



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

Julliene Stephanie Guaraldi Monteiro da Silva

**Efeito das lignanas extraídas da *Piper cubeba* em linhagens
tumorigênicas de colo de útero**

São José do Rio Preto

2019

Julliene Stephanie Guaraldi Monteiro da Silva

**Efeito das lignanas extraídas da *Piper cubeba* em linhagens
tumorigênicas de colo de útero**

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: CNPq – Proc. 165457/2017-1
FAPESP – Proc. 2017/02100-3

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

São José do Rio Preto

2019

S586e

Silva, Julliene Stephanie Guaraldi Monteiro da

Efeito das lignanas extraídas da Piper cubeba em linhagens tumorigênicas de colo de útero / Julliene Stephanie Guaraldi Monteiro da Silva. -- São José do Rio Preto, 2019

76 f. : il., tabs., fotos

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

Orientadora: Rodrigues-Lisoni Flávia Cristina

1. Câncer. 2. Fitoterápico. 3. Genética humana. 4. Piper cubeba. 5. Lignanas. 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.

Julliene Stephanie Guaraldi Monteiro da Silva

**Efeito das lignanas extraídas da *Piper cubeba* em linhagens
tumorigênicas de colo de útero**

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: CNPq – Proc. 165457/2017-1
FAPESP – Proc. 2017/02100-3

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Câmpus de Ilha Solteira
Orientadora

Prof. Dr. Tiago Henrique
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Ana Elizabete Silva
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

01 de março de 2019

À minha família, meu pai Osvaldo e minha mãe Rosangela, irmãs, Jennifer e Kettelyn, por terem me ensinado, cada um à sua maneira, os valores mais preciosos da vida, são exemplos de coragem, humildade e honestidade. Elementos essenciais da minha caminhada, essa conquista com certeza também é de vocês.

À minha orientadora Profª Drª Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, por me acolher desde o início da minha formação acadêmica, uma jornada que já dura 7 anos, permeados de muita paciência, amizade e dedicação a ajudar em todos os momentos dessa trajetória. Grande exemplo de humildade, solidariedade e otimismo. Obrigada por ser uma pessoa tão incrível e por ter me ensinado tanto.

Às mulheres na ciência que um dia foram ocultadas por uma face masculina; às mulheres na ciência que não foram ocultadas e que colhem os frutos de uma trajetória grandiosa; às mulheres não cientistas batalhadoras; às mulheres que morreram em luta na defesa de direitos das minorias; às mulheres inspiradoras que não se calaram e não se calam frente a uma voz autoritária machista; às ancestrais que nos deixaram ensinamentos tão preciosos. Honro e agradeço a contribuição na minha formação humana e acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – (Processo: 165457/2017-1) pela bolsa de Mestrado concedida.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - (Processo: 2017/02100-3).

À Prof^a Dr^a Sonia Maria Oliani, por me acolher tão bem em seu laboratório, pela confiança e assistência durante o meu trabalho. Terei sempre imensa admiração pela sua trajetória profissional brilhante. Grande exemplo de cientista, a qual terá meu respeito eterno. Muito obrigada.

Ao Programa e aos Professores de Pós-graduação em Biociências do IBILCE, por todos os ensinamentos e suporte durante a trajetória do Mestrado.

A todos os funcionários do IBILCE que contribuem com a sua parte essencial para manter uma universidade pública.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação pela atenção, colaboração e compreensão durante o Mestrado.

À coordenadora do programa de Pós-graduação Prof^a Dr^a Claudia Regina Bonini Domingos, pela competência e disposição em ajudar os acadêmicos.

À Prof^a Dr^a Eloiza Helena Tajara da Silva, coordenadora do Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica (LMMBM), da faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelos recursos estruturais e técnicos oferecidos para realização de experimentos em seu laboratório.

À Profa. Dra. Rosangela da Silva Laurentiz, por ceder as lignanas utilizadas no trabalho.

À Laila Toniol Cardin pelo auxílio com o trabalho estatístico.

Ao Prof. Dr. Tiago Henrique, pela imensa disposição em ajudar no desenvolvimento da técnica de PCR quantitativa em tempo real, e por aceitar compor a banca de defesa do meu Mestrado.

À Janesly Prates, por além de ser companheira de laboratório, ter me ajudado tanto durante o desenvolvimento do meu trabalho, na realização de técnicas e experimentos, ter

sanado tantas dúvidas e por ter me auxiliado em diversos momentos no laboratório. Grande exemplo de seriedade e competência.

À Profª Drª Claudia Carareto, por ceder a estrutura e equipamentos de seu laboratório para complementar parte fundamental do meu trabalho.

À Profª Drª Ana Elisabete da Silva por ceder estrutura e equipamentos de seu laboratório para complementar parte essencial da minha pesquisa, agradeço também por aceitar compor a minha banca de defesa.

Às membras da banca de qualificação e defesa, Profª. Draª Joice Matos Biselli, Profª. Drª. Patricia Simone Leite Vilamaior, Profª. Drª. Fernanda da Silva Manoel Caetano, Profª. Drª. Jusciele Brogin Moreli, Profª. Drª. Marilia de Freitas Calmon, pela disponibilidade, suporte, auxílio e considerações valiosas.

Aos companheiros de Pós-graduação.

Às companheiras e companheiro de laboratório, Jusciele, Rafaela, Mab, Juliana, Mayk e minha amigona Thaís que me acompanha desde os primeiros dias de graduação, até hoje. Agradeço a todos vocês, pelas conversas, cafés, risadas e apoio na rotina do laboratório.

Às primeiras grandes mulheres que conheci em Rio Preto, que são exemplos de força, coragem e resistência, minhas amigas Sue, Noemi, Fernanda, Gracieli e Vanessa. Amo vocês.

À Heloíne, meu presente do universo, com quem tenho o grande prazer de compartilhar uma amizade leve e sincera. Obrigada pela parceria em todos os momentos, amiga.

À minha amiga Maria das Angélicas, que me deu uma força essencial com suas palavras, que me motivaram profundamente a continuar, pela resistência. Mulher forte e guerreira, te admiro demais.

Aos amigos e amigas de Ilha Solteira e de Rio Preto, alguns de longa data e outros mais recentes, com os quais pude compartilhar grandes momentos, conversas filosóficas e com certeza muitas risadas, Rafael, Jaurés, Jonas, Renan, Carla, Mayanna, Pâmela, Mizobata, Helena, Stefanie, Paulo, Lucimara, Naiara, Gabriela, Igor, Mariana, Julia, Yrina, Ubirathan.

À minha amada irmã, Jennifer, minha maior apoiadora e incentivadora, meu maior exemplo de ser humano. Sou grata por você existir, me ensinar tanto, me ajudar tanto, ser minha maior cúmplice e me fazer uma pessoa melhor com toda a sua luz. Te amo!

“Se você tem conhecimento, deixe os outros acenderem suas velas nele”

Margaret Fuller

RESUMO

O câncer de cérvix uterina é uma das principais neoplasias ginecológicas em todo o mundo, apresentando altas taxas de mortalidade. O seu tratamento inclui cirurgia, terapia por irradiação e quimioterapia, entretanto, estes métodos são altamente invasivos, podendo causar lesões estéticas irreversíveis, com um significativo comprometimento funcional. Em função disso, tratamentos fitoterápicos contra o câncer têm despertado interesse científico, e a *Piper cubeba*, utilizada no tratamento de diversas doenças e tumores em geral têm sido alvo de estudos devido às suas propriedades biológicas. Assim, o objetivo do trabalho foi investigar os efeitos das lignanas da *Piper cubeba*, além do extrato total das suas sementes em linhagens celulares tendo como controle positivo a podofilotoxina, observando seus efeitos e comparando o processo tumorigênico de cérvix uterina com células normais. As células tumorigênicas (SiHa e HeLa) e normais (HaCaT), tratadas com as lignanas, foram avaliadas nos ensaios de proliferação e citotoxicidade em tempos de 4, 24, 48 e 72 horas e concentrações de 10, 50 e 100 µg/ml, que permitiu a escolha de melhor tempo (24 horas) e concentração (100 µg/ml) para prosseguir com os ensaios de migração celular, genotoxicidade, apoptose e necrose celular e PCR quantitativa em tempo real. Observamos que as lignanas, com destaque especial para etilcubebina, hinoquinina e o extrato total da *Piper cubeba* atuaram sobre as linhagens HaCaT, HeLa e SiHa, influenciando positivamente no tratamento das linhagens de câncer de colo de útero sem afetar de forma agressiva as células normais. Sendo que, não alteraram a morfologia celular, diminuíram a proliferação, a migração e viabilidade, mostraram efeito genotóxico, induziram as células à morte por apoptose e interferem na cascata de genes relacionados a processos inflamatórios, diminuindo significativamente a expressão dos genes *PTGEP3*, *PTGEP4*, *MMP2* e *MMP9*, e aumentando a expressão dos genes *TIMP1* e *TIMP2*, indicando que as lignanas modulam a regulação desses genes. Mais estudos com a *Piper cubeba* são indispensáveis, dada sua imensa gama de propriedades biológicas, que são alvos potenciais para desenvolvimento de novos fármacos e terapias alternativas para o câncer.

Palavras-chave: lignanas; cultura de células; proliferação celular; ensaio MTS; ensaio cometa; apoptose

ABSTRACT

Cancer of the uterine cervix is one of the leading gynecological neoplasms worldwide, with high mortality rates. Its treatment includes surgery, irradiation therapy and chemotherapy, however, these methods are highly invasive and can cause irrecoverable esthetic lesions with significant functional impairment. In function of this, herbal treatments against cancer have aroused scientific interest, and Piper cubeba, used in the treatment of various diseases and tumors in general have been studied because of their biological properties. The objective of this work was to investigate the effects of Piper cubeba lignans, in addition to the total extract of their seeds in cell lines with positive control of podophyllotoxin, observing its effects and comparing the tumorigenic process of uterine cervix with normal cells. Tumorigenic (SiHa and HeLa) and normal (HaCaT) cells, treated with the lignans were evaluated in the proliferation and cytotoxicity assays at times of 4, 24, 48 and 72 hours and concentrations of 10, 50 and 100 µg/ml, which allowed the choice of better time (24 hours) and concentration (100 µg / ml) to proceed with the cell migration, genotoxicity, apoptosis and cell necrosis and real-time quantitative PCR assays. We observed that lignans, with special emphasis on ethylcubebine, hinokinin which proved to be the most bioactive; and Piper cubeba total extract, acting on the HaCaT, HeLa and SiHa lines, positively influencing the treatment of cervical cancer cell lines without aggressively affecting normal cells. They did not alter cell morphology, decreased proliferation, migration and viability, showed genotoxic effect, induced the cells to apoptosis death and interfered in the cascade of genes related to inflammatory processes, significantly decreasing the expression of PTGEP3, PTGEP4, MMP2 and MMP9, and increasing the expression of the TIMP1 and TIMP2 genes, indicating that lignans modulate the regulation of these genes. Further studies with Piper cubeba are indispensable because of their immense range of biological properties that are potential targets for the development of new drugs and alternative therapies for cancer.

Keywords: *lignans; cell culture; cell proliferation; MTS assay; comet assay, apoptosis*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas químicas das lignanas utilizadas no trabalho	23
Figura 2 - A. Gravura da planta <i>Piper cubeba</i> . B. Sementes da <i>Piper cubeba</i>	24
Fluxograma 1 - Sequência experimental do trabalho	32
Figura 3 - Modelo de uma placa utilizada no ensaio de proliferação	33
Figura 4 - Insertos do ensaio de migração	35
Figura 5 - Análise da morfologia das linhagens celulares pré e pós tratamento	42
Figura 6 - Ensaio de proliferação celular com as 7 diferentes lignanas nas diferentes condições experimentais nas 3 linhagens celulares: HaCaT, SiHa e HeLa	44
Figura 7 - Viabilidade e citotoxicidade das 3 linhagens celulares (HaCaT, HeLa e SiHa) nas diferentes condições experimentais com os tratamentos das 7 diferentes lignanas	46
Figura 8 - Células transmigradas sem e com tratamento de lignana	47
Figura 9 - Valores do ensaio de migração celular das 3 linhagens tratadas com as 7 diferentes lignanas na [100]µg/ml e no tempo de 24 horas	48
Figura 10 - Classes de danos do cometa	49
Figura 11 - Índice de dano obtido pelo ensaio de genotoxicidade para as 3 linhagens tratadas com as 7 lignanas no tempo de 24 horas e na [100]µg/mL	50
Figura 12 - <i>Dot Plots</i> obtidos da citometria de fluxo	52
Figura 13 - Efeito do tratamento com as lignanas sobre a viabilidade, apoptose, apoptose tardia e necrose de HaCaT, HeLa e SiHa	54
Figura 14 - Expressão dos genes após tratamento com as 7 lignanas nas 3 linhagens celulares (HaCaT, HeLa e SiHa)	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores para os genes de interesse

38

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

%: porcentagem

[]: concentração

>: maior

≤: menor ou igual

°C: graus célsius

A549: linhagem adenocarcinoma células de pulmão humano

AMPc: monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA: análise de variância

ATCC: banco americano de linhagens celulares

cDNA: DNA complementar

cm²: centímetros quadrados

cm³: centímetros cúbicos

CO₂: gás carbônico

COX: ciclo oxigenase -2

Ct: cycle threshold

DMH: 1,2-dimetilhidrazina

DMSO: dimetilsufóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ER1: receptor de estrógeno alfa

FAMERP: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

h: horas

H₂O: água

HaCaT: linhagem de queratinócitos humano

HCMV: citomegalovírus humano

HeLa: linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de cérvix (adenocarcinoma)

HIF: fator de transcrição de proteínas

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

HPV: papilomavirus humano

HT29: linhagem de adenocarcinoma de cólon humano

IBILCE: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

IC₅₀: metade da concentração inibitória máxima

ID: índice de dano

INCA: Instituto Nacional do Câncer

Kg: quilogramas

LMP: agarose de baixo ponto de fusão

LNCaP – FGC: linhagem celular tumoral de próstata humana

Log₂: escala logarítmica de base 2

M: molar

mA: miliampère

MCF-10: linhagem celular normal de mama humana

MCF-7: linhagem celular tumoral de mama humana

Meio DMEM: mistura de sais enriquecida com aminoácidos, vitaminas e compostos essenciais para crescimento celular

Meio MEM: mistura de sais enriquecida com aminoácidos, vitaminas e compostos essenciais para crescimento celular

mg: miligrama

min: minutos

mL: mililitro

mM: milimolar

MMP2: matriz metalorotetina 2

MMP9: matriz metalorotetina 9

MS: Ministério da Saúde

MTS:(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H tetrazolium)

NaCl: cloreto de sódio

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NaOH: hidróxido de sódio

ng: nanograma

nm: nanômetro

nM: nanomolar

NMP: agarose de ponto de fusão normal

nº: número

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: tampão fosfato salino

PC-3: linhagem celular tumoral de próstata humana

PCR: reação em cadeia da polimerase

PE: fitocoeirina

PGE2: prostaglandina E receptor 2

pH: potencial hidrogeniônico

PSA: pressão atmosférica

PTGEP3: receptor de prostaglandina E 3 (subtipo EP3)

PTGEP4: receptor de prostaglandina E 4 (subtipo EP4)

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotação por minuto

RT: transcriptase reversa

seg: segundo

SiHa: linhagem celular derivada de células de carcinoma epidermóide de cérvix TIMP1:

Inibidor de tecido de metaloproteinase 1

SKBR-3: linhagem celular tumoral de mama humana

SNVS: Secretaria Nacional de Vigilância e Saúde

SP: São Paulo

Spp: espécie

SUS: sistema único de saúde

TFPI-2: inibidor de fator tecidual 2

TIMP2: inibidor de tecido de metaloproteinase 2

TRIZOL: solução monofásica de fenol e tiocianato de guanidina

UNESP: Universidade Estadual Paulista

USP: Universidade de São Paulo

V: volts

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

Δ : delta

μg : microgramas

μL : microlitros

μM : micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Linhagens celulares	30
3.2 Lignanas da <i>Piper cubeba</i> , preparação do extrato e separação das lignanas	30
3.3 Cultivo e análise da morfologia celular	31
3.4 Ensaio de proliferação celular	31
3.5 Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular (MTS)	33
3.6 Ensaio de migração celular	34
3.7 Ensaio de genotoxicidade (Cometa)	35
3.8 Avaliação de apoptose	37
3.9 Seleção dos genes de interesse	38
3.10 Análise e avaliação da expressão gênica	39
3.11 Análises estatísticas	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Morfologia celular	42
4.2 Índice de proliferação celular	43
4.3 Citotoxicidade e viabilidade celular (MTS)	45
4.4 Migração celular	47
4.5 Genotoxicidade (Cometa)	48
4.6 Avaliação de apoptose	50
4.7 Análise e avaliação da expressão gênica	55
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde global, e 21% e 9% das mortes em países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente, estão relacionadas ao câncer. Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), a estimativa para 2018 foi de 18,1 milhões de novos casos, com 9,6 milhões de mortes por câncer mundialmente (GLOBOCAN, 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê aproximadamente 27 milhões de novos casos de câncer e 17,5 milhões de mortes por câncer anualmente até 2050 (HUSSAIN et al. 2016).

O câncer de cérvix uterina é uma das principais neoplasias ginecológicas em todo o mundo, uma doença do colo do útero que está associada ao papilomavírus humano (HPV) e/ou a infecção com agentes bacterianos, tais como *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* (JEMAL et al., 2011; ADEYUFE & SALES, 2012). Em escala global, o câncer do colo do útero é a quarta neoplasia maligna mais frequente em mulheres e está em sétimo lugar dentre todos os tipos de câncer, resultando em uma estimativa de 530.000 novos casos por ano, com 270.000 mortes (SMALL et al., 2017). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontaram para 16.370 novos casos de câncer cervical para 2018.

A incidência e a mortalidade por câncer do colo do útero podem ser efetivamente reduzidas por programas de rastreamento de base populacional de qualidade assegurada (ARBYN et al. 2010; PONTI et al., 2017), mas apesar de vários esforços na introdução desses programas, os países em desenvolvimento não conseguem reduzir os efeitos do câncer cervical devido a inúmeros problemas relacionados com os aspectos culturais, a falta de recursos humanos e de infraestrutura, a falta de compromisso político e investimentos econômicos limitados (TING et al., 2015).

O câncer cervical é o único entre as neoplasias ginecológicas que apresenta um fator de risco bem caracterizado, o HPV (RAMEZ & KRISHNANSU, 2015). O HPV apresenta tipos de alto e baixo risco. Desses, 14 são considerados de alto risco (16, 18, 33, 45, 31, 58, 52, 35, 59, 56, 51, 68, 39, 66), e estudos verificaram que infecções pelo HPV16, 18 ou 45 são mais propensos a evoluírem para carcinoma de células escamosas de cérvix uterina do que os outros tipos, dos quais, os HPV16 e 18 são responsáveis por 70-80% dos casos de câncer de colo de útero em todo o mundo (CLIFFORD et al., 2003; DAS et al., 2015; ROBADI et al., 2018).

Embora possa ser prevenida, a prevalência de HPV na população mundial torna-se um perigo de saúde atual. A infecção pelo HPV pode sofrer regressão naturalmente, porém a persistência dos tipos de alto risco pode levar ao desenvolvimento de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) e câncer de colo uterino (GRAVITT & WINER, 2017).

Programas de rastreio bem-sucedidos reduziram a incidência de carcinoma de células escamosas de colo de útero (o tipo histológico mais frequente desse tipo de câncer), mas não de adenocarcinoma cervical, menos frequente, cuja incidência está em constante crescimento. Esta ainda é uma questão preocupante a ser resolvida porque o adenocarcinoma de colo do útero tem um comportamento biológico mais agressivo em comparação ao carcinoma de células escamosas, com pior prognóstico e diminuindo as taxas de sobrevivência mais rápido. Uma parte destas diferenças é atribuída aos padrões moleculares distintos, mas este assunto não é totalmente compreendido (WRIGHT et al., 2013).

A descoberta da associação etiológica entre HPV e câncer cervical no século passado direcionou a renovação de vários métodos de rastreio do câncer de colo uterino, então a mortalidade por esse tipo de câncer foi significativamente reduzida em alguns países desenvolvidos. Após o início de um método de rastreio eficiente, chamado exame de Papanicolau, além do monitoramento e o tratamento de lesões precursoras, houve uma redução na incidência e mortalidade (SHAO-MING & YOU-LIN, 2015; GUIDO, 2017).

