

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas

Tese de Doutorado

**EFEITO ANTIMETASTÁTICO DE POLIFENÓIS EM LINHAGENS
CELULARES DE CÂNCER DE PULMÃO: REVISÃO
SISTEMÁTICA**

Rafaela Festugatto Tartari

Porto Alegre
2017

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas

Tese de Doutorado

**EFEITO ANTIMETASTÁTICO DE POLIFENÓIS EM LINHAGENS
CELULARES DE CÂNCER DE PULMÃO: REVISÃO
SISTEMÁTICA**

Rafaela Festugatto Tartari

Orientador: Prof. Dr. José da Silva Moreira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Tartari, Rafaela Festugatto
EFEITO ANTIMETASTÁTICO DE POLIFENÓIS EM LINHAGENS
CELULARES DE CÂNCER DE PULMÃO: REVISÃO SISTEMÁTICA /
Rafaela Festugatto Tartari. -- 2017.
53 f.
Orientador: José da Silva Moreira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-
RS, 2017.

1. Efeito dos polifenóis no câncer de pulmão. I.
Moreira, José da Silva, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedicatória

À minha família, meu pai e minha mãe, que me deram educação, amor, amizade, bondade e principalmente valores de vida para que eu alcançasse todos os meus objetivos. Ao meu irmão pelo incentivo, paciência e compreensão pelas horas ausentes. Todos me ensinaram de maneira única e especial a arte de amar, cuidar do outro, saber ouvir, e ir à luta. Muito obrigado por fazerem parte da minha vida.

À minha querida Vó Josefina (*in memoriam*) com todo amor, pelos ensinamentos de vida.

À minha Madrinha Corina pelo incentivo incansável.

Agradecimentos

Desejo expressar meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram , elaboração deste trabalho, em especial:

- A toda minha família Iole, Moacir e Lucas, a cada um que com seu jeito especial me ajudou a enfrentar esta fase de Tese, pela paciência e compreensão em meus momentos de ausência.
- Ao grande mestre, Dr. José da Silva Moreira, pelo incentivo incansável, carinho e dedicação.
- Às minhas grandes mentoras: Aline Kirjner Poziomyck e Rosmeri Kuhmmer Lazzaretti pelo incansável apoio, pela brilhante ajuda e contribuição em todas as etapas da minha Tese.
- À Prof^a Dr^a Alice Zelmanowicz pelo acolhimento, apoio e contribuição indescritível ao trabalho.
- Ao secretário do Programa de Pós-Graduação, Marco Aurélio Silva, pelo total apoio em todos esses anos de estudo no PPG: meu eterno agradecimento.
- À Coordenação da Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas – UFRGS.
- Ao amigo Guilherme Watte pelo incentivo e contribuição.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	- Catequinas
COX-2	- Ciclooxygenase-2
CPC	- Carcinoma de Pequenas Células
CPNPC	- Carcinoma Pulmonar de Não Pequenas Células
EGC	- Epicatequina-galato
EGCG	- Epigallocatequina- galato
ERO	- Espécies Reativas de Oxigênio
IARC	- <i>International Agency fo Research on Cancer</i>
IL	- Interleucinas
INCA	- Instituto Nacional de Câncer
KEM	- Quempferol
MEC	- Matriz extra-celular
MOOSE	- <i>Meta-Analysis of Observational Studies in Epidemiology</i>
MMP-2	- Metaloproteinase – 2
MMP-9	- Metaloproteinase – 9
NCI	- <i>National Cancer Institute</i>
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PECO	- População de interesse, Exposição, Comparações e Resultados
PHY	- <i>Phylantus</i>
PRISMA	- <i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>
TEM	- Transição Epitélio-Mesênquima
TF	- Teaflavinas
TGF- β 1	- Fator de Transformação do Crescimento Beta 1
TNF	- Fator de necrose tumoral
VEGF	- Fator de crescimento endotelial

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais características dos estudos	43
Tabela 2. Avaliação do risco de viés dos estudos incluídos.....	46

Lista de Figuras

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1. Classificação dos polifenóis.....20

ARTIGO: Efeito antineoplásico de polifenóis em linhagens celulares de câncer de pulmão: revisão sistemática

Figura 1. Diagrama de fluxo de seleção dos estudos42

Lista de Quadros

Quadro 1. Estratégias de busca para cada base de dados.....	40
--	----

RESUMO

Introdução: A principal causa de mortalidade em pacientes com câncer de pulmão é a metástase. A metastatização é um fenômeno complexo, de múltiplas etapas, envolvendo proliferação, adesão e motilidade. Estratégias quimiopreventivas como o uso de polifenóis no controle da cascata metastática têm sido sugeridas em estudos *in vitro* e *in vivo*, as quais parecem ter ações na proliferação, invasão, migração e regulação enzimática desse processo.

Objetivo: Revisar na literatura a ação dos polifenóis no comportamento das metátases do câncer de pulmão.

Metodologia: Foi realizada uma revisão sistemática nas bases de dados MEDLINE, LILACS e EMBASE para identificar os estudos publicados sobre a influência dos polifenóis no câncer de pulmão metastático.

Resultados: De 1166 publicações encontradas, foram selecionados 13 artigos. Todos eles relataram benefício na atividade antitumoral, com linhagens e polifenóis diferentes. Os achados mostraram que os polifenóis têm a capacidade de reduzir a proliferação, a migração e a invasão das células cancerígenas, bem como suprimir alguns mediadores envolvidos na cascata metastática.

Conclusão: A relação dos polifenóis com o desenvolvimento da metástase no câncer de pulmão parece existir. Entretanto, os estudos selecionados possuem limitações, principalmente de caráter amostral, sendo necessárias maiores comparações entre as diferentes substâncias e as diferentes populações celulares.

ABSTRACT

Background: The main cause of mortality in patients with lung cancer is metastasis. This process is a complex phenomenon of multiple steps including proliferation, adhesion and motility. Chemopreventive strategies like the use of polyphenols regulating metastasis cascade have been suggested in vitro and in vivo studies, and they seem to influence proliferation, invasion, migration and enzymatic regulation of this process.

Aim: To review the literature about the possible favorable relationship between polyphenols and the behavior of lung cancer metastasis.

Methods: The systematic review was performed using PubMed, LILACS and EMBASE data base to identify published studies about the influence of polyphenols on metastatic lung cancer.

Results: From 1166 studies searched 13 articles were selected. All of them reported benefits in antitumoral activity with different cell line and polyphenols. The findings demonstrate that polyphenols have the ability to reduce proliferation, migration and invasion of cancer cells, as well as suppress some mediators involved in metastasis cascade.

Conclusion: The relationship between polyphenols and the development of metastasis in lung cancer seems to exist. However, the selected studies have limitations, mainly of sample feature; greater comparisons between different substances and different cell lines are necessary.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	7
Lista de Figuras.....	8
Lista de Quadros	9
Resumo.....	10
Abstract.....	11
1. Introdução.....	13
2. Referencial Teórico.....	14
3. Justificativa.....	24
4. Objetivos.....	26
4.1 Objetivo Geral.....	26
5. Referências Bibliográficas	27
5.1 Referências da Introdução.....	27
5.2 Referências do Referencial Teórico.....	28
5.3 Referências da Justificativa.....	34
6. Artigo.....	36
7. Perspectivas Futuras.....	53

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão ocupa local de especial destaque na morbimortalidade mundial tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento¹. A taxa de sobrevida ainda é considerada baixa (15% em 5 anos), apesar de esforços para melhorar os desfechos da doença². Os tratamentos atuais se limitam a cirurgia, quimioterapia, e radioterapia, independentemente do intuito terapêutico, acentuando assim a necessidade de terapias mais efetivas³.

A principal causa de mortalidade em pacientes com câncer de pulmão é a metástase. A metastatização é um fenômeno complexo, de múltiplas etapas, que envolve a proliferação, a adesão e a motilidade da célula⁴. Esse processo ocorre principalmente pela transição epitélio-mesênquima (TEM). A TEM envolve alterações de marcadores epiteliais e mesenquimais, em que as células epiteliais adquirem propriedades similares aos fibroblastos, perdendo contato célula-célula e célula-matriz extracelular, favorecendo a proliferação e a progressão celular. Desta forma, a TME torna-se um alvo para prevenção do desenvolvimento da cascata metastática⁵.

