MARISTELA PERES RANGEL

**Relevância dos proteoglicanos como biomarcadores
prognósticos e preditivos em carcinomas não-pequenas células e seu impacto na
carcinogênese pulmonar**

**Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências**

Programa de: Patologia

**Orientador: Prof^a Dra. Vera Luiza
Capelozzi**

São Paulo

2016

MARISTELA PERES RANGEL

**Relevância dos proteoglicanos como biomarcadores
prognósticos e preditivos em carcinomas não-pequenas células e seu impacto na
carcinogênese pulmonar**

**Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências**

Programa de: Patologia

**Orientador: Prof^a Dra. Vera Luiza
Capelozzi**

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rangel, Maristela Peres

Relevância dos proteoglicanos como biomarcadores prognósticos e preditivos em
carcinomas não-pequenas células e seu impacto na carcinogênese pulmonar /
Maristela Peres Rangel. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Descritores: 1.Neoplasias pulmonares 2.Ácido hialurônico 3.Proteoglicanas
4.Escarro 5.Matriz extracelular 6.Rastreamento 7.Diagnóstico 8.Sobrevida
9.Prognóstico

USP/FM/DBD-377/16

Dedico este trabalho aos meus pais,
que nunca deixaram de acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta tese foi extremamente trabalhoso, cheio de angústias e dificuldades (e ainda assim, maravilhoso). E que seria impossível de finalizar não fosse a grande rede de pessoas a minha volta me apoiando em todos os momentos.

Em primeiro lugar tenho que agradecer a Deus. Que cuida de mim nos mínimos detalhes, me mostrando o caminho a seguir. Um amor que vale mais do que tudo. Sem Ele esse processo todo seria incomparavelmente mais difícil.

Agradeço aos meus pais, Sinésio e Roseli, por terem confiado e acreditarem em mim e por me apoiarem, sempre. Obrigada por ser esse exemplo que vocês são. Se eu cheguei aqui hoje foi por causa de vocês. Amo.

Aos meus irmãos, Carol e João. Obrigada por serem meus melhores amigos. Sempre me fazem rir e, quando preciso, me dão colo pra chorar. Não vivo sem vocês. Caio, obrigada por ser o cunhado/irmão melhor que tem.

À Prof^a Vera Capelozzi por ter aberto tantas portas para mim, por ter sido compreensiva nos momentos difíceis e por estar sempre disponível! Quero muito continuar aprendendo a ser generosa, paciente e, principalmente, humilde como você. Obrigada por tudo! Você é um GRANDE exemplo!

Aos amigos do laboratório, Edwin Parra, Natália Colombo, Tabatha Prieto e Vanessa Martins pela amizade, conversas, apoio e inúmeras risadas no laboratório. Agradeço também à Thiago Rezende por todo o suporte administrativo e a todos do programa de pós-graduação em Patologia.

A todos da Disciplina de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pela oportunidade e colaboração do Prof Dr. João Roberto Maciel Martins. Admiro muito sua competência e excelência no que faz.

À Eloisa Olivieri e ao departamento de pesquisa do Hospital AC Camargo pela colaboração.

Ao Dr. José Elias Miziara, Dr. Carlos Maciel da Silva, Dra Tereza Takagaki e Dr. Rodolfo Milani pela permissão para incluir seus pacientes neste estudo.

Aos pesquisadores Rui Reis e Adhemar Longatto por abrirem as portas do Hospital de Câncer de Barretos (HCB) para o andamento dessa pesquisa.

Aos colegas de área do Mackenzie, por me darem suporte e apoio quando precisei de tempo extra para finalizar esta tese. Adriana, Edilson, Pedro, Priscila e Alcides, MUITO OBRIGADA! Não poderia trabalhar com equipe melhor!! Agradeço também à Lilian Gráballos e Andrea Fanton pela compreensão e suporte em tantas situações.

À FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro de toda pesquisa.

E como não poderia deixar de ser, agradeço aos pacientes e voluntários que sem hesitar consentiram em participar deste estudo.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes”

Cora Coralina

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de biblioteca e documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de biblioteca e documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Câncer de pulmão - Incidência e mortalidade.....	1
1.2 Tipos histológicos.....	2
1.3 Causas principais e fatores de risco.....	2
1.4 Quebra dos mecanismos de defesa e transformação neoplásica.....	4
1.5 Microambiente neoplásico.....	6
1.6 Condroitim sulfato e seus Proteoglicanos.....	7
1.7 Heparan sulfato e seus proteoglicanos.....	8
1.8 Prevenção, screening e diagnóstico do Câncer de Pulmão.....	11
2. HIPÓTESE.....	16
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Gerais.....	17
3.2 Específicos.....	17
4. MÉTODOS.....	19
4.1 Casuística (Tecidos).....	19
4.2 Microscopia Óptica.....	20
4.3 Casuística (escarro).....	20
4.4 Coleta das amostras de escarro.....	22
4.5 Imuno-histoquímica e Imunofluorescência.....	24
4.6 Ensaios para análise da expressão dos GAGs sulfatados.....	26
4.7 Ensaio de Biologia Molecular para análise da expressão dos PGs	30
4.8 Dosagem da concentração de solCD44 e cofilina-1 no escarro dos pacientes com CP.....	32
4.9 Tabulação dos dados e análise estatística.....	33

5. RESULTADOS.....	35
5.1 Pacientes selecionados para amostras de tecido: características demográficas.....	36
5.2 Características de expressão imunohistoquímica do ácido hialurônico (AH) nas amostras.....	38
5.3 Análise semi-quantitativa dos GAGs sulfatados: condroitim sulfato e heparam sulfato.....	41
5.4 Características da expressão gênica dos proteoglicanos no tecido neoplásico pulmonar e no tecido normal.....	43
5.5 Características de expressão imuno-histoquímica dos proteoglicanos biglicam, perlecan e versican.....	47
5.6 Associação entre expressão gênica e proteica.....	50
5.7 Associação dos proteoglicanos com a sobrevida global.....	51
5.8 Pacientes selecionados para amostras de escarro: características demográficas.....	56
5.9 Análise dos níveis de cofilina-1 no escarro	60
5.10 Análise dos níveis de solCD44 no escarro	61
5.11 Análises de Curva ROC.....	63
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÕES.....	82
8. ANEXOS.....	83
9. REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICE	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Amostras de cada um dos tipos histológicos encontrados nos casos selecionados e reclassificados segundo Travis (2011). A e B – Adenocarcinoma acinar; C e D – Adenocarcinoma Papilífero; E e F – Adenocarcinoma In Situ; G e H – Carcinoma de células escamosas clássico; I e J – Carcinoma de Grandes Células. Imagens à esquerda: aumento de 200X. À direita: 400X.....	21
Figura 2. Separação macroscópica do escarro e da saliva sobre placa de Petri com o auxílio de agulha seguida de armazenamento em microtubo eppendorf para congelamento.....	23
Figura 3. Diagrama demonstrando a posição das amostras em gel PDA para corrida em eletroforese.....	28
Figura 4. Todas as lâminas obtidas a partir da eletroforese mostrando o padrão de expressão dos GAGs sulfatados de cada uma das amostras.....	29
Figura 5. Espécimes histológicos do pulmão normal, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e grandes células corados respectivamente por hematoxilina e eosina (A, E, I, M); imuno-histoquímica para HA (B, F, J, N); imuno-histoquímica para microvasos (C, G, K, O) e imunofluorescência para co-localização do HA e microvasos no microscópio confocal (D, H, L, P).....	39
Figura 6. Diferença na concentração de heparam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco) em espécimes tumorais e não tumorais ($p=0.02$).....	41
Figura 7. Diferença na concentração de heparam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco) em adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas ($p=0.02$).....	42
Figura 8. Eletroforese em gel PDA mostrando o padrão semi-quantitativo dos glicosaminoglicanos sulfatados em um padrão, amostras tumorais e não tumorais (CS – condroitim sulfato / DS – dermatan sulfato / HS – heparam sulfato)($p<0.01$).....	42

Figura 9. Diferenças nos níveis de proteoglicanos presentes no tecido tumoral e no parênquima adjacente não tumoral. (Escala Log10).....	44
Figura 10. Espécimes histológicos do pulmão normal e do estroma tumoral corados respectivamente por imuno-histoquímica para biglicam (A, D, G); imuno-histoquímica para perlecan (B, E, H) e imuno-histoquímica para versicam (C, F, I).....	48
Figura 11. Curvas de sobrevivência geradas pelo método de análise de sobrevivência de Kaplan Meyer. Log Rank e valores de significância encontram-se na tabela 10.....	53
Figura 12. A. Diferença na concentração de cofilina-1 (pg/mL) presente no escarro de cada um dos grupos estudados ($p=0.01$). B. Diferença na concentração de solCD44 (pg/mL) presente no escarro de cada um dos grupos estudados ($p=0.01$).....	62
Figura 13. Curvas ROC representando a habilidade diagnóstica da dosagem da cofilina-1 no escarro para (A) diferenciar pacientes com câncer de pessoas saudáveis. Área = 0.78. e (B) para diferenciar pacientes com câncer de pacientes com alto risco. Área = 0.69.....	64
Figura 14. Curva ROC representando a habilidade diagnóstica da dosagem do solCD44 no escarro para diferenciar pacientes com câncer de pacientes com alto risco. Área = 0.67.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. (anexo 1) Características demográficas dos 142 pacientes selecionados no hospital AC Camargo para a coleta de amostras de tecido.....	83
Tabela 02. (anexo 2) Dados demográficos dos 73 pacientes portadores de carcinomas de pulmão selecionados no ICESP e no HCB para a coleta de escarro.....	89
Tabela 03. (anexo 3) Dados demográficos dos 13 pacientes portadores de DPOC selecionados no HC-FMUSP para o grupo de alto risco.....	92
Tabela 04. (anexo 4) Dados demográficos dos 8 pacientes sem histórico de doença pulmonar crônica selecionados no HC-FMUSP para o grupo controle.....	93
Tabela 05. (anexo 5) Critérios de inclusão e exclusão para cada um dos grupos selecionados para a coleta de escarro.....	94
Tabela 06. Características demográficas dos 142 pacientes quanto ao sexo, idade, localização do tumor, estadiamento, tabagismo e sobrevida.....	36
Tabela 07. Análise imuno-histoquímica e distribuição do AH e da densidade de microvasos em células tumorais, do estroma e em tecido normal estratificados de acordo com o tipo histológico.....	40
Tabela 08. Diferenças nos níveis de proteoglicanos presentes no tecido tumoral e no parênquima adjacente não tumoral.....	43
Tabela 09. Associações entre os proteoglicanos presentes no tecido tumoral de pacientes com câncer de pulmão.....	45
Tabela 10. Associações entre as características clinico-patológicas e a expressão gênica dos proteoglicanos avaliados em 96 pacientes com câncer de pulmão.....	46
Tabela 11. Diferenças na expressão proteica dos proteoglicanos presente no estroma tumoral e no parênquima não tumoral adjacente.....	49

