induced by cancer chemotherapy drugs: A scoping review. *Antioxidants*. **Antioxidants**, n. 10, [s.d.].
16. CHOW, L. Q. The New England journal of medicine. p. 60–72, 2020.
17. COHEN, S. M. The role of cell proliferation in the etiology of neoplasia. Em: **Comprehensive Toxicology**. [s.l.] Elsevier, 2010. p. 229–253.
18. COLEMAN, R. A.; SMITH, W. L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacological reviews**, v. 46, n. 2, p. 205–229, 1994.
19. COUSSENS, L. M. Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer--Trials and Tribulations. *Science*, v. 295, n. 5564. p. 2387–2392, 2002.
20. COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 2002.
21. CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R. A. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 147, p. 1–73, 2017.
22. CUI, Y.-Y.; DEPARTMENT OF REGENERATIVE MEDICINE, TONGJI UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE, SHANGHAI 200092, CHINA. Cancer, Mankind's Challenge. **Current cancer reports**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2019.
23. DE FRANCISCO, A. L. M. et al. Onco-Nephrology: Cancer, chemotherapy and kidney. **Nefrología (English Edition)**, v. 39, n. 5, p. 473–481, 2019.
24. EFSA PANEL ON FOOD CONTACT MATERIALS, ENZYMES, FLAVOURINGS AND PROCESSING AIDS (CEF). Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 86, Revision 2 (FGE.86Rev2): Consideration of aliphatic and arylalkyl amines and amides evaluated by JECFA (65th meeting): Flavouring Group Evaluation 86 Revision 2. **EFSA journal**, v. 13, n. 1, p. 3998, 2015.
25. Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews. Cancer**, 2(3), 161–174. <https://doi.org/10.1038/nrc745>
26. EL-ZAHABY, S. A. et al. Limosomes versus hyalurolimosomes loaded with piperine for management of skin cancer. **International journal of pharmaceutics**, v. 650, p. 123730, 2024.
27. FATTAH, A. et al. The synergistic combination of cisplatin and piperine induces apoptosis in MCF-7 cell line. **Iranian journal of public health**, v. 50, n. 5, p. 1037–1047, 2021.
28. FEITELSON, M. A. et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Seminars in cancer biology**, v. 35 Suppl, p. S25–S54, 2015.
29. FERNANDES, T. et al. Stromal cells play a role in cervical cancer progression mediated by MMP-2 protein. **European journal of gynaecological oncology**, v. 29, n. 4, p. 341–344, 2008.
30. FIROUZABADI, K.; KARIMI, E.; TABRIZI, M. H. Fabrication of bovine serum albumin-polyethylene glycol nanoparticle conjugated-folic acid loaded-naringenin as an efficient carrier biomacromolecule for suppression of cancer cells. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 790–797, 2023.

31. FOOT C, M.; PROTASIO G, J. Metastasis from oral cancer: an overview. **Cancer Genomics Proteomics**, v. 9, p. 329–335, 2012.
32. GALLAHER, J. A.; BROWN, J. S.; ANDERSON, A. R. A. The impact of proliferation-migration tradeoffs on phenotypic evolution in cancer. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 2425, 2019.
33. GANESAN, K. et al. Targeting engineered nanoparticles for breast cancer therapy. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1829, 2021.
34. GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic chemistry**, v. 88, n. 102925, p. 102925, 2019.
35. GIANNELLI G, F. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. **Science** v, v. 277, p. 225–228, 1997.
36. GUSSON-ZANETONI, J. P. **Molecular aspects of piperine in signaling pathways associated with inflammation in head and neck cancer. International journal of molecular sciences.** [s.l: s.n.]
37. GYORFFY, B. com: A tool for the enrichment analysis of the cancer hallmarks. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, p. e15079–e15079, 2024.
38. HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: New dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.
39. HAQ, I.-U. et al. Piperine: A review of its biological effects. **Phytotherapy research: PTR**, v. 35, n. 2, p. 680–700, 2021.
40. JAFRI, A. et al. Induction of apoptosis by piperine in human cervical adenocarcinoma via ROS mediated mitochondrial pathway and caspase-3 activation. **EXCLI journal**, v. 18, p. 154–164, 2019.