Novas terapias têm surgido objetivando aumentar a sobrevida, porém a qualidade de vida ainda é bastante questionável. Assim, a descoberta de terapias que possam alcançar resultados reais, mesmo que discretos, são necessários. Nesse sentido, os polifenóis naturais podem oferecer novas perspectivas terapêuticas⁶. Estratégias quimiopreventivas como o uso de polifenóis no controle da cascata metastática têm sido sugeridas em estudos *in vitro* e *in vivo*, as quais parecem ter ações na proliferação, invasão, migração e regulação enzimática do câncer de pulmão metastático⁷.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Câncer de Pulmão

O câncer é um problema de saúde pública mundialmente reconhecido pela *World Cancer Report 2014* da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS). Projeções apontam que em 2025, o câncer de pulmão corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de novos casos estimados¹.

O câncer de pulmão é considerado uma das doenças malignas mais prevalentes no mundo, correspondendo a 16,5% dos casos. A maior incidência é observada na América do Norte e a menor na África Central². A neoplasia pulmonar é responsável por 20% das mortes por causa oncológica³.

O câncer de pulmão se encontra no quarto lugar dos mais incidentes no Brasil, atingindo 180 mil novos casos a cada ano, ocupando o terceiro lugar de incidência em homens e o quarto em mulheres. Em relação ao gênero, foram estimados 61 mil de câncer de próstata em homens e 58 mil de câncer de mama nas mulheres, sendo encontrado em segundo lugar no sexo masculino, e quarto no sexo feminino⁴.

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de traqueia, brônquios e pulmões em homens é o segundo mais frequente nas Regiões Sul (35,17/100 mil) e Centro-Oeste (14,53/100 mil), sendo, nas Regiões Sudeste (19,02/100 mil), Nordeste (9,75/100 mil) e Norte (8,07/100 mil), o terceiro mais frequente. Para as mulheres, é o terceiro mais frequente na Região Sul (20,61/100 mil). Nas Regiões Sudeste (10,56/100 mil), Centro-Oeste (9,37/100 mil) e Nordeste (7,24/100 mil), ocupa a quarta posição. Já na Região Norte (5,07/100 mil), é o quinto mais frequente⁴.

No fim do século XX, o câncer de pulmão se tornou uma das principais causas de morte evitáveis Brasil⁵. Segundo o último Atlas de Mortalidade analisado pelo INCA, no Brasil, foi responsável por 25.333 mortes em 2014. Altamente letal, a sobrevida média cumulativa total em cinco anos varia entre 13% e 21% em países desenvolvidos e entre 7% e 10 % nos países em desenvolvimento⁴.

Os carcinomas de pulmão são classificados em carcinoma de pequenas células (CPC) e carcinoma não de pequenas células (CPNPC). Dentre os CPNPC, subdivide-se em: carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular, adenocarcinoma e carcinoma indiferenciado de grandes células. Em outra classificação considerada pela OMS, o câncer de pulmão compreende sete tipos: carcinoma de células escamosas, carcinoma de pequenas células, adenocarcinoma, carcinoma de grandes células (neuroendócrino e não neuroendócrino), carcinoma adenoescamoso, carcinoma pleomórfico e sarcomatóide, e tumor carcinoide⁵.

Metástase

A principal causa de mortalidade em pacientes com câncer de pulmão é a metástase. A metastatização é um processo complexo, de múltiplas etapas, envolvendo proliferação, adesão e motilidade das células⁶. Esse processo ocorre pela transição epitélio-mesênquima (EMT, do inglês, *epithelial-mesenchymal transition*), consistindo em modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas das células endoteliais, as quais resultam na aquisição de um fenótipo de célula mesenquimal, cuja capacidade de migração, invasão, e resistência à apoptose aumentada⁷.

Transição epitélio-mesênquima (TEM)

No tecido epitelial normal, as células formam camadas que estão intimamente ligadas por estruturas especializadas de membrana. A adesão entre as células epiteliais é necessária para a manutenção da homeostasia do tecido. Para tanto, ocorrem diferentes processos: junções aderentes, desmossomas, zônula oclusiva e junção comunicante. O epitélio apresenta polarização basolateral-apical, que é decorrente da distribuição organizada de caderinas e integrinas. Abaixo das camadas de células epiteliais encontra-se a membrana basal que separa células epiteliais de suas subcamadas de células mesenquimais⁸.

As células epiteliais imóveis e polarizadas sofrem alterações moleculares que ocasionam perda da adesão célula a célula, perda das junções celulares e reorganização do citoesqueleto. Dessa forma, ocorre perda da polaridade apical e aquisição da morfologia fusiforme, adquirindo características mesenquimais, o que proporciona o aumento da capacidade da migração celular. Este importante processo foi inicialmente identificado nos estágios do desenvolvimento embrionário, em que o epitélio é capaz de se modificar em mesênquima, e vice-versa (processo reverso à TEM, denominado *mesenquimal-epithelial transition*, ou MET)⁹. Posteriormente, foi demonstrado que mesmo após sua completa diferenciação, o epitélio retém a capacidade de modificar seu fenótipo sob a influência de estresse patológico ou associado ao reparo tecidual¹⁰.

Durante a carcinogênese, este processo se inicia no tumor primário, regulando negativamente a expressão de proteínas de adesão celular, como e-caderina e positivamente a expressão de proteínas que conferem características relacionadas com a motilidade celular, ganhando o fenótipo de células mesenquimais¹¹. Além da e-caderina, a expressão da vimentina também é uma característica das células mesenquimais e,

portanto, utilizado como marcador da TEM¹².

Invasão celular

Os mecanismos necessários para a invasão e metástase são bastante similares na maior parte das principais neoplasias, embora as bases genéticas do processo variem entre os diferentes tipos de câncer¹³. De uma forma geral, a formação da metástase é realizada por alguns passos que incluem: dissociação das células cancerosas do tumor primário, adesão à matriz extracelular (MEC), migração e invasão das células ao longo da MEC, progressão passo a passo ao longo das cadeias linfáticas e, pela corrente sanguínea, sob forma de êmbolos neoplásicos¹⁴ levados a sítios distantes, onde aderem e invadem membrana basal vascular, com angiogênese e proliferação¹⁵.

A primeira etapa da invasão tumoral é a alteração na interação célula-célula. A adesão célula-célula é mediada principalmente por uma “superfamília” de molécula de adesão chamada caderina¹⁶. De um modo geral, a perda ou diminuição da expressão do sistema caderina-catenina causa perda da adesão célula-célula, resultando em aumento da agressividade de tumores epiteliais, invasão e metástase. Além da diminuição da expressão das caderinas ter ação direta sobre a invasão celular, ela também ocasiona um aumento na expressão de proteínas relacionadas com a progressão tumoral, como as metaloproteinases (MMP), que têm papel essencial na degradação dos componentes da MEC, agravando ainda mais o quadro clínico¹⁷.

Degradação enzimática

O segundo passo percorrido pelas células é a degradação enzimática dos componentes da membrana basal (MB) e do estroma tumoral, permitindo assim, a migração celular. As enzimas proteolíticas tanto são secretadas pelas células tumorais como também pelas células do hospedeiro (fibroblastos e macrófagos infiltrantes), os quais são induzidos, pelas células neoplásicas, a secretarem as enzimas proteolíticas. As principais enzimas que degradam os componentes da matriz extracelular são as MMP¹⁸.

As MMPs mais estudadas são as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) devido ao seu papel crucial na progressão tumoral, atuando diretamente sobre os componentes da MB. Durante o processo de invasão das células epiteliais neoplásicas, a MB representa a primeira estrutura a ser degradada. Por isso, essas proteinases têm sido fortemente destacadas¹⁹.

Migração celular

Após atuação dessas enzimas proteolíticas sobre a MEC, as células migram ao longo da matriz extracelular, alcançando os vasos sanguíneos/linfáticos, com potencialidade de formar metástases. O mecanismo de migração celular é complexo e está relacionado com a produção de citocinas e alguns fatores de crescimento liberados pelas células neoplásicas, dependendo ainda da atividade quimiotática dos próprios produtos de degradação da matriz²⁰.

Liotta et al, em 1988 também descreveram esses passos em seu trabalho, e explica que após esses processos, as células terão, acesso à circulação sanguínea

atravessando a membrana basal vascular. Por fim, este ciclo é repetido quando as células tumorais deixam a árvore vascular e se instalam na matriz extracelular do órgão distante, com a deposição de um nódulo metastático e angiogênese que nutrirá esse novo tumor.