Tabela 12. Associação entre a expressão gênica e proteica dos proteoglicanos no tecido tumoral.....	50
Tabela 13. Análise de sobrevida com estratificação binária em alto e baixo das variáveis pelo método de Kaplan–Meier e as diferenças demonstradas pelo teste de Log-Rank.....	52
Tabela 14. Análise de recidiva com estratificação binária em alto e baixo das variáveis pelo método de Kaplan–Meier e as diferenças demonstradas pelo teste de Log-Rank.....	54
Tabela 15. Análise de sobrevida pelo modelo de risco proporcional de Cox (Chi-Square=38,121, $p<0.01$).....	55
Tabela 16. Características demográficas dos 73 pacientes selecionados para coleta de escarro quanto ao sexo, idade, localização do tumor, estadiamento, tabagismo e sobrevida.....	58
Tabela 17. Características demográficas dos 13 pacientes portadores de DPOC quanto à idade, sexo e tabagismo.....	59
Tabela 18. Características demográficas dos 8 voluntários saudáveis quanto à idade, sexo e tabagismo.....	59
Tabela 19. Análise descritiva dos valores de Cofilina-1 presente no escarro dos grupos selecionados (pg/mL).....	60
Tabela 20. Análise descritiva dos valores de solCD44 presente no escarro dos grupos selecionados (pg/mL).....	61
Tabela 21 (anexo 8) Valores de ponto de corte para dosagem de cofilina-1 no escarro com suas respectivas proporções de sensibilidade e especificidade referente à curva ROC entre amostras saudáveis e amostras de pacientes com câncer.....	101
Tabela 22 (anexo 9) Valores de ponto de corte para dosagem de cofilina-1 no escarro com suas respectivas proporções de sensibilidade e especificidade	

referente à curva ROC entre amostras de pacientes de risco e amostras de pacientes com câncer.103

Tabela 23 (anexo 10) Valores de ponto de corte para dosagem de **solCD44** no escarro com suas respectivas proporções de sensibilidade e especificidade referente à curva ROC entre amostras de pacientes de risco e amostras de pacientes com câncer.106

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AH - Ácido Hialurônico

CD34 – Marcador de células endoteliais

CP – Câncer de pulmão

CSPGs – Proteoglicanos de Condroitim Sulfato

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

ed. - edição

ELISA – Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay

et al. - e outros

EUA – Estados Unidos da América

Fig. - Figura

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

GAGs - Glicosaminoglicanos

HAS - Ácido Hialurônico Sintase

HCB – Hospital de Câncer de Barretos

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HSPGs – Proteoglicanos de heparam sulfato

ICESP – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

INCA – Instituto Nacional de Câncer

MEC - Matriz Extracelular

µg/g – Microgramas por grama

NSCLC - Carcinoma de Pulmão Não Pequenas Células

OMS / WHO – Organização Mundial de Saúde / World Health Organization

PDA – 1,2 diaminopropano

PG – Proteoglicanos

pg/mg – picogramas por miligramas

solCD44 – CD44 solúvel

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

qRT-PCR – Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction

RESUMO

Rangel MP. *Relevância dos proteoglicanos como biomarcadores prognósticos e preditivos em carcinomas não-pequenas células e seu impacto na carcinogênese pulmonar* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução. Os glicosaminoglicanos e os proteoglicanos são moléculas abundantes na matriz extracelular. Vários estudos têm demonstrado que uma produção ou degradação aberrante dessas moléculas tem influência no comportamento do câncer de mama, cólon e pâncreas. Outras proteínas como o solCD44 e a cofilina-1 também tem demonstrado influência direta na progressão dos tumores. Desta forma, a análise da expressão destas moléculas em tecidos e fluidos corporais tem despertado grande interesse como rastreador de indivíduos de alto risco e marcador diagnóstico e/ou prognóstico da doença. **Objetivos.** Conhecer o impacto do ácido hialurônico e dos proteoglicanos (biglicam, glipicam, perlecam, sindecam e versicam) na carcinogênese bem como seu impacto na sobrevida dos pacientes; verificar se a concentração de solCD44 e cofilina-1 presente no escarro de pacientes com câncer de pulmão permite rastreá-los entre pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e voluntários saudáveis. **Resultados.** Uma associação significativa direta foi encontrada entre os tumores com alto percentual de expressão de AH e de microvasos no estroma tumoral. As concentrações de heparam e condroitim sulfato nas amostras tumorais foram mais elevadas quando comparadas às amostras não tumorais. Com exceção do sindecam, todos os outros proteoglicanos apresentaram uma expressão gênica significativamente menor nos tecidos tumorais e biglicam e versicam apresentaram associações com as características clínico patológicas. A expressão proteica de biglicam, perlecam e versicam foi significativamente maior no tecido normal do que nas áreas de estroma tumoral e de células tumorais. Pela análise de regressão de COX controlada para idade, tipo histológico e expressão gênica de biglicam, sindecam e glipicam obtiveram alta taxa de sobrevida os pacientes do sexo feminino com elevada expressão gênica de perlecam e menor risco de óbito em estadio T1, ausência de metástases nodais e expressão gênica de versicam. A

concentração de cofilina demonstrou-se mais elevada no escarro de pacientes com câncer de pulmão quando comparado ao escarro de pacientes de alto risco e de voluntários saudáveis. A concentração de solCD44 também demonstrou-se mais elevada no escarro de pacientes com câncer de pulmão quando comparado ao escarro de pacientes de alto risco e de voluntários saudáveis. Através da curva ROC, a cofilina-1 presente no escarro foi capaz de distinguir os pacientes de alto risco dos pacientes com câncer de pulmão com área abaixo da curva de 0.69 e com um ponto de corte de 802.5 pg/mL a curva apresentou 60% de sensibilidade e 54% de especificidade. O solCD44 presente no escarro também foi capaz de distinguir os pacientes de alto risco dos pacientes com câncer de pulmão através da curva ROC com área abaixo da curva de 0.67 e com um ponto de corte de 65.8 pg/mL a curva apresentou 50% de sensibilidade e 84% de especificidade.

Conclusão. A expressão do ácido hialurônico demonstrou ter correlação no processo de crescimento tumoral através da angiogênese. A análise biomolecular apontou a diminuição dos proteoglicanos no tecido tumoral e, portanto, estes podem ser potenciais biomarcadores prognósticos de câncer de pulmão. As análises feitas em escarro demonstraram que a elevada expressão proteica de solCD44 e da cofilina-1 no escarro nos pacientes com câncer de pulmão mostram-se como promissores alvos de detecção do CP.

Descritores: Neoplasias pulmonares; ácido hialurônico; proteoglicanas; escarro; matriz extracelular; rastreamento; diagnóstico; sobrevida; prognóstico.

ABSTRACT

Rangel MP. *Clinical relevance of matrix proteoglycans as predictors of lung cancer patients outcome* [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

Introduction. The relationship between the extracellular matrix (ECM) components and cancer cells have an important role on cancer development and progression. Between the most important molecules present on the ECM are the glycosaminoglycans and their respective proteoglycans. Studies have reported that they have different behaviours when in the presence of malignant tissues and influence the development of breast, pancreas and colon cancers. Likewise, proteins as solCD44 and cofilin-1 also have shown direct influence in tumor progression. Regarding that, there is growing interest among scientists in analyzing the expression of these molecules in body fluids as a screening tool of high risk patients and as a diagnostic and prognostic lung cancer biomarker. **Objectives.** The aims of this study were to recognize the impact of hyaluronan and the proteoglycans (biglycan, glypican, perlecan, syndecan e versican) on lung cancer carcinogenesis as well as its impact on patient's survival; verify if the solCD44 e cofilina-1 concentrations in the sputum of lung cancer patients could distinguish them from patients with COPD and healthy volunteers. **Results.** A direct association was found between tumors expressing high amounts of hyaluronan and CD34 in tumoral stroma. Heparan and chondroitin sulphate concentrations were higher in tumor specimens when compared to normal lung tissue. All proteoglycans, in exception of syndecan, showed a lower expression in tumoral tissue and biglycan and versican showed association with the clinical pathological features. Protein expression of biglycan, perlecan and versican was higher in the normal tissue when compared to stroma and tumoral cells. COX regression controlled by age, histological types and gene expression of biglycan, syndecan e glypican demonstrated that female patients had higher survival rates with high gene expression of perlecan and the patients with T1 stage, lack of linfonode

metastasis and gene expression of versican had lower risk of death. Cofilin-1 concentration was higher in the sputum of lung cancer patients when compared to a high risk group and healthy volunteers. Also, the solCD44 concentration was higher in the sputum of lung cancer patients when compared to a high risk group and healthy volunteers. ROC curve analysis demonstrated that sputum cofilin-1 was capable to distinguish high risk patients from lung cancer patients with an area under the curve of 0.69 and with a cut off at 802.5 pg/mL the curve presented 60% sensitivity and 54% specificity. Sputum solCD44 was also capable to distinguish high risk patients from lung cancer patients with an area under the curve of 0.67 and with a cut off at 65.8 pg/mL the curve presented 50% sensitivity and 84% specificity. **Conclusions.** Hyaluronan expression showed a correlation with tumoral growth through angiogenesis processes. The biomolecular analysis demonstrated that matrix proteoglycans are potential lung cancer prognostic biomarkers. Sputum analyses showed that solCD44 and cofilin-1 are potential molecules in lung cancer detection.

Descriptors: lung neoplasms; hyaluronic acid; proteoglycans; sputum; extracellular matrix; mass screening; diagnosis; survivorship; prognosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de pulmão - Incidência e mortalidade

Ao contrário de outras neoplasias, o câncer de pulmão é o maior causador de mortes no mundo. A mais recente estimativa apontou uma incidência de 1,82 milhões de casos novos de câncer de pulmão no mundo para o ano de 2012, representando 12,9% de todos os novos casos de câncer. No Brasil, no ano de 2016, estimam-se 17.330 casos novos de câncer de pulmão em homens e 10.890 em mulheres (INCA, 2015). Em relação à mortalidade, entre os anos de 2008 e 2012, o câncer de pulmão foi responsável por 15.3 óbitos/100.000 homens e 7.6 óbitos/100.000 mulheres no mundo. No Brasil, no mesmo período, a doença levou a óbito 12.8 homens/100.000 e 6.3 mulheres/100.000 (INCA, 2014). No estado do RJ a taxa de mortalidade por câncer de pulmão em mulheres no ano de 2012 foi de 11.7/100.000 (INCA, 2014). No mesmo estado, segundo o atlas da violência de 2016 (IPEA 2016), a taxa de mortalidade por homicídios entre mulheres foi de 4.6/100.000 ressaltando a relevância da mortalidade causada por câncer de pulmão.