A introdução de vacinas em adolescentes, meninas entre 9 e 14 anos e meninos de 11 a 14 anos, também contribuiu efetivamente para prevenção de infecção pelo HPV, e tem sido uma ferramenta promissora para reduzir a mortalidade e a iniquidade que é relacionada ao câncer induzido pelo vírus, mas o impacto da prevenção primária é um investimento a longo prazo e os custos são ainda um desafio sobre a possibilidade de ser efetivamente implementado em regiões carentes (McCOMARC et al., 2014; WALKER et al., 2017). No Brasil, em 2014, o Ministério da Saúde e sua Secretaria Nacional de Vigilância e Saúde (SNVS-MS) implementaram uma política pública de prevenção do HPV por meio da vacina quadrivalente recombinante Gardasil®, do Laboratório Merck Sharp & Dohme, seguindo um movimento internacional de imunização visando prevenir o câncer de colo de útero. A vacina foi apresentada como uma ampliação de direitos, uma vez que passou a ser oferecida gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS), sendo que até 2014 só estava disponível em laboratórios privados, com alto custo (R\$300 por dose) (QUEVEDO et al., 2016). Por ser um programa implementado recentemente no Brasil, ainda não há na literatura dados sobre os impactos da vacinação.

Apesar da infecção pelo HPV ser o principal fator de risco relacionado a esta doença, há outros fatores que contribuem para o desenvolvimento do carcinoma de colo de útero, entre eles a idade; múltiplos parceiros sexuais, que tem sido relacionado com co-infecções; uso prolongado de contraceptivos hormonais; além do alto número de partos normais e tabaco, que são fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer (SOTO-DE-LEON et al., 2011;

CROSBIE et al., 2013; ROURA et al., 2016). Aproximadamente 35% das mulheres diagnosticadas com carcinoma cervical tem a doença recorrente, com 90% desses achados nos três anos após o tratamento inicial (PECTASIDES et al., 2008). Assim, terapias alvo e estratégias de quimio e radioterapias são essenciais para a redução da mortalidade por esta malignidade.

A classificação do câncer cervical é realizada pela aparência das células, no qual há duas formas principais, carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). O primeiro é derivado do epitélio estratificado não queratinizado, característico da mucosa normal do colo do útero, e é o tipo histológico mais comum. Esse tumor se origina de células da parte externa do útero em contato com a vagina (ectocervix). O adenocarcinoma se desenvolve a partir das células glandulares produtoras de muco e cresce mais lentamente, esse tumor se origina de células da parte interna do colo do útero (endocervix). Várias alterações genéticas e epigenéticas ocorrem durante a tumorigênese cervical. Entre estas, destacamos a metilação da região promotora de genes supressores de tumor que favorecem o seu silenciamento e resultam na carcinogênese de cérvix (ZHANG et al., 2011). Zhang e colaboradores (2012) verificaram que a diminuição da expressão do gene inibidor da via do fator tecidual -2 (TFPI-2) desempenha papel significativo na apoptose de células tumorais e na angiogênese em pacientes com câncer cervical, podendo ter uma função inibitória durante seu desenvolvimento. Pelas análises imunoistoquímicas, eles observaram a presença deste fator apenas no citoplasma das lesões cervicais e sua expressão diminuída, conforme o aumento da progressão tumoral, podendo ser considerado um gene supressor de tumor.

O hormônio estrógeno também é um dos fatores relacionados com este tipo de câncer, pois o colo uterino é altamente sensível a este hormônio e, durante o ciclo menstrual, as células epiteliais cervicais proliferam e se diferenciam à medida que os níveis desse hormônio aumentam, resultando em epitélio hiperplásico sem mudanças patológicas. No entanto, uma contínua estimulação hormonal pode levar à neoplasia, pois há evidências de que o Receptor de Estrógeno Alfa (ER1) é necessário para o desenvolvimento e manutenção tumoral em associação à infecção pelo HPV de alto risco (CHUNG et al., 2010; RAMACHANDRAN, 2017).

Tendo em vista os malefícios causados pelo câncer de colo de útero, o seu tratamento inclui, cirurgia, terapia por irradiação e quimioterapia. A cirurgia é o método mais antigo utilizado como tratamento do câncer, o qual consiste em remover o tumor da paciente. No entanto é um método altamente invasivo, podendo causar lesões irreversíveis. Para melhorar os resultados da cirurgia e para superar as limitações que esse método possui, foram propostas

algumas estratégias, como a radioterapia e a quimioterapia. A radioterapia é frequentemente usada quando os pacientes são diagnosticados em estágios avançados ou sob condições irressecáveis. A quimioterapia é geralmente usada concomitantemente com radiação e inevitavelmente considerada como uma modalidade de terapia adjuvante (HACKER & VERMORKEN, 2015). Atualmente, o tratamento para lesões pré-malignas inclui técnicas de crioterapia, termocoagulação, procedimentos cirúrgicos, como conização e histerectomia, e o câncer de colo uterino é tratado com cirurgia seguido de quimioterapia e radioterapia, ou ambos (BASU et al., 2018).

Embora o câncer cervical precoce possa ser tratado com cirurgia ou radiação, o câncer cervical metastático é incurável e são necessárias novas abordagens terapêuticas (UYAR & RADER, 2014). Entre essas abordagens e drogas já conhecidas no tratamento do câncer, algumas plantas se destacam na medicina popular, e a relevância de medicamentos complementares e alternativos também estão sendo investigados. Por exemplo, alguns medicamentos fitoterápicos têm sido relatados para induzir efetivamente a apoptose de células cancerígenas do colo do útero e para ter potencial para o tratamento do câncer (ZHOU et al. 2009; GAO et al., 2011).

Um grupo de plantas que tem despertado grande interesse na comunidade científica é a família das Piperaceae que é composta por quatro gêneros principais e quase 4000 espécies, esse grupo é reconhecido em vários sistemas de medicina por suas numerosas propriedades medicinais, como o sistema *Ayurvédico* indiano de medicina e medicina folclórica da América Latina, (BAGATELA et al. 2013; LEMOS et al. 2013; DE QUEIROZ et al. 2014; SARWAR et al. 2015). Aqui destacamos a *Piper cubeba*, conhecida popularmente como pimenta de Java, uma planta usada extensivamente na medicina tradicional na Indonésia. Os frutos são utilizados para o tratamento de gonorreia, sífilis, dores abdominais, diarreia, enterite e asma (SATROAMIDJOJO, 1997; PERAZZO et al., 2013).

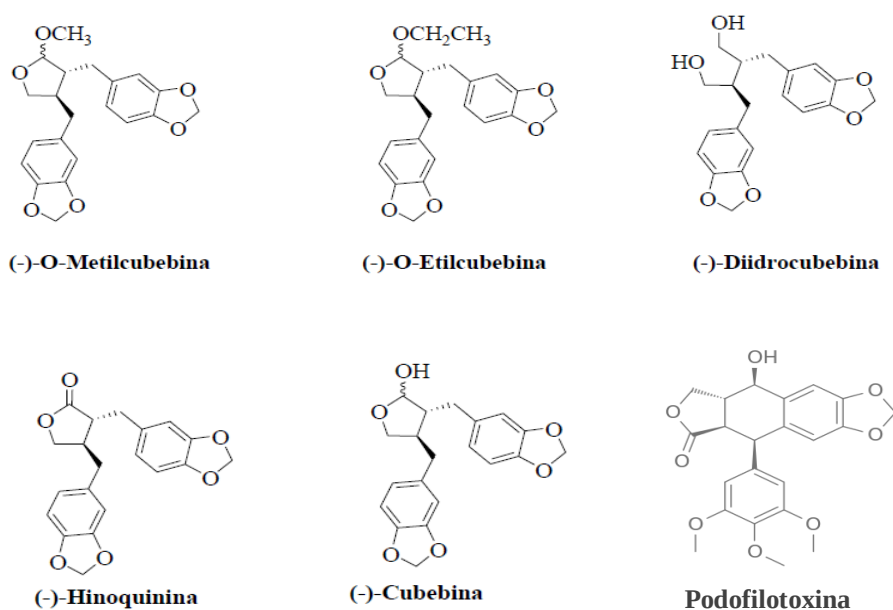
As propriedades fitoterápicas da *P. cubeba* estão diretamente relacionadas à presença de lignanas, que são metabólitos secundários da planta, sendo um dos membros mais importantes dessa classe a podofilotoxina – extraída de *Podophyllum* spp. - que apresenta comprovada atividade anticâncer (entretanto alta toxicidade) e os derivados etoposídeo e tenoposídeo que são usados clinicamente no controle de alguns tipos de câncer (CANEL et al., 2000). Assim como a podofilotoxina, outras lignanas como as da *P. cubeba* vem despertando interesse de muitos grupos de pesquisa no estudo das propriedades químicas e biológicas desses compostos. Esses estudos têm proporcionado a descoberta de várias atividades biológicas não relacionadas ao uso tradicional da *P. cubeba*, como atividade tripanocida, shistomicida,

vasodilatadora entre outras (SILVA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2011; PEREIRA et al., 2015).

As lignanas utilizadas no trabalho estão representadas na Figura 1 por suas estruturas químicas, são conhecidas por suas propriedades biológicas (ZHANG et al., 2014). Existem oito subclasses de lignanas, incluindo dibenzilbutano, dibenzilbutirolactol, dibenzilbutirolactona, furano, furofurano, ariltetralina, arilnaftaleno e dibenzociclooctadieno (MARCOTULLIO et al., 2014; PISSURNO & LAURENTIZ, 2017; LIMA et al., 2017).

Lignanas como a cubebina, hinoquinina, iateina e isoiateina que são comumente encontradas nas plantas do gênero *Piper*, também aparecem como as principais lignanas no fruto seco da *P. cubeba* (ELFAHMI et al., 2007). Das lignanas de *P. cubeba* (Figura 2A) várias classes podem ser isoladas de raízes, rizomas, caules, folhas, sementes (Figura 2B) e frutos (ELFAHMI et al., 2007; PEREIRA et al., 2016).

Figura 1 - Estruturas químicas das lignanas utilizadas no trabalho



Fonte: Elaborado pela autora

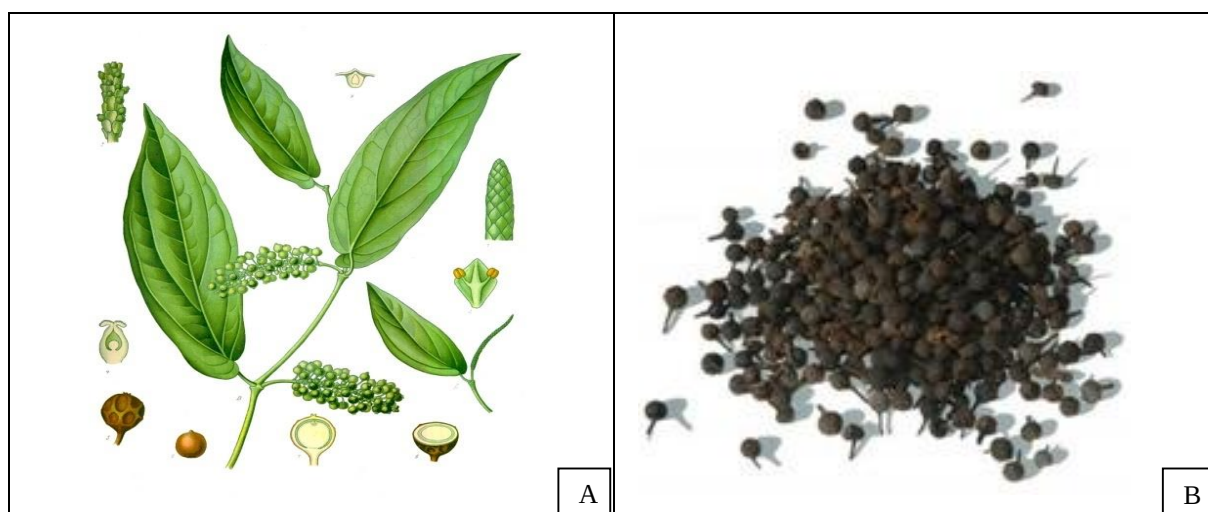
As atividades biológicas de várias lignanas têm sido estudadas mais profundamente assim como o óleo essencial da *P. cubeba*, que acumula os grupos de compostos em quantidades relativamente altas. Vinte e quatro lignanas foram relatados até agora na *P. cubeba* (PRABHU et al. 1985; BADHEKA et al 1986; BADHEKA et al. 1987; CUNHA et al. 2012).

A *P. cubeba* tem sido utilizada na medicina Unani (medicina que abrange terapias com medicação à base de ervas, partes de animais ou minerais, e terapias sem medicação,

manuals e espirituais) como um agente protetor e curativo em várias doenças renais (AHMAD et al., 2012). Extratos e lignanas da *P. cubeba* tem várias atividades biológicas, incluindo anti-inflamatória (PERAZZO et al., 2013; REZENDE et al., 2016), anti-alérgica do tipo IV (CHOI & HWANG, 2003), anti-leishmaniósica (BODIWALA et al., 2007), genotóxica (JUNQUEIRA et al., 2007), antimicrobiana (MOTHANA et al., 2016) anti-proliferativa (YAM et al., 2008), antioxidantes (DE REZENDE et al., 2013) e anti-vírus da hepatite C (JANUARIO et al., 2002).

Em estudos com linhagens celulares de câncer de mama, Cunha e colaboradores (2016), observaram que a lignana hinoquinina extraída da *P. cubeba* contribui como um agente antiproliferativo nessas células. Enquanto em células de adenocarcinoma de cólon tratadas com a lignana cubebina, Niwa e colaboradores (2016) verificaram a diminuição da viabilidade das células após condições específicas de tratamento.

Figura 2 - A. Gravura da planta *Piper cubeba*. B. Sementes da *Piper cubeba*



Fonte: Köler (1887); Rezende et al. (2016).

Barbosa e colaboradores (2014) testaram o potencial antigenotóxico e anticarcinogênico da lignana hinoquinina em lesões pré neoplásicas em cólon de rato. De acordo com os autores, a hinoquinina foi capaz de reduzir o dano ao DNA induzido pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e inibiu adicionalmente a formação de lesões pré-neoplásicas.

A atividade antitumoral da cubebina, isolada a partir de sementes secas de *P. cubeba* e dos seus derivados semisintéticos, foi testada in vitro em seis diferentes linhagens celulares tumorais humanas, entre elas a de carcinoma cervical humano. De acordo com os resultados, que foram expressos como IC₅₀, a hinoquinina e compostos contendo grupo amida e anel lactona foram aqueles que tinham maior atividade nas células testadas (RAJALEKSHMI et al., 2016).

Nahak e Sahu relataram que o extrato etanólico bruto da *P. cubeba* tem uma atividade antioxidante mais elevada do que o extrato de outra espécie de *Piper*, a *P. nigrum*, que pode ser devido a um composto de polifenol, pois a *P. cubeba* tem um conteúdo fenólico que é mais elevado do que *P. nigrum* (NAHAK; SAHU, 2011). A hinoquinina foi examinada como um agente antitumoral em um promotor de citomegalovírus humano (HCMV) de expressão de antígeno precoce imediato (IE) no adenocarcinoma células de pulmão humano (A549) (PUSZTAI et al., 2010).

Apesar dos diversos estudos com as lignanas ainda são poucos os relatos na literatura sobre a citotoxicidade e genotoxicidade dessas lignanas em células tumorais. Um estudo sobre a citotoxicidade da cubebina mostrou que esse composto é capaz de diminuir o crescimento de células de câncer de próstata e que essa redução ocorre por diferentes mecanismos (JIANYING et al., 2008). Em outro estudo, Graidist e colaboradores (2015) também observaram a atividade citotóxica do extrato da *P. cubeba* em linhagens de câncer de mama, verificando que uma fração do fitoterápico inibiu o crescimento celular e induziu apoptose.

Ainda não existem relatos na literatura que relacionam vias genéticas com a ação específica da *P. cubeba*, mas sabemos que genes relacionados com vias inflamatórias e/ou tumorigênicas podem ser modulados pela ação das lignanas. Dentre esses genes destacamos a ciclo-oxigenase 2 (*COX2*), enzima responsável pela conversão do ácido aracdônico em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano, fundamentais no processo de inflamação tecidual. A síntese de *COX2*, usualmente diminuta, sob estímulo de citocinas; fatores de crescimento celular e oncogenes têm sua expressão aumentada, se relacionando com a angiogênese, invasão e metástase tumoral. O aumento da *COX2* é observado em vários tipos de câncer, como por exemplo, nos cânceres de pâncreas, pulmão, mama, estômago, cólon, próstata e de cabeça e pescoço. Os níveis aumentados de *COX2* durante o desenvolvimento e a progressão de tumores estão relacionados com a ativação de oncogenes; atividades aumentadas dos fatores de crescimento celular; e das citocinas. Por via do AMPc, a *COX2* promove a migração e a disseminação destas células através do mecanismo de angiogênese, e além disso, aumenta a síntese de VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial), fundamental para o processo de angiogênese (BONHIN et al., 2014).

A *COX2* sintetiza a PGE₂, que pode ativar receptores acoplados à proteína G, tais como *PTGEP1*, *PTGEP2*, *PTGEP3* e *PTGEP4* e regula a expressão, secreção e ativação de várias metaloproteinases em diferentes tipos celulares. Alguns dados da literatura sugerem que a expressão de *PTGEP3* possui papel prognóstico no câncer (ABRAHAO et al., 2010).

As proteínas que naturalmente inibem a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) são as codificadas pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). A proteólise descontrolada das *MMPs* promove degradação da matriz extracelular, invasão de células tumorais e aumento do risco de metástase de células cancerígenas (BOURBOULIA et al., 2013). As metaloproteinases (*MMPs*) são enzimas proteolíticas dependentes de zinco que degradam a maioria dos componentes da matriz extracelular incluindo colágeno, elastina e fibronectina. A degradação da matriz de colágeno é importante para a invasão de tecidos subjacentes e metástases. Várias *MMPs* possuem expressão elevada em câncer de cabeça e pescoço incluindo *MMP-2*, *MMP-8*, *MMP-9* e *MMP-13*. Inclusive, *MMP-2* e *MMP-9* desempenham um papel importante na carcinogênese de cabeça e pescoço por degradar o colágeno tipo IV, o principal componente da membrana basal. Alguns estudos mostram uma correlação significativa entre a expressão de *MMP-9* e baixa sobrevida em pacientes com câncer (YOSHIZAKI et al., 2001; MOILANEN et al., 2002; CANEVARI & ROGATTO, 2004; SANTIAGO, 2015).

Diante dessas considerações, investigamos *in vitro*, a ação de 5 lignanas -(cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, hinoquinina e metilcubebina), além do extrato total da *P. cubeba* e o controle positivo (podofilotoxina) - sobre as células tumorais SiHa e HeLa, e sobre as células normais HaCaT, avaliando a morfologia, a proliferação, a migração celular e a citotoxicidade, bem como a genotoxicidade, a apoptose e a necrose celular, além da avaliação de expressão dos genes de uma via relacionada com processos inflamatórios (*COX2*, *PTGEP3*, *PTGEP4*, *MMP2* e *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*) de modo a determinar como as lignanas atuam na expressão desses genes e como essas alterações podem participar do processo tumorigênico, buscando assim possíveis biomarcadores moleculares em carcinoma de colo de útero.

2. OBJETIVOS

Em função da importância da atividade antitumoral das lignanas extraídas da *Piper cubeba*, incluindo suas propriedades químicas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial efeito citotóxico e genotóxico de lignanas nas células neoplásicas sobre a morfologia, a proliferação e a migração celular, a citotoxicidade, a genotoxicidade, a apoptose e a necrose celular e a expressão gênica, observando como possivelmente o fitoterápico age, e, ocorrendo alterações, como estas podem participar do processo tumorigênico. Além de observar como o fitoterápico age em células de queratinócitos normais, a fim de comparar todos os efeitos das lignanas em células tumorigênicas e não tumorigênicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Imunomorfologia, Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE-UNESP, em colaboração com a Profa. Dra. Sonia Maria Olini, e no Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica, Departamento de Biologia Molecular – FAMERP-Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto em colaboração com a Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva.