Polifenóis

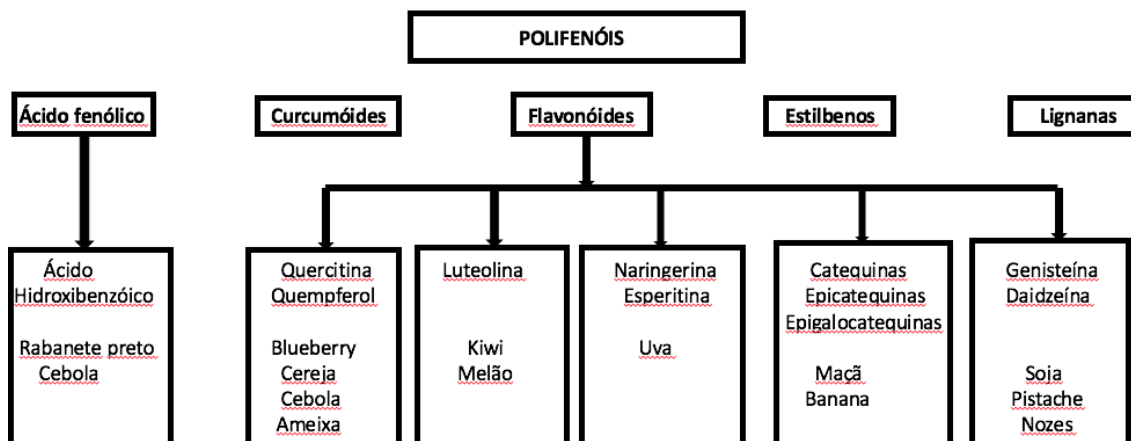
Os polifenóis são compostos orgânicos, derivados de plantas e caracterizados quimicamente pela presença de duas ou mais unidades de fenol. O fenol é constituído de uma molécula formada pela ligação de hidroxila (OH) ao anel aromático fenil ou benzenóide²¹. Essas substâncias correspondem a um grupo vasto de mais de 40.000 metabólitos que fornecem às plantas mecanismos de defesa contra patógenos e estresse ambiental. Os polifenóis são classificados de acordo com diferenças no anel aromático, e dentre eles citam-se: ácido fenólico, curcumóides, flavonóides, estilbenos e lignanas²² (Figura 1).

Os polifenóis têm sido reconhecidos cada vez mais pelos pesquisadores e pelos indivíduos de uma forma geral, por estarem presentes em abundância nas frutas, vegetais, sementes e bebidas. Na comunidade científica, o consumo regular dos polifenóis já foi sugerido como benéfico para saúde humana, devido sua capacidade de eliminação de radicais livres e atuação anti-inflamatória em diversas doenças²³.

Há bastante tempo, algumas plantas são utilizadas como medicamentos nas populações orientais tradicionais, embora, apesar de registros de segurança, ainda não são utilizados de forma terapêutica. Apesar de possíveis associações positivas do uso

de polifenóis em diversas patologias, seguem lacunas sobre os reais benefícios destes componentes na prevenção e tratamento de doenças²¹.

Figura 1. Classificação dos polifenóis



*Adaptado de Amarathna et al ²²

Quimioprevenção dos polifenóis

Em 1976, Sporn et al definiu a quimioprevenção como o uso de agentes químicos naturais ou sintéticos específicos para reverter, suprimir ou prevenir a progressão para o câncer invasivo²⁴.

A quimioprevenção visa a reversão de um processo carcinogênico, atuando na inibição de um ou vários elementos na progressão gradual do câncer. Soria et al sugerem que a quimioprevenção pode ser organizada em três estratégias: prevenção primária, secundária e terciária, e o uso dos polifenóis parece exercer papel nesses três âmbitos²². A prevenção primária do câncer é referida em indivíduos saudáveis que estão

em alto risco como por exemplo, fumantes independentemente do tempo do hábito tabágico; a prevenção secundária é entendida como a prevenção do desenvolvimento de câncer em indivíduos com lesões pré-cancerosas como por exemplo, neoplasia intra-epitelial, leucoplasia e displasia; e prevenção terciária como a prevenção de recorrência ou metástases em indivíduos já portadores²².

No ano de 2010, o *National Cancer Institute* (NCI) dos Estados Unidos (EUA), previu que os custos envolvendo o câncer poderiam exceder 124 bilhões, podendo aumentar a cada ano devido ao crescimento e envelhecimento da população²⁵. Novas terapias têm surgido objetivando aumentar a sobrevida, porém a qualidade de vida é bastante questionável. Assim, a descoberta de terapias que possam alcançar resultados reais, mesmo que discretos, são necessários. Nesse sentido, os polifenóis naturais podem oferecer alguma alternativa de tratamento paliativo para os pacientes com câncer metastático²¹.

Estudos têm demonstrado que os polifenóis podem interferir no processo de carcinogênese^{26,27}, crescimento e disseminação do tumor, atuando em diversos alvos envolvidos na proliferação celular, apoptose, angiogênese, além de processos que envolvem resistência a drogas e radiação^{28, 29, 30}.

Efeito antioxidativo

O estresse oxidativo induzido pela atuação de espécies reativas de oxigênio (ERO) tem sido considerado significativo na promoção da carcinogênese³¹. Segundo Kang NJ et al a descoberta de que muitos promotores de tumores geram ERO tem sido apoiada por estudos *in vivo* e *in vitro*²⁷.

Os polifenóis são bem conhecidos por suas propriedades antioxidantes, já que

podem atenuar o processo de formação de ERO, que desempenham papéis importantes na carcinogênese. Os polifenóis parecem exercer atividade antioxidante mais efetiva do que outras substâncias, já conhecidas por seu alto poder anti-oxidativo, como a vitamina C. No estudo de Kim et al, alguns fitoquímicos fenólicos, incluindo ácido gálico e quercetina, apresentaram maior atividade antioxidante do que o ácido ascórbico³². Eberhardt et al., quando estudaram a atividade antioxidante de maçãs, sugeriram que o efeito antioxidativo da fruta se deve ao efeito combinado de fitoquímicos fenólicos e não da vitamina C³³. Outros efeitos antioxidantes também foram observados em alguns polifenóis, como a quercetina e a genisteína, apresentados como eliminadores eficazes de radicais de superóxido e peroxinitrito³⁴. As catequinas e isoflavonas de soja também já exibiram efeitos protetores contra o dano do DNA causado por ERO, isoladamente ou de forma sinérgica^{35,36}.

Embora atividade antioxidante deva ser considerada nos polifenóis, não pode por si só explicar todos os efeitos quimiopreventivos. Para tanto, é necessário compreender seu papel na sinalização mediada pelo estresse oxidativo envolvido na carcinogênese²⁷.

Efeito antiinflamatório

A geração de estresse oxidativo é parte integrante da resposta inflamatória. Há evidências consideráveis de que as ERO estão envolvidas no vínculo entre inflamação crônica e câncer. Desta forma, seria uma estratégia promissora identificar e desenvolver agentes quimiopreventivos que inibem a inflamação³⁷.

Alguns agentes pró-inflamatórios foram identificados como mediadores na supressão da apoptose, proliferação celular, angiogênese, invasão e metástase. Dentre

eles citam-se: fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18), quimiocinas, metaloproteinase de matriz (MMP-9), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e ciclooxigenase-2 (COX-2)³⁸. Uma vez que a inflamação está intimamente ligada à promoção do tumor, espera-se que substâncias dietéticas com potentes atividades anti-inflamatórias exerçam efeitos quimiopreventivos na carcinogênese, tanto nas fases de promoção quanto na progressão. As ações anti-inflamatórias de polifenóis têm sido descritas em alguns estudos em animais e *in vitro*, envolvendo os fatores mediadores acima descritos, muito embora ainda haja necessidade de uma maior compreensão dos mecanismos moleculares e os caminhos de sinalização celular, já que seriam os principais alvos para inibição da carcinogênese ²⁷.

3. JUSTIFICATIVA

O tratamento do câncer de pulmão engloba cirurgia, quimioterapia e radioterapia, associadas ou não de acordo com o intuito terapêutico. A cirurgia é a principal opção curativa, mas somente em torno de 20% dos pacientes apresentam-se com a doença ressecável e conseqüentemente maiores chances de cura¹. Entretanto, o tratamento local com ressecção ou radioterapia sozinho é seguido por altas taxas de recorrências locorregionais e distantes². Os tratamentos quimioterápicos são amplamente utilizados, embora ofereçam sobrevida limitada, com toxicidades moderadas, além de complexidades genéticas³. Desta forma, há necessidade de novas estratégias capazes de auxiliar na inibição do processo metastático.