41. JAIN, R.; TIWARI, R.; AGRAWAL, O. P. **Shukla Bioinspired folic acid-ADH-PLGA polymeric nanoparticles loaded with mangiferin and piperine: a promising strategy for targeted delivery in multidrug-resistant lung cancer cells.** [s.l: s.n.].
42. JAISIN, Y. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of piperine on UV-B-irradiated human HaCaT keratinocyte cells. **Life sciences**, v. 263, n. 118607, p. 118607, 2020.
43. JAVED, B. et al. Enhanced anticancer response of curcumin- and piperine-loaded Lignin-g-p (NIPAM-co-DMAEMA) gold nanogels against U-251 MG glioblastoma multiforme. **Biomedicines**, v. 9, n. 11, p. 1516, 2021.
44. JING, Y. et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment. **Cell & bioscience**, v. 1, n. 1, p. 29, 2011.
45. JUTHANI, R.; PUNATAR, S.; MITTRA, I. New light on chemotherapy toxicity and its prevention. **BJC reports**, v. 2, n. 1, p. 41, 2024.
46. KATOLKAR, U. N.; SURANA, S. J. Exploring the potential role of phytopharmaceuticals in alleviating toxicities of chemotherapeutic agents. **Current protein & peptide science**. p. 753–779, 2024.
47. KAZMI, I. et al. Formulation of piperine nanoparticles: In vitro breast cancer cell line and in vivo evaluation. **Polymers**, v. 14, n. 7, p. 1349, 2022.

48. Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, 141(1), 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>
49. KLEIN, I.; LEHMANN, H. C. Pathomechanisms of paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **Toxics**, v. 9, n. 10, p. 229, 2021.
50. KOLACZKOWSKA, E. et al. Neutrophil elastase activity compensates for a genetic lack of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in leukocyte infiltration in a model of experimental peritonitis. **Journal of leukocyte biology**, v. 85, n. 3, p. 374–381, 2009.
51. KUMAR, A. Insight into the preclinical studies of phytomedicines in cancer theragnostics. **Minerva Biotechnology and Biomolecular Research**, v. 3, [s.d.].
52. LARONHA, H.; CALDEIRA, J. Structure and function of human matrix metalloproteinases. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 5, p. 1076, 2020.
53. Lazăr, L., Loghin, A., Bud, E.-S., Cerghizan, D., Horváth, E., & Nagy, E. E. (2015). Cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 expressions correlate with tissue inflammation degree in periodontal disease. *Revue Roumaine de Morphologie et Embryologie [Romanian Journal of Morphology and Embryology]*, 56(4), 1441–1446.
54. Li, S., Guo, J., Tian, Z., Chen, J., Gou, G., Niu, Y., Li, L., & Yang, J. (2021). Piperine-loaded glycyrrhizic acid- and PLGA-based nanoparticles modified with transferrin for antitumor : Piperine-loaded glycyrrhizic acid- and PLGA-based nanoparticles: Piperine-loaded glycyrrhizic acid- and PLGA-based nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, 22(7), 239. <https://doi.org/10.1208/s12249-021-02123-6>.
55. LI, S. et al. Piperine attenuates lithocholic acid-stimulated interleukin-8 by suppressing Src/EGFR and reactive oxygen species in human colorectal cancer cells. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 3, p. 530, 2022.
56. LIBRA, M. et al. Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases (review). **International journal of oncology**, v. 34, n. 4, p. 897–903, 2009.
57. LIN, X.-M. et al. Cisplatin induces chemoresistance through the PTGS2-mediated anti-apoptosis in gastric cancer. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 116, n. 105610, p. 105610, 2019.
58. LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
59. LIU, N. et al. Expression of matrix metalloproteinase-9, cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor are increased in gastrointestinal stromal tumors. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 4, p. 6495–6501, 2015.
60. LUO, R.; NEU, B.; VENKATRAMAN, S. S. Surface functionalization of nanoparticles to control cell interactions and drug release. **Small**, v. 8, n. 16, p. 2585–2594, 2012.