A alta mortalidade da doença está intimamente relacionada com o fato de que na maioria dos casos ela é diagnosticada em estágios avançados quando as opções de tratamento que restam são somente paliativas (Wistuba e Gazdar, 2006).

1.2 Tipos histológicos

O câncer de pulmão se apresenta sob diversas formas histológicas entre eles os carcinomas de pequenas células e os carcinomas não pequenas células (NSCLC) sendo este último o principal tipo. Esse tipo de neoplasia pulmonar é caracterizada por achados clínicos bem heterogêneos, mas que se assemelham segundo suas origens celulares e moleculares (Brundage *et al.*, 2002). A classificação como NSCLC abrange os adenocarcinomas, os carcinomas escamosos e os carcinomas de grandes células. Esses tipos de carcinomas são classificados juntos, pois seu diagnóstico, estadiamento, prognóstico e tratamento são similares (NCI 2007). A partir de dados obtidos em séries publicadas sobre Incidência de Câncer de Pulmão em 5 Continentes, carcinomas de pequenas células compreendem 20% dos casos e carcinomas indiferenciados/carcinomas de grandes células em torno de 9%. Para outros tipos histológicos, a proporção difere entre os sexos: carcinomas de células escamosas compreendem 44% dos cânceres em homens, e 25% nas mulheres, enquanto adenocarcinomas compreendem 28% dos casos em homens e 42% em mulheres (Travis *et al.*, 2004).

1.3 Causas principais e fatores de risco

O câncer de pulmão inicia seu desenvolvimento a partir da exposição a fatores ambientais carcinogênicos que causam as primeiras mutações nas células. Dentre os mais diversos fatores, o tabaco é considerado o principal fator carcinogênico quando se trata de câncer de pulmão. Oitenta por cento dos homens e 75% das

mulheres que morrem em decorrência dessa neoplasia têm sua doença associada ao fumo. Na maioria das populações, os casos de câncer do pulmão tabaco relacionados representam 80% ou mais dos casos desse câncer e quando comparados com os “não fumantes”, os tabagistas têm cerca de 20 a 30 vezes mais risco de desenvolver câncer do pulmão (INCA, 2011). Além do tabaco, ainda podemos destacar outros fatores que contribuem para o aumento na incidência do câncer de pulmão, tais como exposição a fibras de asbestos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos derivados da poluição atmosférica, radônio, cromo, níquel entre outros agentes irritantes.

A exposição aos fatores ambientais tem grande influência na incidência do câncer de pulmão, entretanto o risco de desenvolver a doença também está relacionado com a susceptibilidade do indivíduo a esses agentes ambientais. Essa susceptibilidade é que determina a extensão das lesões genéticas causadas pela exposição aos agentes ambientais e o tempo decorrido desde a exposição até a ocorrência das lesões (Alberg e Samet, 2007). No caso do câncer de pulmão, já se sabe que no momento que a doença já esta clinicamente detectável, já ocorreram uma série de 10 a 20 lesões genéticas. Essas lesões podem ocorrer tanto em proto-oncogenes recessivos (3p14/21/24-25; 5q; 9p; 11p13/15; Rb gene; p53 gene) quanto em genes dominantes (*Myc*, *ERBB* and *Ras* families and Her2/neu gene) (Minna, 1993).

1.4 Mecanismos de transformação neoplásica

De forma geral, assim como as outras neoplasias, o desenvolvimento do câncer de pulmão (CP) é resultado de um acúmulo de modificações genéticas e epigenéticas e geralmente essas neoplasias ocorrem após uma série de modificações patológicas da mucosa respiratória conhecidas como pré-neoplásicas ou lesões pré-malignas (Wistuba e Gazdar, 2006).

A exposição aos agentes ambientais, em geral, leva a uma irritação aguda ou crônica da mucosa, além do dano genético e isso, com o passar do tempo, acarreta em diversas transformações do epitélio cilíndrico ciliado mucoso que reveste o pulmão. Outras alterações genéticas ocorrem e são concomitantes com as modificações no epitélio que passa por uma hiperplasia, depois começa a se tornar mais resistente, queratinizado, desenvolvendo um processo chamado de metaplasia escamosa. Com esse processo, o epitélio perde a capacidade de aderir o material inalado ao muco, deixando a mucosa respiratória mais interna cada vez mais exposta. Sendo assim, se o estímulo promotor persistir, as células metaplásicas se tornam imaturas e dão origem a displasia escamosa e, por fim, ao carcinoma *in situ*. Já os adenocarcinomas demonstram ser precedidos por uma hiperplasia adenomatosa atípica que se inicia como uma lesão parenquimatosa discreta nos alvéolos próximos aos bronquíolos. Essa hiperplasia pode se transformar num carcinoma bronquioloalveolar que se caracteriza pelo crescimento de células neoplásicas ao redor das estruturas alveolares

preexistentes podendo acarretar, posteriormente, num adenocarcinoma invasivo (Colby *et al.*, 1998; Wistuba *et al.*, 2002).

Em meio a este cenário, diversos grupos de pesquisa têm investido a fundo na procura de marcadores moleculares e imunohistoquímicos e no desenvolvimento de novas técnicas que possam auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento dos diversos tipos de cânceres e principalmente do CP (Ichinose *et al.*, 1995). Além disso, a criação de um sistema de classificação internacional padrão e os recentes avanços da biologia molecular e genética têm criado novas possibilidades de tratamento e diagnóstico para o CP. Nesse ínterim, foram descobertos diversos marcadores moleculares, tais como o K-ras, o erb B-2, o p53 e o S-phase (Harpole *et al.*, 1995).

Independente do tipo de carcinoma ou do tipo de mutação que o acarretou, é importante ressaltar a necessidade da neoangiogênese da região onde as células neoplásicas se encontram para a progressão dos tumores. Esta neoangiogênese é efetuada em função da liberação de agentes angiogênicos, entre eles o VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) e o bFGF (*basic fibroblast growth factor*) pelas próprias células neoplásicas e por células inflamatórias. Na presença destes fatores, ocorre um aumento do aporte sanguíneo para a região e as células neoplásicas, providas de maiores quantidades de oxigênio, encontram-se em condições ideais para sua multiplicação, desenvolvimento e metástase (Cotran *et al.*, 1999).

1.5 Microambiente neoplásico

A morbidade e mortalidade relacionadas ao câncer de pulmão estão intimamente envolvidas com a capacidade das células cancerosas em invadir os tecidos e causar metástases. Para que estas metástases se desenvolvam, é necessário que ocorra uma série de eventos envolvendo a adesão, motilidade e crescimento das células e, sendo assim, grande parte desses processos são influenciados pelo comportamento e composição da matriz extracelular (MEC) (Raghow, 1994). Nos casos neoplásicos, a MEC possui informações importantes para a migração, diferenciação, ligação e organização das células neoplásicas e, durante o desenvolvimento neoplásico, seus componentes protéicos continuam a ser produzidos pelas células normais, pelas células da própria matriz (fibroblastos) e pelas células neoplásicas também.

Na MEC, encontram-se diversos tipos de moléculas. Essas moléculas são subdivididas em: 1) proteínas estruturais fibrosas (sistema colágeno/elástica), 2) glicoproteínas adesivas e integrinas e 3) glicosaminoglicanos e proteoglicanos. Todos esses componentes estão presentes na matriz independente do tecido apresentar-se normal ou neoplásico.

Glicosaminoglicanos (GAGs) São polissacarídeos longos e lineares, que consistem de unidades dissacarídeas que se repetem com seqüências que variam na composição básica do sacarídeo, ligação, acetilação e N- e O- sulfatação. Existem duas principais classes de GAGs: 1) GAG não sulfatado: ácido hialurônico e 2) GAGs sulfatados: condroitim sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato,

heparan sulfato e heparina. Os GAGs são envolvidos em uma variedade de processos biológicos, incluindo interações células-matriz e ativação de quimiocinas, enzimas e fatores de crescimento (Taylor e Gallo, 2006). Esses processos são mediados através da capacidade dos GAGs de interagirem e influenciarem o comportamento de numerosas proteínas, incluindo proteases, citocinas e moléculas de adesão (Handel *et al.*, 2005). Com exceção do ácido hialurônico, os GAGs são encontrados sob a forma de proteoglicanos (PGs).

A interação desses GAGs e PGs com proteínas de matriz e com receptores na superfície celular regula muitos aspectos do comportamento das células, tais como a migração, a adesão célula-célula e a diferenciação celular (Snyder *et al.*, 1990).

1.6 Condroitim sulfato e seus Proteoglicanos

O condroitim sulfato é um polímero linear presente na MEC composto de dissacarídeos repetidos, constituído por unidades alternadas de ácido glucurônico e N- acetilgalactosamina. Presente na superfície das células e na MEC é produzido desde o início do desenvolvimento embrionário e vêm sendo observado em concentrações elevadas em tecidos tumorais independente da origem do tumor (Varga *et al.*, 2012). Sendo assim, é reconhecido como um marcador de transformação neoplásica. O condroitim sulfato não é encontrado na MEC sozinho, mas sempre agregado a um core proteico formando os chamados PGs. Vários PGs apresentam condroitim sulfato em sua composição e dentre eles estão o versicam e o biglicam.

Assim como os outros componentes da MEC os PGs compostos de condroitim sulfato apresentam um comportamento e expressão diferenciados na presença de células neoplásicas. Foi observado que a expressão elevada de versicam nos tecidos promove o crescimento tumoral ao desestabilizar o contato célula-célula e ao influenciar nos processos de angiogênese (Gorter *et al.*, 2010). Também foi demonstrada sua participação em diversos tipos de carcinomas e a sua relação com a diminuição na sobrevida dos pacientes (Varga *et al.*, 2012; Gorter *et al.*, 2010; Cooney *et al.*, 2011). Em relação ao biglicam, trabalhos apontam que a expressão elevada desta PG em tumores gástricos, pancreáticos e de próstata apresenta relação com mau prognóstico e com maior agressividade dos tumores (Wang *et al.*, 2011; C.K.Weber *et al.*, 2011). Entretanto, apesar da conhecida relação destas moléculas com vários tipos de câncer, ainda não é bem conhecida a relação destas moléculas, principalmente do versicam e do biglicam, com o CP.

1.7 Heparan sulfato e seus proteoglicanos

O GAG denominado heparan sulfato é constituído por unidades repetidas compostas da alternância de ácido glucurônico/idurônico e glucosamina. As cadeias de heparan sulfato podem variar de 5 a 70 kDa e sua produção e degradação são controladas por mecanismos de controle bem definidos. O núcleo proteico ligado ao heparan sulfato pode ser degradado por diversas enzimas, entretanto somente a enzima denominada heparanase é capaz de degradar as cadeias de heparan (Iozzo, 2011).

Os PGs compostos por cadeias de heparam sulfato tais como o como o sindecam, o glipicam e o perlecam são conhecidamente envolvidos em alguns processos neoplásicos (Iozzo e Sanderson, 2011).