Os polifenóis são compostos presentes nas frutas e vegetais e, recentemente, sua atividade antitumoral vem sendo bastante estudada e reconhecida. Essas substâncias têm propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, as quais podem atuar no atraso do ciclo celular, na apoptose, na inibição, na migração e na invasão celular^{4,5}. Estudos em animais têm mostrado benefício dos polifenóis no processo de metastatização do câncer de pulmão^{6,7,8,9}. Entretanto, as pesquisas com linhagens de neoplasia pulmonar ainda carecem de estudos prospectivos. As linhagens celulares, de uma forma geral, podem auxiliar na descoberta de mecanismos fisiológicos e bioquímicos em pesquisas experimentais e observacionais¹⁰. Embora os modelos animais ajudem a entender a progressão, não ilustram o mecanismo molecular causador do processo. Os modelos celulares podem ser úteis na identificação de biomarcadores e alvos terapêuticos, e posteriormente devem ser utilizados para desenvolvimento de novas terapias

Neste contexto, o melhor entendimento sobre a atuação dos polifenóis na progressão tumoral do câncer de pulmão em linhagens celulares pode contribuir para o desenvolvimento de outras possíveis estratégias para controle da doença.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo Geral

Conduzir uma revisão sistemática sobre o efeito antimetastático dos polifenóis em linhagens celulares de câncer de pulmão.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5.1 Referências da introdução

1. Rafiememanesh H, Mehtarpour M, Khani F, Hesami SM, Shamlou R, Farhad T et al. Epidemiology, incidence and mortality of lung cancer and their relationship with the development index in the world. *J Thorac Dis* 2016;8(6):1094-1102
2. Ghosal R, Kloer P, Lewis KE. A review of novel biological tools used in screening for the early detection of lung cancer. *Postgraduate Med J*. 2009;85:358-63
3. Hang M, Zhao F, Chen SB, Sun O, Zhang CX. Kaempferol modulates the metastasis of human non-small cell lung cancer cells by inhibiting epithelial-mesenchymal transition. *Bangladesh J Pharmacol*. 2015; 10: 267-270
4. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumor invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007;449:682-688
5. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119:1420-8.
6. Asensi M, Ortega A, Mena S, Feddi F, Estrela JM. Natural polyphenols in cancer therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2011;48(5-6):197-216.
7. Amararathna M, Johnston MR, Rupasinghe HPV. Plant polyphenols as chemopreventive agents for lung cancer. *Int j Mol Sci*. 2016;(17):1352

5.2 Referências do referencial teórico

1. World Health Organization (WHO). World Cancer Report. 2014.
2. FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer, Genève, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro: INCA, 2016.
4. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. INCA. (2014). Atlas de Mortalidade [acessado em 25 nov 2017]. Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo01/consultar.xhtml;jsessionid=14F9247C7C30EE7BA76C3B1402F6EFOF#panelResultado>.
5. Novaes FT, Cataneo DC, Ruiz Junior RL, Defaveri J, Michelin OC, Cataneo AJM. Lung cancer: histology, staging, treatment and survival. J Bras Pneumol. 2008;34(8):595-600.
6. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumor invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer.. nature. 2007;449:682-688.

7. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119:1420-8.
8. Schock F, Perrimon N. Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2002; 18:463-93.
9. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:442-54
10. Boyer B, Valles AM, Edme N. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1091-9
11. Barr S, Thomson S, Buck E, Russo, S, Petti F, Sujka-Kwok I, Eyzaguirre A et al. Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-mesenchymal-like transitions. *Clinical and experimental metastasis*. 2008;25(6):685-693.
12. Lu Z, Ghosh S, Wnag Z, Hunter T. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 2003; 4(6): 499–515.
13. Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *The Lancet* 2007: v. 369
14. Willis, R.A. (1973) *The Spread of Tumors in the Human Body*. 3rd Edition, Butterworth, London. c.24, p.19-30.

15. Lee KJ, Kim JY, Choi JH, Kim HG. Inhibition of tumor invasion and metastasis by aqueous extract of the radix of *Platycodon grandiflorum*. *Food and Chemical Toxicology*. 2006;44:1890–96.
16. Neal C, Berry DP. Basic principles of the molecular biology of cancer II: angiogenesis, invasion and metastasis. *Surgery* 2006; 24(4): 120-126
17. Pashos ka, Canovas D, Bird NC. The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis. *Cellular Signalling* 2009;21: 665–674
18. Chakrabarti S, Patel KD. *Experimental Lung Research* 2005; 31:599–621.
19. Pereira AC., Carmo ED.; Silveira VAS, Amadei SU, Rosa LEB. O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. *Revista Brasileira de Cancerologia* v.52, p.257-62, 2006
20. Liotta LA, Stetler-stevenson WG, Steeg P.S. Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements. *Cancer Invest.* 1991; (9):543–51
21. Asensi M, Ortega A, Mena S, Feddi F, Estrela JM. Natural polyphenols in cancer therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2011;48(5-6):197-216.
22. Amararathna M, Johnston MR, Vasantha R HP. Plant polyphenols as chemopreventive agentes of lung cancer. *Int J Mol Sci* 2016;17:1352.

23. Quideau S, Deffieux D, Douat-Cassassus C, Pouységou L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011;50:586-621.
24. Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, et al. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* 1976; 35: 1332–38.
25. Ocana A, Tannock IF. When are "positive" clinical trials in oncology truly positive? *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(1):16-20
26. Lambert JD, Hong J, Yang GY, Liao J, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: Evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr* 2005;81:284S-291S.
27. Kang NJ, Shin SH, Lee HJ, Lee KW. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol Ther* 2011;130:310-324.
28. D'Incalci M, Steward WP, Gescher AJ. Use of cancer chemopreventive phytochemicals as antineoplastic agents. *Lancet Oncol* 2005;6:899-904.
29. Jiang YL, Liu ZP. Natural products as anti-invasive and anti-metastatic agents. *Curr Med Chem* 2011;18:808-829.
30. Garg AK, Buchholz TA, Aggarwal BB. Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. *Antiox Redox Signal* 2005;7:1630-1647.

31. Nishigori, C., Hattori, Y., & Toyokuni, S. (2004). Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal* 6, 561–570.
32. Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem* 50, 3713–3717.
33. Eberhardt, M. V., Lee, C. Y., & Liu, R. H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405, 903–904.
34. Wei, H., Bowen, R., Cai, Q., Barnes, S., & Wang, Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med* 2005;208: 124–130
35. Noroozi, M., Angerson, W. J., & Lean, M. E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 1210–1218.
36. Johnson, M. K., & Loo, G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutat Res* 2000; 459: 211–218.
37. Wiseman, H., & Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313(Pt 1): 17–29.

38. Shi J, Liu F, Zhang W, Liu X, Lin B, Tang X. Epigallocatechin-3-gallate inhibits nicotine-induced migration and invasion by the suppression of angiogenesis and epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports* 2015;33:2972-2980.

5. 3 Referências da justificativa

1. Watanabe H, Yamamoto N, Tamura T, Shimoyama T, Hotta K, Inoue A, et al. Study of paclitaxel and dose escalation of cisplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2003;33(12):626-30.

2. S, Aigner C, Roesel C. The role of surgery in high grade neuroendocrine tumours of the lung. *J Thorac Dis.* 2017; 9(15): S1474–S1483.

3. Ganguly C, Saha P, Panda CK, Das S. Inhibition of growth, induction of apoptosis and alteration of gene expression. By tea polyphenols in the highly metastatic human lung cancer cell line NCI – H460. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2006;6:326-31.

4. Nguyen TT, Tran E, Ong CK, Lee SK, Do PT, Huynh TT et al. Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A459 lung cancer cells in mediated by activation of MEK-MAPK. *J Cell physiol.* 2003;197:110-21.

5. Shen SC, Lin CW, Lee HM, Chien LL, Chen YC. Lipopolysaccharide plus 12-O tetradecanoylphorbol 13-acetate induction of migration and invasion of glioma cells in vitro and in vivo: Differential inhibitory effects of flavonoids. *Neuroscience* 2006;140:477-89.

6. Rajendran P, Rengarajan T, Nishigaki I, Ekambaram G, Sakthisekaran D. Potent chemopreventive effect of mangiferin on lung carcinogenesis in experimental Swiss albino mice. *J Cancer Res Ther.* 2014;10(4):1033-9.

7. Banerjee S, Manna S, Mukherjee S, Pal D, Panda CK, Das S. Black tea polyphenols restrict benzo(a)pyrene-induced mouse lung cancer progression through inhibition of Cox-2 and induction of caspase-3 expression. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2006;7(4):661-6.

