

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E
SAÚDE - NÍVEL MESTRADO

JOSÉ HENRIQUE FERMINO FERREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE EFEITOS BIOLÓGICOS DA SERICINA EM
LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE PULMÃO HUMANO**

CASCAVEL- PR
Outubro/2017

JOSÉ HENRIQUE FERMINO FERREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE EFEITOS BIOLÓGICOS DA SERICINA EM
LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE PULMÃO HUMANO**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa De Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde - Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

**Área de concentração: Fatores que
influenciam a morfofisiologia orgânica**

ORIENTADORA: Rose Meire Costa
Brancahão

COORIENTADOR: Eduardo Alexandre Loth

CASCAVEL-PR

Outubro/2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas – UNIOESTE)

Santos, José Henrique Fermino Ferreira dos.

S235a Avaliação de efeitos biológicos da sericina em linhagem celular de
câncer de pulmão humano / José Henrique Fermino Ferreira dos Santos. ---
Cascavel (PR), 2017.

70 f.:il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rose Meire Costa Brancalhão

Coorientador: Eduardo Alexandre Loth

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Campus de Cascavel, 2017.

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde.

Inclui Bibliografia

1. Pulmões - câncer. 2. Sericina. 3. Apoptose. 4. Sobrevivência celular.
I. Brancalhão, Rose Meire Costa. II. Loth, Eduardo Alexandre. III.
Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

Rosângela A. A. Silva – CRB 9^ª/1810



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 78680337/0002-65
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4566 - Cascavel - Paraná




PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO


JOSÉ HENRIQUE FERMINO FERREIRA DOS SANTOS

Avaliação de efeitos biológicos da sericina em linhagem celular de câncer de pulmão humano.

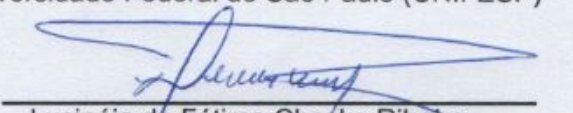
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde, área de concentração Biologia, Processo Saúde-doença e Políticas de Saúde, linha de pesquisa Fatores Que Influenciam A Morfofisiologia Orgânica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:


Orientador(a) - Rose Meire Costa Brancalhão

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Ricardo Alexandre de Azevedo

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)


Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Cascavel, 1 de agosto de 2017

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Josoel e Marta.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a meu Deus, que tanto tem me abençoado e alargado minhas fronteiras.

Aos meus pais, Josoel e Marta, que têm sido minha base de sustentação e meu exemplo de força durante toda minha caminhada acadêmica.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Rose Meire Costa Brancalhão, pela direção, conselhos e ajuda indispensáveis.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Eduardo, Alexandre Loth, por tudo que tem me ensinado, pela parceria e subsídios, sem os quais este trabalho não existiria.

Ao Ricardo Alexandre de Azevedo, pelo apoio técnico, pela disponibilidade de estar em minha banca, e pela prontidão em prestar auxílio quando necessário.

Ao CNPq e à CAPES, pelo auxílio financeiro concedido.

Às professoras Dr^a Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro e PhD Carolina Panis, por aceitarem fazer parte da minha banca.

Aos queridos professores do Programa de Biociências e Saúde, pelos conhecimentos substanciais concedidos.

Aos meus colegas de pesquisa do LABEF, LPM e LME, pela ajuda prestada, conhecimentos repartidos e momentos compartilhados.

À Celeste da Rocha Paiva, pela disponibilidade, simpatia e apoio prestados durante vários momentos da realização deste estudo.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, reservo a minha mais sincera gratidão.

“Adquire a verdade e não a vendas, adquiere sabedoria, instruções e inteligência. ”

(Provérbios 23:23, BJ)

Santos, José Henrique Fermino Ferreira dos. Avaliação de efeitos biológicos da sericina em linhagem celular de câncer de pulmão humano. 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2017.

RESUMO GERAL

O câncer de pulmão apresenta alta letalidade e o fumo se constitui como um importante fator de risco. O tumor de células não pequenas é o tipo de carcinoma pulmonar mais comum, menos agressivo e o tratamento envolve cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Entretanto, o diagnóstico tardio, em função da ausência de sinais e sintomas nos estágios iniciais da doença, faz com que a taxa de sobrevivência seja baixa. Nesse sentido, a busca de novas substâncias químicas com características de seletividade, de efetividade e de baixa toxicidade tem se refletido em pesquisas que investigam o uso dessas substâncias no tratamento do câncer. Estudos mostram que a sericina, proteína extraída dos casulos do bicho-da-seda, apresenta atividade antitumoral e anticarcinogênica em células cancerosas de cólon e de pele, estimulando a apoptose e interrompendo o ciclo celular, além de proteger células normais contra estresse oxidativo e peroxidação lipídica. Assim, o potencial terapêutico da sericina suscitou o interesse em avaliar seu efeito em linhagem celular de câncer de pulmão do tipo células não pequenas. Os estudos foram conduzidos em cultura, em que foram avaliados os efeitos da proteína da seda: na viabilidade celular, por meio de ensaios pelo vermelho neutro e de citotoxicidade com o tetrazólio - MTT; no potencial apoptótico, com ensaios com anexina-5 e Alexa Fluor® e Iodeto de Propídio; e na migração celular, ensaio com o modelo *Wound Healing*. Baixas doses de sericina foram capazes de aumentar a viabilidade lisossomal, reduzir a viabilidade mitocondrial, aumentar a apoptose e a migração celular, enquanto altas doses de sericina reduziram exponencialmente a migração celular e não alteraram a taxa de apoptose/necrose das células cancerosas. A sericina é um biomaterial que provoca efeitos biológicos na linhagem celular testada, e pode ser utilizada para aumentar a viabilidade lisossomal, reduzir a função mitocondrial, aumentar a apoptose em baixas doses e inibir a migração celular em doses altas.

Palavras-chave: Neoplasias pulmonares, Sericina, Sobrevivência Celular, Movimento Celular, Apoptose.

Santos, José Henrique Fermينو Ferreira dos. Evaluation of biological effects of sericin on human lung cancer cell line. 2017. 70 f. Master Thesis (Master Degree Course in Biosciences and Health) – State University of West Paraná, Cascavel, 2017.

EVALUATION OF BIOLOGICAL EFFECTS OF SERICIN ON HUMAN LUNG CANCER CELL LINE

GENERAL ABSTRACT

Lung cancer is highly lethal and smoking is an important risk factor. Non-small cell tumor is the most common, less aggressive type of lung carcinoma and treatment involves surgery, chemotherapy, and radiation therapy. However, late diagnosis, due to the absence of signs and symptoms in the early stages of the disease, makes the survival rate low. In this sense, the search for new chemical substances with characteristics of selectivity, effectiveness and low toxicity have been investigated in the treatment of cancer. Studies show that sericin, a protein extracted from silkworm cocoons, exhibits anti-tumor and anticarcinogenic activity in colon and skin cancer cells, stimulating apoptosis and disrupting the cell cycle, and protecting normal cells against oxidative stress and lipid peroxidation . Thus, the therapeutic potential of sericin has raised interest in evaluating its effect on non-small cell lung cancer cell line. The studies were conducted in culture, where the effects of silk protein were evaluated: on cell viability, by neutral red assays and tetrazolium - MTT cytotoxicity; in the apoptotic potential, with annexin-5 and Alexa Fluor® and Propidium Iodide assays; and in cell migration by the Wound Healing model assay. Low doses of sericin were able to increase lysosomal viability, reduce mitochondrial viability, increase apoptosis and cell migration, while high doses of sericin exponentially reduced cell migration and did not alter the rate of apoptosis / necrosis of cancer cells. Sericin is a biomaterial that causes biological effects on the cell line tested, and can be used to increase lysosomal viability, reduce mitochondrial function, increase apoptosis at low doses and inhibit high-dose cell migration.

Keywords: Carcinoma, Non-Small-Cell Lung, Sericin, Cellular Survival, Cell Movement, Apoptosis

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
OBJETIVOS	15
REVISÃO GERAL DE LITERATURA	16
CÂNCER DE PULMÃO	16
INCIDÊNCIA E FATORES DE RISCO	16
CLASSIFICAÇÃO	20
FISIOPATOLOGIA.....	24
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	25
DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO	27
TRATAMENTO	28
SERICINA.....	31
SERICICULTURA.....	31
SERICINA.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ARTIGO CIENTÍFICO	45
ANEXO B	64

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Variantes histológicas de carcinoma de pulmão. A, Adenocarcinoma; magnificação mostra fator de transcrição tireóideo detectado por imunohistoquímica. B, Carcinoma de células escamosas bem diferenciado mostrando queratinização (seta). C, Carcinoma de células pequenas. Existem ilhas de pequenas células profundamente basofílicas e áreas de necrosis. D, Carcinoma de células grandes. As células tumorais são pleomórficas e não mostram evidências de diferenciação escamosa ou glandular (KUMAR et al., 2014).....21

Figura 2 Células de um adenocarcinoma em um esfregaço de escarro (GOLDMAN et al., 2011).....23

Figura 3 Diagnóstico citológico de câncer de pulmão. Uma amostra de escarro mostra uma coloração alaranjada, carcinoma de células escamosas queratinizado com núcleo hipercromático proeminente (seta maior). Note o tamanho das células tumorais comparado com neutrófilos normais (seta menor) (KUMAR et al., 2014).24

Figura 4. Estadiamento do câncer de Pulmão segundo a escala TNM. (GOLDMAN et al., 2011).....30

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA: Ácido Desoxirribonucleico
RNA: Ácido Ribonucleico
IARC: Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
OMS: Organização Mundial da Saúde
INCA: Instituto Nacional do Câncer
TERT: Telomerase Transcriptase Reversa
HPA: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
EGF: Fator de crescimento epidérmico
GRP: Peptídeo Liberador de Gastrina
IGF: Fator de crescimento semelhante a Insulina
PET: Tomografia por Emissão de Pósitrons
DLCO: Teste de Capacidade de Difusão Pulmonar do monóxido de Carbono VEF1:
Volume Expiratório Forçado em 1 segundo
PM: Peso Molecular
IL-10: Interleucina 10
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral
IFN- γ : Interféron gama
LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade
ROS: Espécies Reativas de Oxigênio
GH: Hormônio do Crescimento
COX-2: Ciclo-oxigenase 2
PARP: Poli-ADP-ribose Polimerase
LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda

INTRODUÇÃO GERAL

O câncer de pulmão é o que mais mata no mundo e, em países desenvolvidos, a sobrevida média cumulativa total em cinco anos varia entre 13 e 21%; já nos países em desenvolvimento entre 7 e 10% (JUNIOR, 2012). Segundo dados do levantamento mundial GLOBOCAN, realizado pela Agência Internacional de Pesquisa no Câncer (IARC), pertencente à Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de pulmão é o terceiro tipo mais prevalente de câncer, tanto que em 2012 foram registrados mais de 1,5 milhão de mortes. A expectativa para os próximos cinco anos é que a doença mate cerca de 19 milhões de pessoas. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que, no ano de 2017, o câncer de pulmão acometerá mais de 28 mil brasileiros, com uma razão de mortalidade de aproximadamente 90% (FERLAY et al., 2015; INCA, 2016).

A faixa etária de maior incidência de câncer de pulmão é acima de 55 anos, além de ser a que apresenta também o maior número de mortes. Esse fato se associa ao padrão de exposição crônica, ao longo da vida, aos carcinógenos ambientais, como a poluição; aos carcinógenos ocupacionais, no caso do amianto e de hidrocarbonetos policíclicos; e ao tabagismo, tanto ativo como passivo, que se constitui como a principal causa de câncer de pulmão. Além disso, fatores hereditários, que envolvem alterações na forma de metabolização dos componentes do cigarro, tais como mutações no cromossomo 15q25, em que dois nucleotídeos mutados afetam a interação com a nicotina e aumentam a possibilidade de desenvolvimento do câncer. Matakidou et al. (2005) chegaram à conclusão que existe um forte componente familiar no câncer de pulmão e que é superior ao fumo passivo. Ainda, evidências apontam que pessoas com câncer de pulmão têm maior

chance de desenvolvimento de outros tipos de câncer (FERLAY et al., 2015; CONSONNI et al., 2010, HUNG et al., 2008; MATAKIDOU et al., 2005)

O estilo de vida desempenha um papel importante no desenvolvimento desse câncer. Uma alimentação rica em carnes, embutidos e derivados aumentam a sua possibilidade, enquanto hábitos alimentares envolvendo consumo de frutas e verduras, especialmente verduras cruas escuras, diminuem essa possibilidade. Além disso, foi encontrada associação entre a ativação da transcriptase telomerase reversa (TERT) durante processos inflamatórios e a ocorrência do câncer de pulmão, indicando uma influência pró-oncogênica de fatores endógenos, como a inflamação, que promove agressão celular prolongada e colabora com o desenvolvimento da patologia (DE STEFANI, 2009; BALDER et al., 2005; BRENNER et al., 2010).

A alta letalidade do câncer de pulmão se relaciona à fisiopatologia da doença, que é insidiosa e produz sintomas pouco específicos, acarretando em diagnóstico tardio. O sintoma inicial é a tosse; essa evolui e se agrava para dispneia, ocorrendo perda de peso, que é um sinal característico da doença (KUMAR et al., 2014).

Dos cânceres de pulmão existentes, o de células não pequenas é o mais prevalente, 86% dos casos, e é um tipo de câncer que apresenta pouca metástase, sendo menos responsável aos tratamentos cirúrgico, quimioterápico e radioterápico (KUMAR et al., 2014). O tratamento cirúrgico mostra um sucesso de 48%, quando o diagnóstico é precoce e a doença é localizada. No entanto, apenas 15% dos casos apresenta doença localizada e é elegível para tratamento cirúrgico, levando-se em consideração, para isso, a idade dos pacientes, em função das comorbidades, como hipertensão e diabetes, que aumentam o risco cirúrgico (KUMAR et al., 2014; RAMALINGAM et al., 2011; BEIJNEN E SCHELLENS, 2004).

O principal esquema quimioterápico utiliza derivados de platina (cisplatina e carboplatina), conjugados com o etoposídeo, sendo frequentemente associado com a radioterapia. É importante ressaltar que a radioterapia parece encurtar a sobrevida dos pacientes (FRANÇA et al., 2011; JUNIOR, 2012).

Pesquisas científicas no tratamento do câncer estão voltadas para o desenvolvimento de terapias ditas biológicas, que atuem em receptores e enzimas iniciadores ou perpetuadores do processo neoplásico, de forma a se restaurar vias metabólicas inibidas, como a apoptose, ou mesmo inibir a atividade de enzimas pró-oncogênicas, como a tirosinase. As pesquisas abrangem também terapias

específicas com ação no DNA e RNA. Segundo informações do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, estão sendo conduzidos cerca de 464 ensaios clínicos dessa natureza (MOREIRA; ENG, 2014; NIC, 2016; ROSELL; KARACHALIOU, 2015).

Nesse contexto de investigação científica, a proteína sericina, extraída do casulo do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), apresenta algumas características biológicas de interesse, que revelam seu potencial uso no tratamento do câncer de pulmão, tais como: atividade antitirosinásica; antitumoral; antiapoptótica, em casos de agressão celular primária; pró-apoptótica, em casos de carcinogênese já estabelecida; e capacidade de interromper o ciclo celular de células cancerosas de cólon intestinal. Ademais, apresenta baixa citotoxicidade em células normais, capacidade de regulação da intensidade da inflamação e efeito protetor na célula contra a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo (CAO; ZHANG, 2015; ZHAORIGETU et al., 2001; DASH et al., 2008a, b; KATO et al., 1998; KAEWKORN et al., 2012; CHLAPANIDAS et al., 2013).

A sericina, juntamente com a proteína fibroína, são constituintes do casulo de seda e são sintetizadas pela glândula da seda das lagartas de *B. mori*. A fibroína é bastante utilizada na indústria de fiação, na produção de diversos tipos de tecidos de seda; entretanto, a sericina, que compreende 20-30% do peso total do casulo (SASAKI et al., 2000), não é aproveitada, sendo frequentemente descartada. Ultimamente, a indústria cosmética tem a utilizado devido às características hidratantes, antirugas e hipoalérgica, além de promover a reepitelização em queimaduras (MONDAL et al., 2007; BERARDESCA et al., 2015; ARAMWIT et al., 2013; KATO et al., 1998).

Assim, considerando que o câncer de pulmão de células não pequenas é o carcinoma pulmonar mais comum e apresenta baixa resposta aos tratamentos disponíveis, é necessário o desenvolvimento de pesquisas com o uso de novos agentes com potencial antitumoral e antioncogênico. Este estudo, então, se propôs a investigar os efeitos antitumorais da sericina em cultura de células não pequenas. Se os efeitos do uso da sericina em outros tipos de câncer puderem ser reproduzidos na linhagem de carcinoma de pulmão de células não pequenas, isso representará uma descoberta capaz de fomentar estudos posteriores com animais experimentais e ensaios clínicos, e resultar em tratamento complementar, com reflexos positivos na sobrevida e qualidade de vida dos pacientes.

OBJETIVOS

Geral

Analisar o potencial efeito antitumoral da sericina em linhagem celular de câncer de pulmão de células não pequenas.

Específicos

Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de sericina na viabilidade e na apoptose das células não pequenas;

Verificar os efeitos da sericina na necrose das células cancerosas de pulmão;

Avaliar a ação da sericina na migração das células não pequenas de câncer de pulmão.

REVISÃO GERAL DE LITERATURA

Este estudo abordou temas nas áreas de patologia, epidemiologia, saúde pública, sericina, entre outros diretamente relacionados a esses. Objetivando otimizar a forma de apresentação, procurou-se organizar este item em tópicos, apresentados a seguir.