3.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas duas linhagens tumorigênicas e uma linhagem de células normais. As linhagens tumorigênicas são uma de carcinoma de células escamosas de cérvix uterina (SiHa) e uma de adenocarcinoma de cérvix uterina (HeLa), ambas do banco americano de linhagens celulares (ATCC), que foram cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/FAMERP, SP. A linhagem de células normais de queratinócitos da pele humana (HaCaT), foi cedida gentilmente pela Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino da USP/Ribeirão Preto, SP.

Essas duas linhagens celulares tumorigênicas foram escolhidas por apresentarem morfologias diferentes, enquanto a SiHa apresenta células isoladas e fusiformes, a HeLa apresenta células mais alongadas, com prolongamentos citoplasmáticos, núcleos grandes e centralizados, as células ficam bem aderidas umas às outras, formando um arranjo típico de mucosa. Além disso, essas duas linhagens celulares apresentam-se infectadas por HPVs diferentes e genes também se expressando diferentemente. A linhagem celular HeLa é infectada pelo HPV18, enquanto a linhagem SiHa é infectada pelo HPV16.

3.2 Lignanas da *Piper cubeba*, preparação do extrato e separação das lignanas

As lignanas avaliadas foram, cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina hinoquinina e metilcubebina, todas extraídas das sementes de *Piper cubeba* além do extrato total etanólico, e foram comparadas com uma outra lignana, podofilotoxina (extraída de *Podophyllum* spp.), utilizada como controle positivo, pois apresenta comprovada atividade anticâncer (entretanto alta toxicidade). Todas as lignanas foram diluídas em 1mL de veículo (50% de Dimetilsulfoxide - DMSO e 50% de água ultrapura), então para todos os experimentos foi utilizada uma amostra controle com o diluente (veículo - DMSO), na metade do volume máximo utilizado para a concentração de 100µg/mL. Todas as lignanas foram cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Rosângela da Silva Laurentiz, Departamento de Físico-Química da FEIS/UNESP.

As sementes da *Piper cubeba* foram importadas da Índia com recursos de projetos anteriores já finalizados. As sementes secas foram trituradas num moinho de facas até um pó fino com o qual foi feito o extrato etanólico. O extrato foi preparado a partir de 1Kg de pó das sementes em 5L de etanol, a mistura foi mantida em repouso com ocasional agitação por 1 semana. Após esse período a mistura foi filtrada e o solvente removido à pressão reduzida em rotaevaporador. O extrato obtido foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (várias colunas) usando gradientes com polaridade crescente desde hexano puro, misturas de hexano e diclorometano, até diclorometano puro. As frações recolhidas foram submetidas a análises RMN (de ^1H e ^{13}C) e HPLC para a confirmação da estrutura e determinação da pureza, sendo esta superior a 98%. Na cultura *in vitro* foram utilizadas as faixas de concentração 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ das lignanas nas linhagens celulares HaCaT, HeLa e SiHa.

3.3 Cultivo e análise da morfologia celular

As linhagens celulares HeLa e SiHa foram cultivadas em meio completo (MEM suplementado com 10% de soro bovino, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% piruvato de sódio, 1% de antibiótico/antimicótico, 1% de L-glutamina), enquanto a linhagem celular HaCat foi semeada em DMEM, igualmente suplementado como descrito acima. As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm^2 , mantidas a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas, até se fixarem na superfície da garrafa. Após esse período, o meio foi trocado a cada dois ou três dias, ou até as células tornarem-se confluentes. O crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente em microscópio invertido de contraste de fase *Olympus CKX41* e, quando a densidade celular atingiu confluência de 80 a 90%, o material foi submetido à tripsinização e subdividido em duas réplicas.

As diferentes condições experimentais são apresentadas no Fluxograma 1.

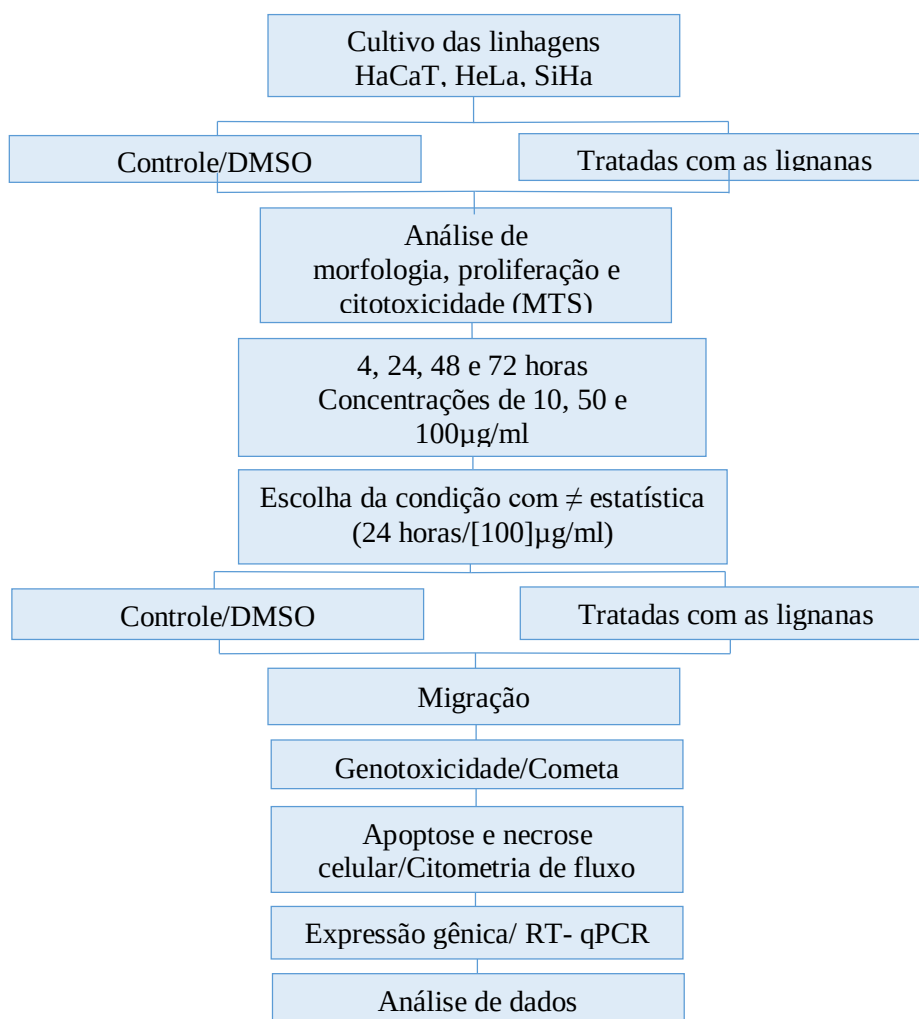
3.4 Ensaio de proliferação celular

Foram realizados 8 tratamentos com as 3 linhagens celulares, um controle com DMSO (veículo), 7 com os diferentes compostos (cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, hinoquinina, metilcubebina e extrato total) e o controle positivo (podofilotoxina), em três diferentes concentrações (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), para os quatro diferentes tempos, 4, 24, 48 e 72 horas.

Para análise do índice de proliferação celular, nas 3 diferentes linhagens, foram realizadas as contagens de células cultivadas em placas de cultura de 24 poços, semeadas na concentração de 5×10^4 em 400 μL de meio com 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37°C em câmara úmida

e atmosfera com 5% de CO₂, por 24 horas, até se fixarem na placa de cultura. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura sem soro (meio 0%), a fim de deixar todas as células na mesma etapa celular. Após 24 horas foi trocado o meio de cultura pelo meio completo e adicionados os tratamentos (lignanas). As células receberam as concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL das lignanas para quatro diferentes tempos de contagem celular (4, 24, 48 e 72 horas).

Fluxograma 1 – Sequência experimental do trabalho

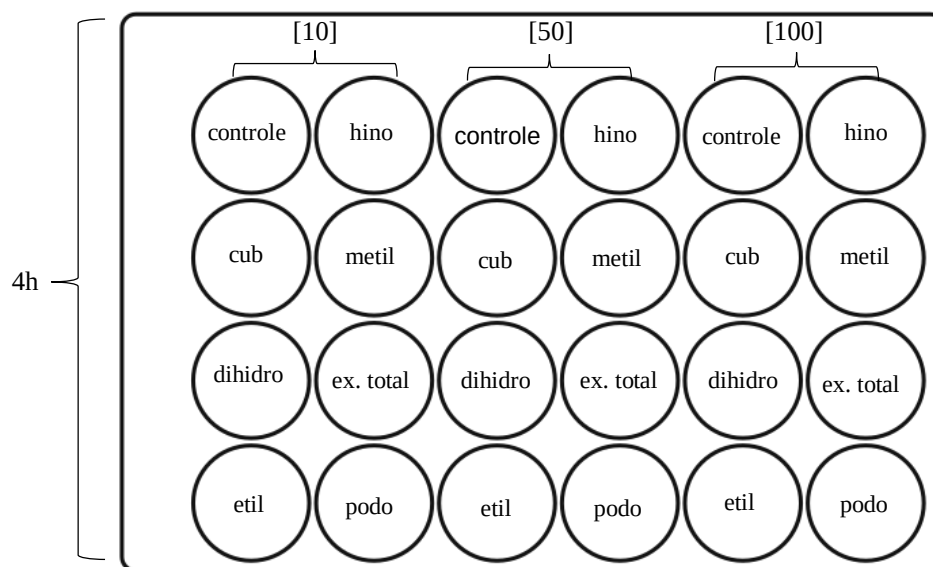


Fonte: Elaborado pela autora

As células, tratadas ou não com as lignanas em todos os períodos experimentais, foram tripsinizadas, coradas com azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro), em microscópio invertido de contraste de fase *Olympus CKX41*, considerou-se apenas as células viáveis nas contagens. Esse experimento foi realizado em quadruplicata e foi executado no Laboratório de Imunomorfologia do Ibilce/UNESP.

Esse ensaio foi realizado para determinar o período experimental, com a diferença estatística mais expressiva, entre os grupos tratados ou não com as lignanas nas diferentes concentrações e tempos, para realização dos experimentos posteriores. A figura 3 mostra o desenho experimental do ensaio de proliferação.

Figura 3 - Modelo de uma placa utilizada no ensaio de proliferação



Fonte: Elaborado pela autora. Placa contendo 5×10^4 células, sem (controle) e com tratamento com as lignanas no tempo de 4 horas nas concentrações de 10, 50 e $100 \mu\text{g/ml}$, este experimento foi repetido para as 3 linhagens estudadas, executado nos 4 diferentes tempos experimentais (4, 24, 48 e 72 horas).

3.5 Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular (MTS)

O ensaio de citotoxicidade é um método colorimétrico para determinar a quantidade de células viáveis, no qual aplica-se o MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). A solução é biorreduzida pelas células em um produto colorido de formazan que é solúvel em meio de cultura. Esta conversão é presumivelmente realizada por NADPH ou NADH produzido por enzimas desidrogenases em células metabolicamente ativas (BERRIDGE & TAN; 1993). A coloração do formazan tem tom azulado e é captada no comprimento de onda de 490nm em espectrofotômetro, a intensidade da coloração é diretamente proporcional a viabilidade celular.

Foram realizados 8 tratamentos com as 3 linhagens celulares, um controle com DMSO (veículo), 7 com os diferentes compostos (cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, hinoquinina, metilcubebina e extrato total) e o controle positivo (podofilotoxina) em três

diferentes concentrações (10, 50 e 100µg/mL), para os quatro diferentes tempos, 4, 24, 48 e 72 horas.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 5×10^4 em 100µL de meio completo 10% e mantidas a 37°C em câmara úmida e atmosfera com 5% de CO₂, por 24 horas, até se fixarem na placa de cultura. Após esse período, o meio foi substituído por meio sem soro (0%), a fim de deixar todas as células na mesma etapa celular. Após 24 horas, foi trocado novamente o meio de cultura por meio completo e adicionados os tratamentos. As células, tratadas ou não com as lignanas em todos os períodos experimentais, receberam diretamente ao meio 20µL da solução de MTS, seguido de incubação em estufa por 4 horas para reação do MTS. As placas foram lidas em leitor de placas de 96 poços em comprimento de onda de 490nm (como indica o protocolo CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay – Promega). Foi utilizada uma equação para obtenção da porcentagem da viabilidade celular, bem como o cálculo do IC₅₀ (Concentração Inibitória para 50% das células), os valores de absorbância obtidos no tratamento com os compostos (A), foram normalizados para os valores obtidos com o controle (B) para obtenção da porcentagem de viabilidade celular (C) pela equação: $C = A/B \times 100$.

3.6 Ensaio de migração celular

Foram realizados 8 tratamentos com as 3 linhagens celulares, um controle com DMSO (veículo), 7 com os diferentes compostos (cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, hinoquinina, metilcubebina e extrato total) e o controle positivo (podofilotoxina), na concentração de 100µg/mL e tempo de 24 horas. Concentração e tempo pré-selecionados após análises dos ensaios de proliferação e MTS, que mostraram melhores resultados nessas condições.

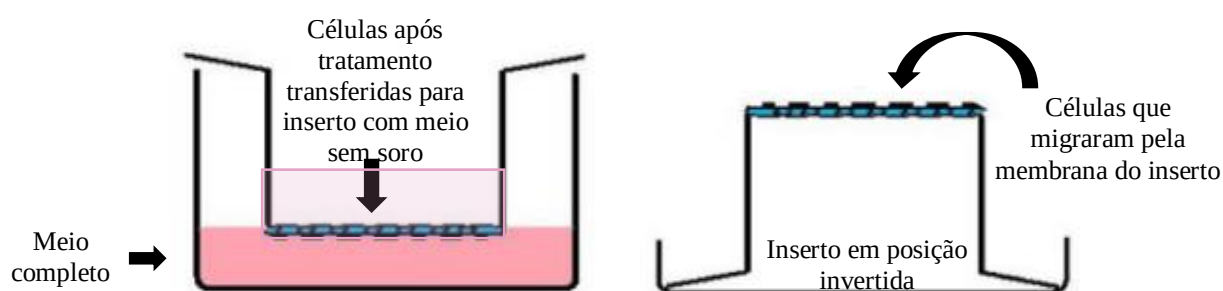
As células foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 5×10^4 em 400µL de meio completo e mantidas a 37°C em câmara úmida e atmosfera com 5% de CO₂, por 24 horas, até se fixarem na placa de cultura. Após esse período, o meio foi substituído por meio sem soro, a fim de deixar todas as células na mesma etapa celular. Após 24 horas, foi trocado novamente o meio de cultura por meio completo e adicionados os tratamentos, esse procedimento foi realizado para obter a quantidade necessária de células para fazer o experimento de migração *transwell*. Após 24 horas (tempo pré-estabelecido) de ação das lignanas, novas placas de 24 poços receberam 500µL de meio completo e insertos *transwell* com membrana de poros para permitir a passagem das células, foram colocados dentro destes novos poços contendo apenas o meio de cultura. As placas contendo as células controle e

tratadas foram tripsinizadas e retirado de cada condição a concentração de 3×10^4 de células que foram transferidas para o inserto *transwell* juntamente com 150 μ L meio sem soro. Desta forma fazendo com que as células pudessem migrar para a parte inferior externa do inserto, a qual estava em contato com o meio completo. Após, as células foram incubadas em estufa por 24 horas para que ocorresse a migração.

Na etapa de fixação das células que migraram, os meios contidos nas placas e insertos foram retirados, os insertos foram lavados com PBS e seus interiores limpos com haste de algodão para remover células que não migraram. Nos espaços vagos da placa de cultura foram adicionados 500 μ L de paraformaldeído, os insertos foram então movidos para os poços contendo paraformaldeído e a placa foi incubada por 30 minutos para que as células se fixassem.

Após 30 minutos, os insertos foram movidos para poços contendo 300 μ L de cristal violeta, e incubados por 30 minutos para coloração. Posteriormente foram lavados com PBS para remover o excesso do cristal violeta, e deixados para secar em posição invertida no fluxo laminar. Secos, os insertos foram colocados sobre lâminas, analisados e fotografados em 5 diferentes campos, em microscópio invertido de contraste de fase *Olympus CKX41* com câmera acoplada em aumento de 100x, a análise quantitativa de células que migraram foi feita a partir das fotos. O experimento foi realizado em triplicata e executado no Laboratório de Imunomorfologia do Ibilce/UNESP. A figura 4 mostra o esquema de um poço com inserto *transwell*.

Figura 4 – Insertos do ensaio de migração



Fonte: Chan et al. (2009) (modificado)

3.7 Ensaio de genotoxicidade (Cometa)

O ensaio cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido às suas particularidades e vantagens quando comparado a outros testes para a detecção de substâncias genotóxicas (GONTIJO & TICE, 2003). É eficiente para quantificação das lesões e para detectar os efeitos do reparo no DNA em células de mamíferos. As membranas das células são

lisadas e os núcleos são submetidas a uma corrente elétrica que age como uma força proporcionando a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem danos detectáveis no DNA e as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Sendo assim, o tamanho da cauda proporcional à dimensão do dano que foi causado no material genético da célula (SILVA, 2007).

Foram realizados 8 tratamentos com as 3 linhagens celulares, um controle com DMSO (veículo), 7 com os diferentes compostos (cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, hinoquinina, metilcubebina e extrato total) e o controle positivo (podofilotoxina) na concentração de 100µg/ml e tempo de 24 horas.

As células foram plaqueadas em placas de cultura de 12 poços em uma concentração de 3×10^4 em 1mL de meio completo 10% e foram mantidas em câmara úmida e atmosfera com 5% de CO₂, por 24 horas, até se fixarem na placa de cultura. Após as 24h o meio completo 10% foi substituído por meio sem soro a fim de deixar todas as células na mesma etapa celular, e foram incubadas. No dia seguinte, foi retirado o meio de cultura das placas e adicionado meio completo 10% juntamente com as lignanas. Após a ação das lignanas (24 horas) o conteúdo dos poços foram tripsinizados e levados à centrífuga em tubos falcon de 15mL por 5 minutos a 1500 rpm, a fim de formar um “*pellet*” de células no fundo dos tubos. O sobrenadante dos tubos foi desprezado, o “*pellet*” foi diluído em agarose de baixo ponto de fusão/*Low Melting Temperature agarose* (LMP) e disposto em lâminas preparadas previamente com agarose de ponto de fusão normal/*Normal Melting agarose* (NMP) para que ficasse com uma fina película sobre a lâmina. Após a disposição das células diluídas sobre as lâminas, foram colocadas lamínulas e o material foi levado à geladeira por 30 minutos para solidificar a agarose *Low Melting*.

Depois de solidificado, as lamínulas foram retiradas das lâminas e estas foram dispostas em cubas de vidro para a etapa de lise das membranas. A solução de lise pH 10 (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, Lauril 35mM, DMSO 10% e Triton-x100 1%), foi adicionada às cubas que em seguida foram cobertas por papel alumínio e acondicionadas em geladeira por 1 hora.

Após lisadas as membranas, as lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese com tampão de corrida pH 13 (NaOH 10N, EDTA 200mM), as lâminas permaneceram na cuba por 30 minutos antes de se iniciar a eletroforese. Transcorrido este tempo, seguiu-se uma eletroforese de 20 minutos a 25V e 300mA.

Efetuada a corrida de eletroforese, as lâminas foram lavadas por 3 vezes com a solução de neutralização (Tris 0,4M) com pH 7,5. Com as lâminas neutralizadas e secas seguiu-se a etapa de fixação, onde as lâminas foram novamente acondicionadas em cubas de vidro preenchidas com etanol absoluto, ficando nesta condição por 10 minutos. Transcorrido este tempo, as lâminas foram expostas para secagem.

Na etapa de coloração, cada lâmina recebeu 100µL da solução de coloração (GelRed®, NaCl 1M e H₂O destilada) e após 5 minutos foram analisadas em microscópio de fluorescência.

Em cada lâmina foram contados dois grupos de 50 núcleos (100 núcleos por lâmina), analisando os seus danos. Os núcleos celulares foram classificados em uma classe de dano que é determinada de acordo com a intensidade e tamanho da cauda do cometa.

Classe 0 – sem dano aparente;

Classe 1 – cauda curta, menor que o diâmetro do núcleo;

Classe 2 – comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo;

Classe 3 – comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo, (KOBAYASHI, 1995).