8. Yang G, Wang ZY, Kim S, Liao J, Seril DN, Chen X, Smith TI, Yang CS. Characterization of early pulmonary hyperproliferation and tumor progression and their inhibition by black tea in a 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)1-butanone induced lung tumorigenesis model with A/J mice. *Cancer Res* 1997;57:1889-94.

9. Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H. Protective effects of green tea polyphenols administered by oral intubation against chemical carcinogen-induced forestomach and pulmonary neoplasia in A/J mice. *Cancer Letters* 73 (1993) 167-1.

10. Raju L, Augustine D, Rao RS, Sowmya SV, Haragannavar VC, Nambiar S et al. Biomarkers in tumorigenesis using cancer cell lines: a systematic review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18(9):2329-37.

6. ARTIGO

EFEITO ANTIMETASTÁTICO DE POLIFENÓIS EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE PULMÃO: REVISÃO SISTEMÁTICA

Rafaela Festugatto Tartari¹, Poziomyck AK², Lazzaretti RK², Moreira JS¹.

- ¹ *Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil;*
- ² *ACENTOR – Soluções Profissionais e Acadêmicas*

Autor correspondente:
José da Silva Moreira, MD PhD
Serviço de Pneumologia, Pavilhão Pereira Filho
Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre
Av. Independência 75, 90035-070
Porto Alegre - RS, Brasil
E-mail: jmmoreirapn@gmail.com

EFEITO ANTIMETASTÁTICO DE POLIFENÓIS EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE PULMÃO: REVISÃO SISTEMÁTICA

INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é considerado mundialmente como a doença maligna mais incidente e mais letal, apresentando taxa de sobrevida de 18% em cinco anos. Em 2012, foram estimados 8 milhões de novos casos, representando 13% de todos os novos diagnósticos de câncer¹.

A principal causa de mortalidade em pacientes com câncer de pulmão é a metástase. A metastatização é um fenômeno complexo, de múltiplas etapas, envolvendo proliferação, adesão e motilidade². Esse processo ocorre principalmente pela transição epitélio-mesênquima (TEM). Assim, as células epiteliais se desprendem da membrana basal, perdem a junção celular promovendo a redução do marcador epitelial e-caderina e a indução de outros marcadores como n-caderina e vimentina. Dessa forma, a estrutura celular se modifica e adquire um fenótipo de célula mesenquimal, que resulta em uma maior capacidade de migração, invasão celular e resistência^{3,4}. Além disso, ocorre secreção de enzimas degradadoras da matriz celular, destacando-se as metaloproteinases da matriz (MMP), mais precisamente MMP-2 e MMP-9, relacionadas às doenças pulmonares⁵. Outro estimulante da TEM é a TGF- β 1, uma citocina multifuncional que regula inúmeras funções celulares. As células estimuladas pelo Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β 1) sofrem mudanças morfológicas, como diminuição da adesão celular, e indução de caminhos de sinalização que favorecem a migração e invasão celular⁶.

O controle do processo da metástase ainda é considerado um grande desafio, apesar de consideráveis avanços terapêuticos no tratamento antineoplásico⁷. Estratégias quimiopreventivas como o uso de polifenóis no controle da cascata metastática têm sido sugeridas em estudos *in vitro* e *in vivo*, as quais parecem ter ações na proliferação, invasão, migração e regulação enzimática desse processo⁸. Acredita-se que um melhor entendimento sobre a influência dessas substâncias na progressão tumoral possa contribuir para o desenvolvimento de outras possíveis estratégias para controle da doença. Portanto, o objetivo desta revisão sistemática foi avaliar o efeito dos polifenóis na atividade antimetastática em linhagens celulares de câncer de pulmão.

MÉTODOS

Trata-se de uma revisão sistemática a partir de estudos clínicos conduzidos em linhagens celulares de câncer de pulmão altamente metastáticas. Um protocolo predeterminado estabelecido de acordo com o *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*⁹ foi registrado de forma prospectiva e internacional em base de revisões sistemáticas sob o número 80905. O *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) e o *Meta-Analysis of Observational Studies in Epidemiology* (MOOSE) foram utilizados para guiar a apresentação dos resultados¹⁰. As referências captadas foram incluídas em uma biblioteca única através do software *Mendeley*.

Critérios de inclusão e exclusão

Foram considerados todos os estudos que analisaram o efeito dos polifenóis em células de câncer de pulmão metastáticas. Os estudos foram excluídos quando se tratava de duplicatas, idiomas diferentes de português, inglês e espanhol, revisões prévias, estudos em animais e outras linhagens celulares diferentes de câncer de pulmão. Não foram incluídos estudos realizados e não publicados, resumos de eventos científicos (apresentados ou não), dissertações e teses. As questões analisadas foram: relação dos polifenóis com câncer de pulmão, capacidade da substância no impedimento da disseminação, invasão e proliferação das células oncológicas da neoplasia pulmonar, identificação e dosagem de quais polifenóis possam impedir o processo.

Estratégias de pesquisa e informação

A pesquisa foi realizada nas seguintes bases de dados eletrônicas: MEDLINE com acesso via Pubmed, EMBASE, LILACS (Literatura Científica e Técnica da América Latina e Caribe) e Cochrane até outubro de 2017. Foi utilizado o acrônimo

PECO (População de interesse, Exposição, Comparações e Resultados) para formular a questão de pesquisa¹¹.

Neste contexto, foram utilizados os termos do Medical Subject Headings (MeSH): “lung neoplasms”, “polyphenol” e “metastasis”, bem como os sinônimos cuidadosamente escolhidos conforme a estratégia completa disponível na Quadro 1. Uma busca manual foi realizada para trabalhos originais que contemplaram todos os requisitos necessários para inclusão nesta revisão.

Processo de seleção dos dados:

Os artigos foram selecionados por duas avaliadoras independentes (RFT e AKP), inicialmente com base na leitura do título, e na sequência pela leitura dos resumos. Os artigos completos foram revisados a partir dos resumos selecionados. Em caso de discordância quanto aos critérios de inclusão, o título e o resumo, ou o artigo completo, foram mantidos para uma avaliação posterior. Desacordos em relação aos critérios de inclusão, um terceiro investigador (RKL) foi consultado. Os dados foram extraídos e tabulados de forma independente incluindo resultados dos estudos e dados metodológicos por meio de ficha de coleta de dados padronizada.

Para avaliar a qualidade dos estudos utilizamos a escala de *Newcastle-Ottawa (NOS) Quality Assessment Scale for case-control and Cohort Studies* do *Ottawa Hospital Research Institute*¹², adaptada por *Flynn* e colaboradores¹³.

Quadro 1. Estratégias de busca para cada base de dados

BASE DE DADOS	ESTRATÉGIAS
PUBMED	("Lung Neoplasms"[Mesh] OR "Pulmonary Neoplasms" OR "Neoplasms, Lung" OR "Lung Neoplasm" OR "Neoplasm, Lung" OR "Neoplasms, Pulmonary" OR "Neoplasm, Pulmonary" OR "Pulmonary Neoplasm" OR "Lung Cancer" OR "Cancer, Lung" OR "Cancers, Lung" OR "Lung Cancers" OR "Pulmonary Cancer" OR "Cancer, Pulmonary" OR "Cancers, Pulmonary" OR "Pulmonary Cancers" OR "Cancer of the Lung" OR "Cancer of Lung") AND ("Polyphenols"[Mesh] OR Polyphenol* OR "Provinols")
LILACS	(mh:("Neoplasias Pulmonares") OR tw:("Neoplasias Pulmonares") OR tw:("Lung Neoplasms") OR tw:("Neoplasias Pulmonares") OR tw:("Pulmonary Neoplasms") OR (tw:(neoplas\$) AND tw:(pulm\$)) OR (tw:(cancer\$) AND tw:(pulm\$)) OR (tw:(neoplas\$) AND tw:(lung\$)) OR (tw:(cancer\$) AND tw:(lung\$))) AND (mh:("Polifenóis") OR tw:(polyphen\$) OR tw:(polifen\$) OR tw:(provinol) OR tw:(provinois) OR tw:(provinols))
EMBASE	'lung cancer'/exp OR 'cancer, lung' OR 'lung cancer' OR 'pulmonary cancer' OR 'schneeberg disease') AND ('polyphenol'/exp OR 'polyphenol' OR 'polyphenol component' OR 'polyphenols')

RESULTADOS

O diagrama de fluxo que mostra o processo de seleção dos artigos incluídos está apresentado na Figura 1.

Das 1166 publicações identificadas, 768 artigos foram selecionados após remoção das duplicatas e 180 foram submetidos a uma avaliação mais completa. Desses, 13 artigos preencheram os critérios de inclusão ao final do processo.