CÂNCER DE PULMÃO

Incidência e Fatores de Risco

De acordo com o último levantamento global do câncer, o GLOBOCAN, o câncer de pulmão matou 1,59 milhões de pessoas em 2012, sendo 1,09 milhões de homens e 491 mil mulheres. É o terceiro tipo de câncer mais comum em países desenvolvidos e o primeiro em regiões em desenvolvimento, com 758 mil e 1,06 milhões de casos, respectivamente. Com 384 mil novos casos em 2012, o continente Americano é o terceiro com mais número de casos no mundo. As taxas mais altas de câncer de pulmão, para 100.000 pessoas, são de 176,9 para os homens e 91,7 para as mulheres, e ambas são registradas em indivíduos da raça negra residentes nos Estados Unidos. A tendência para 2030 é que o câncer de pulmão cresça entre as mulheres e diminua entre os homens. No Brasil, a estimativa feita pelo INCA, válida para o ano de 2017, é de que ocorrerão mais de 16 mil novos casos de câncer de pulmão entre homens e mais de 10 mil novos casos entre mulheres, totalizando mais de 28 mil novos casos (BRAY et al., 2012; FERLAY et al., 2015; INCA et al., 2016).

O hábito tabágico é o principal causador de câncer de pulmão e corresponde de 85% a 90% dos casos. Existem cerca de 40 substâncias que são potenciais causadoras de câncer no cigarro comum, no qual a concentração de alcatrão e

nicotina tem forte relação com a carcinogênese. O risco aumenta de acordo com os hábitos do fumante, tais como: número de cigarros por dia - pessoas que fumam um e dois maços de cigarro por dia apresentam um risco de dezessete e sessenta e quatro vezes maior, respectivamente, em comparação com aquele nunca fumou; grau de inalação; e o uso de cigarros sem filtro. Deve-se considerar, ainda, a idade de início do hábito e o tempo de fumo, que se relacionam com o risco de desenvolver uma neoplasia pulmonar (PORTER; KAPLAN, 2011).

Para pessoas que já fumaram, a taxa de risco é mais alta, independente da cessação do hábito. Não obstante, é possível se diminuir o risco, ainda que não exista possibilidade de retornar ao risco da população que nunca fez uso do tabaco. Calcula-se que um tempo de abstinência em torno de 30 anos seja necessário para que a taxa de risco seja rebaixada para 2,0, o que representaria para um ex-fumante o dobro de chance de desenvolver câncer de pulmão na comparação com a população que nunca fumou. Cachimbos e charutos também aumentam o risco de desenvolver esse câncer; porém, em menor escala na comparação com o cigarro. A fumaça do cigarro tem a tendência de ser inalada muito mais profundamente e por mais tempo do que a fumaça produzida pelo tabaco, utilizado em cachimbos e charutos; o que influencia as taxas de neoplasia pulmonar (LEE et al., 2010).

Drogas ilícitas, como a maconha, são tidas também como causadoras de câncer pulmonar, mas o potencial real dessas drogas ainda não foi elucidado, uma vez que seu uso é menos comum e, por vezes, ilícito (ALDINGTON et al., 2008).

O fumo passivo também é fator de risco para o câncer de pulmão. A inalação involuntária da fumaça do cigarro, proporcionada pela exposição em ambientes fechados, aumenta o risco de desenvolvimento do adenocarcinoma, um subtipo de câncer de pulmão de células não pequenas (LEE et al., 2010).

Existem outras substâncias ambientais causadoras de câncer de pulmão, normalmente relacionadas à ocupação, como o radônio, os asbestos, o arsênio, o berílio, o cádmio, o cromo, o níquel, o cloreto de vinil e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), que são classificados pela Agência Internacional para Pesquisa de Câncer (no inglês, IARC) no grupo I como carcinógenos conhecidos na gênese do câncer de pulmão. Os principais agentes causadores de câncer de pulmão relacionados ao trabalho são os asbestos para os homens e os hidrocarbonetos policíclicos para as mulheres. As ocupações que demonstram mais

forte correlação com o aparecimento de câncer de pulmão em homens são: a indústria de base com materiais não férreos, a olaria e a indústria da cerâmica. Entre as mulheres, as ocupações que demonstraram maior incidência de câncer foram aquelas relacionadas à lavanderia e à limpeza a seco. Em torno de 9% dos homens e 2 % das mulheres que desenvolveram câncer de pulmão tiveram exposição a carcinógenos em suas atividades ocupacionais como fatores determinantes da neoplasia pulmonar (CONSONNI et al., 2010).

O radônio, mencionado anteriormente, é um gás derivado de minério radioativo de urânio e de rádio, especialmente o urânio-238 e o rádio-226, que lesa as células pulmonares por meio da radiação α que emite. Seu risco está relacionado a ocupações envolvendo atividades de mineração, mas também ao solo e à água consumida pelos habitantes de certas regiões com alta concentração desses componentes radioativos no solo. No caso dos asbestos, a lesão pulmonar é causada por fibras microscópicas desse material. As ocupações normalmente relacionadas com a exposição ao amianto envolvem lojas de automóveis, estaleiros, minas e fábricas têxteis e de cimento. A exposição aos asbestos aumenta mais de cinquenta vezes o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão em um fumante. Estima-se que lesões pulmonares decorrentes da exposição ocupacional ao amianto permaneçam durante cerca de 25 a 40 anos, período que representa o advento da neoplasia pulmonar (RIDGE et al., 2013).

O arsênico, também relacionado às atividades de mineração, é resultado da volatilização de minérios de estanho, combinado com cobre, chumbo e zinco. É bastante utilizado em agrotóxicos, podendo estar presente no ar, no solo, na água e nos alimentos. A exposição ao arsênico aumenta o risco de um fumante em desenvolver câncer de pulmão, para além do risco já proporcionado pelo cigarro. O cádmio, que está presente na indústria de plásticos, bateria e pigmentos, aumenta o risco de câncer de pulmão, assim como o cromo, que é utilizado na fabricação de cimento, borrachas e tintas, e o cloreto de vinil que é utilizado pela indústria da cerâmica. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) estão presentes no cigarro, na indústria do alumínio, do aço e do estanho (CONSONNI et al., 2010;).

O tabagismo pode levar a outras doenças, antes de provocar o câncer de pulmão, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Por causa de sua ação agressiva nas células pulmonares, o tabagismo produz uma inflamação que se

torna crônica com o uso contínuo do cigarro. A inflamação tem sido apontada como tendo papel central na carcinogênese de pulmão, por aumentar as mutações genéticas, promover sinalização antiapoptótica e aumentar a angiogênese. A subunidade h5p15 da telomerase transcriptase reversa (no inglês, TERT) e a subunidade 6p21 do complexo principal de histocompatibilidade (no inglês, MHC), mostraram forte correlação com a promoção de respostas inflamatórias precursoras do câncer de pulmão. A existência de uma doença pulmonar inflamatória de base, como a DPOC, a asbestose, a silicose e a fibrose pulmonar, aumenta em quatro vezes o risco de neoplasia pulmonar (BRENNER et al., 2010; CONSONNI et al., 2010).

A dieta também desempenha papel importante na prevenção e na gênese do câncer de pulmão. Verifica-se que existe uma relação inversamente proporcional entre o consumo de frutas e verduras de coloração verde e amarela e a ocorrência do câncer de pulmão. O risco aumenta quando esses alimentos não são incluídos na dieta, sendo que esse efeito parece estar associado à presença das vitaminas A e E, do isotiocianato e selênio, que têm ação antioxidante e apresentam ação preventiva para o câncer de pulmão. No entanto, esse efeito protetivo não apresenta proteção crescente conforme a quantidade consumida de vitaminas, sendo que a suplementação com betacaroteno, de fato, colabora com o aumento da incidência de câncer de pulmão. Um estilo de vida que envolve o consumo de gordura animal, de carne, especialmente a suína, de carne processada e seus derivados, aumenta a incidência do câncer de pulmão (BALDER et al., 2005; DE STEFANI et al., 2009; MOLINA et al., 2008).

O risco de desenvolver câncer de pulmão de pequenas células e adenocarcinoma é maior em mulheres do que homens, o que pode estar associado ao papel do estrógeno como agente pró-oncogênico, as variações de gênero existentes na metabolização dos componentes do cigarro, especialmente nas enzimas do citocromo P-450. As maiores taxas de incidência e de mortalidade por câncer de pulmão são encontradas entre homens afro-americanos. Essa predileção está associada aos hábitos alimentares, com maior consumo de gorduras, maior utilização do tabaco e uma possível diferença na metabolização dos componentes do cigarro. A síndrome da imunodeficiência humana apresenta associação com o desenvolvimento do câncer de pulmão. O fumo, no entanto, desempenha papel

fundamental, apesar do risco trazido pela própria doença, no desenvolvimento da neoplasia pulmonar (BRAY et al., 2012; GOLDMAN; AUSIELLO, 2011).

O câncer de pulmão possui predileção hereditária e familiar, sendo que o risco no seu desenvolvimento aumenta em seis vezes, caso exista histórico de neoplasia pulmonar entre parentes de primeiro grau. Isso pode estar relacionado à exposição a doses crônicas de fumo passivo, mas existe predisposição que aponta para herança gênica. Genes precursores da enzima p53, que está envolvida em processos de reparo do DNA e na morte celular; da enzima p450 envolvida na metabolização dos componentes do cigarro e da enzima detoxificadora glutationa – S – transferase μ , estão relacionados à carcinogênese pulmonar. Foi apontado, também, que polimorfismos nos nucleotídeos rs1051730 e rs8034191 do cromossomo 15q25 apresentam forte predileção pela nicotina e aumentam o risco da doença cancerosa pulmonar quando acontece a exposição tabágica. Condições hereditárias epigenéticas de metilação de genes, como o *p16*, o *RAR- β* , o *RASSF1A*, a metilguanina-metil-transferase e a proteína quinase associada à morte (DAP-quinase), encontrados no câncer de pulmão de células não pequenas diminuem a função de genes supressores de tumor, colaborando para proliferação descontrolada das células (JACKMAN; JOHNSON, 2005; HUNG et al., 2008).

Classificação

Clinicamente, o câncer de pulmão é classificado, com base na responsividade a quimioterapia e capacidade em promover metástases, em: pequenas células, com grande responsividade ao tratamento quimioterápico e capacidade em promover metástases; e células não pequenas, que metastatizam menos e apresentam pouca resposta ao tratamento quimioterápico (KUMAR et al., 2014).

Existe também a classificação baseada no tipo histológico proposta em 1924 por Marchesani, a qual divide o câncer de pulmão em: adenocarcinoma; carcinoma de células escamosas; o carcinoma de pequenas células; e carcinoma de grandes células (Figura 1) (TARANTINO, 2002).

Ressalta-se que 13% dos cânceres de pulmão em homens são do tipo carcinoma de pequenas células e 87% de células não pequenas. Com relação ao câncer de pulmão de células não pequenas, o adenocarcinoma responde por 37% dos casos, o carcinoma de células escamosas por 32%, e o carcinoma de células

grandes por 18%. Entre mulheres, o câncer de células não pequenas representa 82% dos casos, sendo 47% de adenocarcinomas, 25% de carcinoma de células escamosas e 10% de carcinoma de pequenas células. Nas mulheres, o câncer de pequenas células representa 18% dos casos de câncer de pulmão (KUMAR et al., 2014).

O carcinoma de células escamosas está intimamente relacionado ao tabagismo. A principal característica desse subtipo de câncer de pulmão é a presença de queratinização e de pontes intercelulares (Figura 1 e 3). Tais características podem ser observadas com facilidade nos tumores bem diferenciados, e apenas focalmente em tumores mal diferenciados nos quais a atividade mitótica tende a ser maior. Existe uma forte tendência de migração dos carcinomas de células escamosas para a periferia do pulmão. Entre todos os tipos de câncer de pulmão, o carcinoma de célula escamosas é o que apresenta a maior frequência de mutações p53, assim como uma expressão acentuada do receptor do fator de crescimento epidérmico (no inglês, EGF) que ocorre em 80% dos carcinomas de células escamosas. (PETERSEN, 2011).

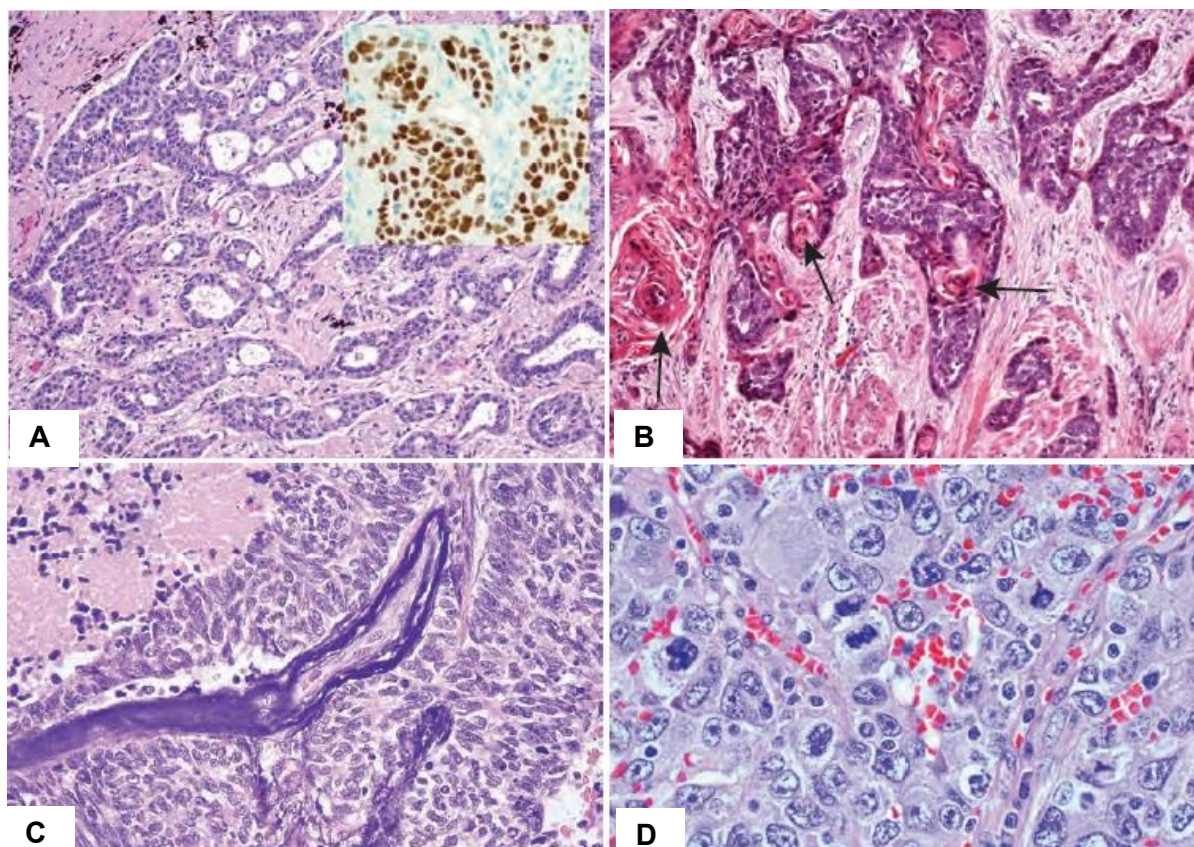


Figura 1. Variantes histológicas de carcinoma de pulmão. A, Adenocarcinoma; magnificação mostra fator de transcrição tireóideo detectado por imunohistoquímica. B, Carcinoma de células escamosas

bem diferenciado mostrando queratinização (seta). C, Carcinoma de células pequenas. Existem ilhas de pequenas células profundamente basofílicas e áreas de necrosis. D, Carcinoma de células grandes. As células tumorais são pleomórficas e não mostram evidências de diferenciação escamosa ou glandular (KUMAR et al., 2014).

O adenocarcinoma é um tipo de câncer com diferenciação glandular, podendo apresentar produção de mucina em 80% das células tumorais. Observa-se, por esse motivo, de maneira focal ou difusa estruturas acinares ou papilares nos tecidos adenocarcinomatosos. Existem vários padrões de crescimento apresentados pelos adenocarcinomas, os quais podem ser puros ou mistos, a saber: padrão acinar, papilar, bronquioloalveolar e sólido. As lesões iniciadoras do processo oncogênico tendem a ser menores e estarem localizadas na periferia pulmonar. O adenocarcinoma está algumas vezes associado a áreas de cicatrização e tende a metastatizar mais rápido que os outros tipos de câncer de pulmão de células não pequenas. É provável que o adenocarcinoma pulmonar surja de uma hiperplasia adenomatosa (Figura 2) que progride para o carcinoma bronquioloalveolar o qual mais tarde se transforma em adenocarcinoma invasivo. O tumor apresenta padrão de crescimento lepidico, sem destruição da arquitetura alveolar (WARTH et al., 2013).

Ultra estruturalmente os carcinomas bronquioloalveolares são formados por um grupo heterogêneo de células: células brônquicas secretoras de mucina, células da Clara ou, ainda, Pneumócitos do tipo II. Podem se apresentar na forma de nódulo solitário ou como múltiplos nódulos, ou até mesmo todo um lobo estar consolidado pelo tumor, se assemelhando a uma pneumonia lobar. Essas lesões apresentam uma maior probabilidade de serem curadas por meio de cirurgia. O adenocarcinoma bronquioloalveolar, ao contrário dos outros tipos de câncer de pulmão metastatizante, tendem a matar por sufocamento, em virtude de seu padrão de disseminação (KUMAR et al., 2014; HAMMERSCHMIDT; WIRTZ, 2009).