Os sindecans são uma família de PGs transmembrana compostos de heparam sulfato ligado a um core proteico e estão presentes em todos os tecidos do corpo desde o desenvolvimento embrionário até a vida adulta. Os sindecans têm funções tanto intracelulares quanto na superfície celular podendo promover a interação célula-célula e célula-MEC regulando a sobrevivência, adesão e migração celular. Os sindecans também podem se ligar a citocinas e fatores de crescimento através de suas cadeias de heparam tendo um papel importante na mediação de eventos intracelulares em cascata. Diferenças na expressão das moléculas de sindecam já foram associadas a algumas patologias. Sendo assim, de acordo com essa variedade de localização e funções os sindecans são moléculas com grande potencial para influenciar a tumorigênese e na progressão tumoral (Lambaerts, 2009).

Um dos tipos de sindecam, o sindecam-1 é altamente expresso na membrana das células epiteliais promovendo a adesão das células a MEC e mantendo o formato das células. Células em transformação neoplásica muitas vezes perdem este PG assim como a e-caderina, dois processos que parecem estar envolvidos com a transição epitélio mesenquimal. Em certos tipos de câncer, como o de laringe, esta diminuição do sindecam facilita a movimentação celular acelerando a progressão tumoral e reduzindo o tempo de sobrevivência dos pacientes. Entretanto, em outros tipos de câncer como os hematológicos e os de mama é a alta

expressão de sindecam-1 que se associa ao aumento da invasibilidade tumoral e ao baixo prognóstico (Iozzo e Sanderson, 2011). Esse comportamento ambíguo, faz com que essa molécula seja alvo ainda hoje de várias pesquisas, sobre tudo no CP, onde seu papel é ainda pouco conhecido. No pulmão, a expressão de sindecam-1 já foi associada a um menor risco de óbito e em estudos *in vitro* em células A549 foi observado que a presença do sindecam-1 diminui a migração e invasão das células tumorais (Shah *et al*, 2004; Pasqualon *et al*, 2015)

Um outro proteoglicano da família do heparan sulfato com características e comportamento similares as dos sindecans, diferindo destes só no seu modo de interação com as membranas celulares que é através de uma âncora glicosil-fosfatidil-inositol, é o glipicam. Esta molécula também tem sua expressão aumentada em vários tipos de câncer principalmente nos de pâncreas e de mama (Yoneda *et al.*, 2012). Entretanto, seu papel no câncer de pulmão ainda apresente resultados controversos. Estudos recentes relacionam o aumento do glipicam com uma menor sobrevida (Li *et al*, 2013; Yu *et al*, 2015) enquanto que outros apontam o gene do glipicam como supressor de tumor uma vez que a perda da sua expressão está associada a uma maior invasão tumoral em adenocarcinomas de pulmão *in vitro* (Zhao *et al*, 2014). Da mesma forma, o perlecan, um outro PG de composição complexa e com homologia com diversos fatores de crescimento e citocinas, tem seus níveis aumentados em pacientes com melanoma invasivo (Sanderson, 2001). Isto foi correlacionado com uma deposição expressiva da molécula na MEC das células tumorais. Esta molécula também apresenta uma alta afinidade com o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) estabelecendo

desta forma uma relação estreita com componentes de matriz nos processos de angiogênese tumoral (Iozzo e Sanderson, 2011).

Apesar de ser conhecida a ocorrência de um aumento dos níveis de condroitim sulfato, heparim sulfato e seus respectivos PGs em doenças como o câncer, ainda existem poucos estudos das suas verdadeiras implicações no CP. Além disso, torna-se evidente a importância de conhecer melhor o comportamento destes GAGs e PGs na MEC do CP. Considerando que nosso grupo já realizou achados importantes relacionando o ácido hialurônico como um potencial novo marcador de diagnóstico e prognóstico neste tipo de câncer, trouxemos com isto novos questionamentos para futuros estudos que serão de suma importância para o melhor entendimento da importância dessas moléculas no CP.

1.8 Prevenção, screening e diagnóstico do Câncer de Pulmão

Sem dúvida, a melhor maneira de prevenção do câncer de pulmão ainda é a cessação do fumo. Uma vez que este é o principal fator de risco para a doença, fica evidente que deixar de fumar seja a principal maneira de evitá-la. Outras ações se mostram importantes nessa prevenção também tais como evitar a exposição dos indivíduos ao fumo passivo e a diminuição da exposição aos outros fatores de risco ambientais tais como as fibras de asbestos e a poluição atmosférica. Outro fator que pode ter importância na prevenção da doença é a inserção de alimentos ricos em antioxidantes na dieta dos indivíduos.

Mesmo com as ações preventivas, é importante que existam métodos capazes de detectar a doença uma vez que ela se desenvolva. Os métodos de “screening”

(rastreamento, reconhecimento, varredura) são realizados para a detecção de um possível câncer antes do aparecimento dos sintomas. Eles são extremamente importantes uma vez que visam a detecção da doença em estádios mais precoces, entretanto, em alguns tipos de câncer (como no caso do CP) são simplesmente métodos capazes de detectar a doença não necessariamente tendo alguma relação positiva com a diminuição da mortalidade ou com a capacidade de detecção precoce.

No caso do CP, os médicos dispõem de três ferramentas principais para a realização deste screening que são as radiografias, as citologias do escarro e as tomografias computadorizadas. A literatura atual nos mostra que a utilização das radiografias (associadas ou não a citologia do escarro) têm alguma efetividade quando estas são realizadas em pacientes de grupos de risco (tabagistas, portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), etc), entretanto têm demonstrado baixa efetividade quando são realizadas em grupos randomizados (NLSTRT, 2011). Os avanços na técnica de tomografia computadorizada, que consegue realizar imagens em alta definição com níveis aceitáveis de radiação, têm tornado possível a detecção de nódulos não visíveis nas radiografias de tórax tornando esta uma ferramenta importante no screening do câncer de pulmão. Um estudo recente realizado pelo *The National Lung Screening Trial Research Team* (2011) demonstrou que o screening realizado através da tomografia computadorizada ocasionou uma melhora na sobrevida dos pacientes acometidos pela doença quando comparado com os casos em que o rastreamento foi

realizado por radiografia, demonstrando a importância desta ferramenta na detecção do câncer de pulmão.

Apesar de efetivos, esses métodos ainda não são considerados robustos o suficiente para rastrear os casos de câncer de pulmão em meio aos pacientes de risco, pois só têm capacidade de detectar o câncer de pulmão em estádios mais avançados.

Em relação aos métodos diagnósticos para a detecção do câncer de pulmão podemos destacar a toracocentese, a biópsia de linfonodos, a broncoscopia, a biópsia por agulha transcutânea e a citologia do escarro.

Todos estes métodos têm utilidade e espaço na prática clínica, entretanto, a grande invasibilidade destes exames ainda é um dos maiores desafios da prática clínica oncológica. Há urgência no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos não invasivos para maior conforto e menor ansiedade do paciente. Em meio a este cenário, diversos grupos de pesquisa têm investido a fundo na procura de marcadores moleculares e imuno-histoquímicos e no desenvolvimento de novas técnicas que possam auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento dos diversos tipos de cânceres e principalmente do CP (Ichinose *et al.*, 1995). Atualmente, a ânsia dos pesquisadores da área é pela descoberta de algum marcador molecular em biópsias líquidas, seja no sangue, no escarro ou nos lavados brônquicos para a detecção precoce do câncer de pulmão, mas até o momento nenhum grupo de pesquisa teve sucesso na padronização destes marcadores para o uso em larga escala na prática clínica.

Em diversos tipos de câncer, proteínas intracelulares e de MEC têm se mostrado como potenciais marcadores diagnósticos presentes em secreções, principalmente no sangue, na saliva, no escarro e na urina (Melo *et al.*, 2015; Franzmann *et al.*, 2011; Rangel *et al.*, 2015; Paserotti *et al.*, 2006).

A proteína receptora do AH presente em todos os tecidos corporais, o CD44, desponta como um bom biomarcador para os cânceres de cabeça e pescoço presente na saliva (Franzmann *et al.*, 2011). Normalmente esta proteína fica anexada às membranas celulares, entretanto, em algumas situações elas são secretadas e detectáveis na circulação e nas secreções via proteases em forma de CD44 solúvel (solCD44) (Kajita *et al.*, 2001) sendo que sua detecção se correlaciona com o desenvolvimento de metástases em alguns tumores (Ristamaki *et al.*, 1997; Yamane *et al.*, 1999).

Outra proteína que têm atraído o interesse dos pesquisadores é a cofilina-1. Esta molécula tem a capacidade de acelerar a polimerização e despolimerização dos filamentos de actina e, por essa razão, tem ligação direta com os processos de divisão celular (Chang *et al.*, 2015). A via de sinalização da qual a cofilina-1 participa foi recentemente reconhecida como uma contribuinte nos processos de migração e invasão em linhagens celulares de CP (Jang *et al.*, 2012). Além disso, também já foi encontrada como um bom biomarcador tumoral presente no plasma de pacientes com CP em estádios avançados (Zheng *et al.*, 2013). Sua concentração e secreção no escarro até a presente data não foi demonstrada por nenhum estudo anterior.

Apesar de todo o conhecimento envolvendo os PGs, o solCD44 e a cofilina-1 e alguns tipos de neoplasias, pouco se sabe sobre a contribuição destes para o desenvolvimento e progressão dos carcinomas de pulmão e tampouco se apresentam algum potencial diagnóstico ou prognóstico relacionado à doença.

2. HIPÓTESE

Ao considerar as evidências que envolvem os PGs como componentes importantes no desenvolvimento e progressão de algumas neoplasias como o câncer de mama, cólon e pâncreas e alguns indícios de que eles possam estar envolvidos nos carcinomas de pulmão, esta tese de doutorado levanta como hipótese a afirmação de que os PGs e proteínas como a cofilina-1 e o solCD44 podem ter um papel relevante nas neoplasias pulmonares como marcadores prognósticos e/ou diagnósticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

a. Conhecer o impacto dos GAGs não-sulfatados (ácido hialurônico) e GAGs sulfatados (condroitim e heparam) e seus respectivos PGs na carcinogênese na progressão do câncer de pulmão.

b. Verificar o potencial prognóstico e/ou diagnóstico do solCD44 e da cofilina-1 presente no escarro de pacientes com câncer de pulmão.