A Tabela 1 apresenta as características relevantes dos estudos selecionados. Os 13 estudos incluídos são transversais, sendo 10 estudos com linhagens do tipo A549, 1 estudo com linhagem H460, 1 com linhagem CL1-5, e 1 com TCG.

Todos os artigos avaliaram o efeito dos polifenóis no câncer de pulmão. Os polifenóis encontrados nos estudos foram: catequinas (CAT - n=4), *Phylantus* (PHY -

n=3), quempferol (KEM - n=1), dioscina (n=1), polifenóis do chá (n=1), resveratrol (n=1), extrato de *Ecklonia* (n=1) e ácido clorogênico (n=1). A avaliação da qualidade metodológica dos estudos incluídos está demonstrada na Tabela 2. Em nenhum estudo foi considerada amostra representativa, já que cada um avaliou somente um tipo de linhagem de câncer de pulmão altamente metastática.

Todos os estudos incluídos tiveram benefício em algum momento do processo metastático, seja na proliferação, na invasão, na supressão ou na regulação de genes, independentemente da linhagem celular. Todos os efeitos foram demonstrados como dose-dependente.

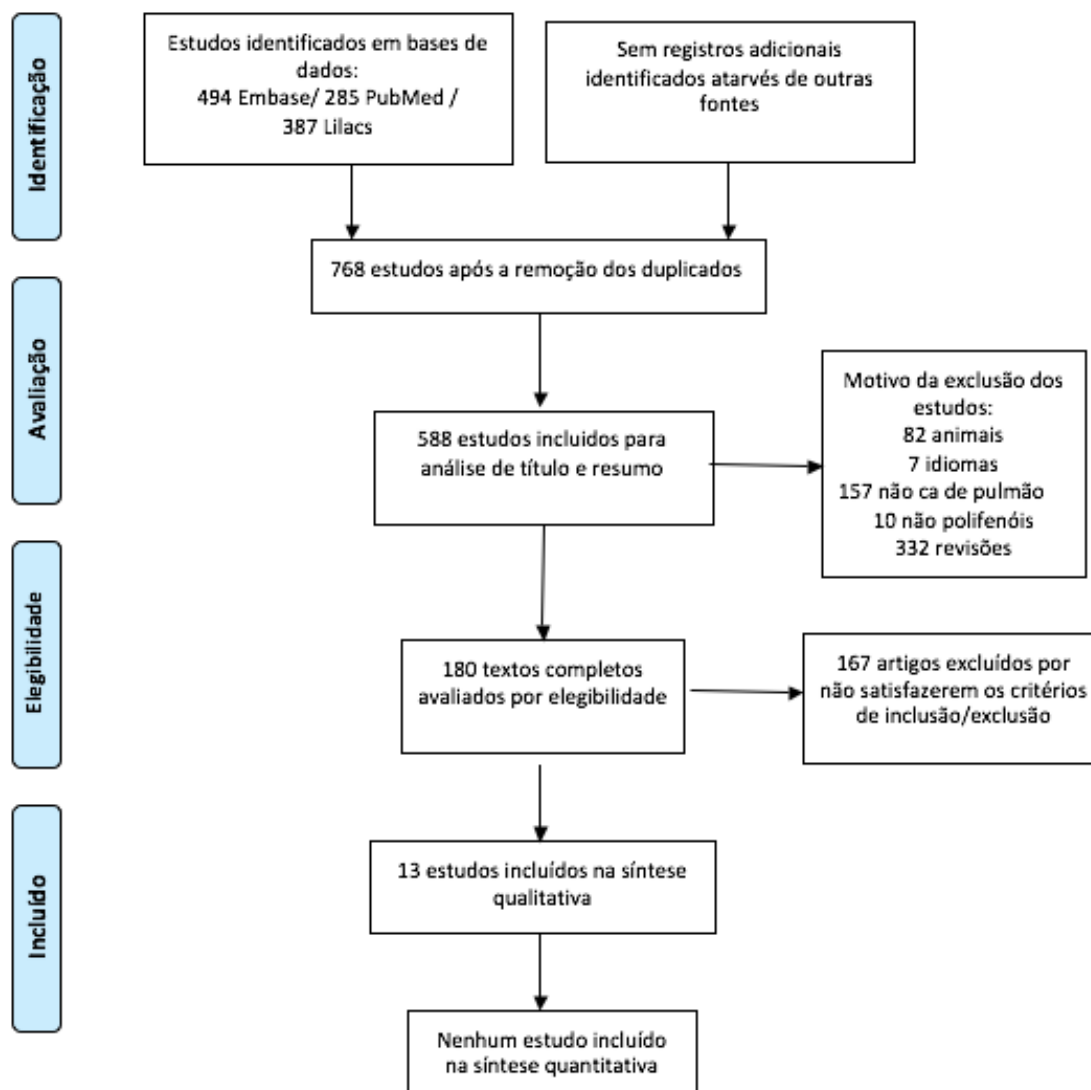


Figura 1. Diagrama de fluxo de seleção dos estudos.

Tabela 1. Principais características dos estudos

Autor, ano	Linhagem celular	Polifenol	Protocolo	Resultados
Lim WC et al, 2017	A549	Dioscina	- 0,5 µM; - 1,0 µM; - 2 µM; - 2,5 µM - 3 µM - 4 µM	- Redução da migração e invasão celular induzida por TGF-beta1: crescimento inibido com 4 µM quando tratadas por 24h - Bloqueio da diminuição da e-caderina e supressão de n-caderina com efeito dose-dependente de 2,5 µM, 3 µM
Yamagata et al, 2017	A549	Ácido Clorogênico	- 10 µM - 30 µM - 50 µM	- Redução da proliferação celular: 27% em 30 µM e 39% em 50 µM em comparação com as células não-tratadas - Expressão de genes associada à apoptose: Em 30 µM e 50 µM houve redução na expressão de BCL-2 para 75 e 69%, para a células não tratadas, respectivamente - Indução da BAX: 110% com 30 µM 127% em 50 µM - CASP3: aumento em 110% com 10 µM e 115% 30 µM
Huang AF et al, 2016	A549	EGC	- 10 µM; - 30 µM; - 50 µM	- Redução da motilidade em 55% com 50 µM - Redução da invasão em 43,8% com 50 µM - Inibição da TEM induzida por TGF-beta1 e MMP-2 na concentração de 50 µM - Redução da adesão célula-matriz por interação célula-colágeno induzida pelo TGF-beta1 com concentração de 50 µM
Hang M et al, 2015	A549	KEM	- 10 µM - 20µM - 40µM - 60 µM	- Efeito inibitório na proliferação dose-dependente - mínimo com 10 µM - Aumento da expressão de e-caderina e diminuição da vimentina
Shi J et al, 2015	A549	EGC	- 10 µM - 25 µM - 50 µM - 100 µM	- Inibição da invasão e migração induzida pela nicotina: efeito dose-dependente - Reversão da suprarregulação FCVE, FIH-1 alfa, COX-2, níveis de vimentina, e infraregulação de p53 e beta-cateninas
Ko H, 2015 ^[1]	A549	Geranina Isolado do <i>Phyllanthus</i>	- 2,5µM; - 5, µM; - 10 µM;	- Inibição da proliferação com 30 µM, quando tratada por 48h. - Inibição do TGF-β1 - O fenótipo mesenquimatoso induzido por TGF-β1 foi suprimido pelas dosagens de 15