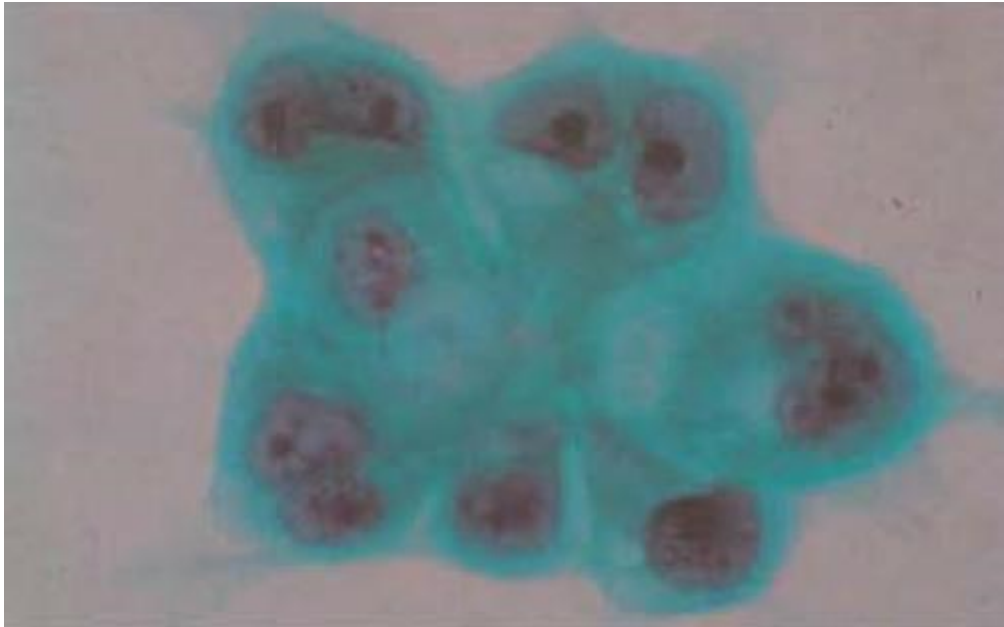


Figura 2. Células de um adenocarcinoma em um esfregaço de escarro (GOLDMAN et al., 2011).

O carcinoma de pequenas células apresenta extrema malignidade e tipo histológico bem definido com células epiteliais pequenas com formato arredondado, oval ou fusiforme, possuindo citoplasma escasso, bordos mal definidos, cromatina nuclear em padrão de sal e pimenta e nucléolos ausentes ou inconspícuos. Seu tamanho tende a ser menor que o de linfócitos em repouso. O crescimento celular é acentuado, ocorrendo de forma desordenada, sem definição tecidual, sendo bastante frequente e extensa a presença de necrose. A microscopia eletrônica revela grânulos neurosecretores semelhantes aos encontrados nas células argentafins neuroendócrinas do epitélio brônquico do feto e neonato (KUMAR et al., 2014; TARANTINO, 2002).

Os carcinomas de pequenas células apresentam relação estreita com o tabagismo e ocorrem tanto na porção central como na periferia do pulmão. São os tumores mais agressivos, não apresentam fase pré-carcinogênese, metastatizam amplamente e raramente são curados por meios cirúrgicos. Os genes supressores de tumor *p53* e *RB* frequentemente estão mutados, e em 90% dos tumores ocorre intensa expressão do gene antiapoptótico *Bcl-2*, enquanto o gene pró-apoptótico *Bax* é hipoexpresso (JACKMAN; JOHNSON, 2005).

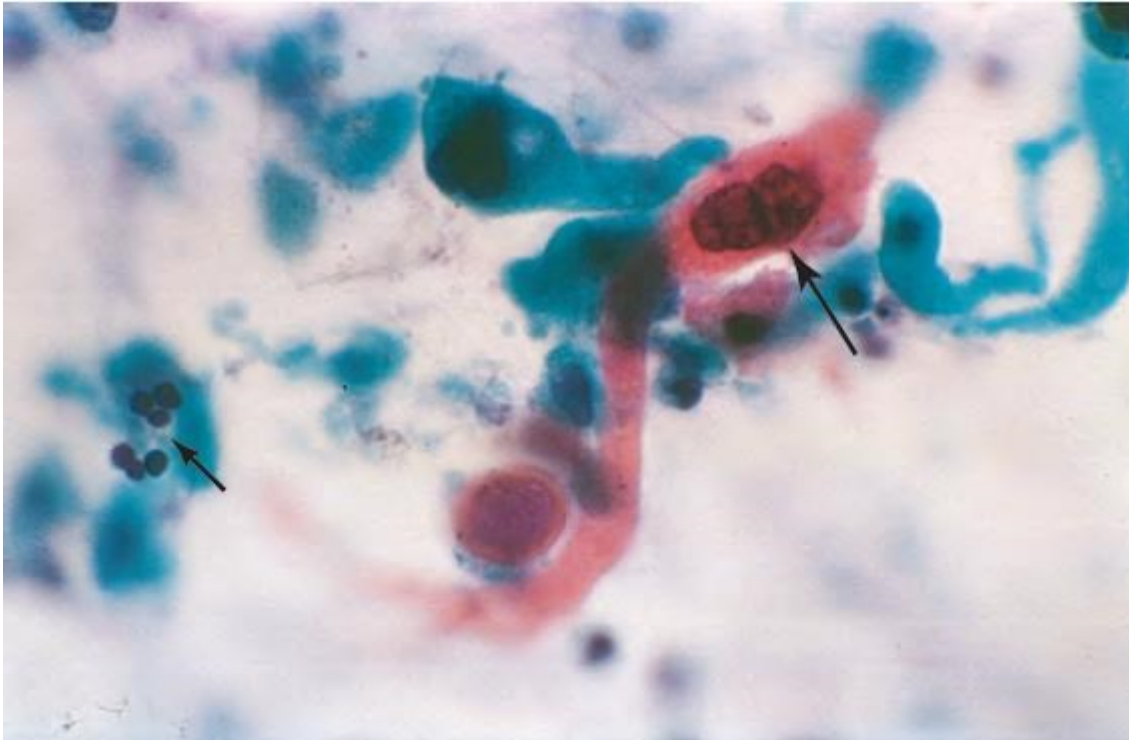


Figura 3. Diagnóstico citológico de câncer de pulmão. Uma amostra de escarro mostra uma coloração alaranjada, carcinoma de células escamosas queratinizado com núcleo hiper cromático proeminente (seta maior). Note o tamanho das células tumorais comparado com neutrófilos normais (seta menor) (KUMAR et al., 2014).

O carcinoma de grandes células é um tipo de tumor epitelial altamente indiferenciado, que não apresenta semelhança histológica com nenhum dos outros tipos de câncer de pulmão. Apresenta células com grandes núcleos e quantidade moderada de citoplasma. Provavelmente os carcinomas de grandes células tenham origem em carcinomas prévios de células escamosas e adenocarcinoma que se tornaram tão indiferenciados, que não podem ser mais reconhecidos, pois ultra estruturalmente, diferenciações escamosas ou glandulares podem ser encontradas. Entre as variações histológicas, está a variante de carcinoma neuroendócrino de células grandes, com organização em ninhos organoides, trabeculares, tipo-roseta e paliçada. O carcinoma compartilha esta semelhança de variação com as alterações moleculares do carcinoma de pequenas células (PETERSEN, 2011; KUMAR et al, 2014).

Fisiopatologia

O câncer de pulmão é o resultado de um processo que inclui hiperplasia de células pulmonares, displasia, e carcinoma in situ. As alterações genéticas promovidas pelo cigarro promovem a perda do controle do crescimento celular.

Ocorre ativação de genes “janus” como o p53, que apresentam atividade normal na célula até o momento em que carcinógenos como os do cigarro levam a mutações que lhe conferem funções carcinogênicas. O agente agressor celular leva a perda de função de alguns genes responsáveis por impedirem os processos oncogênicos e promoverem o controle da proliferação celular. O fator de crescimento epidérmico humano, localizado no cromossomo 17, presente também em carcinomas invasivos de mama; está frequentemente ativado nos cânceres de células não pequenas predizendo uma sobrevida bastante curta quando sua expressão se mostra aumentada em adenocarcinomas. O *Bcl-2*, que codifica uma família de proteínas antiapoptóticas está frequentemente ativado nos cânceres de pulmão, especialmente no câncer de pulmão de pequenas células. O gene p53 codifica uma proteína celular que controla a divisão celular, funcionando como um verificador de qualidade, capaz de interromper a divisão celular quando o DNA apresenta danos. Porém quando mutado, na maioria das vezes em consequência do tabagismo, a verificação não é mais realizada resultando na perpetuação de mutações gênicas através das células filhas (KROEMER et al., 1995).

O *p53* encontra-se mutado em 50% dos cânceres de pulmão de células não pequenas e em torno de 80% dos cânceres de pulmão de pequenas células. Ocorre estimulação parácrina e por vezes autócrina de fatores de crescimento, que contribuem para a proliferação celular de células cancerosas como o peptídeo liberador de gastrina (GRP), envolvido em muitos casos de câncer de pulmão de pequenas células; o fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) e o fator de crescimento de hepatócito. O receptor do fator de crescimento epidérmico, uma tirosina-quinase, é por vezes superexpresso pelo oncogene *c-erbB-1*. Esta situação é bastante comum no câncer de pulmão de células não pequenas, e leva um aumento considerável na proliferação de células neoplásicas (MOLINA et al., 2008; KROEMER et al., 1995).

Manifestações Clínicas

O câncer de pulmão é silencioso, não provoca dor, até o momento em que órgãos vizinhos são acometidos por contiguidade ou por metástase. Isso se deve principalmente ao fato de que o pulmão não contém receptores para dor (HAMMERSCHMIDT; WIRTZ, 2009).

O diagnóstico geralmente é acidental, ocorrendo quando o paciente vai ao serviço de saúde por outras razões. Os sinais e os sintomas comuns do câncer de pulmão, ainda que não específicos para esse tipo de câncer, são a anorexia, a perda de peso, a fadiga, a anemia e a febre. Os pacientes, no entanto, apresentam sinais e sintomas que podem estar relacionados diretamente ao fenômeno de crescimento tumoral. Esses sinais e sintomas podem ser locais, como invasão e obstrução brônquica, podem estar relacionados à disseminação contígua regional do tumor, outros estão relacionados a metástases distantes, existindo também os sinais e sintomas atribuíveis a síndromes paraneoplásicas (TARANTINO, 2002).

O sintoma mais comum causado por crescimento tumoral localizado é a tosse que está presente na maioria dos casos, embora já seja comum em fumantes e pacientes com DPOC. Pode ocorrer, ainda, hemoptise, dispnéia e sibilos quando ocorre ulceração ou obstrução da luz brônquica, o que pode levar à pneumonia pós-obstrutiva com lesões cavitárias, ocasionando a formação de abscessos pulmonares. Em casos em que a caixa torácica é acometida, os pacientes experimentam, como sintoma preditivo, dor torácica grave. Pode acontecer disfagia, por compressão do esôfago, rouquidão, pela compressão do nervo laríngeo recorrente; e hemiparesia ou hemiparalisia de um membro superior, causada pela compressão do plexo braquial. Quando os tumores estão localizados no ápice pulmonar, pode ocorrer síndrome de Horner pela compressão de nervos simpáticos, que levam à miose pupilar, à ptose palpebral, e à anidrose em um lado da face. Pode haver também derrame pleural, derrame pericárdico, insuficiência cardíaca, arritmia e disseminação linfática pelos pulmões, causando dispneia e hipóxia (HAMMERSCHMIDT; WIRTZ, 2009).

Nos casos de disseminação extratorácica do tumor, a metástase óssea é observada em 30% a 40% dos pacientes, especialmente em vértebras, costelas e ossos da pelve, nos quais a dor é um sintoma preponderante. É possível ocorrer também metástases hepáticas produzindo sintomas como fadiga e perda de peso, metástase adrenais, podendo haver dor; metástase cerebral causando náuseas, vômito, dores de cabeça, convulsões, confusão e alteração de personalidade, além de sinais e de sintomas específicos relacionados à área afetada pela doença metastática (RIIHIMAKI et al., 2014).

Dentre as síndromes paraneoplásicas mais comuns, estão as síndromes endócrinas que produzem secreção inapropriada do hormônio antidiurético, hormônio adrenocorticotrófico, da gonadotrofina coriônica humana, da prolactina, gastrina, hormônio do crescimento, o fator de crescimento semelhante a insulina e a calcitonina. Embora sejam raras, as síndromes paraneoplásicas neurológicas podem acontecer no câncer de pulmão, especialmente no câncer de pulmão de pequenas células, e incluem a encefalopatia límbica, a degeneração cerebelar, a neuropatia sensorial subaguda, a neuropatia autonômica e a neurite óptica. Existem, ainda, as síndromes esqueléticas, que incluem baqueteamento digital e osteopatia pulmonar hipertrófica, e as síndromes hematológicas, com hipercoagulação, tromboflebite migratória e endocardite trombótica (KANAJI et al., 2014).

Diagnóstico e Estadiamento

No momento do diagnóstico, a anamnese é o primeiro passo na busca das causas dos sintomas, e fatores como o hábito tabágico, a idade do paciente, a exposição a carcinógenos ambientais, histórico familiar de câncer e histórico de doença infecciosa pulmonar devem ser levados em consideração. O diagnóstico preciso do câncer de pulmão é feito com exame citológico de amostras de tecidos, que podem ser obtidos via biópsia, escarro, lavado brônquico, escovação brônquica, lavado broncoalveolar e aspirado brônquico e alveolar por meio de agulha. O exame citopatológico (Figuras 2 e 3) permite identificar o tipo histológico do câncer, o que irá influenciar a terapia a ser utilizada. Entretanto, os exames por imagem são normalmente a primeira linha de contato com a alteração brônquica, não sendo eficazes para diagnosticar de forma diferencial o carcinoma pulmonar, muito embora a tomografia por emissão de pósitrons (PET) consiga proporcionar a formulação da hipótese de carcinoma pulmonar de maneira satisfatória. A análise citológica apresenta sensibilidade de 80% para lesões centrais e quando utilizadas três ou mais amostras esta sensibilidade atinge quase 90%. Já a biópsia aspirativa com agulha fina consegue geralmente uma correlação de detecção de 85% dos cânceres de pulmão (MOLINA et al., 2008).

Com a identificação da neoplasia, procede-se o estadiamento TNM (Figura 4), mundialmente aceito para o câncer de pulmão de células não pequenas, no qual T é o tamanho do tumor, N o envolvimento dos linfonodos regionais e M a presença de

metástases distantes. No caso do câncer de pulmão de pequenas células, o estadiamento apresenta apenas duas categorias: doença limitada ou doença extensa, sendo essa última geralmente associada a estados metastáticos (IELCAP et al., 2006; SIMÕES et al., 2008).

A radiografia torácica possui pouco valor na definição do estágio do câncer de pulmão, não sendo segura para detecção de linfadenopatia hilar ou mediastinal. A tomografia computadorizada é útil para identificar linfonodos metastáticos do hilo do mediastino, fígado e glândulas adrenais, porém não possui capacidade de diferenciação, mostrando apenas o alargamento linfonodal. Embora seja preditivo de metástase, o alargamento linfonodal não é fator absoluto pois linfonodos de tamanho normal têm 8% a 15% de probabilidade de ter doença metastática. A PET se mostra mais sensível que a tomografia comum com especificidade e valor preditivo negativo de 96%, se constituindo em exame de imagem de escolha no estadiamento e acompanhamento do câncer de pulmão (JACKMAN, JOHNSON; 2005).

Tratamento

O tratamento do câncer de pulmão é baseado no tipo histológico e no estágio em que a neoplasia pulmonar se encontra (Figura 4). As terapias mais utilizadas são a cirúrgica, a quimioterapia e a radioterapia (JÚNIOR, 2012).

Nos estágios I e II do câncer de pulmão de células não pequenas, a cirurgia é o tratamento de escolha. É necessário, entretanto, exame físico e avaliação imagiológica e citológica adequadas para garantir a ressecção do tumor. Testes de função pulmonar volume expiratório forçado em 1 segundo (VEF1), de capacidade de difusão pulmonar do monóxido de carbono (DLCO) e análise gasométrica sanguínea mostrarão qual tipo de cirurgia é a mais eficaz (pneumectomia, lobectomia, ressecção em cunha ou segmentectomia). Baixos valores de VEF1 e DLCO predizem mortalidade acentuada. Ainda outros fatores, como a existência de comorbidades, devem ser avaliados antes do processo cirúrgico (SIMÕES et al., 2008).

A quimioterapia tem indicação nessa fase de modo complementar e se baseia na administração de cisplatina 120 mg/m² a cada quatro semanas com etoposídeo, 100 mg/m², vinorelbina, 30 mg/m² semanalmente, vinblastina, 4 mg/m²

semanalmente ou vindesina, 3 mg/m² semanalmente. A administração de quimioterapia adjuvante se mostrou pouco efetiva na sobrevida dos pacientes. O tratamento com anticorpos monoclonais não foi consistentemente benéfico. A radioterapia não tem indicação nos estágios I e II, e quando os pacientes não podem realizar ressecção cirúrgica, a radioterapia pode ser utilizada visando a cura da doença. Nesse caso, a sobrevida desses pacientes para cinco anos varia entre 10 e 20% (FRANÇA et al., 2011; JÚNIOR, 2012).

No estágio III, quando ainda há possibilidade de ressecção e cura, o tratamento cirúrgico não apresenta tanta eficácia quanto a obtida nos estágios I e II, pois o risco de metástase escusa é alto. Nesses casos, uma terapia combinada (quimioterapia e radioterapia) é utilizada antes e após o tratamento cirúrgico (JÚNIOR, 2012).

Nos estágios IIIA e IIIB, a doença pode atingir um patamar no qual a cura não é mais possível. A radioterapia torácica pode ser utilizada para alívio dos sintomas torácicos sem influência positiva significativa na sobrevida para 5 anos. Quando a doença se encontra nesse estágio, utiliza-se uma terapia combinada (radioterapia e quimioterapia) que aumenta a sobrevida em 5 anos para 7% a 19%. Não obstante, a terapia combinada aumenta em 5 vezes os efeitos colaterais, do quais o mais proeminente é a esofagite. Novas formas de tratamento com terapias de alvo molecular e enzimático, ou que utilizam liberação seletiva e gradual de quimioterápicos em alvos específicos, têm sido bastante estudadas, com propósito de reduzir a toxicidade do tratamento ao câncer. Tratamento envolvendo inibidores da tirosinase-quinase EGF tem mostrado resultados promissores em relação à quimioterapia tradicional, embora de maneira discreta. O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos contabiliza que estejam sendo conduzidos atualmente mais de 460 ensaios clínicos, na busca de novas substâncias para tratamento do câncer de pulmão de células não pequenas (JÚNIOR, 2012; MOREIRA; ENG, 2014; NIC, 2016; ROSELL; KARACHALIOU, 2015).

ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO				
Estádio	Tumor	Linfonodo	Metástase	Descrição Geral
CÂNCER PULMONAR DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS*				
LOCALIZADO				
IA	T1	N0	M0	Tumor T1: < 3 cm, circundado por pulmão ou pleura; nenhum tumor mais próximo que o brônquio lobar
IB	T2	N0	M0	Tumor T2: > 3 cm, envolvendo o brônquio principal \geq 2 cm distal da carina, invadindo a pleura; a atelectasia ou pneumonite se estende para o hilo, mas não para o pulmão inteiro
IIA	T1	N1	M0	N1: envolvimento dos linfonodos peribronquiais ipsilaterais ou hilares e dos linfonodos intrapulmonares por extensão direta
LOCALMENTE AVANÇADO				
IIB	T2	N1	M0	Tumor T3: invasão da parede torácica, diafragma, pleura mediastinal, pericárdio e do brônquio principal, distalmente a carina < 2 cm; atelectasia ou pneumonite de todo o pulmão
	T3	N0	M0	
IIIA	T1	N2	M0	N2: envolvimento dos linfonodos mediastinais ipsilaterais ou subcarinais
	T2	N2	M0	
	T3	N1	M0	
IIIB	T3	N2	M0	N3: envolvimento dos linfonodos (pulmonares) contralaterais ou dos linfonodos supraclaviculares
	Qualquer T	N3	M0	
AVANÇADO				
IIIB	T4	Qualquer N	M0	Tumor T4: invasão do mediastino, coração, grandes vasos, traqueia, esôfago, corpo vertebral e carina; nódulos tumorais separados; derrame pleural maligno
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	Metástases distantes
CÂNCER PULMONAR DE CÉLULAS PEQUENAS †				
Doença limitada				Evidência de tumor confinada ao hemitórax ipsilateral; um único portal de radiação pode abrangê-lo
Doença extensa				Todas as outras doenças, inclusive doenças metastáticas

Figura 4. Estadiamento do câncer de Pulmão segundo a escala TNM. (GOLDMAN et al., 2011)

No estágio IV, a doença encontra-se disseminada e o tratamento é paliativo. Os quimioterápicos utilizados nessa fase são a cisplatina ou carboplatina, combinada com paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, vinorelbina, irinotecano ou topotecano. A sobrevivência para dois anos varia de 10% a 15%. A duração da quimioterapia nessa fase é de quatro a seis ciclos, sendo que a radioterapia apresenta benefícios para os pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas metastático na redução de sintomas, como a dor óssea (MOLINA et al., 2008; JÚNIOR, 2012).

No caso do câncer de pulmão de pequenas células, a quimioterapia é o tratamento de escolha, devido à boa responsividade e à característica de alta disseminação desse tipo de câncer. Em 40% dos casos de câncer de pulmão de pequenas células, a doença encontra-se no estágio limitado e a quimioterapia e radioterapia são os procedimentos de escolha. A cirurgia no câncer de pulmão de pequenas células é apenas indicada em 5% dos casos, quando existem nódulos isolados, o que não é característico da maior parte dos cânceres de pulmão de pequenas células. Para a grande maioria dos pacientes a terapia combinada é

efetiva, sendo utilizada no Brasil e nos Estados Unidos, a associação de etoposídeo e cisplatina com a radioterapia. Esse tratamento produz uma taxa de sobrevivência de 26% para 5 anos (JACKMAN; JOHNSON, 2005; JÚNIOR, 2012)

No estágio extenso do câncer de pulmão de pequenas células, a quimioterapia é o tratamento mais indicado, sendo a associação entre o etoposídeo e cisplatina ou carboplatina a mais utilizada. O uso de radioterapia craniana paliativa é recomendado neste estágio pelas Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de pulmão no Brasil. Nesse estágio, nenhuma terapia reúne evidência de aumento da sobrevida, nem mesmo as terapias de alvo molecular (JÚNIOR, 2012)

SERICINA

Sericicultura

Estima-se que a sericicultura tenha se iniciado na China entre os anos 2.850 e 2.650 a.C. A China foi o primeiro país produtor e exportador mundial da seda, delineando a famosa rota da seda. Durante muito tempo, uma pena capital era aplicada para quem retirasse bichos-da-seda da China, porém, entre os anos 200-300 a.C, aproveitando-se do tumulto político que circundava o País, ovos do inseto foram contrabandeados para a Coréia, Índia e Ásia Central; e a China perdeu seu monopólio. Entre os anos 300-400 d.C houve uma nova expansão no mercado da seda, tendo como principal produtor o Japão. Tempos depois, o cultivo da seda foi ampliado para a Europa. No Brasil, o cultivo da seda se iniciou no século XIX, durante o reinado de D. Pedro I, com a instauração da “Companhia Seropédica Fluminense”. No Paraná, a sericicultura teve início em 1932, na cidade de Cambará, onde, em 1946, surgiu a primeira fábrica paranaense (FEDERICO, 1997; PADUA, 2005)

Atualmente, os principais países produtores de casulos de seda são a China, a Índia, o Uzbequistão, o Brasil, a Tailândia, a República Islâmica do Irã e o Vietnã. No mundo, são produzidos anualmente cerca de 563 mil toneladas de casulos secos, sendo que China e Índia, em 2014, somaram mais de 90% da produção mundial. (CIRIO, 2014).

O Brasil produziu, no ano de 2012, cerca de 3,2 mil toneladas de casulos, dos quais o estado Paraná é o principal produtor, respondendo por cerca de 90% da produção nacional. No ano de 2011, o Paraná contribuiu com 85% das exportações

brasileiras de fios e de subprodutos de seda. Entre os anos de 2013 e 2014, a sericicultura esteve presente em 181 municípios paranaenses, somando 1.900 sericultores (CIRIO, 2014; FREDERICO, 1997).

A sericicultura é uma atividade agroindustrial que se utiliza da mão de obra de pequenos produtores rurais, representando uma importante fonte de renda para as famílias, auxiliando na diminuição do êxodo rural e das desigualdades sociais. Além das características socioeconômicas, a atividade apresenta um aspecto ambiental positivo, devido ao baixo impacto no uso de agrotóxicos que invariavelmente levam à morte do inseto (BRANCALHÃO, 2002; PANUCCI-FILHO; CHIAU; PACHECO, 2011)

O produto final da sericultura, a seda, é uma fibra natural obtida dos casulos produzidos pelas lagartas do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (*Lepidoptera bombycidae*). O casulo protege o inseto das intempéries e de outros microrganismos, de forma a possibilitar sua metamorfose em mariposa (FREDERICO, 1997).

Esse casulo é constituído principalmente pelas proteínas sericina e fibroína. A sericina constitui cerca de 25-30% da proteína da seda e envolve a fibroína com sucessivas camadas adesivas, que ajudam na formação dos casulos (Zhang, 2002). Na produção de seda bruta, a sericina deve ser removida dos casulos, pelo processo de degomagem, no qual se utiliza de água quente (60°C), a fim de dissolver esta proteína e liberar os fios (fibroína) para a posterior fiação (OLIVEIRA, 1996).

Esse processamento gera a cada ano no mundo cerca de 50 toneladas de resíduos que são constituídos principalmente por sericina. Esses resíduos são comumente descartados no meio ambiente sem o tratamento adequado (WU, 2006; ZHANG, 2002).

Sericina

A sericina é uma proteína globular, de estrutura enovelada, amorfa e randômica, com ocorrência de folha do tipo beta na sua menor extensão. É constituída por 17 aminoácidos dos quais os principais são a serina (31%), a glicina (19,1%), o ácido aspártico (17,8%) e a treonina (8,0%). Possui ponto isoelétrico de cerca de 3,9 e pode ser considerada, de acordo com suas características, como

uma espécie de cola hidrofílica, por causa de sua propriedade de aderir firmemente os fios de fibroína (CHEN F. et al., 2012; KATO et al., 1998; KODAMA, 1926; PADAMWAR et al., 2005; ZHANG et al., 2004).

O peso molecular da sericina possui uma grande variação, de 10 a mais de 400 kDa; entretanto, a estrutura e o peso molecular da sericina variam de acordo com o método de extração e purificação. Peptídeos de sericina de alto peso molecular (PM) ou grande sericina apresentam um PM de 191 a 400 kDa, já os de baixo PM ou pequena sericina de 61 a 132 kDa. A grande sericina tem sido investigada para utilização em materiais médicos, biomateriais degradáveis, polímeros compostos, biomembranas funcionais, hidrogéis, fibras funcionais e tecidos; enquanto a pequena sericina tem sido utilizada em cosméticos, incluindo produtos para cuidados da pele e dos cabelos, pois possui atividade antibacteriana, é resistente à radiação ultravioleta e absorve e libera a umidade facilmente. Ainda, a sericina foi capaz de produzir aumento nos níveis de hidroxiprolina e hidratação das células epidérmicas, além de diminuição da perda de água transepidérmica (KAEWKORN et al., 2012; PADAMWAR et al., 2004; ZHANG, 2002).

Vários são os estudos utilizando as proteínas da seda, destacando sua aplicabilidade na área da saúde. Shin et al. (2010) verificaram um aumento na concentração de testosterona plasmática, em ratos após administração de uma solução contendo aminoácidos extraídos da seda. Entre esses aminoácidos, os de maior expressão foram a alanina (34.36%), glicina (27.23%), serina (9.58%), valina (3.49%) e treonina (2.00%). Somado ao aumento de testosterona, verificou-se aumento na contagem de espermatozoides e aumento na resistência muscular, possibilitada por um efeito antioxidante provocado pela solução de aminoácidos da seda.

Kato et al. (1998) demonstraram a primeira evidência do potencial antioxidante da sericina verificando a ação de inibição da atividade da tirosinase (polifenol oxidase), uma enzima cuproférica envolvida na síntese de melanina em diversos sítios corporais, gerando escurecimento. Esse potencial é de grande importância, especialmente na indústria de alimentos e de cosméticos, na qual o uso da sericina tem sido estudado como uma valiosa matéria prima.

Entre as diversas ações da sericina, a que lhe torna bastante atrativa é seu efeito cosmético de hidratação profunda da pele e antirrugas. Esse efeito

provavelmente se deve ao alto conteúdo do aminoácido serina da molécula. Outra propriedade da sericina, bastante explorada pelo meio cosmético, é o seu potencial em se ligar a outras proteínas, tais como a queratina, presente na pele e nos cabelos. A sericina, uma vez ligada à proteína queratina, passa a formar um biofilme aquoso que proporciona proteção, hidratação e aparência de vitalidade aos cabelos, funcionando como um escudo interligado as proteínas queratina, numa alusão à sua ligação com a fibroína (KATO et al., 1998; KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE INC, 2003).

Aramwit et al. (2007) estudaram os efeitos da sericina na cicatrização e diminuição do tamanho de feridas em ratos. O creme à base de sericina não exerceu citotoxicidade e diminuiu as reações inflamatórias da pele, além de acelerar a cicatrização das feridas.

A capacidade anti-inflamatória da sericina está associada à inibição da atividade macrofagocitária, da secreção da interleucina 10 (IL-10), do fator de necrose tumoral (TNF- α), e do interferon gama (IFN- γ), o que evidencia seu papel anti-inflamatório, sua capacidade de biocompatibilidade e proteção contra agressões endógenas (CHLAPANIDAS et al., 2013; PANILAITIS et al., 2003).

Além de sua capacidade de inibir os processos inflamatórios, a atividade antioxidante da sericina ocorre especialmente por meio de um mecanismo de ligação ao grupamento cúprico de enzimas oxirredutoras, como aquela responsável pela peroxidação e oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Quando se liga ao cobre, por intermédio do grupamento hidroxil da serina e carboxil do ácido aspártico, a sericina impede a oxidação e o estresse causados à célula pelos processos oxirredutores. A sericina também elimina espécies reativas de oxigênio (ROS) e possui atividade antitirosinásica e antielastásica (CHLAPANIDAS et al., 2013; ZHAORIGETU et al., 2007). No seu mecanismo de redução do estresse oxidativo, a sericina provoca diminuição da atividade e dos níveis intracelulares das enzimas catalase, lactato desidrogenase e malondialdeído (KATO et al., 1998). Dessa maneira, a proteína é indicada por Dash et al. (2008a) como molécula de escolha na prevenção do estresse oxidativo, podendo ser utilizada em terapia combinada com outros antioxidantes não enzimáticos como o ácido ascórbico, o tocoferol, ácido úrico e o betacaroteno.

Em um estudo envolvendo a aplicação de um potente agente indutor de estresse oxidativo no cólon intestinal de ratos foram encontradas evidências de que a administração oral da sericina exerceu efeito protetor antioxidante e preveniu a formação de criptas aberrantes. Uma das vantagens da utilização da sericina no cólon intestinal é a sua resistência a proteases, o que leva à sua permanência no trato digestório, prolongando a ação protetora e antioxidante (KATO et al., 1998).

Essas ações foram também comprovadas no fígado de ratos. À época, Li et al. (2008) verificaram que o álcool, um dos principais causadores de doença hepática, teve sua metabolização hepática e excreção aumentadas pela sericina. Assim, com a proteção da sericina, as células hepáticas controlaram as alterações celulares induzidas pelo álcool, eliminando espécies reativas de oxigênio e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes, o que reduz os danos mitocondriais e nucleares e protege a membrana do hepatócito contra a peroxidação lipídica. Esse resultado, segundo os autores, atribui à sericina a alcunha de agente hepatoprotetor, sendo seu uso potencialmente recomendado em situações de prevenção da lesão hepática.

Os efeitos da sericina vão além dos potenciais já pontuados e podem ser observados na diabetes, tanto na doença como nas complicações advindas dela. Chen et al. (2013) relatam que, após a administração de sericina a ratos diabéticos por dano hipocampal, houve redução da glicose plasmática, diminuição da secreção do hormônio do crescimento (GH), aumento significativo do número de receptores hipocampais para o GH, aumento do nível circulante do fator de crescimento derivado da insulina (IGF-1) e diminuição da apoptose de neurônios hipocampais.

Uma complicação comum da diabetes é a queratopatia, que atinge cerca de 50% dos diabéticos. Essa condição de lesão corneana foi induzida em ratos por Nagai et al. (2009) num modelo experimental de diabetes tipo II, que receberam aplicação ocular de sericina. Nesse caso, a sericina foi capaz de promover a cicatrização e a diminuição da área cicatricial, o que torna a sericina um potencial agente protetor da córnea de paciente diabéticos.

Song et al. (2013) exploraram uma outra complicação muito frequente do diabetes, a neuropatia diabética. Os autores trataram um modelo experimental de ratos diabéticos com sericina e observaram efeito neuroprotetor do nervo isquiático, diminuição da expressão do neuropeptídeo inibidor Y, aumento da liberação de

neurotransmissores, vasodilatação, redução da isquemia tecidual e aumento na velocidade da recuperação neurofisiológica. Os autores afirmam, portanto, que a sericina é um agente neuroprotetor contra danos provocados pelo diabetes mellitus tipo II.

Além da diabetes, outra condição de saúde altamente incidente é a obesidade, na qual a sericina também demonstrou efeitos positivos. Seo et al. (2011) sugerem que a alimentação com proteínas da seda, especialmente a sericina, é eficaz em promover diminuição da massa gorda, redução do ganho de peso, regulação da produção de adipocinas e inibição da lipogênese adipocitária e hepática. Chen Z et al. (2012) mostraram ainda que a sericina diminui a resistência insulínica e o nível de triglicerídeos, fosfolípidios, colesterol e ácidos graxos livres.

Onsa-Ard et al. (2013) estudaram o efeito da sericina na hipertensão arterial. Oligopeptídeos de sericina de 5 kDa promoveram vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa da parede arterial, levando à redução da pressão arterial. O possível mecanismo desse efeito é a ação antagonista e bloqueadora da sericina nos canais de cálcio e a interação agonista com o óxido nítrico e a prostaciclina, o que em ambos os casos resulta em relaxamento da musculatura lisa da artéria.

Os efeitos da sericina também foram estudados nos processos de carcinogênese e pré-carcinogênese, utilizando cânceres já estabelecidos e reconhecidos agentes causadores de câncer. Um desses estudos foi o de Zhaorigetu et al. (2003), que irradiaram luz ultravioleta (UVB) sobre a pele de ratos sem pelo e realizaram tratamento com sericina. A sericina protegeu a epiderme contra lesões por radiação, promoveu redução da ciclo-oxigenase 2 (COX-2), que nos casos de lesões por radiação é o principal vetor celular de estresse oxidativo, reduziu a proliferação celular e a atividade tumoral. Os autores do estudo concluíram que a sericina pode ser utilizada como agente protetor contra danos físicos provocados pelos raios solares UVB.

Num estudo *in vitro* realizado por Dash et al. (2008b), com irradiação de luz UVB e suplementação com sericina de linhagem imortalizada de queratinócitos humanos, foi observado que a sericina reduziu a apoptose, diminuiu a expressão da caspase – 3 e da proteína pró-apoptótica Bax, aumentou a expressão das proteínas antiapoptóticas BCL-2 e reduziu a ativação da enzima poli-ADP-ribose polimerase (PARP) que está envolvida diretamente nos processos de clivagem do DNA do

processo apoptótico. Houve, ainda, diminuição da concentração intracelular das ROS e redução da concentração intracelular de peróxido de hidrogênio, que é um importante causador de disfunção da membrana mitocondrial e desencadeador de apoptose. Com isso, os autores afirmam que a sericina é um potente agente antiapoptótico e antioxidante.

A ação da sericina em células do cólon intestinal foi descrita por Kaewkorn et al. (2012), utilizando células cancerosas de cólon intestinal humano (SW480), células normais do cólon intestinal humano (FHC) e sericinas de dois pesos moleculares. A sericina, especialmente a de baixo peso molecular, foi capaz de provocar aumento da ativação da caspase-3, diminuição da expressão da proteína antiapoptóticas BCL-2, diminuição do ciclo celular e aumento da apoptose em linhagens SW480. Estes efeitos não foram observados em linhagem FHC. O tratamento com sericina não mostrou indícios de citotoxicidade em nenhuma das linhagens celulares (KAEWKORN et al., 2012).