3.2 Específicos

1) Estudo da concentração e localização do AH e do CD34 em tecido neoplásico de pacientes portadores de CP

a. Correlacionar a relação dos níveis de AH com a severidade da doença e sua associação com a angiogênese;

2) Estudo da concentração e localização dos GAGs não sulfatados e GAGs sulfatados em tecido neoplásico de pacientes portadores de CP

a. Avaliar a diferença nos níveis de GAGs sulfatados (condroitim e heparam sulfato) presentes em amostras de CP em relação a amostras normais;

b. Avaliar a relação dos níveis destes GAGs com a severidade da doença;

c. Avaliar a relação dos níveis desses GAGs com a evolução dos pacientes tratados por ressecção cirúrgica;

3) Estudo da expressão gênica e proteica dos PGs compostos por heparan e condroitim em tecido neoplásico de pacientes portadores de CP

a. Avaliar a diferença na expressão gênica e proteica dos PGs entre tecidos neoplásicos pulmonares e tecidos normais

b. Avaliar a relação da expressão destes PGs com a severidade da doença;

c. Avaliar a relação da expressão destes PGs com a evolução dos pacientes tratados por ressecção cirúrgica;

4) Estudo da concentração do solCD44 e da Cofilina-1 em escarro de pacientes portadores de CP

a. Avaliar os níveis de solCD44 e cofilina-1 no escarro como novos marcadores nas neoplasias respiratórias;

4. MÉTODOS

4.1 *Casuística (Tecidos)*

Foram incluídos neste estudo espécimes cirúrgicos de tecidos tumorais de 142 pacientes operados por Câncer de Pulmão. Os espécimes de tumor primário pulmonar foram provenientes do Hospital do Câncer AC Camargo, selecionados a partir do banco de tumores contendo espécimes de câncer de pulmão pertencentes a pacientes em estádios I, II, IIIA, IIIB e IV. Um banco de dados foi criado e continuamente alimentado com diversas informações sobre cada paciente, incluindo o diagnóstico anátomo-patológico estabelecido por ocasião da cirurgia.

Todos os pacientes selecionados fazem acompanhamento ambulatorial no Hospital do Câncer AC. Camargo há pelo menos 2 anos.

Na Tabela 01 (Anexo 1) são apresentados os 142 pacientes com NSCLC incluídos no estudo e seus respectivos dados demográficos, incluindo o estadiamento patológico final e tipo histológico inicial (definido no momento da cirurgia).

Das peças dos mesmos pacientes foi coletado um espécime cirúrgico de tecido normal a partir da margem cirúrgica para que cada paciente pudesse ser controle de si mesmo nas dosagens compondo amostras pareadas.

4.2 Microscopia Óptica

As lâminas e laudos correspondentes aos pacientes foram solicitados ao arquivo da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer AC. Camargo para análise e revisão da classificação histológica. As lâminas e laudos de cada paciente selecionado foram revisados por um patologista experiente para que a classificação histológica fosse atualizada, compatível com as amostras e de acordo com a última classificação vigente (Travis et al., 2011) (Figura 1). Os fragmentos teciduais de áreas não tumorais também foram avaliados em lâminas de hematoxilina-eosina (H&E) para que fosse confirmada a ausência de regiões neoplásicas no espécime.

4.3 Casuística (escarro)

Quinze pacientes provenientes do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) e cinquenta e oito pacientes provenientes do Hospital de Câncer de Barretos (HCB) foram incluídos no estudo para que fosse realizada a coleta prospectiva de escarro para análise dos níveis de AH.

Para o diagnóstico dos pacientes, em ambas as instituições, os pacientes foram submetidos à broncoscopia. O estadiamento clínico foi estabelecido através da avaliação de imagens de radiografia de tórax, tomografia computadorizada de tórax e biópsias de linfonodos quando indicado.

Figura 1: Amostras de cada um dos tipos histológicos encontrados nos casos selecionados e reclassificados segundo Travis (2011). **A e B** – Adenocarcinoma acinar; **C e D** – Adenocarcinoma Papilífero; **E e F** – Adenocarcinoma In Situ; **G e H** – Carcinoma de células escamosas clássico; **I e J** – Carcinoma de Grandes Células. Imagens à esquerda: aumento de 200X. À direita: 400X.

Treze pacientes foram selecionados para compor um grupo de alto risco de desenvolvimento de câncer de pulmão. Neste grupo foram incluídos pacientes portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) em tratamento no Hospital das Clínicas do Estado de São Paulo (HC-FMUSP).

Para o grupo controle foram selecionados oito pacientes provenientes do Ambulatório Geral Didático do HC-FMUSP em tratamento pré-operatório para catarata com radiografia de tórax recente documentada e sem histórico de doença pulmonar crônica ou hábito tabagista.

Os dados demográficos dos indivíduos selecionados para cada um dos grupos acima descritos encontram-se nas tabelas 02, 03 e 04 apresentadas nos anexos 2, 3 e 4, respectivamente.

Os critérios de inclusão e exclusão de cada grupo encontram-se na tabela 05, anexo 5.

4.4 Coleta das amostras de escarro

Os pacientes portadores de carcinomas de pulmão selecionados para a coleta prospectiva de escarro foram, primeiramente, informados dos objetivos e procedimentos do estudo e antes de qualquer procedimento assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com as normas da lei 196/96 (anexos 6 e 7). Após a assinatura do termo, foram submetidos a até 3 inalações com solução salina hipertônica (3%), com duração máxima de 7 minutos cada uma, para a indução do escarro com inalador ultrassônico de micropartículas

menores que 4 μ m capazes de alcançar o espaço alveolar, (Pulmosonic Star Luxo II, Soniclear, Brasil). Durante o procedimento de indução houve sempre a retaguarda de um médico e corpo de enfermagem para eventuais intercorrências médicas. Todas as coletas foram realizadas nos consultórios do ICESP e do HCB.

Após cada inalação os pacientes foram orientados a enxaguar a boca, assoar o nariz e o escarro foi então colhido em recipiente estéril próprio e armazenado em isopor contendo gelo picado até a separação. Após a coleta, o escarro foi separado macroscopicamente da saliva sobre placa de Petri com o auxílio de uma agulha e o material foi armazenado em tubos eppendorf a -80°C até o momento de análise (Figura 2).

Figura 2: Separação macroscópica do escarro e da saliva sobre placa de Petri com o auxílio de agulha seguida de armazenamento em microtubo eppendorf para congelamento.

O mesmo procedimento de indução do escarro foi realizado com os 13 pacientes do grupo de alto risco e com os 8 voluntários do grupo controle. Em ambos os casos as coletas foram realizadas em consultórios do HC-FMUSP com a retaguarda de médicos e corpo de enfermagem.

4.5 Imuno-histoquímica e imunofluorescência

Dentre as amostras de tecido coletadas, 46 espécimes foram selecionados para a análise imuno-histoquímica do ácido hialurônico e do marcador de angiogênese, o CD34 e destes quarenta e seis, 41 espécimes foram marcados para análise da presença de perlecan, versican e biglican. Para a marcação imuno-histoquímica do ácido hialurônico foram realizadas as seguintes etapas: a) inibição da atividade endógena da peroxidase com peróxido de hidrogênio 3% diluído em tampão PBS; b) bloqueio dos sítios inespecíficos com albumina do soro bovino (BSA) 1% em PBS; c) incubação com solução contendo proteína de ligação para o ácido hialurônico biotinilada diluída 1:600 em 1% BSA/PBS por 1 h à 46°C; d) eliminação da biotina endógena com incubação em solução de estreptavidina-peroxidase; e e) visualização da atividade da peroxidase através da incubação com diaminobenzidina cromogênica (DAB - Sigma, USA) e peróxido de hidrogênio 0.03%. Coloração marrom foi considerada como evidência da expressão de AH nas lâminas. Já para a avaliação da presença de CD34 e dos PGs, a imuno-histoquímica foi realizada utilizando um anticorpo monoclonal anti-CD34 (Novocastra Laboratory, UK; dilution 1:600), anti-biglican (Santa Cruz Biotechnology, USA; diluição 1:50), anti-perlecan (Santa Cruz Biotechnology,

USA; diluição 1:100) e anti-versicam (Santa Cruz Biotechnology, USA; diluição 1:100). A recuperação antigênica foi realizada com panela de pressão e os anticorpos foram incubados *overnight*. Foi utilizado o *Novolink Max Polymer Detection System* sendo que o anticorpo pós primário e o polímero foram incubados por 30 minutos à 37°C, respectivamente (Novocastra Laboratory, UK). Para revelação, foi utilizado diaminobenzidina cromogênica (DAB – Sigma, USA) e contra marcação com hematoxilina. Coloração marrom foi considerada como evidência da expressão de CD34, biglicam, perlecan e versicam nas amostras.

A análise quantitativa dos índices de expressão antigênica observados através da imunomarcacão foi realizada mediante análise digital. O sistema utilizado consiste de uma câmara Nikon acoplada a um microscópio da mesma marca (Nikon 50i), a partir do qual as imagens foram visualizadas em um monitor. Através de uma câmara instalada no computador as imagens foram processadas pelo *software Image Pro-Plus-7.0*.

Todas as áreas tumorais e as áreas de tecido normal contidas nas lâminas foram capturadas com ajuda do *software*. O *software Image Pro-Plus-7.0* tem a capacidade de identificar, mediante a tonalidade da coloração, todas as células imunomarcadas. Foi analisada a quantidade de imunomarcacão nas áreas tumorais, nas áreas de estroma e tecido normal contido nas lâminas histológicas. Paralelamente, foram medidas as áreas totais sólidas tumorais, estromais e normais em micrômetros quadrados correspondente ao tecido pulmonar presente, excluindo-se os espaços aéreos. O índice de positividade foi expresso mediante a relação:

$$IP(\%) = \frac{\text{média da área marcada} - \text{média área não marcada}}{\text{área total}}$$

A co-localização do AH e CD34 foi avaliada no estroma tumoral por imunofluorescência utilizando microscopia confocal. Foi realizada recuperação antigênica com panela de pressão seguida de incubação com anticorpo monoclonal anti-CD34 (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) e como anticorpo primário para AH uma solução contendo uma proteína de ligação para o ácido hialurônico biotinilada (1:150; gentilmente cedida pela Dra. Helena Nader do Departamento de Bioquímica, Disciplina de Biologia Molecular - UNIFESP). Para os controles negativos, lâminas foram incubadas com PBS sem o anticorpo primário. Todas as lâminas foram então incubadas com os anticorpos secundários: cabra anti-rato ALEXA 488 e estreptavidina ALEXA 546 (Invitrogen, USA; dilution 1:400) por 3 horas. Marcação nuclear foi feita com DAPI (Invitrogen; 1:300). As imagens foram obtidas com microscópio confocal Zeiss LSM-410 (Carl Zeiss, Germany), processadas e reconstruídas utilizando o “*US National Institutes of Health Image*” software.