O Índice total de danos (ID total) foi calculado pela fórmula abaixo, onde n, refere-se ao número de células de cada classe de danos:

$$\text{ID total} = 0.(n \text{ Classe } 0) + 1.(n \text{ Classe } 1) + 2.(n \text{ Classe } 2) + 3.(n \text{ Classe } 3).$$

Todas as etapas do ensaio cometa foram realizadas no Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE/UNESP, em ambientes sem a incidência de luz direta e com temperaturas baixas, para evitar danos adicionais ao DNA.

3.8 Avaliação de Apoptose

As células das 3 linhagens utilizadas no trabalho foram cultivadas em garrafas de cultura de 25cm², sendo uma garrafa para cada tratamento e uma garrafa extra contendo o controle positivo para calibrar o citômetro, totalizando 9 garrafas para cada linhagem.

As células foram dispostas nas garrafas de cultura em 2mL de meio completo e mantidas em câmara úmida, atmosfera com 5% de CO₂, por 24 horas, até se fixarem nas superfícies. Após as 24h o meio completo foi substituído por meio sem soro a fim de deixar todas as células na mesma etapa celular, e foram incubadas novamente. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por 2mL de meio completo e foram adicionadas as lignanas numa concentração de 100µg/ml, cada garrafa recebeu cada uma das lignanas (cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, hinoquinina, metilcubebina e extrato total), além da garrafa controle que recebeu

apenas DMSO e uma segunda garrafa que recebeu podofilotoxina (controle positivo) para calibrar o citômetro.

Passado o tempo do tratamento (24 horas), o conteúdo das garrafas foi tripsinizado e centrifugado a 1500 rpm por 3 minutos em tubos falcon de 15mL, para obtenção do “*pellet*” de células, esse “*pellet*” foi lavado 3 vezes com PBS, e após as lavagens foi homogeneizado em novo PBS. As células de cada tubo foram contadas, e destas, uma concentração de 1×10^6 células/mL foram diluídas no *buffer* 1x do kit “*PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I*” (BD *pharmigen*, San Diego, USA). Desta solução foram transferidos 100µL para um tubo de 1,5mL, em seguida foram adicionados 5µL de PE Annexin V e 5µL de 7-AAD (BD *Pharmigen*, San Diego, USA). Após homogeneizada, a solução foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, no escuro. Para a leitura foram adicionados 400µL de *buffer* 1X e posteriormente adquiridos 10.000 eventos de cada amostra no citômetro (*Guava Easy Cyte*, MILLIPORE). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE/UNESP.

3.9 Seleção dos genes de interesse

Os genes estudados foram previamente selecionados, por bioinformática, a partir dos marcadores potenciais em ambiente tumoral identificados por estudos anteriores (RODRIGUES-LISONI et al., 2010; LEE et al., 2011), utilizando bibliotecas SAGE. As vias metabólicas desses marcadores potenciais foram avaliadas e alguns genes relacionados a elas também foram escolhidos. A seleção dos genes seguiu um parâmetro: envolvimento potencial em processos de inflamação e invasão tumoral.

Os iniciadores específicos para cada transcrito foram desenhados com a ferramenta *Primer3*, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores para os genes de interesse

Oligonucleotídeo	Sequência
<i>PTGEP3 anti-sense</i>	5' TCTCCGTGTGTGTCTTGCAG 3'
<i>PTGEP3 sense</i>	5' AGCTTATGGGGATCATGTGC 3'
<i>PTGEP4 anti-sense</i>	5' CCAAACCTGGCTGATATAACTGG 3'
<i>PTGEP4 sense</i>	5' CGAGATCCAGATGGTCATCTTAC 3'
<i>MMP2 anti-sense</i>	5' CCGTCAAAGGGGTATCCATC 3'
<i>MMP2 sense</i>	5' AAGTCTGGAGCGATGTGACC 3'
<i>MMP9 anti-sense</i>	5' ATTTCGACTCTCCACGCATC 3'
<i>MMP9 sense</i>	5' TTGTGCTCTTCCCTGGAGAC 3'
<i>COX2 anti-sense</i>	5' AGAAGGCTTCCCAGCTTTTG 3'
<i>COX2 sense</i>	5' ATTCCCTTCCTTCGAAATGC 3'
<i>TIMP1 anti-sense</i>	5' TTTTCAGAGCCTTGGAGGAG 3'
<i>TIMP1 sense</i>	5' ACTGTTGGCTGTGAGGAATG 3'
<i>TIMP2 anti-sense</i>	5' CTATATCCTTCTCAGGCCCTTTG 3'
<i>TIMP2 sense</i>	5' AGAAGGAAGTGGACTCTGGAAAC 3'

Fonte: Moreira (2015) (modificado)

3.10 Análise e avaliação de expressão gênica

As reações foram realizadas para as condições escolhidas anteriormente (tempo de 24h e concentração de [100µg/mL]) em termociclador *7500 Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*), no Laboratório de Biomarcadores e Bioinformática Médica, na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, SP. Todas as reações foram preparadas em triplicata, incluindo o controle endógeno *GAPDH*, e processadas em volume final de 20µL contendo 100ng de cDNA, *SYBR® Green PCR Master Mix* e 100nM de cada primer, seguindo protocolo da *Applied Biosystems*.

As condições de termociclagem compreenderam uma incubação de 2 min a 50°C, seguida por desnaturação inicial de 10 min a 95°C. Em seguida, o programa continuou com 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C, para anelamento de primers e extensão das cadeias, e 35 seg a 65°C, para coleta do sinal. A curva de dissociação foi gerada após amplificação e compreendeu um passo de 15 seg a 95°C seguido de 1 min a 60°C. A quantificação foi realizada comparando-se os valores de expressão obtidos das curvas padrões, as quais foram desenhadas pela diluição seriada a partir de um *pool* de amostras de cDNA. O fator de normalização utilizado foi a média geométrica do gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), utilizado como controle interno (controle endógeno). Os valores de expressão gênica obtidos nas análises foram quantificados tendo como base a amostra controle, escolhida como calibrador de todas as amostras.

A análise dos resultados da PCR quantitativa em tempo real foi a partir dos valores do Ct (Cycle threshold) de cada amostra, sendo que foram calculadas as médias das triplicatas. Posteriormente, foi calculado o ΔCt a partir da subtração da média obtida para a sequência de interesse por aquela do controle interno. Para o cálculo do $\Delta-\Delta Ct$, foi escolhida a amostra controle como calibrador, sendo atribuído ao mesmo o valor de zero como resultado da subtração com seu próprio ΔCt . Nas demais amostras (tratadas com as lignanas), o resultado do $\Delta-\Delta Ct$ foi calculado a partir das diferenças dos valores de ΔCt de cada um deles em relação ao calibrador. Em seguida, foi calculado o $2^{-\Delta-\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001). Finalmente, para uma melhor representação gráfica, os resultados foram apresentados em uma escala logarítmica de base 2 (Log2). Foi considerado aumento ou redução significativa de expressão quando o valor de expressão foi duas vezes maior ou menor, respectivamente, em relação à amostra controle ou quando esteve acima ou abaixo de 1 quando apresentado na forma de Log2.

3.11 Análises estatísticas

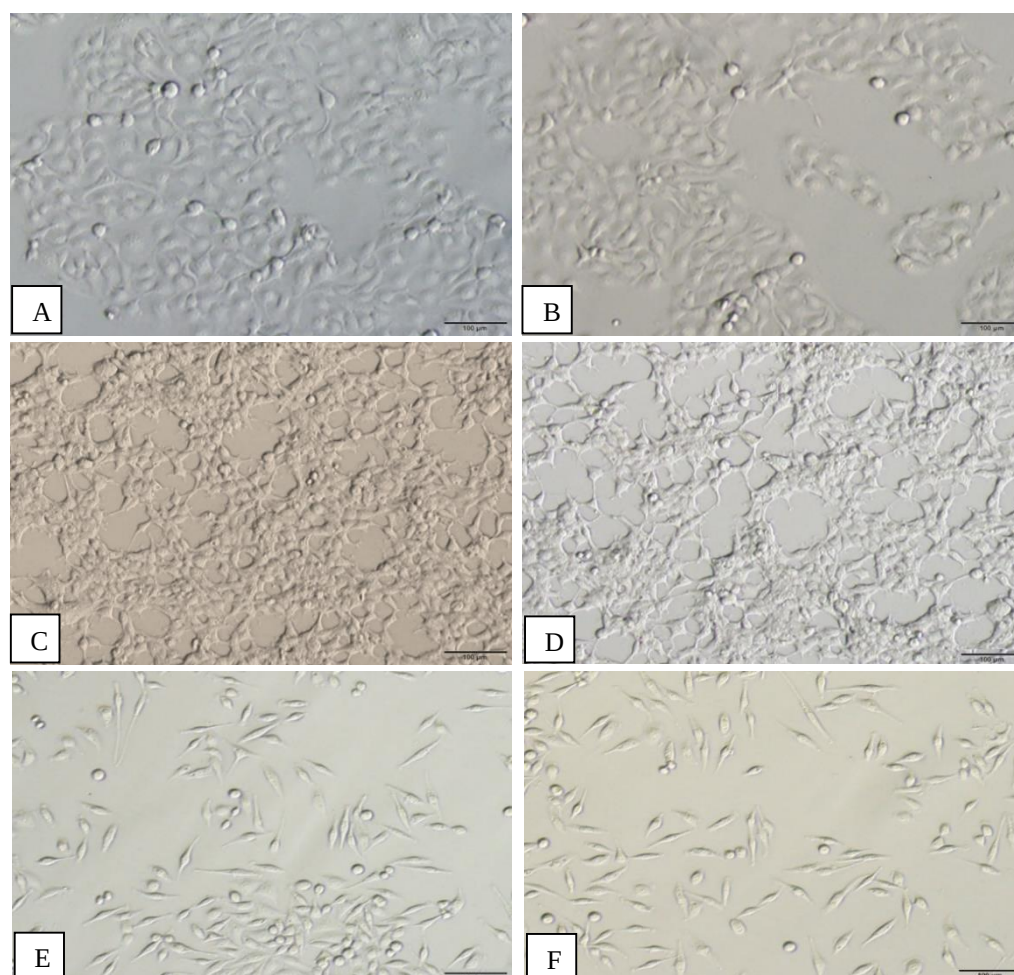
Para os ensaios de proliferação, citotoxicidade/viabilidade e migração celular foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguido do *post-test* de comparações múltiplas *Bonferroni*. Para o ensaio Cometa, primeiro foi calculado o Índice Total de Danos (ID), por meio da fórmula: $ID\ total = 0.(n\ Classe\ 0) + 1.(n\ Classe\ 1) + 2.(n\ Classe\ 2) + 3.(n\ Classe\ 3)$ e posteriormente foi realizada ANOVA seguida por teste de *Bonferroni*. O intervalo de confiança estabelecido foi de 95% e quando $p < 0,05$, o resultado foi considerado significativo estatisticamente, utilizando o software *GraphPad PRISM 5.0*. Para a análise de expressão gênica foi feito o cálculo do $\Delta\Delta Ct$.

4. RESULTADOS

4.1 Morfologia celular

Inicialmente, as células HaCaT, HeLa e SiHa, foram cultivadas e observadas na microscopia de contraste de fase. A linhagem HaCaT (Fig. 5 A e B) apresenta células de aspecto arredondado e núcleo de posição central, a linhagem HeLa (Fig. 5 C e D) apresenta células mais alongadas, com prolongamentos citoplasmáticos, núcleo grande e centralizado, as células ficam bem aderidas umas às outras, formando um aspecto aglomerado, já a linhagem SiHa (Fig. 5 E e F) apresenta células isoladas e fusiformes. Não houve alteração morfológica, entre as células controle e as células tratadas com as lignanas em nenhuma das condições para as 3 linhagens. A figura 5 mostra as células sem tratamento e tratadas com cubebina na concentração de 100 μ g/mL por 24h.

Figura 5 – Análise da morfologia das linhagens celulares pré e pós tratamento



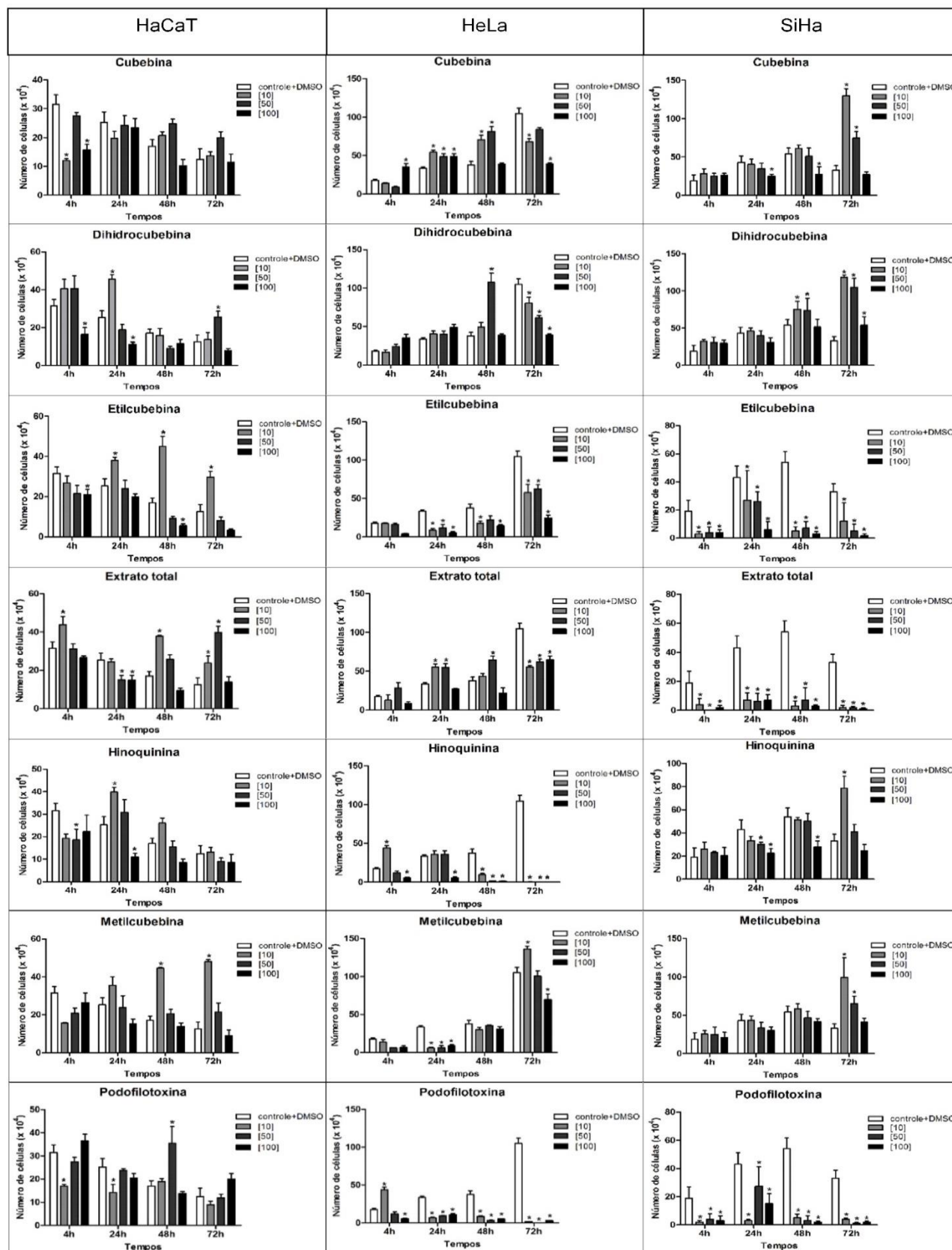
Fonte: Elaborado pela autora. Células controle, sem tratamento HaCaT [A], HeLa [C] e SiHa [E]. Células tratadas com cubebina, na concentração de 100 μ g/mL por 24 horas, HaCaT [B], HeLa [D] e SiHa [F]. Aumento de 100x, escala de 100 μ m.

4.2 Índice de proliferação celular

Comparamos a proliferação das células HaCaT, HeLa e SiHa tratadas e não com as lignanas nos diferentes tempos (4, 24, 48 e 72 horas) e nas diferentes concentrações (10, 50 e 100µg/mL). Foi realizada uma análise quantitativa para cada condição experimental, somando à mesma análise feita com os resultados de citotoxicidade, obtivemos um *ranking* de melhores condições experimentais. Considerou-se como melhores condições, os tempos e concentrações que apareciam mais vezes como significativos estatisticamente quando considerado a atividade antiproliferativa e citotóxica para as células tumorigênicas. Esta análise trouxe como melhores condições experimentais o tempo de 24 horas e concentração de 100µg/mL, e em segundo lugar o tempo de 48 horas e concentração de 100µg/mL. Sendo assim, os experimentos posteriores foram realizados nestas condições experimentais (24h/[100µg/mL]). A figura 6 mostra os gráficos obtidos a partir da análise estatística das contagens de proliferação celular, onde é possível observar alta atividade antiproliferativa especificamente da lignana Etilcubebina sobre as 2 linhagens tumorigênicas, bem como para o Extrato total da *Piper cubeba* sobre a linhagem SiHa, e Hinoquinina sobre a linhagem HeLa. Como já era esperado por ser utilizada como um controle positivo, a lignana Podofilotoxina apresentou alta atividade antiproliferativa nas linhagens tumorigênicas.

Interessantemente a linhagem normal (HaCaT) não foi severamente afetada por nenhuma das lignanas.

Figura 6 – Ensaios de proliferação celular com as 7 diferentes lignanas nas diferentes condições experimentais nas 3 linhagens celulares: HaCaT, SiHa e HeLa



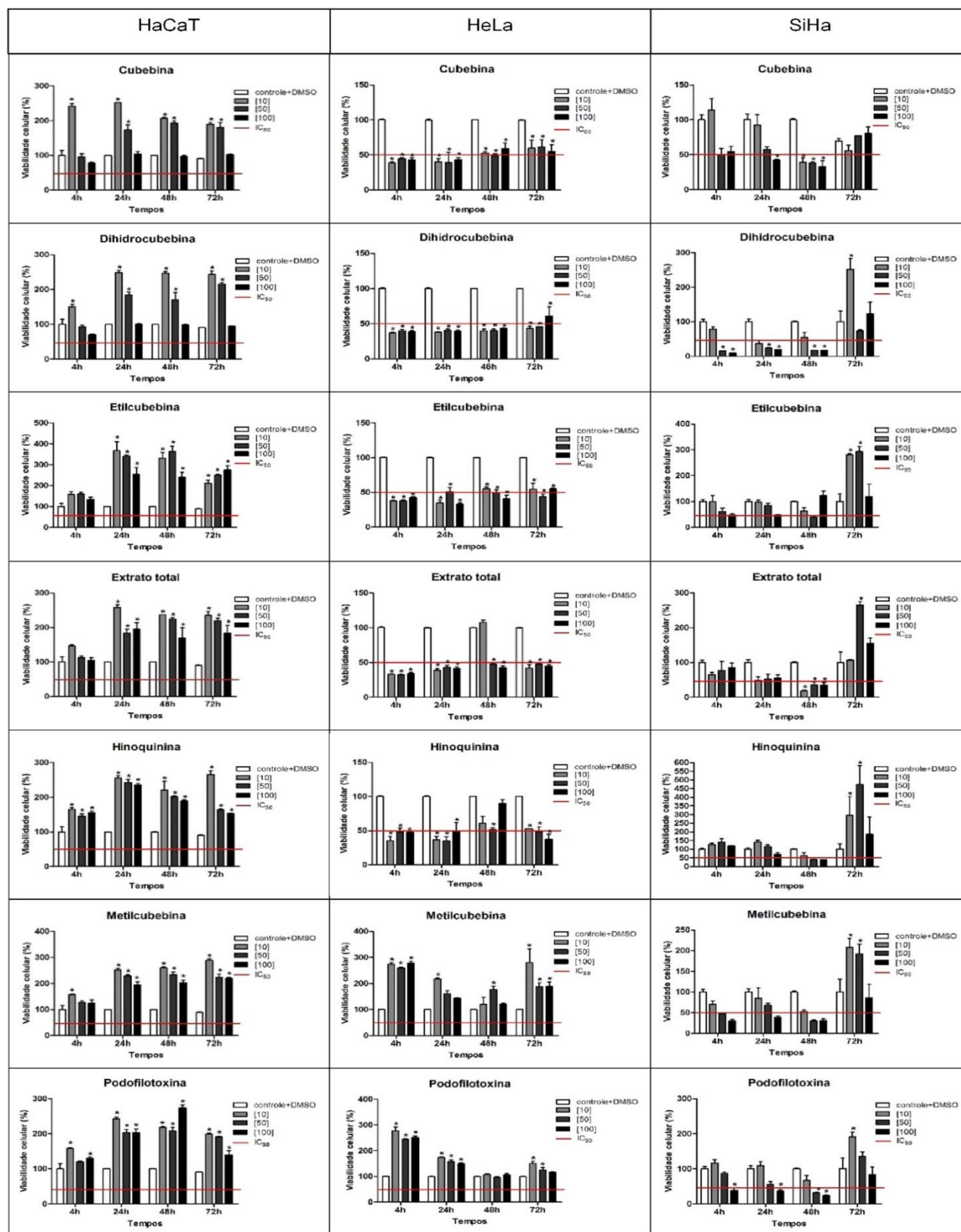
Fonte: Elaborado pela autora. * = $p < 0,05$, diferença significativa do tratamento em relação ao controle.