61. MANAYI, A. et al. Piperine as a potential anti-cancer agent: A review on preclinical studies. **Current medicinal chemistry**, v. 25, n. 37, p. 4918–4928, 2018.
62. Marônek, M., Marafini, I., Gardlík, R., Link, R., Troncone, E., & Monteleone, G. (2021). Metalloproteinases in inflammatory bowel diseases. **Journal of Inflammation Research**, 14, 1029–1041. <https://doi.org/10.2147/JIR.S288280>

63. MARQUES DA FONSECA, L. Piperine inhibits TGF- β signaling pathways and disrupts EMT-related events in human lung adenocarcinoma cells. *Medicines*. **Medicines**, n. 7, 2020.
64. MBEMI, A. Impact of gene-environment interactions on cancer development. *International journal of environmental research and public health*. v. 21, 2020.
65. MITTRA, I. Cell free chromatin from dying cancer cells integrate into genomes of bystander healthy cells to induce DNA damage and inflammation. *Cell Death Discov*, 2017.
66. MK, H. et al. Association of Notch4 with metastasis in human oral squamous cell carcinoma. *Life sciences*, v. 156, p. 38–46, 2016.
67. MOHAMED, H. R. H. et al. Induction of potent preferential cell death, severe DNA damage and p53-independent ROS-mediated mitochondrial apoptosis by CaTiO₃NPs in HNO-97 tongue cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2025.
68. MOHAMMAD, J. et al. JNK inhibition blocks piperlongumine-induced cell death and transcriptional activation of heme oxygenase-1 in pancreatic cancer cells. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, v. 24, n. 9–10, p. 730–744, 2019.
69. MONIER, B. et al. Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding. *Nature*, v. 518, n. 7538, p. 245–248, 2015.
70. MURRAY, N. P. The role of matrix metalloproteinase-2 in the metastatic cascade: a review. *Oncologie (Paris, France)*, v. 26, n. 1, p. 27–40, 2024.
71. Mustafa, S., Koran, S., & AlOmair, L. (2022). Insights into the role of matrix metalloproteinases in cancer and its various therapeutic aspects: A review. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 896099. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.896099>
72. NAHAND, J. S. et al. microRNAs: New prognostic, diagnostic, and therapeutic biomarkers in cervical cancer. *Journal of cellular physiology*, v. 234, n. 10, p. 17064–17099, 2019.
73. NAKATA, E. et al. Potentiation of tumor response to radiation or chemoradiation by selective cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, v. 58, n. 2, p. 369–375, 2004.
74. NKABINDE, L. A. et al. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles: Uptake by epithelial cells and cytotoxicity. *EXPRESS polymer letters*, v. 8, n. 3, p. 197–206, 2014.
75. OHTA, T. et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase increases efficacy of cisplatin in in vivo ovarian cancer models. *Endocrinology*, v. 147, n. 4, p. 1761–1769, 2006.
76. OOKI, Akira *et al.* YAP1 and COX2 coordinately regulate urothelial cancer stem-like cells. *Cancer research*, v. 78, n. 1, p. 168–181, 2018.
77. OKTAVIA, S. et al. Piperine acts as an anticancer agent by reducing cyclooxygenase-2 activity and inducing apoptosis by activating p53 in HeLa cells. *Tropical Journal of Natural Product Research*, v. 8, n. 2, 2024.
78. PARIDA, S. et al. GW627368X inhibits proliferation and induces apoptosis in cervical cancer by interfering with EP4/EGFR interactive signaling. *Cell death & disease*, v. 7, n. 3, p. e2154, 2016.

79. PATIL, Y. et al. Targeting of folate-conjugated liposomes with co-entrapped drugs to prostate cancer cells via prostate-specific membrane antigen (PSMA). **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 14, n. 4, p. 1407–1416, 2018.
80. PINTO, B. C. S. Desenvolvimento de um Método de Nanoprecipitação para o Aprisionamento de Fármaco em nanopartículas de Poli-e- Caprolactona. Em: **Revista Processos Químicos**, v. 16, n. 31. [s.l: s.n.]. p. 61–65.