		<i>amarus</i>	-15 µM; -20 µM; -30 µM	µM e 20 µM - Aumento na expressão de e-caderina e supressão na expressão de n-caderina e vimentina
Zheng FJ et al, 2012	Tumor de células gigantes (TCG)	Polifenóis do chá	- 100 µg/ml; - 200 µg/ml; - 400 µg/ml; - 800 µg/ml	- Efeito inibitório na expressão de CD44 e CD54 – dose dependente. Grupo de 800 µg/ml (expressão CD44 86; CD54 13; Grupo de 400 µg/ml (expressão de CD44 92; CD54 20; Grupo de 200 µg/ml (expressão de CD44 108 e CD54 29; Grupo controle: expressão de CD44 148 e CD54 45. - Efeito inibitório na adesão celular das TCG para as células endoteliais Grupo de 800 µg/ml (taxa de adesão de 29,6% Grupo de 400 µg/ml (taxa de adesão de 30,4% Grupo de 200 µg/ml (taxa de adesão de 38% Grupo controle (s/ polifenol): taxa de adesão de 50%
Tseng HH et al, 2012	A549	PHY	-Até 100µg/ml	- Inibição da invasão e migração celular com concentração de 100µg/ml, efeito dose-dependente - Redução da atividade de MMP-2 e MMP-9 - 71% de inibição na dosagem 100µg/ml, efeito dose-dependente - Redução da atividade de u-PA-menos que 51,3% da atividade com dose 100µg/ml, efeito dose-dependente
Wang et al, 2013	A549	Resveratrol	- 10 µM; - 20 µM; - 40 µM	- Inibição da proliferação com 40 µM -Inibição da invasão, assim como migração com 20 µM - Inibição dos efeitos morfológicos do TGF-β1 *Concentração inferior a 10 µM as células A549 apresentaram fenótipo mesenquimatoso. Concentração de 20 µM e 40 µM apresentaram morfologia epitelial clássica. - Aumento do fenótipo epitelial através do marcador e-caderina, enquanto que os marcadores do fenótipo mesenquimatoso fibronectina e vimentina reprimidos em dosagem de 20 µM
Lee 2011	H, A549	Extrato de <i>Eklonia cava</i>	- 12,5 µg/ml; - 25 µg/ml; - 50 µg/ml	- Redução na migração de 24% em concentração de 12,5 µg/ml, 38% em 25 µg/ml e 65% quando 50 µg/ml - Inibição da invasão com 12,5 µg/ml, dose dependente - Inibição da ativação de MMP-2: inibição de 12% na concentração de 12,5 µg/ml; 31% em 25 µg/ml; 69% quando 50 µg/ml, quando comparados ao controle

Lee SH et al, 2011	A549	PHY	- 20 a 200g de extrato metanólico - 50 a 500g de extrato aquoso	Citotoxicidade: - Extrato metanólico maior citotoxicidade do que o aquoso - Inibição da invasão de 40-60% (200 µg/ml quando extrato metanólico e 500 µg/ml aquoso) - Inibição da migração, dose dependente (extrato metanólico 20-200 µg/ml e aquoso 50-500 µg/ml) * mesmo com a menor concentração – inibição maior que 20% - Aumento da atividade da caspase- 3 e 7
Deng YT et al, 2011	CL1-5	EGCG	- 5µM -10µM -20 µM -40 µM - 50 µM	- Sem efeito no apoptose, porém induziu atraso na fase G2/M do ciclo celular com doses acima de 20 µM - Redução da proliferação com doses maiores que 20 µM - Inibição da invasão e migração, dose mínima de 5 µM - Supressão de MMP-2 e MMP-9 acima de 20 µM, dose-dependente
Ganguly C, 2005	H460	TF, EGC, EC	- 100 µM	- Efeito anti-proliferativo: * Índice de proliferação no controle: 24,9%, * Índice de proliferação: 10,1% com TF, 9,2% com ECG e 12% com EGCG - Efeito na expressão de p53 * Controle: 15% da população celular * TF: 20% inicial e após aumentando para 30% EGG e ECG: 30%

EGC: Epigallocatequina-galato ; EGCG: Epigallocatequina-galato; KEM: Quempferol; PHY: *Phyllanthus*; TF: Teaflavonas

Tabela 2 – Avaliação do risco de viés dos estudos incluídos.

Estudo	Representatividade da amostra	Definição da condição apresentada	Avaliação da exposição	Avaliação do Desfecho	Taxa de não-resposta
Lim WC et al, 2017	0	1	1	1	1
Yamagata et al, 2017	0	1	1	1	1
Huang AF et al, 2016	0	1	1	1	1
Hang M et al, 2015	0	1	1	1	1
Shi J et al, 2015	0	1	1	1	1
Ko H, 2015	0	1	1	1	1
Zheng FJ et al, 2012	0	1	1	1	1
Tseng HH et al, 2012	0	1	1	1	1
Huang W et al, 2012	0	1	1	1	1
Lee H, 2011	0	1	1	1	1
Lee SH et al, 2011	0	1	1	1	1
Deng YT et al, 2011	0	1	1	1	1
Ganguly C, 2005	0	1	1	1	1

0: Não informado/ nenhum; 1: adequado

DISCUSSÃO

O câncer de pulmão é considerado a doença maligna mais comum e mais letal no mundo, sendo a metástase a maior responsável pelas causas de morte^{14, 15}. O presente estudo conduziu uma revisão sistemática sobre a influência dos polifenóis no desenvolvimento de metástase em linhagens celulares altamente metastáticas de câncer de pulmão. A metástase é um processo complexo que envolve diversos eventos, incluindo invasão, migração, adesão e proliferação celular. As metástases tumorais são o motivo de maior preocupação no tratamento do câncer^{7,16}. Dessa forma, são necessárias alternativas emergenciais para limitar seu desenvolvimento por meios seguros e eficientes. Na presente revisão, todos os tipos de polifenóis estudados apresentaram efeitos antimetastáticos nas células de câncer de pulmão, independentemente de suas linhagens celulares.

As ações das catequinas foram avaliadas em 4 dos estudos revisados. Dois deles avaliaram a EGCG^{17,18}. Um estudo¹⁹ avaliou a EGCG juntamente com ECG e TF, e por último Huang et al²⁰ que avaliaram o efeito da EGC. Todos esses estudos apresentaram efeitos inibitórios na proliferação, invasão e migração celular após 48h, dose-

dependente, com dosagem mínima de 10 μM ¹⁷. Mecanismos mais específicos envolvidos na TEM como inibição do TGF- β ¹²⁰, supressão de MMP-2^{20,18} e MMP-9¹⁸, foram observados também com doses mínimas de 10 μM em células altamente invasivas CL1-5¹⁸ e A549²⁰, e efeito máximo com dose de 20 μM e 50 μM , respectivamente. As catequinas também demonstraram efeito na expressão gênica do p53, das quais EGCG e ECG demonstraram maior expressão com positividade celular de 30%, quando comparadas ao grupo controle 15% de positivos.¹⁹. Na presente revisão, os efeitos do *Phyllanthus* foram avaliados em três estudos, com a mesma linhagem celular^{21, 22, 23}. Efeito máximo na redução da inibição e invasão celular foi observado com 100 $\mu\text{g/ml}$ ²¹. No estudo de Lee et al²², mesmo com a menor concentração (20 $\mu\text{g/ml}$) foi observada inibição de mais de 20% da migração celular, quando se trata do extrato aquoso, já que o autor separa as duas formas. Efeitos específicos também foram avaliados e demonstrados na utilização desses polifenóis na regulação de enzimas e marcadores da atividade tumoral, como MMP-2 e MMP-9, u-PA, LDH, caspase-3 e 7. No trabalho de Ko H et al²³, foi utilizado um composto isolado do *Phyllanthus* (geranina) a qual além da inibição da proliferação também teve papel na cascata metastática, inibindo o TGF- β 1, com dosagens de 30 μM . Além disso, avaliou o fenótipo mesenquimatoso, a qual foi suprimido com dosagens mínimas de 15 μM , e aumento de e-caderina e supressão da vimentina, ambos envolvidos na TEM.

Outros tipos de polifenóis, dioscina, quempferol, ácido clorogênico e resveratrol também foram encontrados nos demais estudos^{24,25, 26, 27, 28} com efeitos antimetastáticos similares envolvidos na TEM. Em todos eles, houve redução na migração, invasão, proliferação, com doses variadas de acordo com o tipo de polifenol, independente da linhagem celular. Efeitos como bloqueio na diminuição da e-caderina (marcador de fenótipo epitelial) e supressão da n-caderina foi demonstrado com o tratamento de dioscina²⁵, quempferol²⁶ e resveratrol²⁸, além da diminuição da vimentina (marcador do fenótipo mesenquimatoso) encontrada em linhagens A549 tratadas com quempferol²⁶. Recentemente, Yamagata K et al²⁷ também avaliaram a expressão de genes específicos envolvidos na apoptose celular: BCL2 (anti-apoptótico), BAX (pró-apoptótico) e CASP3 (via comum final de quase todas as vias apoptóticas), em que foi encontrada redução de BCL-2, indução da BAX e aumento da CASP-3, com efeito dose-dependente.