4.6 Ensaios para análise da expressão dos GAGs sulfatados

Extração das cadeias de GAGs sulfatados das amostras de tecido pulmonar

Quarenta e seis das amostras de tumores obtidas foram descongeladas, picotadas com bisturi, homogeneizadas e desidratadas em acetona, por 18 h à temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de acetona foi removido por centrifugação, 4000 x g por 15 min e o precipitado seco em estufa. O pó seco

obtido teve seu peso seco verificado em balança analítica. Para cada 1mg de pó seco foi adicionado 100 µL de maxatase 4 mg/mL em Tris-HCl 0,05 M + NaCl 1M, pH 8 e o material foi incubado por 18 h a 60°C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi separado em um novo tubo. Sob refrigeração, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 90% na proporção de 11% do volume de maxatase presente em cada amostra. O tubo foi agitado em vórtex e o material permaneceu em incubação durante 10 minutos, sob refrigeração. Após este período os tubos foram novamente centrifugados (15.000rpm, 10 minutos) e o sobrenadante foi separado em novo tubo. Ainda sob refrigeração, foram adicionados, lentamente, 2 volumes de metanol sob agitação no vórtex e os tubos permaneceram em incubação overnight a -20°C.

Em seguida, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi desprezado. Os tubos foram secos em estufa a 50°C e para cada mg de pó seco foi adicionado 50µl de DNase. O material permaneceu em DNase por no mínimo 24h e após este período seguiu a eletroforese em tampão diaminopropano.

Análise semi-quantitativa dos padrões de expressão dos GAGs sulfatados (condroitim sulfato, heparam sulfato e dermatan sulfato) nas amostras

Após a extração das cadeias de GAGs sulfatados das amostras foi realizada a eletroforese em tampão 1,2 diaminopropano (PDA).

Previamente, géis de PDA foram confeccionados e armazenados em geladeira até o momento da realização das reações.

Em cada gel foram colocadas 6 amostras e 2 padrões conhecidos de GAGs sulfatados conforme exemplo descrito no diagrama da figura 3.

Figura 3: Diagrama demonstrando a posição das amostras em gel PDA para corrida em eletroforese.

Em cada um dos “poços” foram depositados 5µl de amostra ou padrão. Após a adição das amostras no gel, o mesmo foi colocado com as amostras voltadas para baixo e para o pólo negativo no compartimento central da cuba de eletroforese contendo benzina. Os eletrodos da cuba estavam localizados nos compartimentos laterais da cuba os quais estavam preenchidos com tampão PDA.

O aparelho de voltagem foi ajustado para 100 volts e o gel permaneceu sob esta voltagem durante uma hora para possibilitar a corrida das amostras.

Durante este processo a cuba foi coberta por um recipiente com gelo a fim de que a benzina não se aquecesse com a voltagem.

Após 1 hora o gel foi retirado da cuba e imerso em brometo de cetiltrimetilamônio 0,1% (CTV 0,1%) para que houvesse a precipitação dos GAGs. O gel permaneceu nesta solução por pelo menos 2 horas.

Depois de precipitados os GAGs, a lâmina permaneceu em repouso sobre papel filtro até secagem completa. Quando seca, colocou-se a lâmina imersa em azul de toluidina 0,1% para visualização das bandas no gel de PDA.

Após secas e coradas (Figura 4) as lâminas foram escaneadas e a integral das bandas calculadas no escaner Helena QuickScan Gel (Helena Laboratories, Beaumont, TX). A partir dos valores dos padrões de cada lâmina e do valor correspondente a cada banda foi calculada a quantidade de cada GAG nas amostras ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco).

Figura 4: Todas as lâminas obtidas a partir da eletroforese mostrando o padrão de expressão dos GAGs sulfatados de cada uma das amostras.

4.7 Ensaio de Biologia Molecular para análise da expressão dos PGs

Extração de RNA

Noventa e seis amostras de tecido foram submetidas às análises de biologia molecular para verificação da expressão gênica dos proteoglicanos biglicam, versicam, sindecam-1, perlecan e glypican entre tecidos neoplásicos pulmonares e tecidos normais.

As moléculas do RNA foram extraídas dos espécimes tumorais pulmonares, criopreservados à -80°C , usando o reagente Trizol (Invitrogen Co.) de acordo com as instruções do fabricante, a partir de aproximadamente 4mg de tecido congelado. O tecido foi macerado e colocado em um microtubo juntamente com 1ml de Trizol sendo homogeneizado por inversão. Após 10 minutos à temperatura ambiente foi acrescentado 0,2ml de clorofórmio homogeneizando por inversão e a mistura foi deixada a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foi realizada centrifugação a 12.000g por 20 minutos a 4°C , transferindo-se depois o sobrenadante para um tubo novo com 0,6 ml de álcool isopropílico. O material permaneceu à temperatura ambiente em repouso por 10 minutos e em seguida foi centrifugado por 15 minutos a 12.000g e a 4°C . Após essa centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet resultante foi lavado com 1ml de etanol 75% e centrifugado por 5 minutos a 7.500g a 4°C . O sobrenadante foi descartado e os tubos escorreram sobre papel absorvente até secar o pellet. Feito isso, foi adicionada H_2O miliQ autoclavada tratada com DEPC na quantidade suficiente para diluir o pellet de RNA. A integridade e qualidade do RNA extraído foram controladas pelo aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

Reações de polimerização em cadeia em tempo real (qRT-PCR)

As reações de qRT-PCR foram realizadas utilizando ensaios de expressão gênica TaqMan inventoriados dos proteoglicanos biglicam, glipicam, perlecam, sindecam-1 e versicam (BGN Hs00959141_g1; gpc-1 Hs00892476_m1; HSPG-2 Hs00194179_m1; SDC-1 Hs00896423_m1 e VCAN Hs00171642_m1) assim como para o gene endógeno de referência β actina (ACTB Hs01060665_g1).

A expressão gênica foi realizada através da técnica TaqMan de acordo com as instruções do fabricante no sistema StepOnePlus (Applied Biosystems, USA) e os dados foram analisados pelo software StepOne (v. 2.0; Applied Biosystems). Os resultados obtidos são representados como valores de CT. A expressão relativa dos genes de interesse foi normalizada pela expressão do gene endógeno β actina e a expressão gênica de cada amostra foi comparada à expressão obtida de um pool de amostras. O método CT comparativo foi usado para quantificar a expressão gênica e a expressão relativa foi calculada como $\Delta\Delta CT$.

4.8 Dosagem da concentração de solCD44 e cofilina-1 no escarro dos pacientes com CP

Para dosagem de cofilina-1 e do solCD44 foi utilizado o método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) de captura (USCN Business Co. Ltd., Houston, USA). Placas pré-sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-cofilina e anti-solCD44 foram bloqueadas, para evitar ligações inespecíficas com 300µL de solução de bloqueio e incubadas por 2 horas a 37°C.

Após o bloqueio, foram adicionados 100µL de amostra e dos padrões diluídos previamente em PBS por poço. Em dois poços foi colocado somente PBS para caracterização do branco. A placa foi incubada por 2 horas à 4°C.

Após incubação, foram adicionados 100µL do anticorpo conjugado (biotinilado) na concentração estabelecida e as placas foram incubadas por 2 horas à 37°C. Posteriormente, foram adicionados 100µL de Streptavidina HRP por poço e a placa foi incubada por 30 minutos à 37°C.

A cada etapa a placa foi lavada com tampão de lavagem (PBS + Tween 20) por 6 vezes. A revelação foi realizada através da adição de 100µL da Solução de Revelação (H₂O₂ + Tetrametilbenzidina) por poço e incubação de 10 minutos à 37°C. A reação foi parada com 50µL de H₂SO₄ 30% por poço e leve agitação.

A leitura foi feita em leitor de ELISA (Power Wave, Bio-tek, USA) utilizando filtro de 450nm.

4.9 Tabulação dos dados e análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS versão 18 (Inc., Chicago, IL). Os dados foram tabulados considerando as estatísticas descritivas (média, desvio padrão, mínimo, máximo e quartis) para os dados quantitativos e tabelas de frequência para os qualitativos. Quando necessário as variáveis foram analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação do padrão de normalidade.

A associação entre tipos histológicos, fatores demográficos e perfil molecular foi primeiramente comparada pelo teste exato de Fisher (quando qualquer célula de uma tabela de contingência tinha contagem menor que 5) e teste chi-quadrado de Person (quando nenhuma célula de uma tabela de contingência tinha contagem menor que 5). A associação entre as variáveis gênicas e proteicas foi realizada pelo teste-T pareado. O impacto das seguintes variáveis sobre a sobrevida global foi avaliado para: gênero, idade, estadiamento, tipos histológicos, expressão de proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs) e proteoglicanos de condroitim sulfato (CSPGs). Essas variáveis foram incluídas em uma análise univariada para determinação de eventual efeito sobre a sobrevida global. Para a análise da sobrevida as variáveis foram estratificadas pela curva ROC (Receiver Operation Characteristic) para determinação do limite ótimo de cut-off binário e analisadas pelo método de Kaplan–Meier sendo as diferenças examinadas por meio do teste log-rank. O risco de morte foi avaliado pela análise multivariada

de Cox.

Curvas ROC foram construídas para demonstrar a habilidade diagnóstica do solCD44 e da cofilina-1 presente no escarro. A escolha do ponto de corte para cada uma das situações apresentadas nas curvas ROC foi baseada no ponto em que a sensibilidade e especificidade demonstrassem maiores valores simultaneamente (Martinez et al., 2003).

Em todo estudo, foi considerado a significância de 0,05. Nos casos das comparações simultâneas feitas pelo método não paramétrico, o ajuste para múltiplas comparações foi feito pelo método de Bonferroni, quando necessário.

5. RESULTADOS

Apesar de todo o conhecimento envolvendo os PGs, o solCD44 e a cofilina-1 e alguns tipos de neoplasias, pouco se sabe sobre a contribuição destes para o desenvolvimento e progressão dos carcinomas de pulmão e tampouco se apresentam algum potencial diagnóstico ou prognóstico relacionado à doença.

Levando em conta essas informações, foram avaliados neste estudo a relação dos perfis de expressão de proteoglicanos presentes em espécimes tumorais e das concentrações das proteínas solCD44 e cofilina-1 em amostras de escarro com o prognóstico e diagnóstico do câncer de pulmão.

Os resultados provenientes destas análises serão relatados a seguir.

5.1 Pacientes selecionados para amostras de tecido: características demográficas

Na Tabela 06 estão descritas as características demográficas dos 142 pacientes quanto ao sexo, idade, localização do tumor, estadiamento, tabagismo e sobrevida.

Tabela 06. Características demográficas dos 142 pacientes quanto ao sexo, idade, localização do tumor, estadiamento, tabagismo e sobrevida.