4.3 Citotoxicidade e viabilidade celular (MTS)

A equação utilizada para este teste, mostra porcentagem de células viáveis tratadas com os compostos em relação às células viáveis existentes no controle. Na figura 7, os gráficos representam a viabilidade celular bem como o IC_{50} , que representa a viabilidade celular inferior a 50%, quando esse nível é atingido considera-se que composto estudado é citotóxico. Foi observado que as lignanas não foram tóxicas em nenhuma das concentrações e tempos testados para as células normais (HaCaT), mas tal efeito foi encontrado nas linhagens tumorigênicas (HeLa e SiHa).

Na linhagem HeLa, as lignanas Metilcubebina e Podofilotoxina mostraram efeito de aumento significativo na viabilidade celular, embora grande parte dos tratamentos tenham diminuído significativamente estes níveis em relação ao controle. Além da diminuição significativa das células viáveis ainda é possível observar a alta taxa de citotoxicidade das lignanas para esta linhagem, representadas pelo IC_{50} . Para a linhagem SiHa obtivemos que os tratamentos mais efetivos foram com a Cubebina, Dihidrocubebina, Extrato total e Podofilotoxina, que mostraram diminuição significativa principalmente no tempo de 48 horas, ainda é possível observar o efeito citotóxico indicados pelo IC_{50} , as demais lignanas, parecem não causar efeitos sobre a viabilidade dessa linhagem.

Figura 7 – Viabilidade e citotoxicidade das 3 linhagens celulares (HaCaT, HeLa e SiHa) nas diferentes condições experimentais com os tratamentos das 7 diferentes lignanas



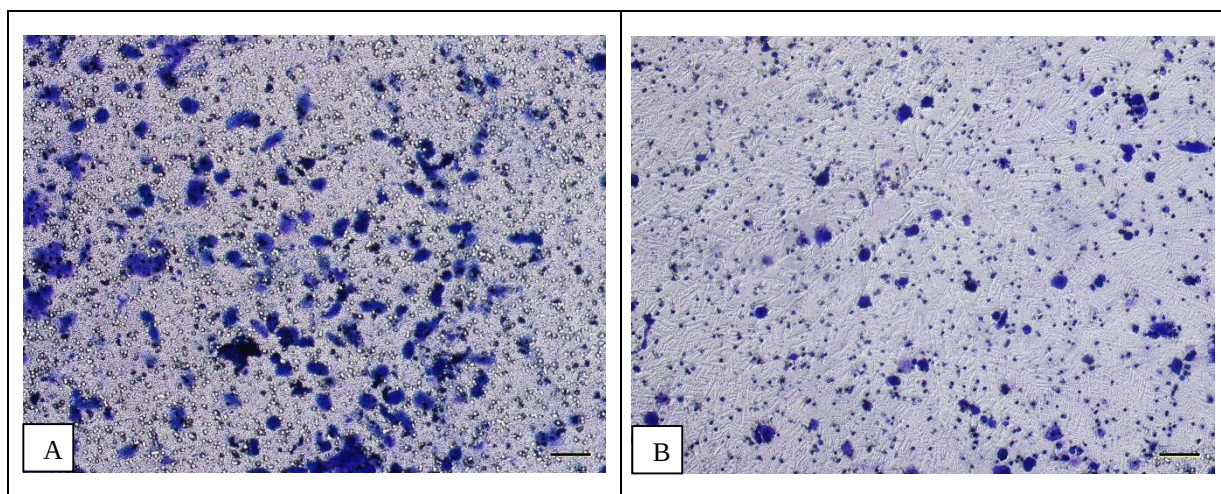
Fonte: Elaborado pela autora. * = $p < 0,05$ diferença significativa do tratamento em relação ao controle.

4.4 Migração celular

A invasão de células tumorais em tecidos normais ocorre pela migração celular através da barreira endotelial. Utilizamos o ensaio de migração para observar se esse evento continua ocorrendo após a administração das lignanas da *Piper cubeba* no tempo de 24 horas e concentração de 100µg/ml (condições escolhidas pelos ensaios de proliferação e citotoxicidade). Observamos, que após o tratamento com as lignanas, as células normais (HaCaT) e a linhagem tumoral HeLa apresentaram diminuição significativa na capacidade migratória apenas quando submetidas às lignanas Cubebina e Podofilotoxina, as demais lignanas não afetaram a migração celular. Na linhagem SiHa, observamos a diminuição da migração sob o tratamento do Extrato total da *Piper cubeba* e da Podofilotoxina, quando comparadas ao controle.

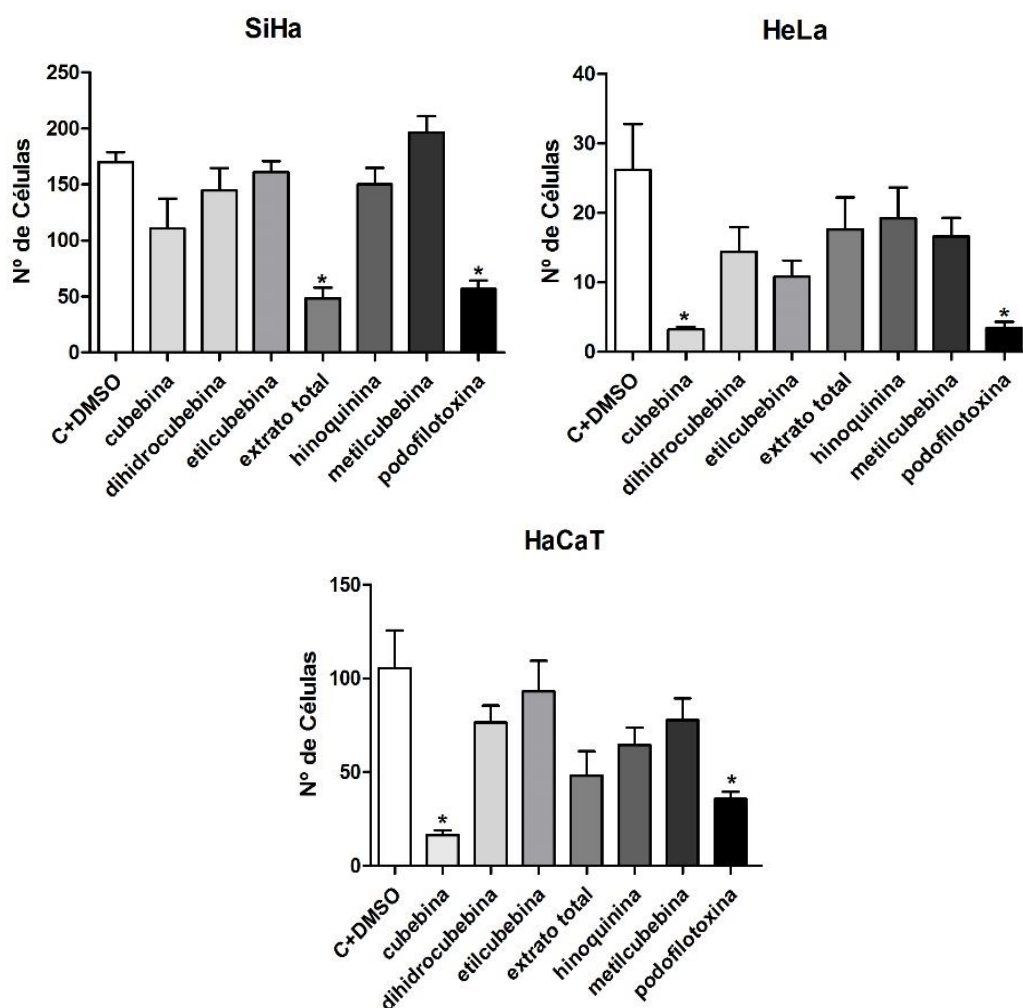
A figura 8 mostra as células que migraram pela membrana do inserto utilizado no experimento e a imagem 9 mostra os gráficos das análises estatísticas para este ensaio.

Figura 8 – Células transmigradas sem e com tratamento de lignana



Fonte: Elaborado pela autora Células SiHa controle (A) e tratadas com podofilotoxina, após ensaio de migração e coradas com cristal violeta. Aumento de 100x, escala 100µm.

Figura 9 – Valores do ensaio de migração celular das 3 linhagens tratadas com as 7 diferentes lignanas na [100]µg/ml e no tempo de 24 horas



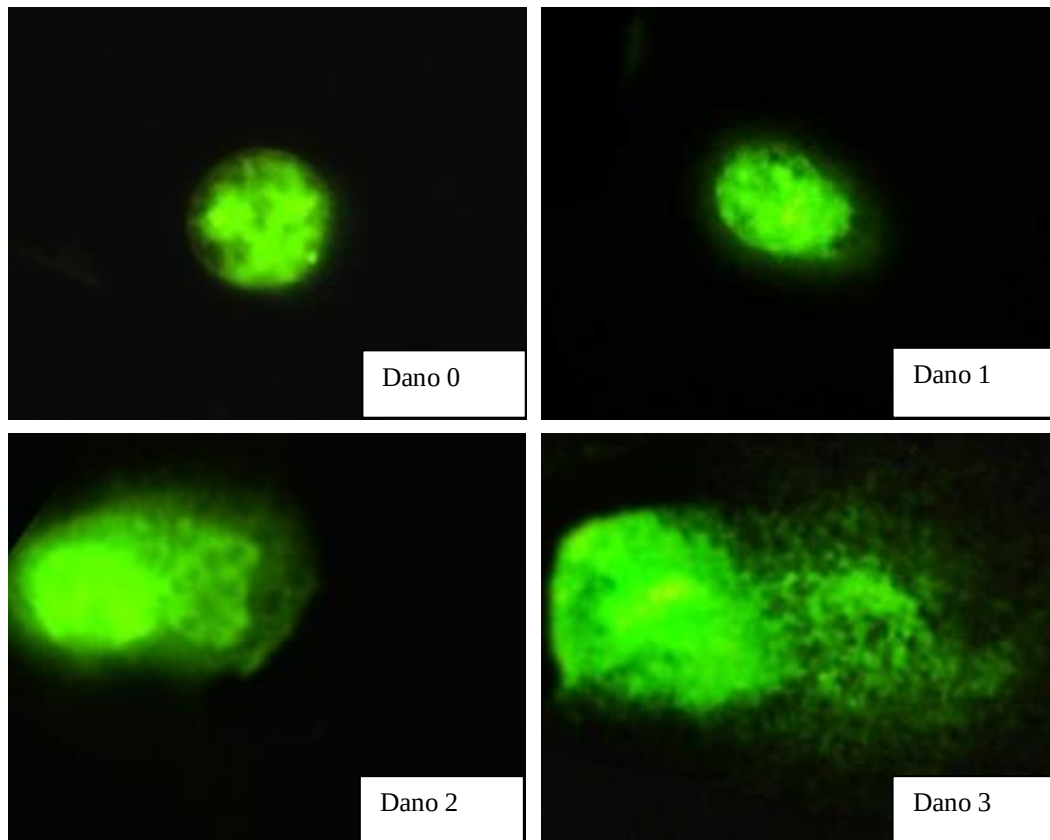
Fonte: Elaborado pela autora. * = $p < 0,05$, diferença significativa do tratamento em relação ao controle.

4.5 Genotoxicidade (Cometa)

Utilizamos a técnica do ensaio cometa para verificar se ocorrem danos ao material genético das células das 3 linhagens (HaCaT, HeLa e SiHa), após os tratamentos com as lignanas da *Piper cubeba* no tempo de 24 horas e concentração de 100µg/ml. Observamos que as 3 linhagens sofreram danos significativos no DNA, após os tratamentos quando comparamos com os controles. A linhagem tumorigênica HeLa, sofreu altos índices de danos, sob todos os tratamentos, a linhagem SiHa sofreu danos significativos apenas quando tratadas com as lignanas Cubebina, Extrato total e Podofilotoxina, as demais lignanas não apresentaram atividade genotóxica significativa para essa linhagem. Na linhagem normal (HaCaT) também podemos observar danos ao DNA, após tratamento com Cubebina, Etilcubebina, Extrato total e Podofilotoxina. Os danos foram calculados a partir da análise da cauda do cometa (Figura 10),

o tamanho da cauda é diretamente proporcional à intensidade do dano causado no interior do núcleo da célula.

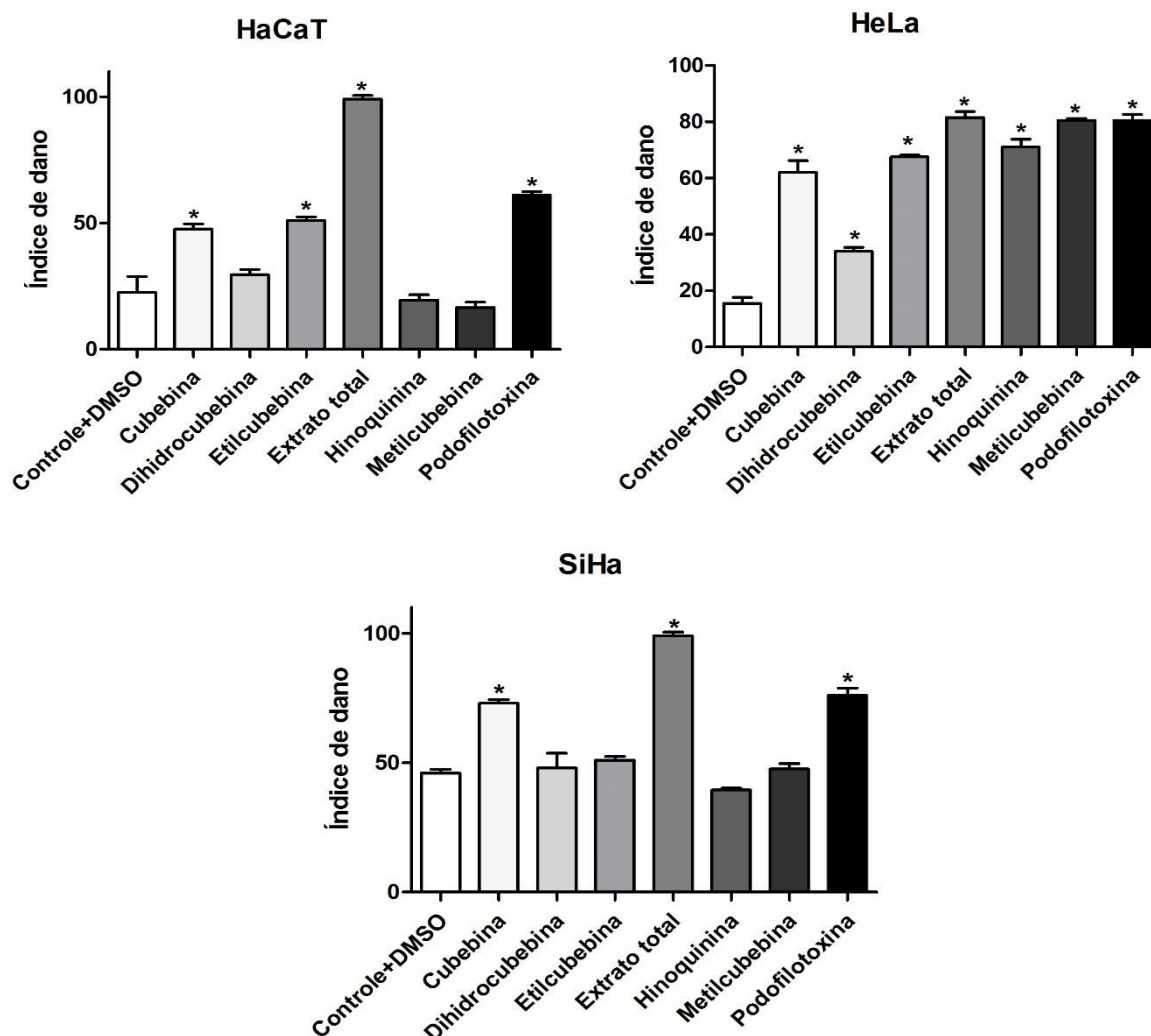
Figura 10 – Classes de danos do cometa



Fonte: Elaborado pela autora. Núcleos celulares representando as 4 classes de danos consideradas para o ensaio do Cometa, fotografados em microscópio de fluorescência. Linhagem celular HeLa. Aumento 400x.

Os gráficos da figura 11 mostram estatisticamente os danos causados ao DNA das linhagens estudadas.

Figura 11 – Índice de dano obtido pelo ensaio de genotoxicidade para as 3 linhagens tratadas com as 7 lignanas no tempo de 24 horas e na [100]µg/ml

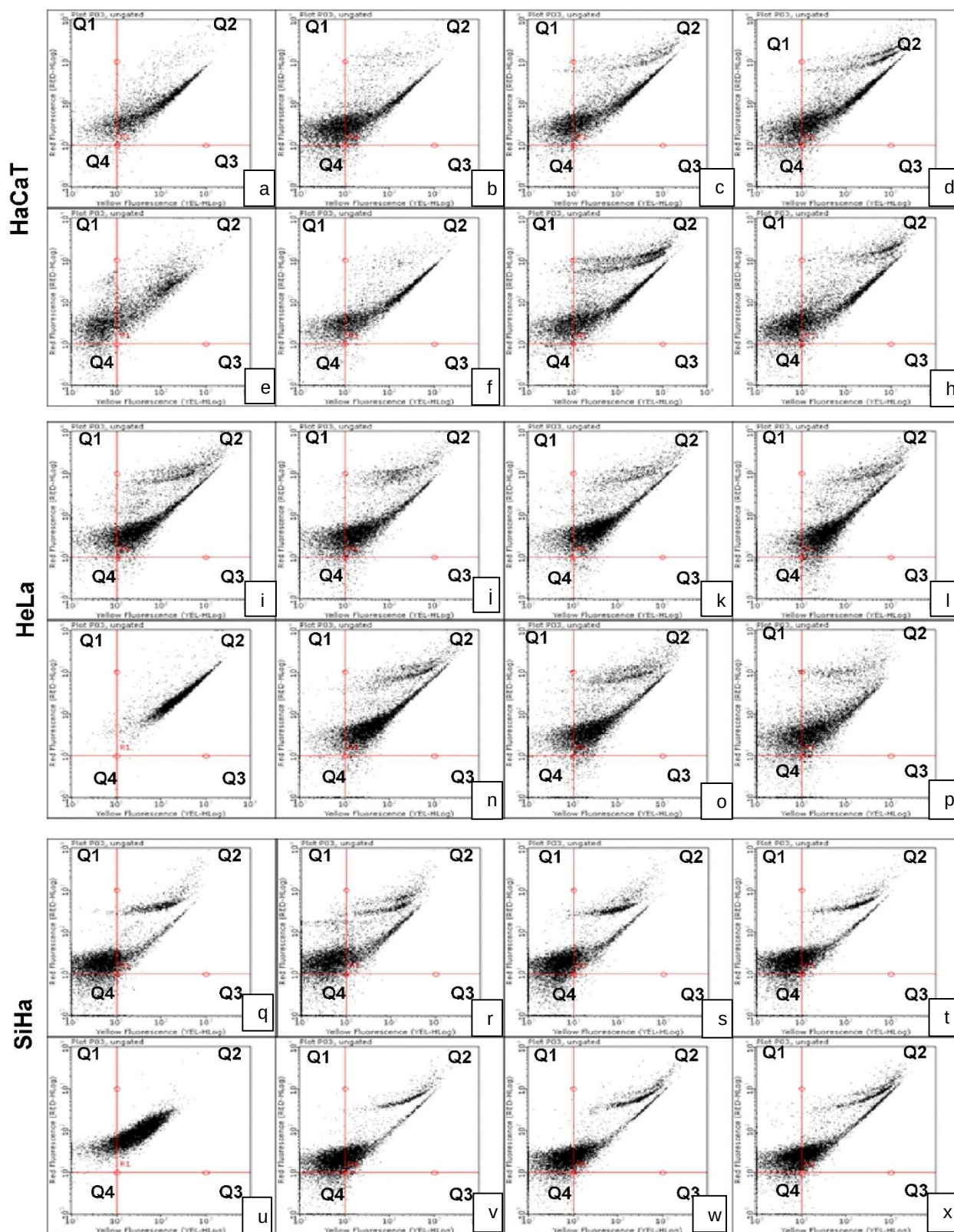


Fonte: Elaborado pela autora. * = $p < 0,05$ diferença significativa do tratamento em relação ao controle.