Todos os estudos avaliados apresentaram resultados de possíveis efeitos antimetastáticos. Todavia, pode ser entendido como viés o fato de inexistir quaisquer estudos com comparação entre diferentes substâncias com a mesma população celular, assim como diferentes populações celulares para única substância com caráter polifenol. Faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que comparem os diferentes compostos, com dosagens similares em amostras celulares idênticas para a identificação de quais possíveis terapias podem ser extrapoladas para modelos in vivo com real capacidade de prover melhores tratamentos. Também é interessante que as comparações devam ser analisadas com número de células similares a fim de evitar vieses futuros. O fato das metodologias utilizadas serem díspares nos diferentes protocolos dos estudos também pode indicar possíveis vieses na extrapolação dos resultados. De acordo com a avaliação da qualidade dos artigos, a amostra não foi considerada representativa, pois todos os estudos utilizaram apenas uma linhagem celular altamente metastática.

Na presente revisão encontram-se algumas limitações, das quais pode-se destacar a não inclusão de estudos em animais, mesmo com demonstrações prévias de possíveis benefícios em alguns trabalhos^{29,30,31,32}.

Entretanto, as linhagens celulares, de uma forma geral, podem auxiliar na descoberta de mecanismos em pesquisas experimentais e observacionais. Embora os modelos animais ajudem a entender a progressão, não ilustram o mecanismo molecular causador do processo. Os modelos celulares podem ser úteis na identificação de biomarcadores e alvos terapêuticos, e posteriormente devem ser utilizados para desenvolvimento de novas terapias³³.

Em conclusão, e de acordo com as evidências disponíveis, a relação dos polifenóis com o câncer de pulmão metastático parece existir, muito embora com estudos limitados tanto em relação aos polifenóis quanto às linhagens celulares. Pesquisas adicionais devem ser realizadas para explorar a influência desses compostos na metástase do câncer de pulmão. Apesar das limitações, a descrição dos resultados da presente revisão oferece um eixo para futuras pesquisas em nutrição oncológica e ajudará pesquisadores interessados em investigar o tema a desenvolver suas hipóteses.

CONCLUSÃO

Em suma, há relação dos polifenóis com o processo de metastatização do câncer de pulmão. Entretanto, os estudos existentes possuem limitações importantes. Pesquisas adicionais devem ser realizadas para explorar a influência desses compostos na cascata metastática das neoplasias de pulmão. A presente revisão dos estudos em linhagens celulares pode servir como alicerce para futuras pesquisas e novas estratégias terapêuticas na área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012
2. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumor invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007;449:682-688.
3. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119:1420-8.
4. Xie D, Gore C, Liu J, et al. Role of DAB2IP in modulation epithelial-to-mesenchymal transition and prostate cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:2485-2490.
5. Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (mmp-2) and mmp-9 in pulmonary pathology. 2005; (31): 599–621.
6. Ko H. Geraniin inhibits TGF- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition and suppresses A549 lung cancer migration, invasion and anoikis resistance. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 25 (2015) 3529–3534

7. Xia SH, Wang J, Kang JX. Decreased n-6/n-3 fatty acid reduces the invasive potential of human lung cancer cells by downregulation of cell adhesion/invasion-related genes. *Carcinogenesis* 2005 (26):779-784.
8. Amararathna M, Johnston MR, Rupasinghe HPV. Plantpolyphenols as chemopreventive agentes for lungcancer..*Int j Mol Sci.* 2016:(17):1352
9. Cochrane Higgins JPT, Green S (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0 [updated March 2011].* The Cochrane Collaboration, 2011. Available from <http://handbook.cochrane.org>.
10. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLos Med.* 2009;6(7):e000097. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19621072>.
11. Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Diretrizes metodológicas: Elaboração de Revisão Sistemática e Metanálise de estudos observacionais comparativos sobre fatores de risco e prognóstico. Brasília: MS; 2014.
12. Wells GA, Shea B, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses. [Cited in 2009 Oct 19]. 1996-2006. Available from: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp
13. Flynn D, Knoedler MA, Hess EP, Murad MH, Erwin PJ, Montori VM, et al. Engaging patients in health care decisions in the emergency department through shared decision-making: a systematic review. *Acad Emerg Med.* 2015;19(8):959-67.
14. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M. et al. *Int. J. Cancer.* 2015 (136); E359–E386.
15. Lim WC, Kim H, Kim YJ, Choi KC, Lee IH, Lee KH et al. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.* 2017 (27); 3342-3348.

16. Random BE, Roger T, Teneng I, Zhao M, Al-Abed Y. Regulation of human lung adenocarcinoma cell migration and invasion by macrophage migration inhibitory factor. *K Biol Chem.* 2007 (282); 29910-29918
17. Shi J, Liu F, Zhang W, Liu X, Lin B, Tang X. Epigallocatechin-3-gallate inhibits nicotine-induced migration and invasion by the suppression of angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports* 2015;33:2972-2980.
18. Deng YT, Lin JK. EGCG inhibits the invasion of highly invasive CL1-5 lung cancer cells through suppressing MMP-2 expression via JNK signaling and induces G2/M arrest. *J Agric Food Chem* 2011;59:13318-27.
19. Ganguly C, Saha P, Panda CK, Das S. Inhibition of growth, induction of apoptosis and alteration of gene expression. By tea polyphenols in the highly metastatic human lung cancer cell line NCI – H460. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2006;6:326-31
20. Huang SF, Horng CT, Hsieh YS, Hsieh YH, Chu SC, Chen PN. Epicatechin-3-gallate reverses TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits cell invasion and protease activities in human lung cancer cells. *Food and chemical toxicology.* 2016; 94: 1-10
21. Tseng HH, Chen PN, Kuo WH, Wang JW, Chu S, Hsieh YS. Antimetastatic potentials of *Phyllanthus urinaria* L on A549 and Lewis Lung Carcinoma Cells via Repression of matrix-degrading proteases. *Integrative Cancer Therapies.* 2012;3:267078.
22. Lee SH, Jaganath IB, Wang SM, Sekaran SD. Antimetastatic effects of *Phyllanthus* on human lung (A549) and breast (MCF-7) cancer cell lines. *Plos One* 2011;6(6):e20994.
23. Ko H. Geraniin inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and suppresses A549 lung cancer migration, invasion and anoikis resistance. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015;1(17):3529-34.

24. Zeng FJ, Shi L, Tang J, Deng XH, Wu YQ. Effect of tea polyphenols on the adhesion of highly metastatic human lung carcinoma cell lines to endothelial cells in vitro. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2012;13:1351-55
25. Lim WC, Kim H, Kim YJ, Choi KC, Lee IH, Lee KH et al. Dioscin suppresses TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and suppresses A549 lung cancer migration and invasion. *Bioorg Med Chem Lett*.2017;1(15):3342-48.
26. Hang M, Zhao F, Chen SB, Sun O, Zhang CX. Kaempferol modulates the metastasis of human non-small cell lung cancer cells by inhibiting epithelial-mesenchymal transition. *Bangladesh J Pharmacol*. 2015; 10: 267-270
27. Yamagata K, Izawa Y, Onodera D, Tagami M. Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene expression in A549 human lung cancer cells. *Mol Cell Biochem*. 2017;5:1-11.
28. Wang H, Zhang H, Tang L, Chen H, Wu C, Zhao M et al. Resveratrol inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses lung cancer invasion and metastasis. *Toxicology* 2013; 303: 139–146
29. Rajendran P, Rengarajan T, Nishigaki I, Ekambaram G, Sakthisekaran D. Potent chemopreventive effect of mangiferin on lung carcinogenesis in experimental Swiss albino mice. *J Cancer Res Ther*. 2014;10(4):1033-9.
30. Banerjee S, Manna S, Mukherjee S, Pal D, Panda CK, Das S. Black tea polyphenols restrict benzopyrene-induced mouse lung cancer progression through inhibition of Cox-2 and induction of caspase-3 expression. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2006;7(4):661-6.
31. Yang G, Wang ZY, Kim S, Liao J, Seril DN, Chen X, Smith TI, Yang CS. Characterization of early pulmonary hyperproliferation and tumor progression and their inhibition by black tea in a 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)1-butanone induced lung tumorigenesis model with A/J mice. *Cancer Res* 1997;57:1889-94.

32. Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H. Protective effects of green tea polyphenols administered by oral intubation against chemical carcinogen-induced forestomach and pulmonary neoplasia in A/J mice . *Cancer Cancer Letters* 73 (1993) 167- 71.

33. Raju L, Augustine D, Rao RS, Sowmya SV, Haragannavar VC , Nambiar S et al. Biomarkers in tumorigenesis using cancer cell lines: a systemativ review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18(9):2329-37.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Entre as perspectivas futuras pode-se destacar a continuação da análise estatística dos resultados advindos dos estudos presentes nesta revisão, bem como conduzir nova revisão sistemática avaliando a mesma questão de pesquisa em populações animais.