A enzima L- asparaginase (L-ASNase) é utilizada no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA). Zhang et al. (2004) testaram a inserção da sericina no tratamento da LLA como um agente estabilizador da enzima L-ASNase. A sericina foi capaz de proporcionar resistência contra alterações de temperatura e proteção contra enzimas catalíticas, o que aumentou a estabilidade e o tempo de ação da L-ASNase. Essa terapia combinada de sericina e L-ASNase, aumenta a eficácia no tratamento da LLA com a L-ASNase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDINGTON, S. et al. Cannabis use and risk of lung cancer: a case–control study. **European Respiratory Journal**, v. 31, n. 2, p. 280-286, 2008.

ARAMWIT, P.; SANGCAKUL, A. The effects of sericin cream on wound healing in rats. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 71, n. 10, p. 2473-2477, 2007.

ARAMWIT, P.; PALAPINYO, S.; SCHRIANA, T.; CHOTTANAPUND, S.; MUANGNAM, P. Silk sericin ameliorates wound healing and its clinical efficacy in burn wounds. **Archives of dermatological research**, v. 305, n. 7, p. 585-594, 2013.

BALDER, H. F.; GOLDBOHN, R. A.; VAN DEN BRANDT, P. A. Dietary patterns associated with male lung cancer risk in the Netherlands Cohort Study. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 2, p. 483-490, 2005.

BERARDESCA, E.; ARDIGO, M.; CAMELI, N.; MARIANO, M.; AGOZZINO, M.; MATTS, P. Randomized, double-blinded, vehicle-controlled, split-face study to evaluate the effects of topical application of a Gold Silk Sericin/Niacinamide/Signaline complex on biophysical parameters related to skin ageing. **International journal of cosmetic science**, 2015.

BRANCALHÃO, R. M. C; SOUZA, V. B. B; SOARES, M. A. M. Infecção causada por *Nucleopolyhedrovirus* nas células gordurosas de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 57-63, abr/jun, 2002.

BRAY, F.; JEMAL, A.; GREY, N.; FERLAY, J.; FORMAN, D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. **The lancet oncology**, v. 13, n. 8, p. 790-801, 2012.

BRENNER, D. et al. Inflammation and immune response pathway analysis of lung cancer using hierarchical modeling based on GWAS data. **Cancer Research**, v. 70, n. 8 Supplement, p. 938-938, 2010.

CAO, T.T.; ZHANG, Y. Q. Viability and proliferation of L929, tumor and hybridoma cells in the culture media containing sericin protein as a supplement or serum

substitute. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 17, p. 7219-7228, 2015.

CHEN, F.; PORTER, D.; VOLLRATH, F. Silk cocoon (*Bombyx mori*): Multi-layer structure and mechanical properties. **Acta biomaterialia**, v. 8, n. 7, p. 2620-2627, 2012.

CHEN, Z.; HE, Y.; SONG, C.; DONG, Z.; SU, Z.; XUE, J. Sericin can reduce hippocampal neuronal apoptosis by activating the Akt signal transduction pathway in a rat model of diabetes mellitus. **Neural regeneration research**, v. 7, n. 3, p. 197-201, 2012.

CHEN, Z.; YANG, S.; HE, Y.; SONG, C.; LIU, Y. Effect of sericin on diabetic hippocampal growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis. **Neural regeneration research**, v. 8, n. 19, p. 1756-1764, 2013.

CHLAPANIDAS, T. et al. Sericins exhibit ROS-scavenging, anti-tyrosinase, anti-elastase, and in vitro immunomodulatory activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 58, p. 47-56, 2013.

CIRIO, G. M. Sericicultura, 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/yurHJ9>>. Acesso em: 11 set. 2015.

CONSONNI, D. et al. Lung cancer and occupation in a population-based case-control study. **American journal of epidemiology**, p. kwp391, 2010.

DASH, R.; ACHARYA, C.; BINDU, P. C.; KUNDU, S. C. Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. **BMB Reports**, v. 41, n. 3, p. 236-241, 2008a.

DASH, R.; MANDAL, M.; GHOSH, S. K.; KUNDU, S. C. Silk sericin protein of tropical tasar silkworm inhibits UVB-induced apoptosis in human skin keratinocytes. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 311, n. 1-2, p. 111-119, 2008b.

DE STEFANI, E. et al. Dietary patterns and risk of cancer: a factor analysis in Uruguay. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 6, p. 1391-1397, 2009.

FEDERICO, G. **An Economic History of the Silk Industry, 1830-1930**. United Kingdom: Cambridge University Press, 1997. p. 1-7.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015.

FRANÇA, L. B., OLIVEIRA, M. A., SMALL, I. Á., ZUKIN, M., DE LIMA ARAÚJO, L. H. Tratamento adjuvante em câncer de pulmão de células não-pequenas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, n. 3, p. 354-359, 2011.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil-Tratado de Medicina Interna**. 23. ed. Brasil: Elsevier Brasil, 2011. p. 1675-1685.

HAMMERSCHMIDT, S.; WIRTZ, H. Lung cancer: current diagnosis and treatment. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 106, n. 49, p. 809-18, 2009.

HUNG, R. J. et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 633-637, 2008.

IELCAPI. INTERNATIONAL EARLY LUNG CANCER ACTION PROGRAM INVESTIGATORS et al. Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. **New England Journal of Medicine**, v. 2006, n. 355, p. 1763-1771, 2006.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://goo.gl/0dJfKk>>. Acesso em: 27 jul. 2016.

JACKMAN, D. M.; JOHNSON, B. E. Small-cell lung cancer. **The Lancet**, v. 366, n. 9494, p. 1385-1396, 2005.

JÚNIOR, H. M. M. Oncologia, Diretrizes Diagnósticas e terapêuticas em Carcinoma de pulmão. *In* BRASIL. Portaria nº 600. **Ministério da Saúde**. 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2012/prt0600_26_06_2012.html>. Acesso em: 24 ago. 2015.

KAEWKORN, W.; LIMPEANCHOB, N.; TIYABOONCHAI, W.; PONGCHAROEN, S.; SUTHEERAWATTANANONDA, M. Effects of silk sericin on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells. **Biological research**, v. 45, n. 1, p. 45-50, 2012.

KANAJI, N et al. Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 3, p. 197, 2014.

KATO, N.; SATO, S.; YAMANAKA, A.; YAMADA, H.; FUWA, N.; NOMURA, M. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 145-147, 1998.

KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE INC. TYRRELL, D.J.; DI LUCCIO, R.C.; YAHIAOUI A.; EVERHART, D.S.; MAY, W.B. **Delivery of a skin health benefit agent to a treated substrate for transfer to skin**. USPTO N° 6503524, 16 jun. 2000, 7 jan. 2003.

KODAMA, K. The Preparation and physico-chemical properties of sericin. **Biochemical Journal**, v.20, p.1208-1222, 1926.

KROEMER, G.; PETIT, P.; ZAMZAMI, N.; VAYSSIÈRE, J.L.; MIGNOTTE, B. The biochemistry of programmed cell death. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, n. 13, p. 1277-1287, 1995.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J.C. **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease**. 9. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2014.

LEE, Y. A.; HUNG, R.; BOFFETTA, P.; BRENNAN, P.; YANG, P.; ZHANG, Z. F. A Pooled Analysis on the Associations between Involuntary Smoking and Lung Cancer Risk by Histological Types. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 3, p. 892-893, 2010.

LI, Y. G.; JI, D. F.; CHEN, S.; HU, G. Y. Protective effects of sericin protein on alcohol-mediated liver damage in mice. **Alcohol and alcoholism**, v. 43, n. 3, p. 246-253, 2008.

MATAKIDOU, A.; EISEN, T.; HOULSTON, R. S. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 7, p. 825-833, 2005.

MOLINA, J. R.; YANG, P.; CASSIVI, S. D.; SCHILD, S. E.; ADJEI, A. A. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2008. p. 584-594.

MONDAL, M.; TRIVEDI, K.; KUMAR, S. N. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn, a review. **Caspian Journal of Environmental Science**, v. 5, n. 2, p. 63-76, 2007.

MOREIRA, A. L.; ENG, J. Personalized therapy for lung cancer. **CHEST Journal**, v. 146, n. 6, p. 1649-1657, 2014.

NAGAI, N.; MURAO, T.; ITO, Y.; OKAMOTO, N.; SASAKI, M. Enhancing effects of sericin on corneal wound healing in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats as a model of human type 2 diabetes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 9, p. 1594-1599, 2009.

NCI - National Cancer institute. Clinical Trials Search Results. **National Institute of Health**, 2016. Disponível em: <<http://goo.gl/TlvAOG>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

OLIVEIRA, M. H. Seda, um tecido nobre. **BNDES**, 1996. Disponível em: <<http://goo.gl/5B1nHJ>>. Acesso em: 13 set. 2015.

ONSA-ARD, A.; SHIMBHU, D.; TOCHARUS, J.; SUTHEERAWATTANANONDA, M.; PANTAN, R.; TOCHARUS, C. Hypotensive and vasorelaxant effects of sericin-derived oligopeptides in rats. **ISRN pharmacology**, v. 2013, 2013.

PADAMWAR, M. N.; PAWAR, A. P. Silk sericin and its applications: A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 63, n. 4, p. 323-329, 2004.

PÁDUA, O. S. A origem da Sericicultura. **SEAB**, 2005. Disponível em: <<http://goo.gl/aeU4uz>>. Acesso em: 13 set. 2015.

PANILAITIS, B.; ALTMAN, G. H.; CHEN, J.; JIN, H. J.; KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. L. Macrophage responses to silk. **Biomaterials**, v. 24, n. 18, p. 3079-3085, 2003.

PANUCCI-FILHO, L.; CHIAU, A. V.; PACHECO, V. Custo da sericicultura: A produção de casulos de Bicho-da-Seda no Paraná. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v. 4, n. 1, p. 37-55, 2011.

PETERSEN, I. The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 108, n. 31-32, p. 525-531, 2011.

PORTER, R. S.; KAPLAN, J.L. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Nineteenth Edition. **Merck Sharp & Dohme Corp.** Whitehouse Station, New Jersey, 2011.

RIDGE, C. A.; MCERLEAN, A. M.; GINSBERG, M. S. Epidemiology of lung cancer. In: Seminars in interventional radiology. **Thieme Medical Publishers**, p. 093-098, 2013.

RIIHIMÄKI, M. et al. Metastatic sites and survival in lung cancer. **Lung Cancer**, v. 86, n. 1, p. 78-84, 2014.

ROSELL, R.; KARACHALIOU, N. Lung cancer in 2014: Optimizing lung cancer treatment approaches. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 2, p. 75-76, 2015.

SASAKI, M., YAMADA, H., KATO, N. Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1505-1511, 2000.

SEO, C. W.; UM, I. C.; RICO, C. W.; KANG, M. Y. Antihyperlipidemic and body fat-lowering effects of silk proteins with different fibroin/sericin compositions in mice fed with high fat diet. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 8, p. 4192-4197, 2011.

SHIN, S. et al. Silk amino acids improve physical stamina and male reproductive function of mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 273-278, 2010.

SIMÕES, J.C.; GAMA, R. R.; WINHESKI, M. R. **Câncer: estadiamento & tratamento**. São Paulo: Lemar, 2008.

SONG, C.; YANG, Z.; ZHONG, M.; CHEN, Z. Sericin protects against diabetes-induced injuries in sciatic nerve and related nerve cells. **Neural Regeneration Research**, v. 8, n. 6, p. 506, 2013.

TARANTINO, A. B. **Doenças pulmonares**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

WARTH, A.; STENZINGER, A.; WEICHERT, W. Neue morphologische und molekulare Aspekte des Lungenkarzinoms. **Der Pathologe**, v. 34, n. 5, p. 419-428, 2013.

ZHANG, Y. Q. et al. Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3751-3759, 2004.

ZHANG, Y.Q. Applications of natural silk sericin in natural biomaterials. **Biotechnology Advances**, v.20, p.91-100, 2002.

ZHAORIGETU, S.; SASAKI, M.; KATO, N. Consumption of sericin suppresses colon oxidative stress and aberrant crypt foci in 1, 2-dimethylhydrazine-treated rats by colon undigested sericin. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 53, n. 3, p. 297-300, 2007.

ZHAORIGETU, S.; SASAKI, M.; WATANABE, H.; KATO, N. Supplemental silk protein, sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1, 2-dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 10, p. 2181-2186, 2001.

ZHAORIGETU, S.; YANAKA, N.; SASAKI, M.; WATANABE, H.; KATO, N. Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 71, n. 1, p. 11-17, 2003.

ARTIGO CIENTÍFICO

**AVALIAÇÃO DE EFEITOS BIOLÓGICOS DA SERICINA EM
LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE PULMÃO HUMANO**

Submetido ao Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial
(normas Anexo B)

<http://www.jbpml.org.br/>

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=1676-2444&lng=en&nrm=iso

Artigo Original

Código de Fluxo: 2137 (Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial)

Avaliação de Efeitos Biológicos da Sericina em Linhagem Celular de Câncer De Pulmão Humano

Evaluation of Biological Effects of Sericin on Human Lung Cancer Cell Line

Autores

José Henrique Fermino Ferreira dos Santos: Universidade Estadual do Oeste do Paraná -

Ricardo Alexandre de Azevedo: Universidade de São Paulo -

Eduardo Alexandre Loth: Universidade Estadual do Oeste do Paraná -

Ana Tereza Bittencourt Guimarães: Universidade Estadual do Oeste do Paraná -

Rose Meire Costa Brancalhão: Universidade Estadual do Oeste do Paraná -

Descritores (Palavras-chave)

Keywords

Neoplasias Pulmonares; Sericinas; Sobrevivência Celular; Movimento Celular; Apoptose

Carcinoma, Non-Small-Cell Lung; Sericins; Cell Survival; Cell Movement; Apoptosis

Resumo

Abstract

Introdução: O câncer de pulmão apresenta alta letalidade e o fumo se constitui como importante fator de risco. O tumor de células

Introduction: Lung cancer presents high lethality and smoking constitutes an important risk factor. Non-small cell tumor is the most

não pequenas é o tipo de carcinoma pulmonar mais comum e o tratamento envolve cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Entretanto, a ausência de sinais e de sintomas nos estágios iniciais da doença faz com que a taxa de sobrevivência seja baixa. Nesse sentido, a busca de novas substâncias químicas com características de seletividade, de efetividade e de baixa toxicidade têm sido pesquisadas no tratamento do câncer. Estudos mostram que a sericina, proteína extraída dos casulos do bicho-da-seda, apresenta atividade antitumoral, anticarcinogênica e pró-apoptótica. Objetivo: Analisar o potencial efeito antitumoral da sericina em linhagem celular de câncer de pulmão de células não pequenas. Materiais e Métodos: Os estudos foram conduzidos em cultura, na qual foram avaliados a viabilidade celular por meio do ensaio pelo vermelho neutro, de citotoxicidade com o MTT; potencial apoptótico, com ensaios com anexina-5 e Alexa Fluor® e Iodeto de Propídio; e na migração celular, com o ensaio Wound Healing. Resultados: Baixas doses de sericina foram capazes de aumentar a viabilidade lisossomal, de reduzir a viabilidade mitocondrial, de aumentar a apoptose e a migração celular, enquanto altas doses de sericina reduziram exponencialmente a migração celular e não alteraram a taxa de apoptose/necrose das células cancerosas. Conclusão: A sericina é um biomaterial que provoca efeitos biológicos na linhagem celular testada, e pode ser utilizada para aumentar a viabilidade lisossomal, reduzir a função mitocondrial, aumentar a apoptose em baixas doses e inibir a migração celular em doses altas.

common type of lung carcinoma and the treatment involves surgery, chemotherapy, and radiation therapy. However, the absence of signs and symptoms in the early stages of the disease makes the survival rate low. In this sense, the search for new chemical substances with characteristics of selectivity, effectiveness and low toxicity have been investigated in the treatment of cancer. Studies show that sericin, a protein extracted from silkworm cocoons, has antitumor, anticarcinogenic and pro-apoptotic activity. Objective: To analyze the potential antitumor effect of sericin on non-small cell lung cancer cell line. Materials and Methods: The studies were conducted in culture, where the cell viability was evaluated through the neutral red assay, cytotoxicity with MTT; apoptotic potential, with annexin-5 and Alexa Fluor® and Propidium Iodide assays; and cell migration with the Wound Healing assay. Results: Low doses of sericin were able to increase lysosomal viability, reduce mitochondrial viability, increase apoptosis and cell migration, while high doses of sericin exponentially reduced cell migration and did not alter the rate of apoptosis / necrosis of cancer cells. Conclusion: Sericin is a biomaterial that causes biological effects on the cell line tested, and can be used to increase lysosomal viability, reduce mitochondrial function, increase apoptosis at low doses and inhibit high-dose cell migration.

Trabalho submetido em 24/09/2017 17:28:21

Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Correspondência: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional
Rua Universitária, 2069
Universitário
85819-110 - Cascavel, PR - Brasil

Suporte Financeiro: Bolsas de Mestrado e fomento financeiro concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Carta ao editor:

Ilmo. Sr. Editor Chefe

Estamos encaminhando nosso trabalho intitulado "Avaliação de Efeitos Biológicos da Sericina em Linhagem Celular de Câncer De Pulmão Humano" para análise e publicação nesta revista.

Os autores declaram que:

a) O presente trabalho é original e não foi publicado ou encaminhado para publicação em nenhum outro periódico ou revista científica, independentemente do idioma;

b) Observaram as normas para publicação disponíveis em

<http://www.jbpml.org.br/instrucoes-aos-autores>

c) Aceitam ceder o direito de reprodução para o Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, do trabalho cujo título está acima descrito (ou o título que posteriormente chegar a ser adotado, para atender às sugestões dos revisores e editores);

d) Todos os autores tiveram contribuição substancial neste trabalho, no que se refere à concepção do projeto de pesquisa, análise e interpretação dos dados, redação e revisão crítica,

certificando que participaram suficientemente do trabalho para tornar pública sua responsabilidade pelo conteúdo.