4.6 Avaliação de apoptose

Os *dot plots* representativos na Figura 12 mostram os resultados obtidos após incubação com PE (fitocointerina) anexina V e 7-AAD (7-Amino-Actinomicina), em cada grupo de células. A porção Q4 dos *dot plots* representa o número de células viáveis, ou seja, não apresentam nenhuma marcação, enquanto a porção Q3 mostra o número de células em apoptose inicial. Quando as células são incubadas com indutores de apoptose, externalizam o fosfolípídeo fosfatidilserina na membrana plasmática, que é marcada pela anexina V. A anexina V é uma proteína que tem alta afinidade com a fosfatidilserina, e pela conjugação dessa com um fluorocromo ficoeritrina (PE) é possível quantificar o índice de apoptose por citometria de fluxo. A porção Q1 dos *dot plots* representa o nº de células em necrose. Neste caso, os indutores

de necrose causam o rompimento na membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citoplasmático. Assim, a incubação das células com 7-AAD, que possui alta afinidade para estruturas intracelulares, como o DNA, a marcação pode ser detectada pelo citômetro de fluxo. Como o 7-AAD apresenta fluorescência, conseguimos verificar a quantidade de células em necrose. A porção Q2 dos *dot plots* representa o número de células em apoptose tardia, demonstrando a expressão de fosfatidilserina na superfície, quando ocorre ruptura da membrana. Assim, há marcação pela anexina V e coloração com o 7-AAD, ou seja, dupla marcação.

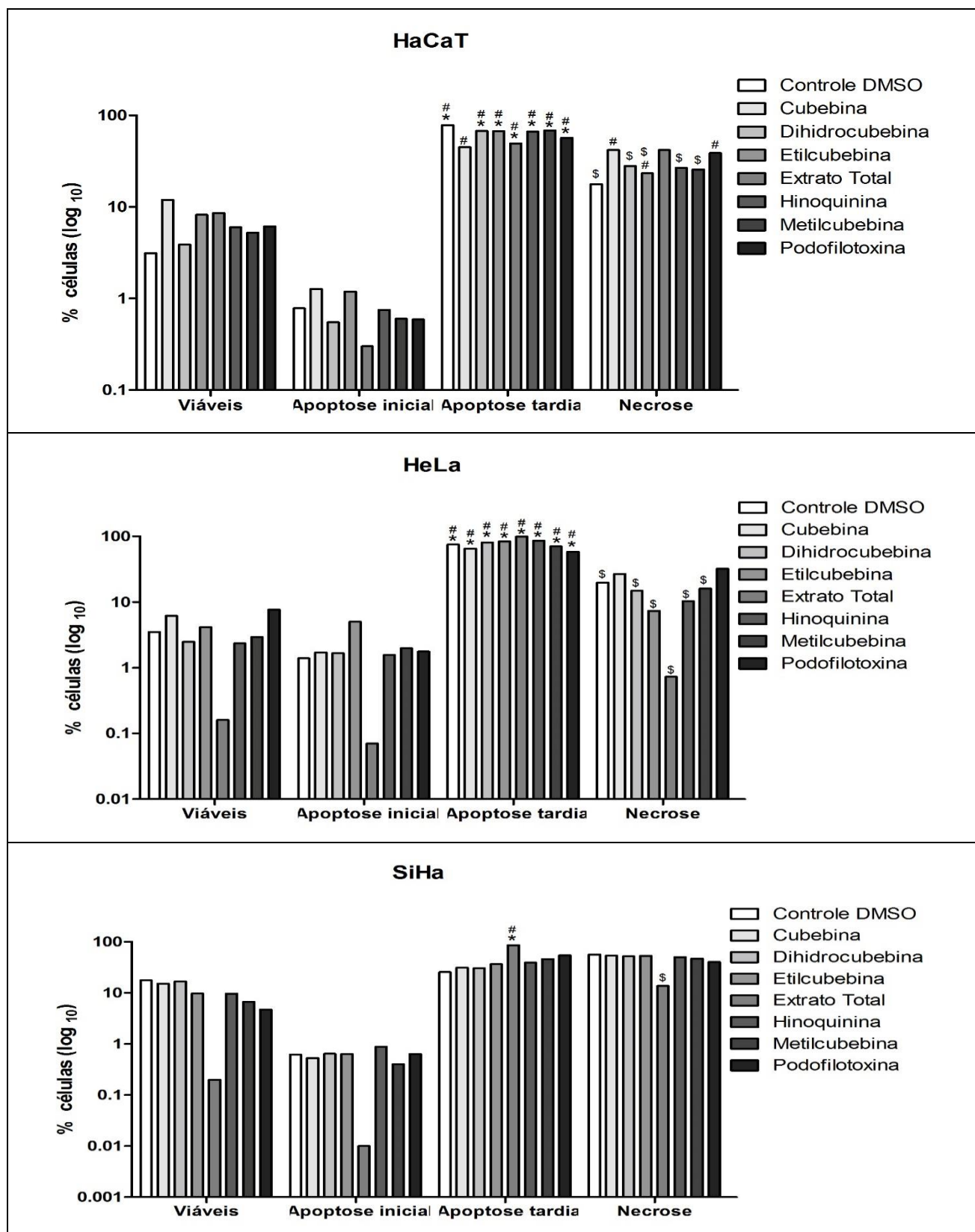
Figura 12 – *Dot Plots* obtidos da citometria de fluxo

Fonte: Elaborado pela autora. Viabilidade (Q4), apoptose inicial (Q3), apoptose tardia (Q2) e necrose (Q1). (a; i; q) controle+dmsco; (b; j; r) cubebina; (c; k; s) dihidrocubebina; (d; l; t) etilcubebina; (e; m; u) ex. total; (f; n; y) hinoquinina; (g; o; w) metilcubebina; (h; p; x) podofilotoxina.

A partir da análise dos gráficos da Figura 13, podemos observar que as lignanas causaram um efeito de apoptose tardia significativo em relação às células viáveis, tanto para HaCaT quanto para HeLa. Quando comparadas à apoptose inicial, a apoptose tardia, também se sobressai, desta forma, indicando que, para essas duas linhagens, a morte celular está ocorrendo mais por apoptose tardia, do que por apoptose inicial.

Enquanto na linhagem SiHa, os resultados de morte por apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose não se mostraram significativos quando comparados aos mesmos tratamentos das células viáveis. Em ambas as linhagens tumorigênicas observamos claramente o efeito do extrato total, mostrando uma ação tardia na morte celular, representado também nos *dot plots* (figura 12m e 12u) com bastante discrepância em relação aos demais tratamentos.

Figura 13 – Efeito do tratamento com as lignanas sobre a viabilidade, apoptose, apoptose tardia e necrose de HaCaT, HeLa e SiHa



Fonte: Elaborado pela autora. Dados apresentados em escala logarítmica para melhor visualização. * $p < 0,05$ vs. células viáveis, # $p < 0,05$ vs. apoptose inicial, \$ $p < 0,05$ vs. apoptose tardia.

4.7 Análise e avaliação da expressão gênica

Previamente a PCR quantitativa em tempo real, validamos a integridade dos RNAs e cDNAs obtidos das diferentes amostras. Os resultados obtidos foram expressos em valores de Ct, os quais refletem o número de ciclos de amplificação necessários para que o sinal fluorescente emitido atinja o limiar de detecção.

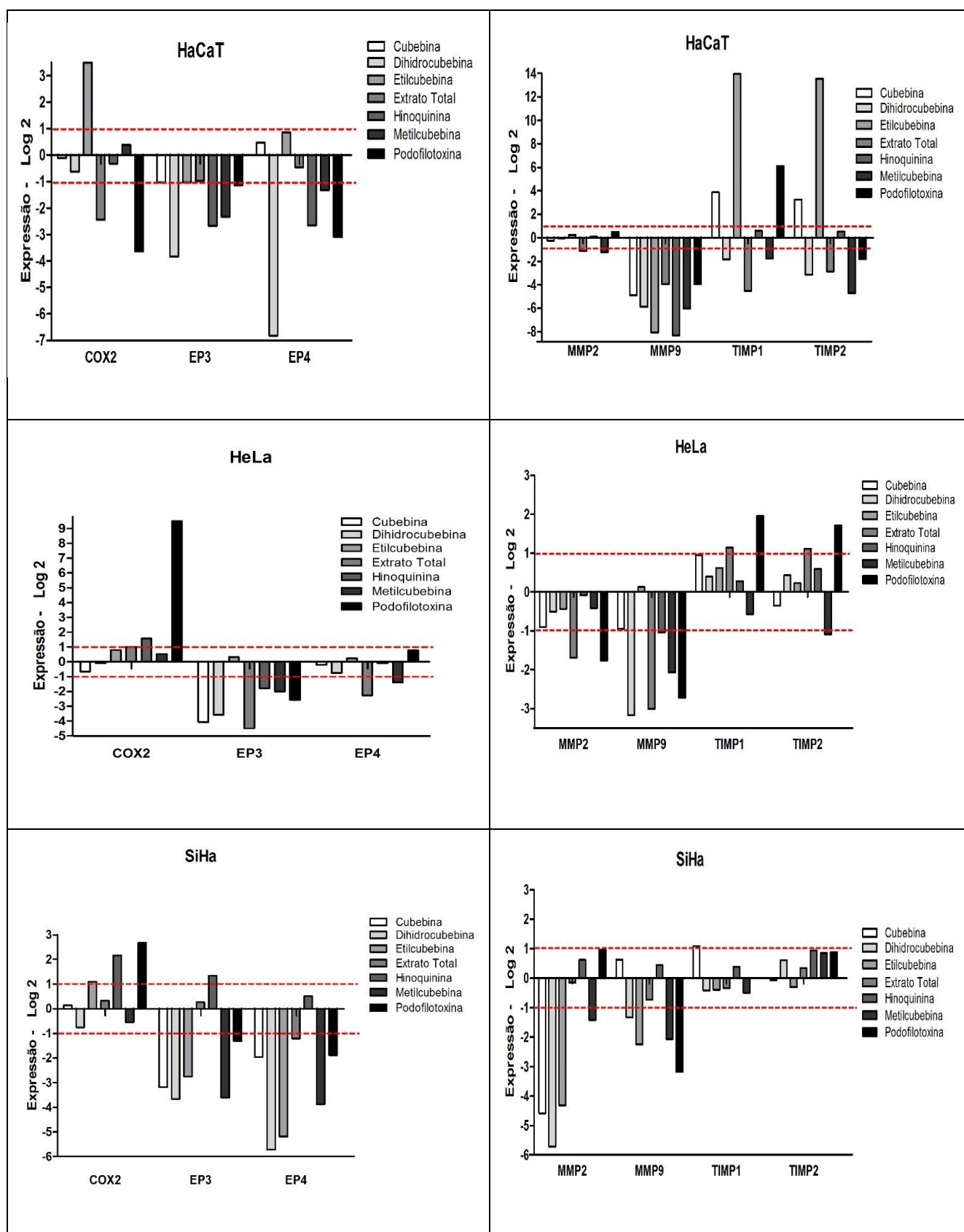
Os genes de interesse (*COX2*, *PTGEP3*, *PTGEP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*) estão envolvidos em cascatas relacionadas com inflamação e processos de invasão tumoral e foram representados na figura 14.

Na linhagem celular normal (HaCaT) houve efeito de diminuição proeminente da expressão dos genes estudados após o tratamento com as lignanas, exceto após o tratamento com a lignana etilcubebina, que causou efeito de superexpressão de *COX2*, *TIMP1* e *TIMP2*, assim como a cubebina aumentou a expressão dos genes *TIMPs* e podofiloxina de *TIMP1*.

Para a linhagem tumoral HeLa, observamos que os genes dessa cascata inflamatória também foram modulados de forma a exibirem expressão reduzida, após tratamento com as lignanas. Com exceção do gene *COX2*, que houve um aumento de expressão após tratamento com hinoquinina e podofilotoxina, esta última também influenciou o aumento da expressão dos genes *TIMPs*, tal como o extrato total sobre esses genes.

Na linhagem celular SiHa, o gene *COX2* encontra-se com sua expressão aumentada após tratamento com a etilcubebina, hinoquinina e podofilotoxina. A hinoquinina também causou o aumento na expressão dos receptores de prostaglandinas (*PTGEP3* e *PTGEP4*), enquanto as demais lignanas causaram a diminuição da expressão desses genes. Com relação a expressão dos genes *TIMPs*, as lignanas não influenciaram significativamente, exceto pela cubebina que aumentou a expressão de *TIMP1*.

Figura 14 – Expressão dos genes após tratamento com as 7 lignanas nas 3 linhagens celulares (HaCaT, HeLa e SiHa)



Fonte: Elaborado pela autora.

5. DISCUSSÃO

Os medicamentos fitoterápicos têm sido alvo de estudos para induzir efetivamente a apoptose de células cancerígenas do colo do útero e para ter potencial para o tratamento do câncer (GAO et al., 2011; ZHOU et al. 2009). As lignanas, compostos secundários de algumas espécies de plantas têm demonstrado efeitos positivos em diversos tipos de câncer, e a investigação sobre esses compostos naturais se torna cada vez mais necessária.

Nosso estudo mostra resultados entusiasmantes em relação à pesquisa com as lignanas, uma vez que algumas delas apresentaram redução na proliferação das células tumorigênicas como é o caso da hinoquinina, uma lignana dibenzilbutirolactona que além de ser encontrada em sua forma específica nas sementes de *Piper cubeba*, pode ser obtida pela síntese parcial de cubebina, pois difere da cubebina pela presença de uma porção carbonila no carbono 9 em vez de um grupo hidroxila, portanto suas características estruturais possibilitam que ela seja sintetizada a partir da cubebina. No nosso estudo, observamos que quando administrada sobre as células de adenocarcinoma de cérvix (HeLa), a hinoquinina diminuiu significativamente a proliferação e afetou substancialmente a viabilidade celular, enquanto em linhagem normal (HaCaT), tais efeitos não foram observados, nem sobre a proliferação, tampouco para a viabilidade, que pode estar relacionado ao tecido de origem diferente. Estes dados são semelhantes aos apresentados por Cunha e colaboradores (2016), que também observaram a diminuição da viabilidade em células de câncer de mama (MCF-7 e SKBR-3) após tratamento com hinoquinina, e não observaram o mesmo efeito em células de mama normais (MCF-10), encontraram também que após o tratamento, a linhagem de células tumorigênicas MCF-7 entraram em morte por apoptose e as células normais não. A linhagem SKBR-3 tumorigênica, não foi induzida à morte por apoptose, mas ficou estacionada em fase G2, mostrando também um efeito citostático que está associado a redução da sobrevida, causado por essa lignana. Os autores sugeriram que a hinoquinina possui uma seletividade celular, que pode estar associada à base genética do tipo de linhagem, que acaba por decidir o destino celular em resposta ao tratamento. Nesse contexto, a sugestão de Cunha e colaboradores (2016), sobre a seletividade celular, nos leva a considerar que o efeito divergente na proliferação e citotoxicidade observado na linhagem de carcinoma de células escamosas (SiHa) possa ter relação com suas especificidades genéticas, diferentes da linhagem HeLa.

No ensaio cometa nós não observamos efeito genotóxico da lignana hinoquinina nas células normais, apenas na linhagem tumoral HeLa. Esta constatação é muito relevante, levando em consideração o trabalho de Barbosa e colaboradores (2014), que observaram em experimentos *in vivo* (ratos *Wistar*) a ausência de efeitos genotóxicos e carcinogênicos do

composto hinoquina em concentração idêntica ao estudo de Souza e colaboradores (2005) que comprovaram a atividade tripanocida *in vivo*, sugerindo assim, o uso seguro deste composto.

A cubebina é uma lignana dibenzilbutirolactol, encontrada em algumas espécies de plantas, entre elas a *Piper cubeba*. Em diversos estudos, a cubebina foi relatada com propriedades benéficas, incluindo atividade tripanocida (SOUZA et al., 2005), analgésica, anti-inflamatória (Bastos et al., 2001), leishmanicida (BODIWALA et al., 2007) e antiproliferativa (YAM et al., 2008). A cubebina é de grande interesse para indústria farmacêutica, porque além de exibir promessa terapêutica, a partir dela podem ser extraídos ou produzidos diversos derivados sintéticos e semissintéticos eficazes, então estudos que buscam avaliar possíveis efeitos nocivos nas células são importantes para determinar o perfil de segurança da cubebina (NIWA et al., 2016).

Nossos testes com a cubebina mostraram seu efeito sobre a proliferação e viabilidade das duas linhagens tumorigênicas, a proliferação celular foi diminuída sob a concentração mais alta (100µg/ml) e observou-se diminuições significativas na viabilidade celular mas também efeito citotóxico em HeLa no tempo de 24 horas e em SiHa em 48 horas, corroborando com o estudo feito por Niwa e colaboradores (2016), que observaram efeito citotóxico em linhagem de adenocarcinoma de cólon humano (HT29) após administração de cubebina em alta concentração (280 µM) e tempos de 24 horas ou mais, e portanto, sugeriram que o uso da cubebina pode ser mais seguro quando administrado em doses mais baixas.

A proliferação na linhagem normal HaCaT foi diminuída apenas no primeiro tempo de tratamento (4 horas) com a cubebina, após esse tempo as células parecem ter se recuperado e continuado sua proliferação normal. Observamos que essa lignana também aumentou a viabilidade destas células nas concentrações de 10 e 50µg/ml, embora tenhamos observado efeito genotóxico, pelo ensaio do cometa, assim como para as linhagens HeLa e SiHa. Niwa e colaboradores (2016) também observaram a genotoxicidade causada por cubebina em linhagem de adenocarcinoma de cólon humano.

A migração celular é um evento crucial na invasão de células tumorais e metastáticas. A invasão das células tumorais em tecido circundante envolve a migração ativa dessas células através da barreira endotelial (HURD et al., 2011). Baseado no processo de invasão tumoral, verificamos que a cubebina reduziu o processo de migração tanto para a linhagem HeLa, como para HaCaT, enquanto na linhagem SiHa houve também diminuição, porém não significativa estatisticamente, em relação as células controle, sugerindo um possível potencial antimetastático.

Yam e colaboradores (2008) estudaram *in vitro* duas diferentes linhagens celulares de câncer de próstata humano (LNCaP-FGC e PC-3) e avaliaram o potencial efeito antitumorigênico de um extrato etanólico de *Piper cubeba*, chamado no estudo de P9605. Análises de HPLC revelaram que P9605 continha 16,53% de cubebina. Os resultados indicaram que P9605 inibiu a proliferação em células de câncer de próstata humano LNCaP por reduzir a síntese de DNA e induzir apoptose. O efeito antiproliferativo foi menos pronunciado na linhagem PC-3. P9605 inibiu de forma significativa a atividade da 5 α -redutase II, que é responsável por converter a testosterona em sua forma ativa e suprimiu a secreção de antígeno específico da próstata (PSA), importante marcador tumoral, em células LNCaP, agindo, portanto, por vários mecanismos. Estas constatações corroboram com os nossos achados, que se mostraram variantes frente aos diferentes tratamentos, sugerindo que os eventos antiproliferativos, citotóxicos e migratórios, podem ser influenciados por diferentes mecanismos.