Total de pacientes	142
Idade (anos)	66 (43-87) ^a
Sexo	92 homens, 50 mulheres
Estadio T	
1	36
2	65
3	10
4	5
Não consta	26
Estadio N	
0	75
1	19
2	21
3	1
Não consta	26
Tipo histológico	
Carcinoma de células escamosas	43
Adenocarcinoma	88
Outros tipos	11
Tabagismo	
Sim	44
Não	17
Ex	21
Não consta	60
Seguimento (meses)	29 (1-152) ^a
Pacientes censurados para análise da sobrevida até a última data do seguimento	99

Foram avaliados 142 pacientes, dos quais 92 homens e 50 mulheres, todos portadores de carcinomas não-pequenas células primários de pulmão. A mediana de idade dos pacientes estudados foi de 66 anos (variação 43 a 87 anos). Quanto ao estadiamento, 36 pacientes eram T1, 65 estadio T2, 10 estadio T3, 5 estadio T4 e 26 pacientes não tinham esta informação em seus prontuários. Quanto ao comprometimento de linfonodos, 75 pacientes eram estadio N0, 19 estadio N1, 21 estadio N2, 1 estadio N3 e 26 pacientes não tinham essa informação no prontuário. Em relação ao tabagismo consta que 44 pacientes eram tabagistas, 17 não eram fumantes, 21 eram ex-fumantes e 60 não tinham esta informação no prontuário. Quanto ao tipo histológico, de acordo com a nova classificação (Travis et al., 2011), 43 eram carcinomas de células escamosas, 88 adenocarcinomas e 11 eram de tipos histológicos variados e por isso foram agrupados neste terceiro grupo. A mediana de sobrevida foi de 29 meses (variação, 1 a 152 meses). Até o momento do último registro em prontuário consultado, 43 pacientes faleceram, 90 estavam vivos e 9 não tinham acompanhamento recente nem atestado de óbito no prontuário e por isso foram censurados junto com os vivos.

5.2 Características de expressão imunohistoquímica do ácido hialurônico (AH) nas amostras

Quarenta e cinco espécimes de NSCLC foram analisados para imunoexpressão do AH. A Figura 5 mostra espécimes histológicos de pulmão normal, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células, corados respectivamente por hematoxilina e eosina (A, E, I, M), imuno-histoquímica para HA (B, F, J, N); imuno-histoquímica para microvasos (CD34) (C, G, K, O) e imunofluorescência para co-localização do AH e microvasos no microscópio confocal (D, H, L, P).

O tecido pulmonar normal (A) exibiu forte expressão de AH na interface célula epitelial-matriz extracelular (B), coincidente com regular visualização dos microvasos (C) e ausência de co-localização na microscopia confocal (D).

Os espécimes de carcinoma de células escamosas (E) exibiram abundante expressão de AH na interface câncer-estroma (F) coincidente com proeminência dos microvasos (G) e idêntica co-localização sob microscopia confocal (H). O adenocarcinoma (I) revelou forte expressão de AH no estroma em exuberante contraste com a fraca expressão do AH nas células tumorais (J). Focos de intensa expressão de AH no estroma coincidiram com aumento de densidade dos microvasos (K) e co-localização sob microscopia confocal (L). A intensidade de expressão do AH no estroma tumoral não demonstrou significância estatística entre os dois tipos histológicos ($p=0.3$).

Figura 5: Espécimes histológicos do pulmão normal, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e grandes células corados respectivamente por hematoxilina e eosina (A, E, I, M); imuno-histoquímica para AH (B, F, J, N); imuno-histoquímica para microvasos (C, G, K, O) e imunofluorescência para co-localização do HA e microvasos no microscópio confocal (D, H, L, P).

A avaliação morfométrica realizada nas amostras para a expressão de ácido hialurônico e densidade de microvasos (CD34) está apresentada na tabela 7 de acordo com os tipos histológicos estudados.

A expressão de microvasos foi significativamente maior nos casos de adenocarcinoma (32.3%) e carcinoma de grandes células (16.1%) quando comparados aos carcinomas de células escamosas (3.2%; $P=0.02$). Não houve diferença estatística entre a expressão de microvasos no estroma normal quando comparado ao estroma tumoral dos três tipos histológicos.

Uma associação significativa direta foi encontrada entre os tumores com alto percentual de expressão de AH e de microvasos no estroma tumoral ($R=0.6$; $P=0.02$) assim como uma associação direta entre tumores de estadio N1 e altos níveis de AH nas células tumorais também foi observada ($R=0.31$; $P=0.05$). Além disso, tumores em estadio T4 apresentaram uma associação positiva com a expressão de AH nas células tumorais ($R=0.80$; $P=0.01$)

Tabela 07. Análise imuno-histoquímica e distribuição do AH e da densidade de microvasos em células tumorais, do estroma e em tecido normal estratificados de acordo com o tipo histológico.

	AH em células tumorais (%)			AH no estroma peritumoral (%)			Microvasos no estroma tumoral (%)			Microvasos no estroma peritumoral (%)		
	<48%	≥48%	P	<84%	≥84%	P	<33%	≥33%	P	<26%	≥26%	P
			<0.001			0.3			0.02			0.5
Carcinoma de céls escamosas	0 (0)	9 (32.1)		4 (14.3)	5 (17.9)		6 (19.4)	1 (3.2)		4 (14.3)	3 (10.7)	
Adenocarcinoma	10 (35.7)	5 (17.9)		7 (25)	8 (28.6)		8 (25.8)	10(32.3)		8 (28.6)	9 (32.1)	
Grandes células	4 (14.3)	0 (0)		3 (10.7)	1 (3.6)		1 (3.2)	5 (16.1)		1 (3.6)	3 (10.7)	

5.3 Análise semi-quantitativa dos GAGs sulfatados: condroitim sulfato e heparam sulfato

Em relação aos GAGs sulfatados foi observado um padrão diferente entre as amostras tumorais e não tumorais.

No caso do heparam sulfato foi observado um significativo aumento nas concentrações presentes nas amostras tumorais quando comparadas às amostras não tumorais. ($p=0.02$) (Figura 6). Esse dado se correlacionou também com os tipos histológicos onde houve uma maior quantidade de heparam sulfato nos adenocarcinomas do que nos carcinomas de células escamosas ($p=0.02$) (Figura 7).

Figura 6. Diferença na concentração de heparam sulfato (µg/mg de peso seco) em espécimes tumorais e não tumorais $p=0.02$.

Em todas as amostras tumorais foi observada a presença de condroitim sulfato enquanto que nas amostras não tumorais esse componente não foi detectado pela metodologia empregada ($p < 0.01$) (Figura 8).

Figura 7. Diferença na concentração de heparan sulfato ($\mu\text{g/mg}$ de peso seco) em adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas $p=0.02$.

Figura 8. Eletroforese em gel PDA mostrando o padrão semi-quantitativo dos glicosaminoglicanos sulfatados em um padrão, amostras tumorais e não tumorais (CS – condroitim sulfato / DS – dermatan sulfato / HS – heparan sulfato) ($p < 0.01$).

5.4 Características da expressão gênica dos proteoglicanos no tecido neoplásico pulmonar e no tecido normal

Dentre os proteoglicanos analisados, todos apresentaram um aumento significativo nos tecidos normais em relação aos tecidos tumorais com exceção do sindecam, conforme ilustrado na Tabela 8 e na Figura 9.

Tabela 8. Diferenças nos níveis de proteoglicanos presentes no tecido tumoral e no parênquima adjacente não tumoral.

	Média	Erro Padrão	Significância (p=)
Biglicam tumoral	0,83	0,37	0,01
Biglicam não tumoral	46,17	16,52	
Glipicam tumoral	0,43	0,29	<0,01
Glipicam não tumoral	39,47	11,85	
Perlecam tumoral	0,90	0,12	<0,01
Perlecam não tumoral	7,29	1,26	
Sindecam tumoral	4,97	2,68	0,15
Sindecam não tumoral	10,09	1,41	
Versicam tumoral	1,08	0,30	<0,01
Versicam não tumoral	25,29	8,29

Figura 9. Diferenças nos níveis de proteoglicanos presentes no tecido tumoral e no parênquima adjacente não tumoral. (Escala Log10)

Uma associação significativa foi encontrada entre biglicam e perlecam ($R=0.32$; $P<0.01$); biglicam e versicam ($R=0.55$; $P<0.01$); perlecam e sindecam ($R=0.20$; $P=0.05$) e perlecam e versicam ($R=0.28$; $P<0.01$) conforme a tabela 9 demonstra abaixo.

Tabela 9. Associações entre os proteoglicanos presentes no tecido tumoral de pacientes com câncer de pulmão.

		Biglicam	Glipicam	Perlecam	Sindecam	Versicam
Biglicam	Correlação	1	0.15	0.32	0.11	0.55
	Significância		0.16	<0.01	0.266	<0.01
Glipicam	Correlação	0.15	1	0.13	0.18	0.15
	Significância	0.16		0.23	0.08	0.16
Perlecam	Correlação	0.32	0.13	1	0.20	0.28
	Significância	<0.01	0.23		0.05	<0.01
Sindecam	Correlação	0.11	0.18	0.20	1	0.17
	Significância	0.26	0.08	0.05		0.09
Versicam	Correlação	0.55	0.15	0.28	0.17	1
	Significância	<0.01	0.16	<0.01	0.09	

As associações entre as características clínico patológicas e a expressão gênica dos proteoglicanos foram avaliadas e foi encontrada uma associação significativa entre biglicam e tipos histológicos ($R=7.07$; $P<0.01$) e versicam e tipos histológicos ($R=4.91$; $P=0.02$) conforme tabela 10.

Tabela 10. Associações entre as características clínico-patológicas e a expressão gênica dos proteoglicanos avaliados em 96 pacientes com câncer de pulmão.