Atenciosamente,

INTRODUÇÃO

Segundo dados da Agência Internacional de Pesquisa no Câncer (IARC), o câncer de pulmão é o terceiro tipo mais prevalente de câncer. A expectativa para os próximos cinco anos é que a doença mate cerca de 19 milhões de pessoas. O

Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima 28 mil casos no ano de 2017, com uma razão de mortalidade de aproximadamente 90% ^(1,2).

A faixa etária de maior incidência de câncer de pulmão é acima de 55 anos e é a que apresenta também o maior número de mortes ⁽¹⁾. Esse fato se associa ao padrão de exposição crônica, ao longo da vida, aos carcinógenos ambientais e ocupacionais ⁽³⁾. Além disso, fatores hereditários, como mutações no cromossomo 15q25, afetam a interação com a nicotina e aumentam a possibilidade de desenvolvimento do câncer ⁽⁴⁾. O hábito tabágico é o principal causador de câncer de pulmão e corresponde a cerca de 85% dos casos ⁽⁵⁾.

Além disso, foi encontrada associação entre a ativação da transcriptase telomerase reversa (TERT) durante processos inflamatórios e a ocorrência do câncer de pulmão, indicando uma influência pró-oncogênica deste fator endógeno ⁽⁶⁾.

Dos cânceres de pulmão existentes, o de células não pequenas é o mais prevalente, 86% dos casos, e menos responsável aos tratamentos cirúrgico, quimioterápico e radioterápico ⁽⁷⁾. O principal esquema quimioterápico utiliza derivados de platina (cisplatina e carboplatina), conjugados com o etoposídeo, sendo frequentemente associado com a radioterapia ⁽⁸⁾. É importante ressaltar que a radioterapia parece encurtar a sobrevida dos pacientes ⁽⁹⁾.

Pesquisas científicas no tratamento do câncer estão voltadas ao desenvolvimento de terapias com foco nos receptores e enzimas iniciadores ou perpetuadores do processo neoplásico, visando restaurar vias metabólicas inibidas, como a apoptose, ou inibir a atividade de enzimas pró-oncogênicas, como a tirosinase. As pesquisas abrangem também terapias com ação no DNA e RNA ^(10,11).

Nesse contexto, a proteína sericina, extraída do casulo do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), apresenta algumas características biológicas de interesse, como: atividade antitirosinásica; antitumoral e pró-apoptótica. Além disso, apresenta baixa citotoxicidade em células normais, capacidade de regulação da intensidade da inflamação e efeito protetor na célula contra a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo ⁽¹²⁻¹⁶⁾.

OBJETIVO

Analisar o potencial efeito antitumoral da sericina em linhagem celular de câncer de pulmão de células não pequenas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido nos Laboratórios de Biologia Estrutural e Funcional e no Laboratório de Patologia Molecular, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

Cultivo Celular

Foi utilizada linhagem celular A549 de adenocarcinoma humano gentilmente doadas

pelo Dr. Ricardo Alexandre de Azevedo, da Alchemy, Inovação Pesquisa e Desenvolvimento. A linhagem celular foi cultivada em meio RPMI 1640, suplementado com 1% de estreptomicina e penicilina, e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) em frascos de cultura, incubados a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Cada vez que a cultura atingiu 80% de confluência, as células foram repicadas até que se obteve um volume celular suficiente para cada experimento.

Extração da Sericina

O peptídeo sericina foi extraído de casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), obtidos da empresa sericícola BRATAC Silk do Brasil, com o protocolo de extração proposto por Gimenes et al. (2014). A concentração da proteína medida pelo método de Bradford ⁽¹⁸⁾ mostrou uma concentração de 1395 µg/mL.

Doses de Sericina

Foram utilizadas as doses de 13.95, 34.88, 69.75, 104.625, 139.5, 697.5 e 1395 10⁻¹ ng/µL, para o ensaio MTT, Vermelho Neutro e de Migração Celular. No ensaio de Apoptose e de Necrose, foram utilizadas as doses de sericina de 13.95, 69.75, 139.5 e 1395 10⁻¹ ng/µL.

Teste de Viabilidade Celular por Exclusão do Azul de Tripán

O teste de viabilidade celular foi utilizado para quantificar o número de células viáveis das amostras utilizadas nos experimentos. Os dados resultantes foram expressos em percentual de células viáveis, que foram, para todos os ensaios, maiores que ≥ 90% ⁽¹⁹⁾.

Ensaio MTT

O ensaio MTT foi realizado em triplicata, conforme proposto por Mosmann ⁽²⁰⁾. A viabilidade celular após exposição as diferentes concentrações de sericina foi aferida após 24 e 48 horas, por absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nM.

Ensaio de Viabilidade Celular com Vermelho Neutro

O ensaio de Viabilidade Celular com Vermelho Neutro foi realizado em triplicata, conforme proposto por Repetto *et al.* ⁽²¹⁾. A viabilidade celular após exposição as diferentes concentrações de sericina foi aferida após 24 e 48 horas, por absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nM.

Ensaio de Apoptose e Necrose com Alexa® Fluor 488 Annexin V e Iodeto de Propídio

O ensaio de Apoptose e Necrose com Alexa® Fluor 488 Annexin V e Iodeto de Propídio foi realizado em triplicata, conforme protocolo proposto pelo fabricante ⁽²²⁾ com o modelo de fixação proposto por Rieger *et al.* ⁽²³⁾. O número de células em apoptose, em necrose ou em viáveis foi aferido após 24 horas, em microscópio de

fluorescência, com número total final de 300 células por grupo. Para o procedimento de contagem celular, foi utilizada a distribuição FIJI do programa ImageJ ^(24,25).

Ensaio de Migração Celular

A realização do ensaio de Migração Celular seguiu princípios dos protocolos propostos por Martinez-Mora *et al.* ⁽²⁶⁾ e Liang *et al.* ⁽²⁷⁾, com tempo total de 46 horas. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio invertido, e posteriormente mensuradas na distribuição FIJI do programa ImageJ ^(24,25).

Análise estatística

Utilizando o programa StatSoft STATISTICA 7.0, foram utilizados o teste ANOVA Fatorial, com pós teste de Tukey, teste Qui-Quadrado para Independência e Regressão múltipla polinomial. Em todos os testes o nível de significância adotado foi de $\alpha = 5\%$.

RESULTADOS

Ensaio MTT

Na figura 1, expressou-se o resultado do ensaio de MTT. No tempo de 24 horas, foi verificado que houve diminuição da viabilidade celular, exceto na concentração de $13,95 \times 10^{-1} \text{ ng}/\mu\text{L}$, na qual ocorreu um ligeiro aumento da viabilidade. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p=0,6968$) no tempo de 24 horas. Em 48 horas, houve redução estatisticamente significativa ($p= 0,009$) da viabilidade celular dos grupos tratados com sericina, sendo que na comparação com o controle, o grupo $697,5 \times 10^{-1} \text{ ng}/\mu\text{L}$ foi o único que apresentou diferença significativa ($p= 0,0203243$).

Ensaio com Vermelho Neutro (Figura 2)

No tempo de 24 horas, as doses de 69,75 e 104,625 ($\times 10^{-1} \text{ ng}/\mu\text{L}$) foram estatisticamente diferentes na comparação com o controle, indicando aumento significativo da viabilidade celular. Com 48 horas, a viabilidade celular adotou comportamento parabólico, com aumento de viabilidade nas menores doses e depois diminuição da viabilidade nas doses mais altas. As doses de 34,88; 69,75; 104,625 e 139,5 ($\times 10^{-1} \text{ ng}/\mu\text{L}$) apresentaram aumento estatisticamente significativo da viabilidade celular na comparação com o grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado da comparação dos grupos tratados com sericina com o grupo controle. Valores de p-valor significativos evidenciados em negrito.

Doses ($\times 10^{-1} \text{ ng}/\mu\text{L}$)	Tempo	p- valor
---	-------	----------

13,95	24 horas	p>0,5
13,95	48 horas	p>0,5
34,88	24 horas	p>0,5
34,88	48 horas	p<0,001
69,75	24 horas	p<0,001
69,75	48 horas	p<0,001
104,625	24 horas	p<0,001
104,625	48 horas	p<0,05
139,5	24 horas	p>0,5
139,5	48 horas	p<0,001
697,5	24 horas	p>0,5
697,5	48 horas	p>0,5
1395	24 horas	p>0,5
1395	48 horas	p>0,5

Ensaio de Apoptose e Necrose

Os resultados da contagem da marcação das células A549 viáveis, apoptóticas e necróticas foram expostas na Figura 3, figura 4 e na Tabela 2. Na Tabela 2, encontra-se a contagem final de cada tipo celular para cada dose de sericina testada, com as diferenças estatísticas indicadas por letras. O número de células viáveis foi significativamente maior na dose 1.395×10^{-1} ng/L, enquanto que nas doses de 13,95 e 69,75 ($\times 10^{-1}$ ng/ μ L) foi significativamente menor. Quanto ao número de células necróticas, o grupo 69,75 $\times 10^{-1}$ ng/ μ L apresentou número significativamente maior e o grupo 1395 $\times 10^{-1}$ ng/ μ L a um número significativamente reduzido. Os grupos 13,95 e 69,75 ($\times 10^{-1}$ ng/ μ L) tiveram o maior número de células apoptóticas, sendo o grupo 69,75 $\times 10^{-1}$ ng/ μ L estatisticamente diferente do controle, que apresentou a menor taxa de apoptose (Tabela 2).

Tabela 2. Número de tipos celulares encontrados para cada grupo experimental de acordo com tratamento utilizado (doses em $\times 10^{-1}$ ng/ μ L).

	Controle	13,95	69,75	139,5	1395
Vivas	186 ^A	149 ^B	151 ^B	180 ^A	218 ^C

Necróticas	48 ^A	49 ^B	42 ^C	27 ^C	3 ^D
Apoptóticas	66 ^A	102 ^B	107 ^C	93 ^B	79 ^B

* Letras diferentes em cada categoria (Vivas, Mortas e Apoptóticas) denotam significância na comparação intergrupo $\alpha=5\%$

Ensaio de Migração Celular

Os resultados de área foram dispostos em forma de gráfico modelado de regressão múltipla polinomial disposto na Figura 5. Nesse ensaio, em doses menores, a sericina provocou um aumento da migração celular e conseqüente diminuição da área de *scratch*; porém, esse efeito se inverteu com o aumento da concentração de sericina, quando a área de *scratch* foi maior e a migração celular, menor (figura 6), sendo 46 horas o tempo de fechamento aferido em nosso experimento. Tais resultados podem ser relacionados com os resultados encontrados nos ensaios de viabilidade no tempo de 48 horas.

DISCUSSÃO

O câncer de pulmão de células não pequenas é o que mais mata entre os tipos de câncer de pulmão. A busca de novas terapias para esse tipo de câncer, que usem vias diferentes ou complementares aos quimioterápicos comumente utilizados, tem sido verificada na literatura. Estudos descrevendo a ação de fitoterápicos no tratamento desse tipo de câncer revelaram que alguns compostos naturais possuem ações de interesse, por se mostrarem mais lesivas às células cancerosas do que às células normais.

Em um desses estudos, Wu *et al.*,⁽²⁸⁾ utilizando teobromina proveniente do chá verde e linhagem A549 de células de câncer de pulmão humano de células não pequenas, observaram diminuição da expressão de enzimas antiapoptóticas, aumento da expressão de enzimas apoptóticas, aumento da atividade da enzima p53, e gatilho gênico da apoptose induzida por caspases. O efeito aumentou em função do aumento da concentração e do tempo.

Ainda utilizando linhagens celulares A549 de câncer de pulmão humano de células não pequenas, Lin *et al.*⁽²⁹⁾ concluíram que a exposição dessa linhagem a um tipo de microalga marinha, comum na culinária oriental, aumenta a expressão de BAX e diminui a expressão de Bcl-2. Além disso, também houve aumento das formas ativas das caspases 3 e 9. Segundo os autores, o composto utilizado foi eficiente em produzir apoptose na linhagem A549 por meio da via mitocondrial.

Kaewkorn *et al.*⁽³⁰⁾, ao utilizarem sericina de baixo peso molecular (61-132 kDa), reportaram aumento da apoptose em linhagem de câncer colorretal humano, com

redução significativa da expressão de enzimas pró-apoptóticas e aumento de expressão de caspase 3 e enzimas BAX. Esse estudo evidenciou tendência de redução da mortalidade e da apoptose das células da linhagem A549 com o aumento da dose, em 24 horas, sendo que os resultados mais significativos de apoptose foram encontrados nas menores doses utilizadas.

Além do potencial apoptótico, foram reportados outros efeitos utilizando compostos naturais, como a diminuição do potencial metastático. Num estudo utilizando Cinamaldeído, foi encontrada forte ação pró-apoptótica e também redução da transformação epitelial para tecido mesenquimal, o que reduz o potencial invasivo e migratório das células cancerosas ⁽³¹⁾.

Diferentemente, estudos como o de Martinez-Mora *et al.* ⁽²⁶⁾ mostraram que a sericina tem o potencial de aumentar a migração celular *in vitro*. Utilizando linhagem de queratinócitos humanos e dose de 0,05% de sericina, equivalente à metade da menor dose usada neste estudo (13,95 10^{-1} ng/ μ L), os autores obtiveram aumento estatisticamente significativo da migração celular. Esse fato foi confirmado nos dados obtidos, nos quais pequenas quantidades de sericina produziram diminuição da área de scratch, indicando migração celular.

De maneira similar, num estudo com linhagens celulares e um modelo *in vivo* de infarto do miocárdio, a sericina foi capaz de diminuir a área cicatricial pós infarto, aumentar a neovascularização, reduzir a apoptose e a inflamação, promover a migração e transformação celular ⁽³²⁾. A quantidade de sericina utilizada nesse experimento, 2%, é equivalente à dose de 139,5 $\times 10^{-1}$ ng/ μ L utilizada neste estudo, que obteve resultados semelhantes na análise de migração celular e no número de células sob apoptose.

Aramwit *et al.*, ⁽³³⁾ utilizando sericina num sistema de microesferas de liberação prolongada, corroboraram os efeitos da sericina sobre linhagem celular fibroblástica de ratos L929, já relatadas por Cao *et al.* ⁽³⁴⁾. Os autores também investigaram o efeito da sericina sobre linhagens de hibridomas, linhagens celulares de câncer hepático, câncer de mama e linhagem A549, que apresentou, neste estudo, boa aceitação da substituição do soro fetal bovino pela sericina. As quantidades de sericina com melhor crescimento, 5 e 10% são semelhantes às doses de 697,5 $\times 10^{-1}$ ng/ μ L e 1395 $\times 10^{-1}$ ng/ μ L aqui utilizadas. Embora este estudo não tenha substituído o soro fetal pela sericina e sim acrescentado as dosagens de sericina, os resultados de viabilidade foram diferentes dos encontrados por Cao *et al.* ⁽³⁴⁾, quando comparados com o mesmo teste de viabilidade. De forma geral, a viabilidade da linhagem A549 apresentou tendência de diminuição com o uso destas dosagens de sericina nos tempos utilizados. Se considerar, entretanto, a função lisossomal, a dose de 697,5 $\times 10^{-1}$ ng/ μ L, equivalente a dosagem de 5% do estudo de Cao *et al.* ⁽³⁴⁾, representa uma exceção, já que nessa dose no estudo deste e no presente, houve aumento de viabilidade acima dos valores do grupo controle.

Uma das grandes dificuldades no tratamento é a inespecificidade da terapia, que acaba provocando efeitos colaterais. Entre as estratégias utilizadas para esse fim

estão as terapias-alvo com ligantes associados a quimioterápicos. Huang *et al.* ⁽³⁵⁾ utilizaram nanopartículas conjugadas de sericina-folato carregadas com doxorrubicina no tratamento de linhagem celular HeLa de câncer cervical humano, com alta expressão de receptores de folato. Os autores testificaram da eficácia dessa terapia e aludem que tal estratégia pode ser utilizada na terapêutica de outros tipos de câncer com a alta expressão de receptores de folato, com alta afinidade e baixos efeitos colaterais. No estudo de O'Shanessy *et al.*, ⁽³⁶⁾ 74% dos adenocarcinomas apresentavam alta expressão de receptores de folato. O estudo mostrou que grupos tratados com baixas doses de sericina tiveram aumento da viabilidade lisossomal na comparação com o grupo controle, o que corrobora o uso da sericina se utilizando de vias lisossomais. Por outro lado, a diminuição da viabilidade mitocondrial nessas baixas doses significa outra vantagem do uso da sericina. Segundo Okon e Zou, ⁽³⁷⁾ a produção de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria pode também desempenhar efeito promotor da oncogênese e produzir resistência aos quimioterápicos, especialmente quando o alvo da terapia é o EGFR, como é o caso do câncer de pulmão humano de células não pequenas.

CONCLUSÃO

A sericina tem a capacidade de influenciar nas funções citofisiológicas da linhagem de câncer de pulmão humano de células não pequenas A549. Tais resultados sugerem que a sericina não tem uma ação própria definida, agindo ora como promotora, ora como inibidora do crescimento e proliferação das células cancerosas. No entanto, a sericina mostra potencial para ser utilizada no câncer de pulmão de células não pequenas, já que seus resultados mostram que consegue influir na função de duas importantes organelas celulares, a mitocôndria e o lisossomo.

REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2014;136(5): E359-E386. PubMed PMID: 25220842
2. Ministério da Saúde. Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação-Geral de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro; 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>
3. Consonni D, De Matteis S, Lubin J et al. Lung Cancer and Occupation in a Population-based Case-Control Study. *Am J Epidemiol*. 2010; 171(3):323-333. PubMed PMID: 20047975
4. Hung R, McKay J, Gaborieau V et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*. 2008; 452(7187):633-637. PubMed PMID: 18385738

5. Porter RS, Kaplan JL. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th ed. Merck Sharp & Dohme Corp. Whitehouse Station, New Jersey, 2011.
6. Brenner D, Brennan P, Boffetta P et al. Abstract 938: Inflammation and immune response pathway analysis of lung cancer using hierarchal modeling based on GWAS data. *Cancer Res.* [Internet]. 2010;70(8 Supplement):938-938. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM10-938>.
7. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2014.
8. Júnior HMM. Oncologia, Diretrizes Diagnósticas e terapêuticas em Carcinoma de pulmão. In BRASIL. Portaria nº 600. Ministério da Saúde. 2012. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2012/prt0600_26_06_2012.html.
9. França L, Oliveira M, Small I, Zukin M, Araújo L. Tratamento adjuvante em câncer de pulmão de células não pequenas. *J bras pneumol.* [Internet]. 2011;37(3):354-359. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132011000300012>
10. Moreira A, Eng J. Personalized Therapy for Lung Cancer. *Chest.* 2014; 146(6):1649-1657. PubMed PMID: 25451351
11. Rosell R, Karachaliou N. Lung cancer in 2014: Optimizing lung cancer treatment approaches. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014; 12(2):75-76. PubMed PMID: 25533943
12. Kato N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M. Silk Protein, Sericin, Inhibits Lipid Peroxidation and Tyrosinase Activity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998; 62(1):145-147. PubMed PMID: 9501526
13. Zhaorigetu S, Sasaki M, Watanabe H, Kato N. Supplemental Silk Protein, Sericin, Suppresses Colon Tumorigenesis in 1,2-Dimethylhydrazine-Treated Mice by Reducing Oxidative Stress and Cell Proliferation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001; 65(10):2181-2186. PubMed PMID: 11758907
14. Dash R, Acharya C, Bindu P, Kundu S. Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. *BMB Rep.* 2008; 41(3):236-241. PubMed PMID: 18377728
15. Dash R, Mandal M, Ghosh S, Kundu S. Silk sericin protein of tropical tasar silkworm inhibits UVB-induced apoptosis in human skin keratinocytes. *Mol Cell Biochem.* 2008; 311(1-2):111-119. PubMed PMID: 18214642
16. Chlapanidas T, Faragò S, Lucconi G et al. Sericins exhibit ROS-scavenging, anti-tyrosinase, anti-elastase, and in vitro immunomodulatory activities. *Int J Biol Macromol.* 2013; 58:47-56. PubMed PMID: 23541552
17. Gimenes M, Silva V, Vieira M, Silva M, Scheer A. High Molecular Sericin from Bombyx mori Cocoons: Extraction and Recovering by Ultrafiltration. *Int J Chem Eng*

Appl. [Internet]. 2014;5(3):266-271. Disponível em: <http://www.ijcea.org/papers/391-G0002.pdf>

18. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976; 72(1-2):248-254. PubMed PMID: 942051

19. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* 2001. PubMed PMID: 18432654

20. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2):55-63. PubMed PMID: 6606682

21. Repetto G, del Peso A, Zurita J. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 2008; 3(7):1125-1131. PubMed PMID: 18600217

22. Johnson I, Spence MTZ. *Molecular Probes Handbook, A guide to fluorescent Probes and Labelling Technologies.* 11th ed. [Internet]. 2011. Disponível em: <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp13241.pdf>.

23. Rieger A, Nelson K, Konowalchuk J, Barreda D. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *J Vis Exp.* 2011; (50). PubMed PMID: 21540825

24. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9(7):676-682. PubMed PMID: 22743772

25. Schneider C, Rasband W, Eliceiri K. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9(7):671-675. PubMed PMID: 22930834

26. Martínez-Mora C, Mrowiec A, García-Vizcaíno E, Alcaraz A, Cenis J, Nicolás F. Fibroin and Sericin from *Bombyx mori* Silk Stimulate Cell Migration through Upregulation and Phosphorylation of c-Jun. *PLoS One.* 2012; 7(7):e42271. PubMed PMID: 22860103

27. Liang C, Park A, Guan J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007; 2(2):329-333. PubMed PMID: 17406593

28. Wu F, Zhou L, Jin W et al. Anti-Proliferative and Apoptosis-Inducing Effect of Theabrownin against Non-small Cell Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *Front Pharmacol.* 2016; 7. PubMed PMID: 27994550

29. Lin P, Tsai C, Chuang W et al. *Chlorella sorokiniana* induces mitochondrial-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells and inhibits xenograft tumor growth in vivo. *BMC Complement Altern Med.* 2017; 17(1). PubMed PMID: 28143460

30. Kaewkorn W, Limpeanchob N, Tiyaboonthai W, Pongcharoen S, Sutteerawattananonda M. Effects of silk sericin on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells. *Biol Res.* 2012; 45(1):45-50. PubMed PMID: 22688983
31. Wu C, Zhuang Y, Jiang S et al. Cinnamaldehyde induces apoptosis and reverses epithelial-mesenchymal transition through inhibition of Wnt/ β -catenin pathway in non-small cell lung cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2017; 84:58-74. PubMed PMID: 28093328
32. Song Y, Zhang C, Zhang J et al. An injectable silk sericin hydrogel promotes cardiac functional recovery after ischemic myocardial infarction. *Acta Biomater.* 2016; 41:210-223. PubMed PMID: 27262742
33. Aramwit P, Yamdech R, Ampawong S. Controlled Release of Chitosan and Sericin from the Microspheres-Embedded Wound Dressing for the Prolonged Anti-microbial and Wound Healing Efficacy. *AAPS J.* 2016; 18(3):647-658. PubMed PMID: 26935427
34. Cao T, Zhang Y. Viability and proliferation of L929, tumour and hybridoma cells in the culture media containing sericin protein as a supplement or serum substitute. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015; 99(17):7219-7228. PubMed PMID: 25895088
35. Huang L, Tao K, Liu J et al. Design and Fabrication of Multifunctional Sericin Nanoparticles for Tumor Targeting and pH-Responsive Subcellular Delivery of Cancer Chemotherapy Drugs. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016; 8(10):6577-6585. PubMed PMID: 26855027
36. O'Shannessy D, Yu G, Smale R, Fu Y, Singhal S, Thiel R et al. Folate Receptor Alpha Expression in Lung Cancer: Diagnostic and Prognostic Significance. *Oncotarget.* 2012; 3(4):414-425. PubMed PMID: 22547449
37. Okon I, Zou M. Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. *Pharmacol Res.* 2015; 100:170-174. PubMed PMID: 26276086

Imagens enviadas pelo autor.

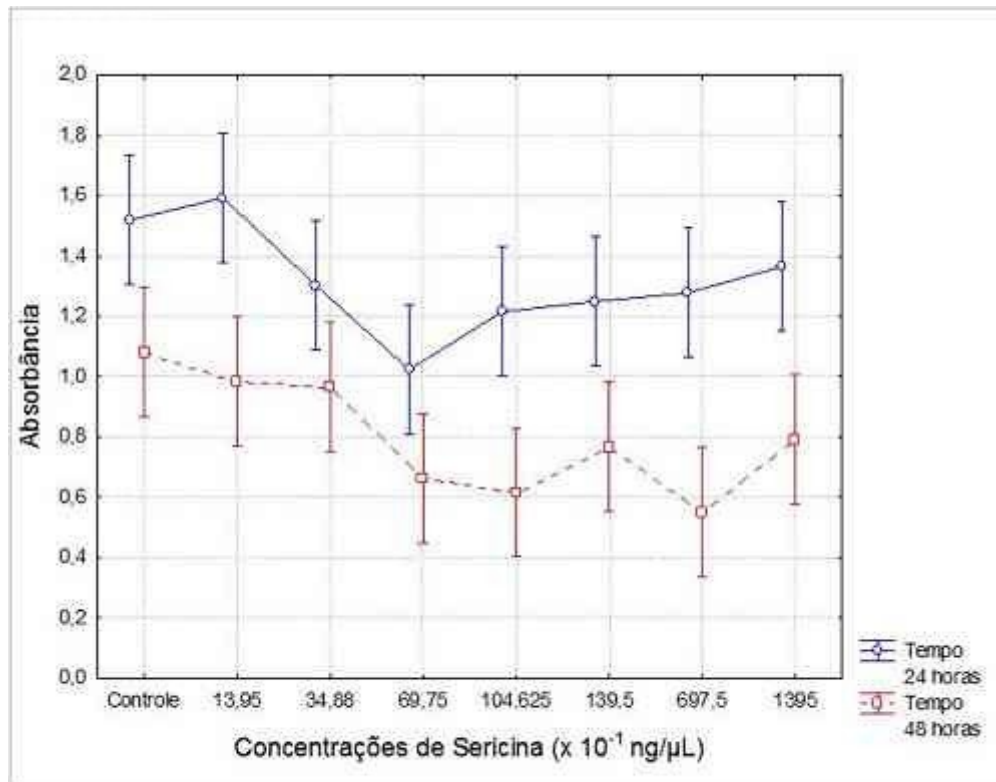


Figura 1. Resultado do ensaio de viabilidade celular através do ensaio MTT mostrando para cada tempo (24, 48 e 72 horas) a resposta de cada dose de sericina utilizada. Os resultados são mostrados por média e intervalo de confiança (95%) segundo o Teste ANOVA.

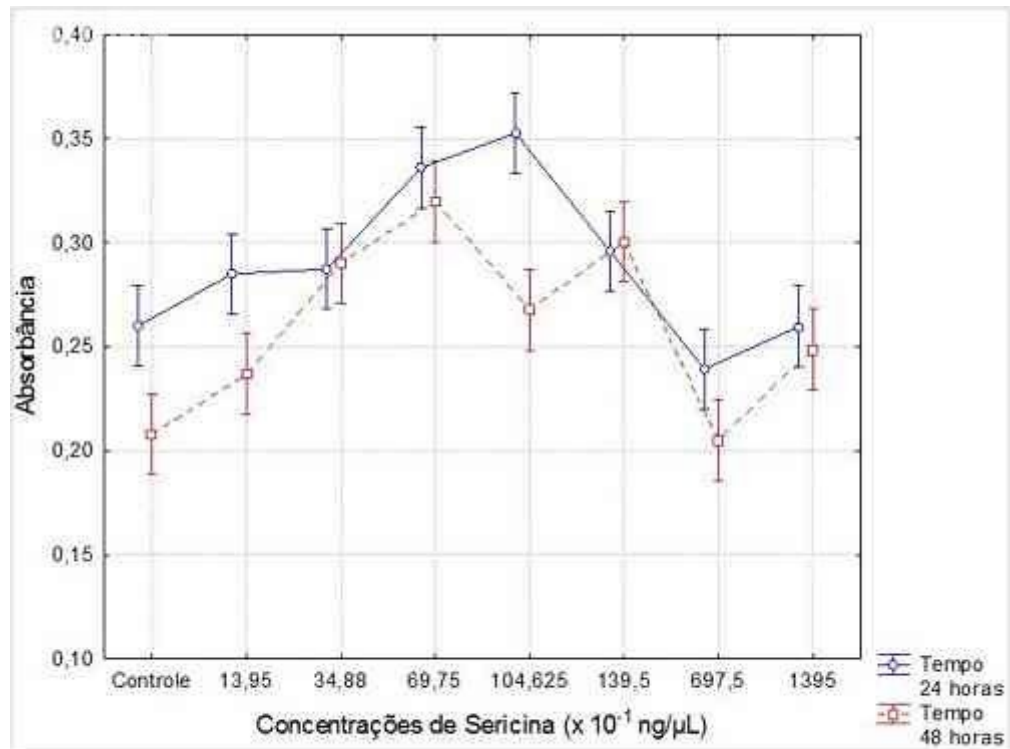


Figura 2. Resultado do ensaio de viabilidade celular com vermelho neutro mostrando em valores de absorbância, para cada tempo (24, 48 e 72 horas) a resposta de cada dose de sericina utilizada. Os resultados são mostrados por média e intervalo de confiança (95%).

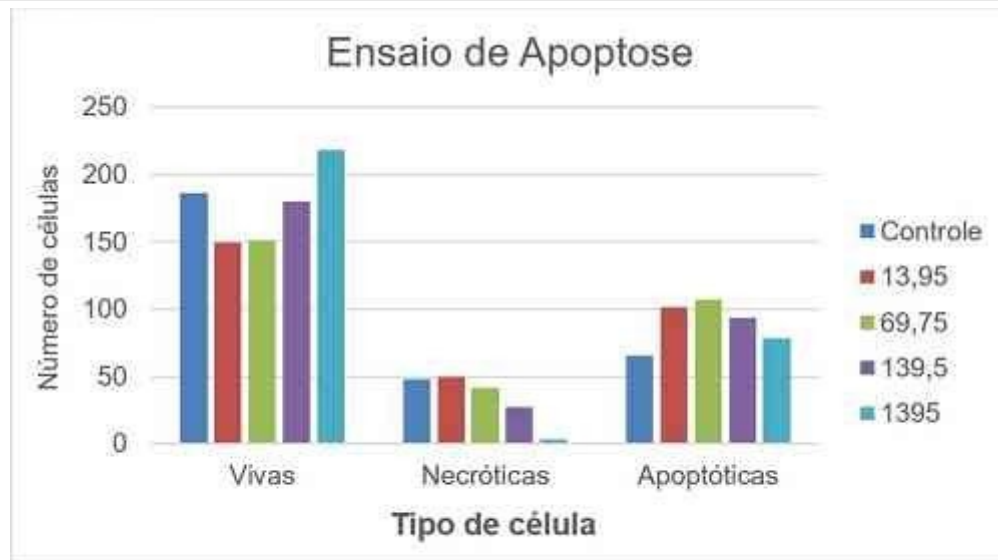


Figura 3. Número de células viáveis, necróticas e apoptóticas encontradas de acordo com a dose de sericina.

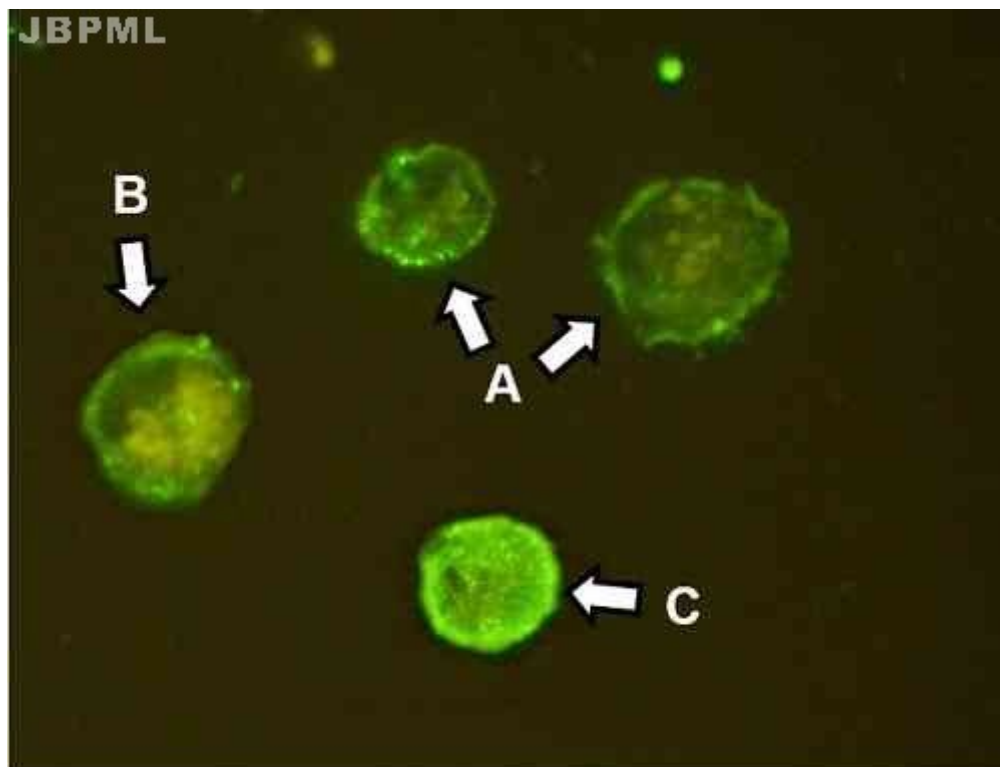


Figura 4. Fotomicrografia das células A549, viável (A), necrótica (B) e apoptótica (C), conforme ensaio de apoptose e necrose com Alexa® Fluor 488 Annexin V e Iodeto de Propídio

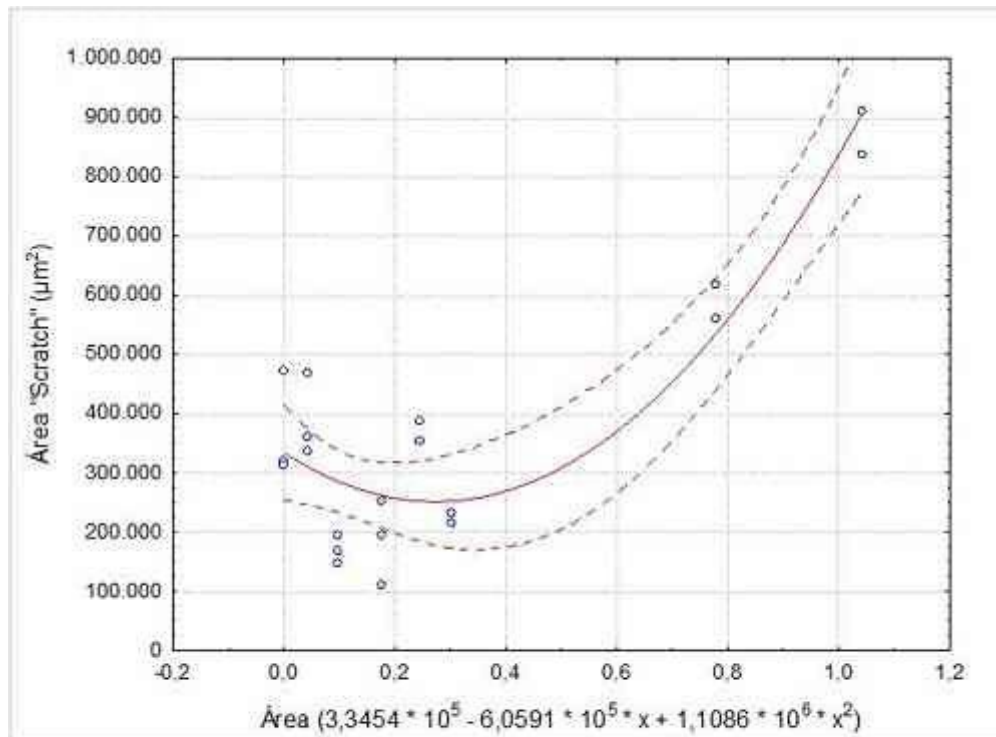


Figura 5. Resultado do ensaio de migração celular mostrando em curva de regressão múltipla polinomial os valores de área de *scratch* avaliados. Os resultados estão expressos pela área do *scratch* em µm² em função do modelo construído, expresso pela função do eixo y.