81. PONTAN, F. et al. Celecoxib prevents neuroblastoma tumor development and potentiates the effect of chemotherapeutic drugs in vitro and in vivo. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 3, p. 1036–1044, 2007.
82. POVEA-CABELLO, S. et al. Dynamic reorganization of the cytoskeleton during apoptosis: The two coffins hypothesis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 11, 2017.
83. PRATES, J. et al. Cisplatin treatment modulates Annexin A1 and inhibitor of differentiation to DNA 1 expression in cervical cancer cells. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 129, n. 110331, p. 110331, 2020.
84. PRIMO, F. L. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phtha,kcyanine for synergic use in skin cancer treatment. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 320, n. 14, p. e211–e214, 2008.
85. QI, Y.-B. et al. Wnt/ β -catenin signaling modulates piperine-mediated antitumor effects on human osteosarcoma cells. **Molecular medicine reports**, v. 21, n. 5, p. 2202–2208, 2020.
86. QUIJIA, C. R. et al. Macrophage cell membrane coating on piperine-loaded MIL-100(Fe) nanoparticles for breast cancer treatment. **Journal of functional biomaterials**, v. 14, n. 6, p. 319, 2023.
87. RAM, A. et al. A guide to ERK dynamics, part 1: mechanisms and models. **The Biochemical journal**, v. 480, n. 23, p. 1887–1907, 2023.
88. RATHER, R. A.; BHAGAT, M. Cancer chemoprevention and piperine: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 6, p. 10, 2018.
89. REN, T. et al. Piperine-loaded nanoparticles with enhanced dissolution and oral bioavailability for epilepsy control. **European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 137, n. 104988, p. 104988, 2019.
90. ROMA-RODRIGUES, C. et al. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 4, p. 840, 2019.
91. SADAT TABATABAEI MIRAKABAD, F. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. Asian Pacific journal of cancer prevention. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 15, n. 2, p. 517–535, 2014.
92. SARKER, S. D.; NAHAR, L. Application of nanotechnology in phytochemical research. **Pharmaceutical sciences**, v. 23, n. 3, p. 170–171, 2017.

93. SCHMOECKEL, E. et al. The role of EP-2 receptor expression in cervical intraepithelial neoplasia. **Histochemistry and cell biology**, v. 154, n. 6, p. 655–662, 2020.
94. SHAIKH, M. A. **Em: Advanced Drug Delivery Systems in the Management of Cancer**. [s.l.] Elsevier, 2021.
95. SHAO, B. Enhanced oral bioavailability of piperine by self-emulsifying drug delivery systems: in vitro, in vivo and in situ intestinal permeability studies. **Drug Delivery**, v. 22, p. 740–747, 2014.
96. SIQUEIRA-MOURA, M. P. et al. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 33, n. 3, p. 1744–1752, 2013.
97. SONG, L. et al. Piperine inhibits colorectal cancer migration and invasion by regulating STAT3/Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition. **Biotechnology letters**, v. 42, n. 10, p. 2049–2058, 2020.
98. SUN, Y. **Effect of lipid metabolism disorder on liver function in patients with malignant tumors after chemotherapy: a case-control study**. **Lipids in health and disease**. [s.l.: s.n.].
99. TCHOUNWOU, P. B. et al. Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. **Journal of experimental pharmacology**, v. 13, p. 303–328, 2021.
100. THAO, D. T. et al. The improved anticancer activities of piperine nanoliposome conjugated CD133 monoclonal antibody against NTERA-2 cancer stem cells. **Natural product communications**, v. 16, n. 2, p. 1934578X2199818, 2021.
101. TRIVEDI, D. D.; DALAI, S. K.; BAKSHI, S. R. The mystery of cancer resistance: A revelation within nature. **Journal of molecular evolution**, v. 91, n. 2, p. 133–155, 2023.
102. ULLAH, S. et al. Phytochemicals for cancer treatment: An update on plant-derived anti-cancer compounds and their mechanisms of action. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 25, n. 8, p. 871–890, 2024.
103. VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275–292, 2011.
104. VISSE, Robert; NAGASE, Hideaki. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry: Structure, function, and biochemistry. **Circulation research**, v. 92, n. 8, p. 827–839, 2003.