Segundo Suffness & Pezutto (1991), é bastante útil considerar o conhecimento do índice de seletividade (IS), o qual pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, indicando o potencial uso deste composto em testes clínicos. Assim como Pereira (2016), que observou citotoxicidade duas vezes maior em células neoplásicas do que em linhagem normal, nós também observamos que os efeitos de citotoxicidade foram mais altos nas nossas linhagens tumorigênicas do que na linhagem não tumorigênica, evento que pode também estar relacionado com as origens distintas dos tecidos das linhagens que utilizamos.

A Dihidrocubebina é uma lignana dibenzilbutanodioica obtida a partir de extrato etanólico de sementes da *Piper cubeba*. Poucos estudos utilizaram a dihidrocubebina como alvo investigativo, porém um dos achados foi um estudo utilizando 9 lignanas, dentre elas a hinoquinina e dihidrocubebina que foram avaliadas quanto à sua capacidade de inibir a expressão do antígeno IE do citomegalovírus humano (HCMV) em células de câncer de pulmão (A549). Os autores observaram que a maioria dos compostos avaliados reduziu a expressão do antígeno IE do HCMV. No entanto, um aumento significativo dependente da dose de expressão do antígeno IE foi encontrado para a dihidrocubebina (PUSZTAI et al., 2010).

Parreira e colaboradores (2018) testaram 6 lignanas sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, dentre essas lignanas haviam cubebina, hinoquinina e dihidrocubebina. Todas as lignanas que possuíam um anel lactona, grupo metoxi ou características lipofílicas, tiveram atividade antiparasitária, enquanto que dihidrocubebina mostrou-se inativa, os pesquisadores relacionaram este efeito a sua baixa lipofilicidade. Laurentiz e colaboradores

(2015), também relacionaram a baixa atividade antimicobacteriana de dihidrocubebina à presença da segunda hidroxila em sua estrutura que diminui a lipofilicidade do composto, o que pode dificultar a penetração através da barreira lipídica nas cepas de micobacterias testadas, contribuindo para a menor atividade apresentada por essa lignana. Entretanto, eles concluíram que a dihidrocubebina pode ser um bom alvo na busca por novas moléculas bioativas através da sua modificação estrutural, mantendo uma hidroxila livre ligada ao carbono 9 e a introdução de grupos com funções orgânicas, polaridade e tamanho diferentes.

Esses achados com a dihidrocubebina, corroboram com o nosso estudo, pois também observamos baixa atividade antiproliferativa para este composto, o que poderia ser explicado pela sua estrutura lipofóbica. Entretanto, observamos resultados contraditórios sobre a atividade citotóxica nas linhagens tumorais, que mostram índices de citotoxicidade significativos, mas que não foi encontrado na linhagem normal. Não encontramos índices alterados de migração e de genotoxicidade, apenas observamos os valores de genotoxicidade aumentados em HeLa. Nossos dados indicam, que de alguma forma as células tumorigênicas são afetadas pela lignana dihidrocubebina, já que alteram sua viabilidade e apresentam citotoxicidade, mas não conseguimos concluir relacionando nossos dados com a literatura disponível até o momento, fazendo-se necessários mais estudos com a dihidrocubebina em linhagens tumorigênicas.

A etilcubebina é uma lignana dibenzilbutirolactol derivada da cubebina, isolada pela primeira vez por Badheka e colaboradores em 1986. Esta lignana diferencia-se da cubebina por um grupo etil no carbono 9 em vez de uma hidroxila. Não encontramos estudos com essa lignana na literatura, todavia, em nosso estudo ela apresentou características importantes para a pesquisa com linhagens tumorais, já que se apresentou extremamente antiproliferativa para as células tumorais, e não causou esse efeito na linhagem normal. Além disso, foi citotóxica e genotóxica para HeLa, e não foi citotóxica para a linhagem normal, agindo no aumento da viabilidade celular, embora tenha se mostrado genotóxica, esse fenômeno pode estar relacionado com a origem tecidual. Nossas observações sugerem que a etilcubebina pode ser um alvo importante de estudos futuros, dado as suas características biológicas sobre o câncer *in vitro*.

A metilcubebina é uma lignana derivada da cubebina que sofreu uma metilação em sua estrutura química. Silva e colaboradores (2009) observaram que esse composto apresentou atividade antimicobacteriana significativa, sobressaindo até a atividade de sua precursora cubebina. Em outro estudo, utilizando a indução de edema em patas de ratos, pesquisadores administraram a metilcubebina e observaram efeito anti-inflamatório e analgésico significativos quando comparados ao grupo controle tratado com fármaco não esteroide. Eles sugeriram que

a lignana tem o mecanismo de ação associado à inibição da síntese de prostaglandinas como observado para a maioria das drogas não esteroidais (SOUZA et al., 2004). Estudos utilizando a metilcubebina em cultura de células são escassos e embora tenhamos encontrado um efeito genotóxico na linhagem tumoral HeLa, os demais ensaios não a apontaram como um composto potencial para o tratamento do câncer.

O extrato total utilizado nesse estudo, trata-se de um extrato bruto etanólico das sementes da *Piper cubeba*, e por ser um extrato bruto, pode conter uma gama variada de compostos, sobretudo lignanas, que podem promover uma ação sinergista quando juntas. Nahak & Sahu (2011) relataram que testes fitoquímicos indicaram a presença de alcalóides, glicosídeos, taninos e flavonóides no extrato etanólico bruto da *Piper cubeba*. Eles avaliaram o potencial efeito antioxidante do extrato, e encontraram grande atividade sequestradora de radicais livres nos extratos etanólicos de *Piper cubeba*, relacionando essa atividade à presença de constituintes fitoquímicos, especialmente polifenóis. Estes dados são de grande relevância para nossa pesquisa, já que se sabe que o estresse oxidativo agudo bem como estresse oxidativo crônico têm sido relacionados a um grande número de doenças degenerativas, dentre elas o câncer (VALKO et al., 2006).

Encontramos alta atividade do extrato total sobre as linhagens tumorigênicas, especialmente sobre a SiHa, onde esta foi afetada de diversas formas, na diminuição do índice de proliferação celular, diminuição da viabilidade em 48 horas de tratamento, diminuição da migração celular e danos no DNA, enquanto os danos causados na linhagem normal foram mais sutis, já que sobre estas células, observamos apenas uma diminuição da proliferação celular em 24 horas que tendeu a se normalizar nos tempos seguintes e encontramos efeito genotóxico. Nossos dados corroboram com o estudo de Graidist e colaboradores (2015), que investigaram os efeitos do extrato bruto metanólico da *Piper cubeba* em linhagens de células de câncer de mama, linhagem normal de mama e fibroblastos normais, e embora tenham observado atividade citotóxica em células de câncer de mama e células mamárias normais, obtiveram resultados de menor toxicidade em células normais de fibroblastos, eles verificaram que o efeito citotóxico inibiu o crescimento celular e parece ter induzido apoptose nas linhagens tumorais.

A podofilotoxina é uma lignana extraída de *Podophyllum* spp. que apresenta comprovada atividade anticâncer (entretanto alta toxicidade) e seus derivados etoposídeo e tenoposídeo são usados clinicamente no controle de alguns tipos de câncer (CANEL et al., 2000). Devido a já conhecida atividade da podofilotoxina, utilizamos este composto como um controle positivo, e apesar de termos resultados contraditórios nos valores de citotoxicidade, com a maioria de seus valores não considerados citotóxicos, nos demais ensaios, observamos a

diminuição significativa da proliferação celular, danos substanciais no material genético e diminuição na migração celular de todas as linhagens estudadas.

Um estudo recente buscou alternativa para os efeitos secundários indesejáveis da podofilotoxina, onde foi desenvolvido um conjugado de podofilotoxina e um polipeptídeo utilizado para o tratamento de câncer de mama resistente a múltiplas drogas, comprovaram que o conjugado notavelmente aumentou a eficácia antitumoral, com toxicidade mínima (KIM et. al., 2018).

A apoptose está envolvida em uma variada gama de processos fisiológicos e patológicos (ULUKAYA et al., 2011; PEREIRA & AMARANTE-MENDES, 2011). Vários estudos buscam encontrar mecanismos que ajudem a célula tumoral a entrar nessa condição de morte celular programada com o auxílio de várias técnicas que quantificam esse processo; uma dessas técnicas é a citometria de fluxo, a qual utilizamos no presente estudo. Nossos resultados mostraram que dentre as lignanas estudadas, essas causaram morte celular de uma maneira bem semelhante, ocorrendo principalmente por apoptose tardia.

Na análise de expressão gênica, observamos que tratamento com as lignanas influenciam na modulação da cascata *COX2*, *PTGEP3*, *PTGEP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2* - que está relacionada com processos de inflamação e invasão tumoral - em todas as linhagens estudadas.

O gene da ciclooxigenase-2 (*COX2*) que tem a sua expressão usualmente diminuída em células normais, sob estímulos de citocinas, fatores de crescimento celular e oncogenes passa a ter sua expressão aumentada, dessa maneira estudos sobre análise da expressão desse gene em câncer evidenciam a superexpressão desse, incluindo o câncer colorretal, mama, próstata, pulmão e fígado (RIZZO, 2011; BONHIN et al. 2014; ZHANG et al., 2017). Em nosso estudo, observamos que *COX2*, teve a sua expressão aumentada nas 3 linhagens em relação ao controle após o tratamento com algumas lignanas. A etilcubebina aumentou a expressão desse gene na linhagem tumoral SiHa e na linhagem normal HaCaT, já a hinoquinina e a podofilotoxina aumentaram a sua expressão nas duas linhagens tumorais. A *COX2* sintetiza a prostaglandina E2 (*PGE2*) que pode ativar receptores acoplados à proteína G, tais como *PTGEP1*, *PTGEP2*, *PTGEP3* e *PTGEP4* e regula a expressão, secreção e ativação de várias metaloproteinasas em diferentes tipos celulares (GAN et al., 2016).

Embora não tenhamos observado diminuição de *COX2* após o tratamento com as lignanas, vimos que as expressões dos *EPs* foram diminuídas substancialmente, indicando que *COX2* não estava sintetizando *PGE2* a ponto de ativar esses receptores. Nossos resultados positivos em relação aos genes *PTGEP3* e *PTGEP4* são importantes do ponto de vista da

inibição da progressão tumoral, já que a superexpressão desses genes sugerem possível papel prognóstico no câncer. Abrahao e colaboradores (2010) observaram a superexpressão de *PTGEP4* em 7 linhagens de câncer de cabeça e pescoço. Outro estudo, utilizando amostras de tecidos de câncer de colo de útero de 250 pacientes, mostrou que mais de 77% das amostras analisadas estavam com superexpressão citosólica de *PTGEP3*, ainda nesse estudo os autores sugeriram que o papel prognóstico de *PTGEP3* em câncer de cérvix uterina, pode ser independente de *COX* e *PGE2*, corroborando com os nossos resultados (HEIDEGGER et al., 2017). Mas, é importante levar em consideração que existem diferentes isoformas do receptor *PTGEP3*, muitos detalhes e isoformas são descobertos e os dados apresentam várias discrepâncias, especialmente em relação aos seus efeitos. Estas diferentes isoformas podem ter diferentes efeitos e papéis fisiológicos baseados no tecido, nos quais são expressos (ISRAEL & REGAN, 2009).

As proteínas que naturalmente inibem a atividade de metaloproteinases de matriz (*MMPs*) são codificadas pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (*TIMPs*). A proteólise descontrolada das *MMPs* promove degradação da matriz extracelular, invasão de células tumorais e aumento do risco de metástase de células cancerígenas (BOURBOULIA et al., 2013). O extrato total da *Piper cubeba* e a podofilotoxina, promoveram o aumento da expressão dos *TIMPs* estudados na linhagem tumoral HeLa, em consequência a esse aumento da expressão dos inibidores, a *MMP2* e *MMP9* tiveram a resposta antagônica de diminuição da expressão sob a condição desses mesmos compostos. Para a linhagem tumoral SiHa, o mesmo efeito foi observado quando esta foi tratada com a cubebina. Na tumorigênese o papel das *MMPs* é bem estabelecido, e a degradação do colágeno tipo IV pode ser considerada papel chave das *MMP2* e *MMP9*, essas metaloproteinases de matriz estão com a expressão aumentada em diversos tipos de câncer, incluindo câncer de ovário, de mama e próstata (LI et al., 2014; ROOMI et al., 2009). Reforçando os nossos resultados, o estudo de Zeng e Yang (2018), também encontraram uma diminuição significativa de expressão de *MMP9* em células de câncer de próstata, em resultado da ação da piperina. Em outro estudo investigativo com a piperina foi verificado que a *MMP2* e *MMP9* tiveram a expressão inibida, com aumento da expressão de *TIMP1* e *TIMP2* em células de osteossarcoma humano (ZHANG et al., 2015), corroborando com os nossos resultados com as linhagens tumorigênicas, tratadas com a podofilotoxina, extrato total e cubebina. As demais lignanas também promoveram efeito de diminuição da expressão das *MMPs* nas células tumorais, porém, não encontramos esse padrão de equilíbrio *MMPs* – *TIMPs*, igualmente em nossa linhagem normal HaCaT, que aparece com as *MMPs* e *TIMPs* com expressão diminuída.

No geral, notamos que a linhagem HeLa foi mais afetada pelas lignanas em comparação à linhagem SiHa, estes resultados podem estar relacionados à seletividade das lignanas e características genéticas da linhagem, porém é muito importante que a HeLa tenha sido mais afetada, pois esta é proveniente de um tipo de tumor de epitélio glandular com alta agressividade e de difícil remoção cirúrgica, tornando o tratamento por métodos alternativos imprescindível.

6. CONCLUSÃO

Concluímos que as lignanas e o extrato total da *Piper cubeba* atuam sobre as linhagens HaCaT, HeLa e SiHa, influenciando positivamente no tratamento do câncer de colo de útero sem afetar de forma agressiva as células normais, uma vez que: não alteram a morfologia celular, diminuem a proliferação, a migração e a viabilidade das células tumorais, possuem efeito genotóxico e induzem as células à morte por apoptose, além de interferir na cascata de genes relacionados a processos inflamatórios, diminuindo significativamente a expressão dos genes *PTGEP3*, *PTGEP4*, *MMP2* e *MMP9*, e, aumentando a expressão dos genes *TIMP1* e *TIMP2*, indicando que as lignanas modulam a regulação desses genes.

Destas lignanas, a hinoquinina e o extrato total, merecem atenção especial para ensaios futuros, mostrando-se promissores nas pesquisas antitumorigênicas. Além disso, destacamos a etilcubebina que se mostrou extremamente bioativa sobre o câncer de colo de útero e ainda é pouco pesquisada.

Sendo assim, as pesquisas com produtos naturais, especialmente com a *Piper cubeba* são indispensáveis, dada sua imensa gama de propriedades biológicas, que são alvos potenciais para desenvolvimento de novos fármacos e terapias alternativas para diversas doenças e não somente o câncer.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAO, A. C. et al. A role for COX2- derived PGE2 and PGE2-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. **Oral Oncol**, v. 46, n. 12, p. 880-7, 2010.
- ADEYUFE, A.; SALES, K.; Regulation of inflammatory pathways in câncer and infectious disease of the cervix. **Scientifica**, v. 2012.
- AHMAD, Q. Z.; JAHAN, N.; AHMAD, G. Tajuddin Nephroprotective effect of Kabab chini (*Piper cubeba*) in gentamycin-induced nephrotoxicity. Saudi J. Kidney Dis. **Transplant**; 23:773–781, 2012.
- ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J.K.; CALEFI, P.S.; CIUFFI, K.J.; CUNHA, W.R.; LAURENTIZ, R.S.; LUCARINI, R.; NASSAR, E.J.; SILVA FILHO, A.A.; SILVA, M.L.A. Cubebin, dibenzylbutyrolactone lignan, semi-synthetic and synthetic derivatives thereof, and other lignans and neolignans as vasodilating agents in the therapy of erectile dysfunction. WIPO Patent Application WO/2011/075801, 2011.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cervical Cancer, 2016.
- ARBYN, M.; ANTTILA A.; JORDAN, J; RONCO, G.; SCHENCK, U.; SEGNAN, N.; WIENER, H.; HERBERT, A.; VON, L. Karsa European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. second edition--summary document **Ann. Oncol.**, 21 (3) pp. 448-458, 2010.
- BADHEKA, L. P.; PRABHU, B. R.; MULCHANDANI, N. B. Dibenzylbutyrolactone lignans from *Piper cubeba*, **Phytochemistry** 25: 487–489, 1986.
- BADHEKA, L. P.; PRABHU, B. R.; MULCHANDANI, N. B. Lignans of *Piper cubeba*, **Phytochemistry** 26: 2033–2036, 1987.
- BAGATELA, B. S.; LOPES, A. P.; FONSECA, F. L. A.; ANDREO, M. A.; NANAYAKKARA, D. N.; BASTOS, J. K.; PERAZZO, F. F. Evaluation of antimicrobial and antimalarial activities of crude extract, fractions and 4-nerolidylcathecol from the aerial parts of *Piper umbellata* L. (Piperaceae). **Nat Prod Res.** 27:2202–2209, 2013.
- BASU, P. et al. Management of cervical premalignant lesions. Current problems in câncer. Jan. 2018.
- BARBOSA, L. C.; FURTADO, R. A.; BERTANHA, H. C. C.; TOMAZELLA, I. M.; COSTA, E. S.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. L. A.; TAVARES, D. C. Chemopreventive Effects of (–)-Hinokinin against 1,2- Dimethylhydrazine-Induced Genotoxicity and Preneoplastic Lesions in Rat Colon. **J. Nat. Prod.** 77:2312-2315, 2014.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3 (4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Arch. Biochem. Biophys.** 303, 474–82, 1993.
- BODIWALA, H. S.; SINGH, G.; SINGH, R.; DEY, C. S.; SHARMA, S. S.; BHUTANI, K. K.; SINGH, I. P. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicines.** 61:418–421, 2007.
- BONHIN, R. G.; FERNANDES, F. L.; CARVALHO, G. M.; GUIMARÃES, A. C.; ALTEMANI, A. M.; CHONE, C. T.; CRESPO, A. N.; AMSTALDEN, E. M. I. Correlação entre a expressão de ciclooxigenase-2, VEGF e KI-67 em carcinomas de células escamosas da

laringe e hipofaringe com estadiamento TNM. **Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço**, Campinas, v. 43, 1, p.42-49, 01 mar. 2014.

BOURBOULIA, D.; HAN, H.; JENSEN-TAUBMAN, S.; GAVIL, N.; ISAAC, B.; WEI, B.; NECKERS, L.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Semin Cancer Biol.** vol. 20, n. 3, p. 161-168, 2013.

CANEL, C; MORAES, RM; DAYAN, FE; FERREIRA, D. Molecules of Interest: Podophyllotoxin. **Phytochemistry** 54(2): 115–120, 2000.

CHAN, M. C.; CHAN, R. W.; YU, W. C.; HO, C. C.; CHUI, W. H.; LO, C. K.; YUEN, K. M.; GUAN, Y. I.; NICHOLLS, J. M.; PEIRIS, J. S. Influenza H5N1 virus infection of polarized human alveolar epithelial cells and lung microvascular endothelial cells. **Respiratory research**, 10(1), 102, 2009.

CANEVARI, R. A.; ROGATTO, S. R. Câncer de cabeça e pescoço. In: Ferreira CG, Casalli JCR, organizadores. **Oncologia molecular**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 189-203. 2004.

CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Investigations of anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrid*. **Journal of Ethnopharmacology**; 89:171–175, 2003.

CHUNG, S. H.; FRANCESCHI, S.; LAMBERT, P. F. Estrogen and ERalpha: culprits in cervical cancer? **Trends in Endocrinology & Metabolism**, New York, v. 21, n. 8, p. 504-511, Aug., 2010.

CLIFFORD, G. M. et al. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. **British journal of cancer**, v. 89, n. 1, p. 101–5, Jul. 2003.

CROSBIE, E. J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, v. 382, n. 9895, p. 889–899, 7 Sep. 2013.