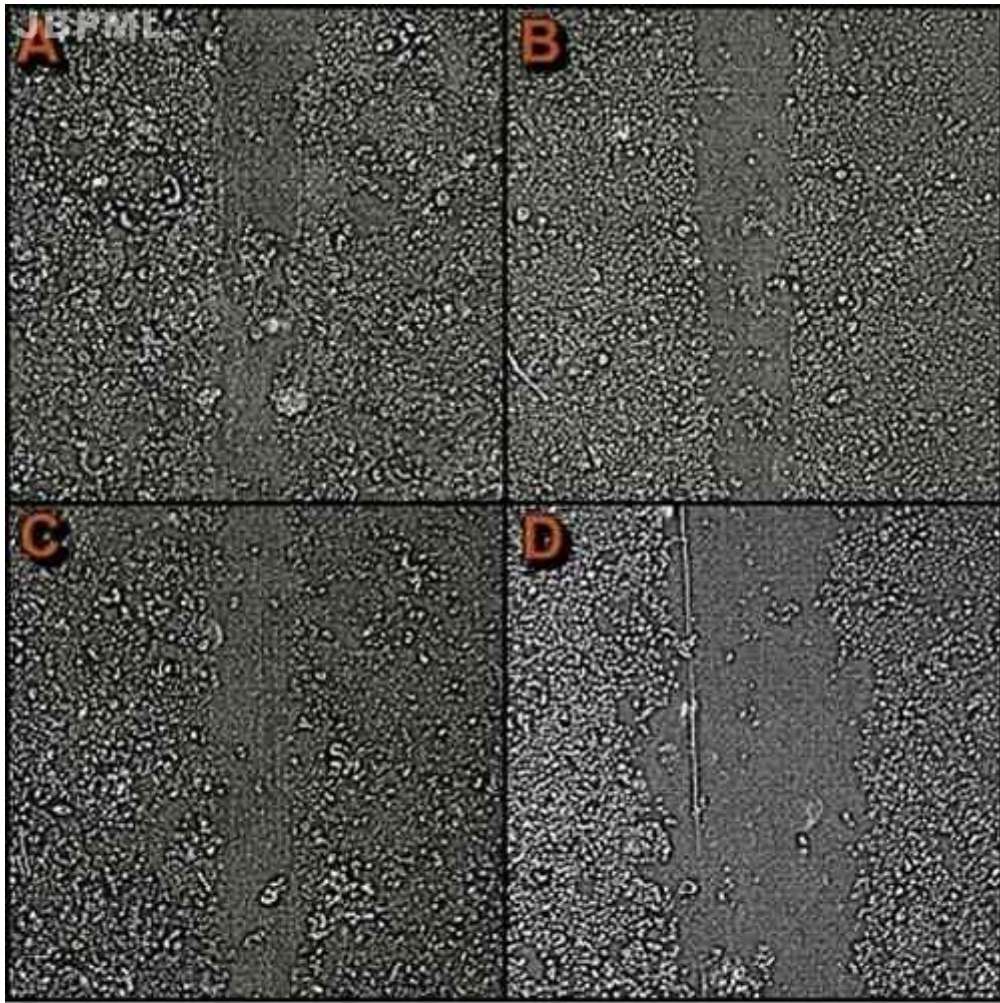


Figura 6. Fotomicrografias de células A549 durante o *Wound Scratch Assay*, ensaio de migração celular. Em A, grupo controle; B, dose de $13,95 \times 10^{-1} \text{ ng}/\mu\text{L}$; C, dose de $104,625 \times 10^{-1} \text{ ng}/\mu\text{L}$; D, dose de $1395 \times 10^{-1} \text{ ng}/\mu\text{L}$.

ANEXO B: Normas da revista científica

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML, versão impressa: 1678-2444, versão online: 1678-4774), continuação do Jornal Brasileiro de Patologia, de periodicidade bimestral (fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro), é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML), da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) e da Sociedade Brasileira de Citopatologia (SBC). É indexado no Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), no Periodica e no Chemical Abstracts e é integrante da base de dados Scientific Electronic Library Online (SciELO). Destina-se à publicação de trabalhos científicos que contribuam para o desenvolvimento da área de Medicina Laboratorial e aceita as seguintes categorias: artigos originais, de revisão, de atualização, experimentais, relatos de caso, comunicações breves e cartas aos editores. Os trabalhos podem ser submetidos nos idiomas português, inglês ou espanhol, mas o texto completo será publicado apenas em inglês, com resumo em português ou espanhol.

ANÁLISE DOS TRABALHOS

O manuscrito recebido será enviado para, pelo menos, dois avaliadores independentes, pares científicos, de renome e com conhecimento específico na área contemplada pelo artigo. Após análise pelos avaliadores, o editor-chefe do JBPML entrará em contato com o autor principal comunicando os passos a serem seguidos na aceitação do trabalho para publicação ou sua eventual rejeição.

ÉTICA

Estudos realizados com seres humanos, incluindo órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Quando pertinente, o trabalho deverá ter aprovação do comitê de ética da instituição onde foi realizada a pesquisa, em consonância com a Declaração de Helsinki, atualizada em 2008.

Nos trabalhos experimentais envolvendo animais, devem ser respeitados os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as normas estabelecidas no Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C., atualizada em 2011). As drogas e substâncias químicas eventualmente utilizadas na realização do trabalho

devem ser identificadas com precisão. Não devem ser utilizados nomes ou iniciais do paciente nem informados nomes comerciais, de empresas e/ou registros de hospitais.

RESPONSABILIDADE DA AUTORIA E CONFLITO DE INTERESSES

De acordo com as diretrizes elaboradas pelo International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), atualizada em 2013, a autoria deve ser validada para: a) concepção e projeto do trabalho ou aquisição, análise e interpretação dos dados; b) redação inicial do artigo ou revisão crítica do seu conteúdo; c) aprovação final da versão para publicação; d) responsabilidade para todos os aspectos do trabalho, garantindo que questões relacionadas à acurácia ou integridade de qualquer parte do trabalho sejam adequadamente investigadas e analisadas. Todos os autores listados no artigo devem preencher os quatro critérios de validação de autoria para serem designados como tal. Os participantes do trabalho que não preencherem os quatro critérios devem ser incluídos na seção de Agradecimentos (Acknowledgements). O autor principal deve especificar a contribuição de cada um nas diferentes etapas do estudo.

Do mesmo modo, o autor principal deve declarar ou negar a existência de possíveis conflitos de interesse. Caso exista algum conflito, ele deve ser especificado como nota no final do artigo.

RESUMOS E UNITERMOS

Independentemente do idioma no qual o trabalho foi escrito, devem constar dois resumos: um em português (Resumo) e outro em inglês (Abstract). Os resumos devem identificar os objetivos, os procedimentos e as conclusões do trabalho (máximo de 250 palavras para artigos originais, artigos de revisão e artigos de atualização; e máximo de 100 palavras para relatos de caso e comunicações breves). Caso o trabalho tenha sido escrito em espanhol, deverá haver um resumo também nesse idioma.

Os unitermos, palavras que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de três a seis, utilizando o vocabulário controlado Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da BIREME, acrescidos de outros termos, quando necessário. Devem ser apresentados em português e inglês. Caso o trabalho tenha sido escrito em espanhol, deverá haver descritores também nesse idioma.

AGRADECIMENTOS

Devem ser breves, diretos e dirigidos apenas à pessoa ou à instituição que contribuiu substancialmente para a elaboração do trabalho. Devem ser incluídos após as conclusões e antes das referências bibliográficas.

ESTRUTURA DO TEXTO

Artigos originais

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original que possam ser replicados. Os artigos podem conter até 4 mil palavras. A sua estrutura formal deve seguir o esquema de apresentação do texto para esse tipo de artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

O uso de subtítulos é recomendado, particularmente na Discussão. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser claramente apontadas. Sugere-se o detalhamento do tópico Material e Método. Para esses artigos, exige-se a apresentação de resumos estruturados em português e inglês, com cabeçalhos obedecendo à apresentação formal do artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. O Abstract (resumo em inglês) deve ser precedido pelo título em inglês. As referências bibliográficas devem aparecer no final do texto, obedecendo às normas especificadas a seguir

Comunicações breves

São relatos curtos que devem apresentar: 1) dados de estudos preliminares com achados sugestivos que garantam uma investigação mais definitiva; 2) estudos de replicação; e 3) estudos negativos de tópicos importantes. Esses artigos devem ter até 1.500 palavras, incluir resumo não estruturado e, no máximo, uma tabela ou figura, além das referências bibliográficas.

Artigos de revisão

Serão aceitos apenas mediante convite.

Avaliações críticas sistematizadas da literatura sobre determinado assunto, devem incluir conclusões e ter até 5 mil palavras. A organização do texto, com exceção de Introdução, Discussão e Conclusão, fica a critério do autor. Para esses artigos, exige-se um resumo estruturado no idioma do texto e outro em inglês. Uma lista extensa de referências bibliográficas deve aparecer no final do texto.

Relatos de caso

São trabalhos de observações clinicolaboratoriais originais, acompanhados de análise e discussão. Devem conter até 1.500 palavras. A estrutura deve apresentar, no mínimo, os seguintes tópicos: Introdução, Relato (s) dos (s) caso (s) e Discussão. Incluir um resumo não estruturado no idioma do texto e outro em inglês.

Cartas aos editores

Inclui cartas que visam a discutir artigos recentes publicados na revista ou a relatar pesquisas originais ou achados científicos significativos. Cartas breves, com no

máximo 500 palavras (incluindo referências, sem tabelas ou figuras), serão consideradas se estiver explícita a frase “para publicação”.

REFERÊNCIAS

As referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, e ser numeradas sucessivamente pela ordem em que são mencionadas pela primeira vez no texto. Devem seguir as normas do Estilo Vancouver. Os títulos dos periódicos deverão ser referidos na forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se a lista de referências não seguir a norma adotada, os trabalhos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados, quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas; apenas mencionados no texto ou em nota de rodapé. A lista de referências deve seguir o estilo dos exemplos abaixo.

Exemplos:

- **Artigos de periódicos (um só autor)**
Fry PH. O significado da anemia falciforme no contexto da ‘política racial’ do governo brasileiro 1995-2004. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2005; 12: 347-70. PubMed PMID: 16353330.
- **Artigos de periódicos (até seis autores)**
Barbosa AJA, Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Lima GF Jr, Oliveira CA. Immunocytochemical identification of *Campylobacter pylori* in gastritis and correlation with culture. *Arch Pathol Lab Med*. 1988 May; 112(5): 523-5. PubMed PMID: 3282485.
- **Artigos de periódicos (mais de seis autores)**
Rocha GA, Queiroz DM, Mendes EN, et al. Indirect immunofluorescence determination of the frequency of anti-*H. pylori* antibodies in Brazilian blood donors. *Braz J Med Biol Res*. 1992; 25(7): 683-9. PubMed PMID: 1342599.
- **Artigo de periódico on-line**
Polgreen PM, Diekema DJ, Vandenberg J, et al. Risk factors for groin wound infection after femoral artery catheterization: a case-control study. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 2006 Jan; 27(1): 34-7. Disponível em: <http://www.journals.uchicago.edu/ICHE/journal/issues/v27n1/2004069/2004069.web.pdf>.
- **Livros no todo (dois autores)**
Eyre HJ, Lange DP. *Informed decisions: the complete book of cancer diagnosis, treatment, and recovery*. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; 2002.
- **Capítulos ou parte de livro editado por outro autor**
Mendenhall WM. Treatment of head and neck cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Cancer: principles and practice of*

oncology. 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 729-80.

- **Parte de livro em meio eletrônico**
São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: São Paulo (Estado). Entendendo o meio ambiente. São Paulo; 1999. v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>.
- **Evento em meio eletrônico**
Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editores. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.
- **Tese ou dissertação**
Silva MAL. Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com doença falciforme. 2008. [dissertação]. Programa de pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
- **Citações no texto**
Devem ser identificadas por algarismos arábicos (números-índice). Podem também ser acrescentados o nome do autor e o ano. As referências com mais de um autor devem conter o sobrenome do autor seguido da expressão et al., como, por exemplo, Higashi et al.

Tabelas e figuras

As tabelas deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas por seu título, recomendando-se a não repetição dos mesmos dados em gráficos. Na montagem das tabelas, seguir as normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicadas pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993).

As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos etc.) deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras. Devem ser suficientemente claras para permitir sua produção. Os gráficos deverão vir preparados em programa processador de gráficos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto onde as ilustrações serão intercaladas como figuras.

O SGP aceita a importação de tabelas, imagens e gráficos em arquivo eletrônico nos seguintes formatos: jpg, gif, psd, tif e png, e com resolução de no mínimo 300 dpi.

O direito à privacidade do paciente não deve ser infringido. Imagens que eventualmente permitam a identificação pessoal somente poderão ser utilizadas com consentimento por escrito do paciente ou responsável, quando da submissão do manuscrito

Abreviações e nomes de medicamentos

As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. Empregar o nome genérico de medicamentos e indicar a fonte de componentes não disponíveis para prescrição.

As unidades de medida, inclusive suas abreviaturas, devem ser expressas no sistema métrico decimal e, quando o autor assim o desejar, também no Sistema Internacional (SI) entre parênteses.

Contato com a secretaria do JBPML

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

Tel.: +55 (21) 3077-1400

e-mail: jbpml@sbpc.org.br

COMO SUBMETER UM ARTIGO AO JPBML

1. Entre em www.jbpml.org.br.
2. Se você já é cadastrado, digite seu login e sua senha e clique no botão “Entrar no SGP”. Se ainda não é cadastrado, clique em “Quero me Cadastrar”.
3. Primeiro passo: no campo “Informe seu Email”, cadastre o e-mail que será usado para receber os avisos e informações do Sistema de Gestão de Publicações (SGP). Clique em “Continuar cadastro”.
4. Segundo passo: preencha os campos do cadastro. Atenção: os campos marcados com * são obrigatórios. Clique em “Continuar cadastro”. Aparecerá a mensagem “Seu cadastro no SGP foi concluído com sucesso”. Um e-mail com o login e a senha informados será enviado para seu endereço cadastrado. Nesta mesma página, clique em “Voltar”.
5. Você será encaminhado à página inicial do SGP, com login e senha. Nesta página, digite o login e a senha que você cadastrou e clique em “Entrar no SGP”.
Obs.: o login e a senha estão no e-mail que o SGP lhe enviou no final do seu cadastro.
6. Na página de abertura do SGP aparece uma mensagem informando ser esta a primeira vez que você acessa o sistema. Caso contrário, a mensagem informa quantas vezes já o acessou, data e hora do último acesso e que você tem acesso com nível de autor.
7. Observe o menu do lado esquerdo da tela. Se você ainda não submeteu nenhum artigo pelo SGP, todos os itens do menu estão indicados com quantidade “zero”.
8. Para submeter um artigo, clique em “Submeter novo artigo para Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial”.
9. Janela “Passo 1”: informar a classificação do artigo (manuscrito):
 - Artigo de revisão
 - Artigo original

- Carta ao editor
- Comunicação breve
- Relato de caso

Clique na opção correspondente à classificação do artigo. Por exemplo: Artigo original.

10. Janela “Passo 2”: anexar imagens e/ou gráficos usados no artigo. Todas as imagens e/ou gráficos devem estar em um dos seguintes formatos: jpg, gif, png, pdf ou tif.

Após anexar imagens/gráficos, clique em “Enviar imagens”. Caso o artigo não tenha imagens, clique em “Não necessito enviar imagens”.

11. Nesta janela o autor pode conferir as imagens que enviou e enviar mais. Caso não tenha enviado imagens, aparecerá a mensagem “Nenhuma imagem foi enviada pelo autor”.

Clique em “Próximo”.

12. Janela “Passo 3”: inserir/editar/excluir novos coautores. Para cada novo coautor devem ser preenchidos os campos “Nome”, “Titulação”, “Cargo” e, opcionalmente, CPF (pedido para posteriormente gerar o termo de Copyright, que garante os direitos autorais).

A ordem de importância dos autores pode ser alterada clicando nas setas amarelas (para cima ou para baixo). O primeiro nome será considerado o autor principal, e os demais, coautores.

Após inserir/editar/excluir novos coautores, clique em “Gravar” e em “Próximo”.

Se não houver novos coautores, clique em “Próximo”.

13. Janela “Passo 4”: preencher com o título do artigo e descritores (palavras-chave ou key words). Essas informações devem ser escritas na língua nativa do autor (por exemplo, português ou espanhol) e em inglês.

Clique em “Próximo”.

14. Janela “Passo 5”: preencher com o resumo (abstract). O autor também pode incluir informações adicionais, como o nome da instituição, nome e endereço para correspondência e se recebeu suporte financeiro.

Também é possível redigir uma Carta ao Editor contendo informações adicionais que considere importantes. Somente o editor terá acesso a esta carta. Clique em “Próximo”.

15. Janela “Passo 6”: redigir o artigo propriamente dito. É fornecido um editor de texto com os comandos necessários para formatação. É possível “colar” um texto já escrito e formatado em MS Word. Clicar em “Próximo”.

16. Janela “Passo 7”: formato de visualização do artigo (html ou pdf). Nesta janela, o autor decide se vai submeter o artigo ou vai excluí-lo e desistir de fazê-lo.

17. Janela “Concluído”: indica que você terminou o processo de submissão do artigo.

18. Você receberá um e-mail comunicando que o artigo foi submetido a avaliação.