105. WANG, H. et al. Pretreatment with dexamethasone increases antitumor activity of carboplatin and gemcitabine in mice bearing human cancer xenografts: in vivo activity, pharmacokinetics, and clinical implications for cancer chemotherapy: In vivo activity, pharmacokinetics, and clinical implications for cancer chemotherapy. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 5, p. 1633–1644, 2004.
106. WANG, H. et al. Dexamethasone as a chemosensitizer for breast cancer chemotherapy: potentiation of the antitumor activity of adriamycin, modulation of

- cytokine expression, and pharmacokinetics. **International journal of oncology**, v. 30, n. 4, p. 947–953, 2007.
107. WEN, Y. et al. Quantitative analysis and comparison of 3D morphology between viable and apoptotic MCF-7 breast cancer cells and characterization of nuclear fragmentation. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184726, 2017.
 108. WIRASWATI, H. L. et al. Piperine: an emerging biofactor with anticancer efficacy and therapeutic potential. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 51, n. 1, p. e2134, 2025.
 109. WU, C. et al. Piperine inhibits the proliferation of colorectal adenocarcinoma by regulating ARL3-mediated endoplasmic reticulum stress. **Biomolecules & biomedicine**, v. 25, n. 2, p. 391–405, 2025.
 110. XIA, J. **Piperine induces autophagy of colon cancer cells: Dual modulation of AKT/mTOR signaling pathway and ROS production. Biochemical and biophysical research communications**, v. 728, n. 150340. [s.l: s.n.].
 111. XIONG, S. et al. Size influences the cytotoxicity of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and titanium dioxide (TiO(2)) nanoparticles. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 6, p. 1075–1086, 2013.
 112. YAFFE, P. B. et al. Piperine, an alkaloid from black pepper, inhibits growth of human colon cancer cells via G1 arrest and apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress: PIPERINE INHIBITS COLON CANCER CELL GROWTH. **Molecular carcinogenesis**, v. 54, n. 10, p. 1070–1085, 2015.
 113. YANG, C. et al. Highly-expressed microRNA-21 in adipose derived stem cell exosomes can enhance the migration and proliferation of the HaCaT cells by increasing the MMP-9 expression through the PI3K/AKT pathway. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 681, n. 108259, p. 108259, 2020.
 114. YE, Y. et al. COX-2-PGE2-EPs in gynecological cancers. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 301, n. 6, p. 1365–1375, 2020.
 115. YING, X. et al. Piperine inhibits IL- β induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocyte. **International immunopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 293–299, 2013.
 116. YOO, E. S. et al. Antitumor and apoptosis-inducing effects of piperine on human melanoma cells. **Anticancer research**, v. 39, n. 4, p. 1883–1892, 2019.
 117. YU, J. S. L.; CUI, W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. **Development (Cambridge, England)**, v. 143, n. 17, p. 3050–3060, 2016.
 118. ZADOROZHNA, M.; TATARANNI, T.; MANGIERI, D. Piperine: role in prevention and progression of cancer. **Molecular biology reports**, v. 46, n. 5, p. 5617–5629, 2019.
 119. ZAPPAVIGNA, S. et al. Anti-inflammatory drugs as anticancer agents. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 7, p. 2605, 2020.
 120. ZEESHAN, R.; MUTAHIR, Z. Cancer metastasis - tricks of the trade. **Udrufenje basicnih medicinskih znanosti [Bosnian journal of basic medical sciences]**, 2017.

121. ZERRILLO, L. et al. PLGA nanoparticles grafted with hyaluronic acid to improve site-specificity and drug dose delivery in osteoarthritis nanotherapy. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 13, p. 2248, 2022.
122. ZHANG, J.; LIANG, Z.; ZHANG, Z. Piperine alkaloid induces anti-cancer effects in human breast carcinoma cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, n. 5, 2022.
123. ZHAO, X.; XU, Z.; LI, H. Author Correction: NSAIDs Use and Reduced Metastasis in Cancer Patients: results from a meta-analysis. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, 2018.