CUNHA, W. R.; ANDRADE E SILVA, M. L.; SOLA VENEZIANI, R. C.; AMBRÓSIO, S. R.; KENUPP BASTOS, J. Lignans: Chemical and Biological Properties. In *Phytochemicals - A Global Perspective of their Role in Nutrition and Health*; Rao, V., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2012.

CUNHA, N. L.; TEIXEIRA, G. M.; MARTINS, T. D.; SOUZA, A. R.; OLIVEIRA, P. F.; SÍMARO, G. V.; REZENDE, K. C.; GONÇALVES, N. dos S.; SOUZA, D. G.; TAVARES, D. C.; SILVA, M. L.; DOS SANTOS, R. A. (-)-Hinokinin Induces G2/M Arrest and Contributes to the Antiproliferative Effects of Doxorubicin in Breast Cancer Cells. **Planta Medica** 82 (06): 530-538, 2016.

DAS, P. et al. Human papillomavirus (HPV) genome status & amp; cervical cancer outcome--A retrospective study. **The Indian journal of medical research**, v. 142, n. 5, p. 525–32, Nov. 2015.

DE REZENDE, A. A.; MUNARI, C. C.; de OLIVEIRA, P. F.; FERREIRA, N. H.; TAVARES, D. C.; E SILVA, M. L. A.; REZENDE, K. C. S.; SPANO, M. A. A comparative study of the modulatory effects of (-)-cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. **Food and Chemical Toxicology**.55:645–652, 2013.

- DE QUEIROZ, A. C.; ALVES, H. D. S.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; DIAS, T. D. L. M. F.; SANTOS, M. D. S.; MELO, G. M. D. A.; CAMPESATTO, E. A.; CHAVES, M. C. D. O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of flavonoids PMT1 and PMT2 isolated from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) in mice. **Nat Prod Res.** 28:403–406 2014.
- ELFAHMI, K. R.; SIEB, B.; REIN B.; OLIVER K.; HERMAN J.; WOERDENBAG, W.; QUAX, J. Lignan profile of *Piper cubeba*, an Indonesian medicinal plant. **Biochemical Systematics and Ecology** 35, 397-402, 2007.
- FRANCE. WORLD HEALTH ORGANIZATION. (Comp.). **The Global Cancer Observatory.** 2018. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 13 mar. 2018.
- GAO, H.; LAMUSTA, J.; ZHANG, W. F.; SALMONSEN, R.; LIU, Y.; O'CONNELL, E.; EVANS, J. E.; BURSTEIN, S.; CHEN, J. J.: Tumor Cell Selective Cytotoxicity and Apoptosis Induction by an Herbal Preparation from *Brucea javanica*. **N Am J Med Sci.** 4: 62-66, 2011.
- GAN, L.; QIU, Z.; HUANG, J.; et al. Cyclooxygenase-2 in tumor-associated macrophages promotes metastatic potential of breast cancer cells through Akt pathway. **Int J Biol Sci.**12(12):1533-1543, nov. 2016
- GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, 2003.
- GRAPHPAD PRISM 5. [S. l.], 2007. 1 CD-ROM.
- GRAIDIST, P.; MARTLA. M.; SUKPONDMA. Y.; Cytotoxic Activity of *Piper cubeba* Extract in Breast Cancer Cell Lines. **Nutrients**, v.7, p 2707-2718, 2015.
- GRAVITT, P. E.; WINER, R. L. Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. **Viruses**, v. 9, n. 10, 2017.
- GUIDO, R. Cervical Cancer Screening. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v. 61, n. 1, p. 1, Dec. 2017.
- HACKER, N. F.; VERMORKEN, J. B. Cervical cancer. In: Berek and Hacker's Gynecologic Oncology. Lippincott Williams and Wilkins, v. 5, p. 336-378, 2015.
- HEIDEGGER H, DIETLMEIER S, YE Y, et al. The Prostaglandin EP3 Receptor Is an Independent Negative Prognostic Factor for Cervical Cancer Patients. **Int J Mol Sci.** 2017;18(7):1571. 2017.
- HURD, T. R.; DEGENNARO, M.; LEHMANN, R. Redox regulation of cell migration and adhesion. **Trends Cell Biol.** vol. 22, p. 107–115, 2011.
- HUSSAIN, S.A.; SULAIMAN, A.A.; BALCH, C. et al.. Natural polyphenols in câncer chemoresistance **Nutr. Cancer**, 68, pp. 879-891, 2016.
- ISRAEL D.D., REGAN J.W. EP3 prostanoid receptor isoforms utilize distinct mechanisms to regulate ERK 1/2 activation. **Biochim. Biophys. Acta.** 2009;1791:238–245. 2009.
- INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017. p. 128, 2018.

JANUARIO, A. H.; RODRIGUES FILHO, R.; PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; FRANCA, S. C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae) **Phytotherapy Research**.16:445–448, 2002.

JEMAL, A. et al. Global câncer statistics. CA: a câncer jornal of clinicians, v. 61, n.2, p. 69-90, 2011.

JIANYING, Y.; MATTHIAS, K.; JUERGEN D. *Piper cubeba* Targets Multiple Aspects of the Androgen-Signalling Pathway. A Potential Phytotherapy against Prostate Cancer Growth? **Planta Med**; 74: 33–38, 2008.

JUNQUEIRA, A. P. F.; PERAZZO, F. F.; SOUZA, G. H. B.; MAISTRO, E. L. Clastogenicity of *Piper cubeba* (Piperaceae) seed extract in an *in vivo* mammalian cell system. **Genetics and Molecular Biology**.30:656–663, 2007.

KIM, J. Y. et al. Beta-Apopicropodophyllin, a derivative of podophyllotoxin, has a function as anticancer drug and radiosensitizer against non-small cell lung cancer cells. **Cancer Research**. v. 78, n. 13, p.3197-3197, jul. 2018.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. Acomparision between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun** 3:103-115, 1995.

KÖLER, F. E. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem. 1887.

LAURENTIZ, R. S. et al. Avaliação da atividade antimicobacteriana da lignana diidroclubebina extraída da *Piper cubeba* e de seus derivados semissintéticos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 17, n. 41, p.782-789, 2015.

LEE, J., S.K. BANU, et al. Selective inhibition of prostaglandina E2 receptors EP2 and EP4 inhibts invasions of human immortalized endometric epitelial and stromal cells through supressions os metalloproteinases. **Mol Cell. Endocrinol**. vol.332, n.1-2, p. 306-13, Jan 30, 2011.

LEMO, C. O. T.; SVIDZINSK, T. I. E.; BAEZA, L. C.; MIRANDA, N.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G.; CARDOZO-FILHO, L.; CABRAL, V. F. Evaluation of antifungal activity of extracts of *Piper regnellii* obtained by supercritical fluid extraction. **Nat. Prod. Res**. 27:2355–2359, 2013.

LI, N. G. et al. Matrix metalloproteinase inhibitors: a patente reviw (2011 – 2013). Expert opinion on therapeutic patentes, v. 24, n. 9, p. 1039-52, set. 2014.

LIMA, T. C.; LUCARINI, R.; VOLPE, A. C.; DE ANDRADE C. Q. J.; SOUZA, A. M. P.; PAULETTI, P. M.; JANUÁRIO, A. H.; SÍMARO, G. V.; BASTOS, J. K.; ANDRIANIE, W.; CUNHA, R.; BORGES, A.; SILVA LAURENTIZ, R.; CONFORTID, V. A.; PARREIRA, R. L. T.; BORGES, C. H. G.; CARAMORIE, G. F.; E SILVA, K. F. M. L. A. **Bioorganic Med. Chem. Lett.**, v. 27, p. 176–179, 2017.

MARCOTULLIO, M. C.; PELOSI, A.; CURINI, M. **Molecules**, 19, 14862–14878, 2014.

MCCOMARCK, P. L. Quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine (gardasil(R)): a review of its use in the prevention of premalignant anogenital lesions, cervical and anal cancers, and genital warts. **Drugs**. 74(11):1253–1283, 2014.

MOILANEN, M.; PIRILA, E.; GRENNAN, R.; SORSA, T.; SALO, T. Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinomas. **J Pathol.** 197(1):72-81. 2002.

MOREIRA, Heloisa Trindade. **Análise celular e molecular da ação do peptídeo Ac2-26 da proteína anti-inflamatória Anexina A1 nas células de carcinoma de colo de útero.** 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2015.

MOTHANA, R.; ALSAID, M.; KHALED, J. M.; et al. Assessment of antinociceptive, antipyretic and antimicrobial activity of *Piper cubeba* L. essential oil in animal models. **Pak J Pharm Sci.**, v. 29, p. 671–677. 2016.

NAHAK, G.; SAHU, R. K. Phytochemical evaluation and antioxidant activity of *Piper cubeba* and *Piper nigrum*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science.**1:153–157, 2011.

NIWA, A. M.; PAULA, N. A.; VESENICK, D. C.; SARTORI, D.; MAISTRO, E. L.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of lignan (–)-cubebin extracted from *Piper cubeba* on human colon adenocarcinoma cells (HT29), **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, Botucatu, Jan., 2016.

OKADA, F. Inflammation-related carcinogenesis. Current findings in epidemiological trends, causes and mechanisms. **Yonago Acta Medica**, v.57, n.2, p. 65-72, 2014.

PARREIRA, R. L. T. et al. Evaluation of lignans from *Piper cubeba* against *Schistosoma mansoni* adult worms: A combined experimental and theoretical study. **Chemistry & Biodiversity**, p.2-12, out. 2018.

PECTASIDES, D.; KAMPOSITORAS, K.; PAPAXOINIS, G.; PECTASIDES, E. Chemotherapy for recurrent cervical cancer. **Cancer Treatment Review**, London, v. 34, n. 7, p. 603-613, nov. 2008.

PERAZZO, F. F.; RODRIGUES, I. V.; MAISTRO, E. L.; SOUZA, S. M.; NANAYKKARA, N. P. D.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T.; DE SOUZA, G. H. B. Anti-inflammatory and analgesic evaluation of hydroalcoholic extract and fractions from seeds of *Piper cubeba* L. (Piperaceae). **Pharmacognosy Journal**, 5:13–16, 2013.

PONTI, A.; ANTTILA A.; RONCO, G.; SENORE, C.; BASU, P.; SEGNAN, N.; et al. Cancer Screening in the European Union. Report on the Implementation of the Council Recommendation on Cancer Screening. International Agency for Research on Cancer, Lyon 2017.

PEREIRA, C. C. S. S.; PERAZZO, F. F.; SOUZA, G. H. B.; FONSECA, F. L. A.; ROSA, P. C. P. **African J. Pharm. Pharmacol.** 10, 526–532, 2016.

PEREIRA, A. C.; SILVA, M. L.; SOUZA J. M.; LAURENTIZ, R. S.; RODRIGUES, V.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M.; TAVARES, D. C.; FILHO, A. A.; CUNHA, W. R.; BASTOS, J. K.; MAGALHÃES, L. G. In vitro and in vivo anthelmintic activity of (–)-6,6' dinitrohinokinin against schistosomula and juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop.**, 149, pp. 195–201, 2015.

- PEREIRA, W. O.; AMARANTE-MENDES, G. P. Apoptosis: A programme of cell death or cell disposal? **Scand J Immunol**, v. 73, p. 401-7, 2011.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, London, v. 9, n. 29, p. 2002-2007, 2001.
- PISSURNO, A. P. R.; DE LAURENTIZ R. DA S. **Rev. Virtual Química**, 9, 656–671, 2017.
- PRABHU, B. R.; MULCHANDANI, N. B.; Lignans from *Piper cubeba*, **Phytochemistry**. 24: 329–331, 1985.
- PUSZTAI, R.; ABRANTES, M.; SHERLY, J.; DUARTE, N.; MOLNAR, J.; FERREIRA, M.J.U. Antitumor-promoting activity of lignans: Inhibition of human cytomegalovirus IE gene expression. **Anticancer Research**. 30:451–454, 2010.
- QUEVEDO, P. J.; INÁCIO, M.; WIECZORKIEWICZ, A. M.; INVERNIZZI, N. Política de vacinação contra o HPV no Brasil: a comunicação pública oficial e midiática face à emergência de controvérsias. **Revista Tecnologia e Sociedade**, v.12, n.24, p. 1-26, jan/abr. 2016.
- RAJALEKSHMI, D. S.; KABEER, F. A.; MADHUSOODHANAN, A. R.; BAHULAYAN, A. K.; PRATHAPAN, R.; PRAKASAN, N.; VARUGHESE, S.; NAIR, M. S. Anticancer activity studies of cubebin isolated from *Piper cubeba* and its synthetic derivatives. **Bioorganic Med. Chem. Lett.** 26:1767-1771, 2016.
- RAMACHANDRAN, B. Functional association of oestrogen receptors with HPV infection in cervical carcinogenesis. **Endocrine-related cancer**, v. 24, n. 4, p. R99 R108, Apr. 2017.
- RAMEZ, N. E.; KRISHNANSU, S. T. Immunotherapy: Na Evolving Paradigm in the treatment of advanced cervical cancer. **Clinical Therapeutics**, v.37, n.1, p.20-38, Jan. 2015.
- REZENDE, K. C. S.; LUCARINI, R.; SÍMARO, G. V.; et al. Antibacterial activity of (–)-cubebin isolated from *Piper cubeba* and its semisynthetic derivatives against microorganisms that cause endodontic infections. **Revista Brasileira de Farmacologia**; 26:296–303, 2016.
- RIZZO, M. T. Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. **Clin. Chim. Acta**. 412 (9–10), 671–687, 2011.
- ROBADI, I. A.; PHARAON, M.; DUCATMAN, B. S. The Importance of High-Risk Human Papillomavirus Types Other Than 16 and 18 in Cervical Neoplasia. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 142, n. 6, p. 693–695, Jun. 2018.
- RODRIGUES-LISONI, F.C. et al., Genomics and proteomics approaches to the study of cancer-stroma interactions. **BMC Medical Genomics**, London. v.4, n.3, p.14, 2010.
- ROOMI, M. W. et al. Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human câncer cell lines. **Oncology reports**, v.21, n. 5, p. 1323 – 33, maio 2009.
- ROURA, E. et al. Correction: The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. 15-14, Mar. 2016.
- SANTIAGO, M. B. **Análise De Proteoma No Carcinoma De Células Escamosas De Laringe**. 2015. 135 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, 2015.

SARWAR, A. H. M. G.; NIRALA, R. K.; ARIF, M.; KHILLARE, B.; THAKUR, S. C. Spermicidal activity of the hexane extract of *Piper longum*: an in vitro study. **Nat. Prod. Res.** 29:1166–1169, 2015.

SATROAMIDJOJO, S. In Obat Asli Indonesia; Tjokronegoro, A., Ed.; Dian Rakyat: Indonesia; p. 171, 1997.

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

SILVA, R.; SOUZA, G. H. B.; SILVA FILHO, A. A.; SOUZA, V. A.; PEREIRA, A. C.; ROYO, V. A.; SILVA, M. L. A.; DONATE, P. M.; ARAUJO, A. L. M. S.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Synthesis and biological activity evaluation of lignan lactones derived from (-)-cubebin Bioorg. **Med. Chem. Lett.** 15, 1033-1037, 2005.

SILVA, M. L. A.; MARTINS, C. H. G.; LUCARINI, R.; SATO, D. N.; PAVAN, F. R.; FREITAS, N. H. A.; ANDRADE, L. N.; PEREIRA, A. C.; BIANCO, T. N. C.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; BASTOS, J. K.; SILVA, R.; FILHO, A. A. S. Antimycobacterial Activity of Natural and Semi-Synthetic Lignans. **Z. Naturforsch** 64, 779, 2009.

SILVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica, Genética na Escola, 02 30–37, 2007.

SOTO-DE LEON, S.; CAMARGO, M.; SANCHEZ, R.; MUNOZ, M.; PEREZPRADOS, A.; PURROY, A.; PATARROYO, M. E.; PATARROYO, M. A. Distribution patterns of infection with multiple types of human papillomaviruses and their association with risk factors. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 2, e14705, Feb., 2011.

SOUZA, V. A.; DA SILVA, R.; PEREIRA, A. C.; ROYO, V. A.; SARAIVA, J.; MONTANHEIRO, M.; DE SOUZA, G. H. B.; FILHO, A. A. S.; GRANDO, M. D.; DONATE, P. M.; BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L. A. Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 15: 303–307, 2005.

SOUZA, G. H. B et al. Analgesic and anti-inflammatory activities evaluation of (-)-O-acetyl, (-)-O-methyl, (-)-O-dimethylethylamine cubebin and their preparation from (-)-cubebin. **II Farmaco**, v. 59, n. 1, p.55-61, jan. 2004.

SMALL, W. et al. Cervical cancer: A global health crisis. **Cancer**, v. 123, n. 13, p. 2404–2412, 1 Jul. 2017.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays for Bioactivity. In Methods in Plant Biochemistry. K. Hostettmann (Editor). **London Academic Press**. 1991.

TING, A. F. ROSITCH, S. M. TAYLOR, L. RAHANGDALE, H. M. SOETERS, X. SUN and J. S. SMITH. Worldwide incidence of cervical lesions: a systematic review. **Epidemiology and Infection**, 143, pp 225-241, 2015.

UYAR, D. & RADER, J. Genomics of cervical cancer and the role of human papillomavirus pathobiology. **Clin. Chem.** 60, 144–146, 2014.

ULUKAYA E.; ACILAN C.; YILMAZ Y. Apoptosis: Why and how does it occur in biology? **Cell Biochem Funct**, v. 29, p. 468-80, 2011.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; **Chem.-Biol. Interact.** 160, 1, 2006.

WALKER, T. Y. et al. National, Regional, State, and Selected Local Area Vaccination Coverage Among Adolescents Aged 13-17 Years - United States, 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 66, n. 33, p. 874–882, 25 Aug. 2017.

WRIGHT A. A.; HOWITT B. E.; MYERS A. P.; DAHLBERG S. E.; PALESCANDOLO E., VAN HUMMELEN P.; MACCONAILL L. E.; SHONI M.; WAGLE N.; JONES R. T. Oncogenic mutations in cervical cancer: genomic differences between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix. **Cancer**. 119(21):3776–3783, 2013.

YAM, J.; KREUTER, M.; DREWE, J. *Piper cubeba* targets multiple aspects of the androgen-signalling pathway. A potential phytotherapy against prostate cancer growth? **Planta Medica**, v.74, p.33-38, 2008.

YOSHIZAKI, T.; MARUYAMA. Y.; SATO, H.; FURUKAWA, M. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**. 95(1):44-50. 2001.

ZENG, Y.; YANG, Y.; Piperine depresses the migration progression via downregulating the Akt/mTOR/MMP-9 signaling pathway in DU145 cells. **Mol Med Rep**. 17(5):6363-6370. 2018.

ZHANG, Y.; CHEN, F.Q.; SUN, Y. H.; ZHOU, S. Y.; LI, T. Y.; CHEN, R. Effects of DNMT1 silencing on malignant phenotype and methylated gene expression in cervical cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, London, v. 30, p. 98, Oct., 2011.

ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; WANG, S. Z.; WANG, N.; JIANG, W. G.; JI, Y. H.; ZHANG, S. L. Reduced expression of tissue factor pathway inhibitor-2 contributes to apoptosis and angiogenesis in cervical cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, London, v. 31, n. 1, p. 1-9, Jan, 2012.

ZHANG, J., CHEN, J., LIANG, Z. & ZHAO, C. New lignans and their biological activities. **Chemistry and Biodiversity** 11(1):1-54. 2014.

ZHANG, J.; ZHU, X.; LI, H.; LI, B.; SUN, L.; XIE, T.; ZHU, T.; ZHOU, H.; YE, Z. Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/-9 expression. **Int Immunopharmacol**. 24:50–58. 2015.

ZHANG, X. W.; LI, J.; JIANG, Y. X.; CHEN, Y. X. Association between COX-2 -1195G>A polymorphism and gastrointestinal cancer risk: A meta-analysis. **World J Gastroenterol**. 23(12):2234-2245. 2017.

ZHOU, Y.; LIU, Y. E.; CAO, J.; ZENG, G.; SHEN C.; LI, Y.; ZHOU M.; CHEN, Y.; PU, W.; POTTERS, L.; SHI, Y. E.: Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth. **Clin Cancer Res** 15: 5161-5169, 2009.