VARIÁVEIS	BIGLICAM		GLIPICAM		PERLECAM		SINDECAM		VERSICAM	
Idade (anos)	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %
≤ 66	25 (26,9%)	22 (23,7%)	25 (30,1%)	19 (22,9%)	24 (26,4%)	22 (24,2%)	25 (26,9%)	22 (23,7%)	26 (28,1%)	21 (22,6%)
> 66	20 (21,5%)	26 (28%)	16 (19,3%)	23 (27,7%)	20 (22%)	25 (27,5%)	20 (21,5%)	26 (28%)	19 (20,4%)	27 (29%)
Sexo	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %
Feminino	17 (18,3%)	16 (17,2%)	16 (19,3%)	11 (13,3%)	16 (17,6%)	16 (17,6%)	15 (16,1%)	18 (19,4%)	18 (19,4%)	15 (16,1%)
Masculino	28 (30,1%)	32 (32,2%)	25 (30,1%)	31 (37,3%)	28 (30,8%)	31 (34,1%)	30 (32,3%)	30 (32,3%)	27 (29%)	33 (35,5%)
Estadio T	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %
T1	16 (19,5%)	15 (18,3%)	12 (16,4%)	14 (19,2%)	15 (18,8%)	15 (18,8%)	13 (15,9%)	18 (22%)	14 (17,1%)	17 (20,7%)
T2	18 (22%)	19 (23,2%)	17 (23,3%)	17(23,3%)	18 (22,5%)	19 (23,8%)	18 (22%)	19 (23,2%)	17 (20,7%)	20 (24,4%)
T3	5 (6,1%)	5 (6,1%)	5 (6,8%)	4 (5,5%)	4 (5%)	5 (6,3%)	6 (7,3%)	4 (4,9%)	6 (7,3%)	4 (4,9%)
T4	2 (2,4%)	2 (2,4%)	2 (2,7%)	2 (2,7%)	2 (2,5%)	2 (2,5%)	3 (3,7%)	1 (1,2%)	2 (2,4%)	2 (2,4%)
Estadio N	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %
N0	30 (37%)	24 (29,6%)	24 (33,3%)	24 (33,3%)	28 (35,4%)	25 (31,6%)	27 (33,3%)	27 (33,3%)	25 (30,9%)	29 (35,8%)
N1	4 (4,9%)	12 (14,8%)	6 (8,3%)	8 (11,1%)	5 (6,3%)	11 (13,9%)	6 (7,4%)	10 (12,3%)	5 (6,2%)	11 (3,6%)
N2	6 (7,4%)	5 (6,2%)	5 (6,9%)	5 (6,9%)	6 (7,6%)	4 (5,1%)	6 (7,4%)	5 (6,2%)	8 (9,9%)	3 (3,7%)
Estadio M	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %
M0	37 (48,1%)	33 (42,9%)	31 (45,6%)	31 (45,6%)	35 (46,1%)	34 (44,7%)	35 (45,5%)	35 (45,5%)	35 (45,5%)	35 (45,5%)
M1	2 (2,6%)	5 (6,5%)	3 (4,4%)	3 (4,4%)	2 (2,6%)	5 (6,6%)	3 (3,9%)	4 (5,2%)	3 (3,9%)	4 (5,2%)
Tipos Histológicos	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %
Adenocarcinoma	23 (25,3%)*	37 (40,7%)	25 (30,9%)	27 (33,3%)	24 (27%)	34 (38,2%)	27 (29,7%)	33 (36,3%)	24 (26,4%)*	36 (39,6%)*
Carcinoma de Células Escamosas	21 (23,1%)	10 (11%)	15 (18,5%)	14 (17,3%)	19 (21,3%)	12 (13,5%)	17 (18,7%)	14 (15,4%)	20 (22%)	11 (12,1%)
Tabagismo	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %	Alto N %	Baixo N %
Sim	18 (33,3%)	9 (16,7%)	17 (36,2%)	8 (17%)	17 (32,7%)	10 (19,2%)	13 (24,1%)	14 (25,9%)	15 (27,8%)	12 (22,2%)
Ex-tabagista	10 (18,5%)	11 (20,4%)	6 (12,8%)	12 (25,5%)	7 (13,5%)	12 (23,1%)	12 (22,2%)	9 (16,7%)	8 (14,8%)	13 (24,1%)
Não	3 (5,6%)	3 (5,6%)	2 (4,3%)	2 (4,3%)	4 (7,7%)	2 (3,8%)	1 (1,9%)	5 (9,3%)	3 (5,6%)	3 (5,6%)

* Linear Association (R) = 7,07; p value < 0,01

** Linear Association (R)= 4,91; p value = 0,02

5.5 Características de expressão imuno-histoquímica dos proteoglicanos biglicam, perlecam e versicam

Quarenta e um espécimes de NSCLC foram analisados para imunoexpressão dos proteoglicanos biglicam, perlecam e versicam. A figura 10 mostra espécimes histológicos apresentando a marcação imuno-histoquímica para biglicam (A, D); imuno-histoquímica para perlecam (B, E) e imuno-histoquímica para versicam (C, F). O tecido pulmonar normal (A, B, C) exibiu forte expressão de biglicam, perlecam e versicam nas células em contraste com a fraca expressão dos mesmos proteoglicanos no estroma tumoral (D, E, F) e nas células tumorais (G, H, I).

A avaliação morfométrica realizada nas amostras para a expressão de biglicam, perlecam e versicam demonstrou uma expressão significativamente maior nas amostras de tecido normal adjacente do que nas áreas de estroma tumoral (Tabela 11). Igualmente significativa foi a diferença entre a expressão dos PGs no tecido normal adjacente em relação às células tumorais (Tabela 11).

Figura 10. Espécimes histológicos do pulmão normal e do estroma tumoral corados respectivamente por imuno-histoquímica para biglicam (A, D, G); imuno-histoquímica para perlecam (B, E, H) e imuno-histoquímica para versicam (C, F, I).

Tabela 11. Diferenças na expressão proteica dos proteoglicanos presente no estroma tumoral e no parênquima não tumoral adjacente.

	Média	Erro padrão	Significância (p=)
Biglicam no estroma tumoral	1,79	0,18	<0,01
Biglicam no tecido normal	12,17	1,40	
Biglicam nas células tumorais	0,39	1,36	<0,01
Biglicam no tecido normal	12,17	1,40	
Perlecam no estroma tumoral	5,39	0,86	<0,01
Perlecam no tecido normal	10,99	1,45	
Perlecam nas células tumorais	1,49	1,66	<0,01
Perlecam no tecido normal	10,99	1,45	
Versicam no estroma tumoral	2,10	0,68	<0,01
Versicam no tecido normal	10,10	1,97	
Versicam nas células tumorais	0,91	1,99	<0,01
Versicam no tecido normal	10,10	1,97	

5.6 Associação entre expressão gênica e proteica

A tabela 12 contém o resultado da análise pareada entre a expressão gênica e proteica do biglicam, perlecam e versicam nas amostras tumorais. Houve significativa associação entre alta expressão gênica do biglicam com sua baixa expressão proteica. Conforme esperado, houve associação semelhante entre a expressão gênica e proteica do versicam, embora essa associação não tenha sido significativa. Em relação ao perlecan, surpreendentemente, a expressão gênica foi inferior em relação à expressão proteica.

Tabela 12. Associação entre a expressão gênica e proteica dos proteoglicanos no tecido tumoral

	<i>Média</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Significância (p=)</i>
Expressão gênica biglicam	12,8977	4,85342	p=0.03
Expressão proteica biglicam	2,1150	,25284	
Expressão gênica perlecam	3,7919	,66939	p=0.10
Expressão proteica perlecam	6,6126	1,61772	
Expressão gênica versicam	3,1468	,74082	p=0.63
Expressão proteica versicam	2,5479	,82469	

5.7 Associação dos proteoglicanos com a sobrevida global

As tabelas 13 e 14 mostram os resultados da análise univariada de sobrevida e recidiva de doença para os pacientes de acordo com as variáveis clínico patológicas e biológicas estudadas. Mulheres ($p=0.02$) e tamanho do tumor (estadio T) ($p=0.009$) foram associados com melhor sobrevida enquanto que apenas o tamanho do tumor associou-se com maior recidiva da lesão ($p<0.01$). Houve uma tendência estatística para associação entre idade >66 anos ($p=0.09$), ausência de metástases linfonodais ($p=0.06$) e adenocarcinoma ($p=0.09$) com melhor sobrevida. Houve uma tendência estatística entre a menor expressão proteica do perlecam e a maior sobrevida dos pacientes ($p=0.09$; tabela 13). Não houve associação entre as curvas de sobrevida e a expressão gênica e proteica dos proteoglicanos estudados (Tabelas 13 e 14; figura 11).

Vários modelos estatísticos de sobrevida foram construídos por análise multivariada para as variáveis significantes e não significantes pelas curvas de sobrevida de Kaplan Meyer. Verificamos que quando o modelo matemático construído é controlado para idade, tipo histológico e expressão gênica de biglicam, sindecam e glipicam obtiveram alta taxa de sobrevida os pacientes do sexo feminino (OR 15.73; 3,73-6,62) com elevada expressão gênica de perlecam (OR 11,64; 1,3-10,09) e menor risco de óbito em estadio T1 (OR 0,07; 0,01-0,04), ausência de metástases nodais (OR 0,10; 0,02 -0,4) e expressão gênica de versicam (OR 0,01; 0,02-0,5) (Tabela 15).

Tabela 13. Análise de sobrevida com estratificação binária em alto e baixo das variáveis pelo método de Kaplan–Meier e as diferenças demonstradas pelo teste de Log-Rank.

Variáveis	Sobrevida global (meses)		Chi-Square (Log Rank)	Valor de <i>p</i>
	Média	Erro Padrão		
Idade (anos)				
≤66	101,6	13,3	2,78	0,09
>66	67,6	9,6		
Sexo				
Feminino	93,2	11,4	5,14	0,02
Masculino	79,7	10,70		
Tabagismo				
Não	74,0	12,5	0,70	0,7
Ex	74,6	10,6		
Sim	80,4	10,72		
Tamanho do tumor (T)				
T1	110,9	11,4	11,64	0,009
T2	78,6	12,3		
T3	38,1	12,0		
T4	42,6	10,0		
Metástase Linfonodal (N)				
N0	105,4	11,6	5,61	0,06
N1	50,4	7,8		
N2	52,1	10,7		
Metástase à distância (M)				
M0	103,8	9,9	2,14	0,1
M1	60,0	15,4		
Tipo Histológico				
Adenocarcinoma	93,6	10,86	2,80	0,09
Carcinoma Células Escamosas	50,0	6,91		
mRNA de Biglicam				
≤4.14	97,3	11,99	0,05	0,8
>4.14	58,4	7,82		
mRNA de Glipicam				
≤1.97	85,51	13,21	0,29	0,5
>1.97	69,22	8,87		
mRNA de Perlecam				
≤2.58	94,63	12,27	0,10	0,7
>2.58	59,93	6,99		
mRNA de Sindecam				
≤3.40	83,82	13,64	1,90	0,1
>3.40	97,41	11,53		
mRNA de Versicam				
≤1.95	104,54	12,43	1,69	0,1
>1.95	54,01	7,06		
Expressão proteica de Biglicam				
≤0.39	77	18.75	0.07	0.78
>0.39	61	10.89		
Expressão proteica de Perlecam				
≤0.50	55	31	2.88	0,09
>0.50	13.5	8.5		
Expressão proteica de Versicam				
≤0.88	5	0.0	1.00	0.30
>0.88	24	0.0

Figura 11. Curvas de sobrevivência geradas pelo método de análise de sobrevida de Kaplan Meyer. Log Rank e valores de significância encontram-se na tabela 10

Tabela 14. Análise de recidiva com estratificação binária em alto e baixo das variáveis pelo método de Kaplan–Meier e as diferenças demonstradas pelo teste de Log-Rank.

Variáveis	Recidiva da doença (meses)		Chi-Square (Log Rank)	Valor de p
	Média	Erro Padrão		
Idade (anos)				
≤66	39,8	4,8	2,43	0,1
>66	56,3	6,6		
Sexo				
Feminino	43,35	4,49	0,13	0,7
Masculino	48,60	8,49		
Tabagismo				
Não	52,73	11,81	2,11	0,34
Ex	42,32	5,00		
Sim	48,00	4,47		
Tamanho do tumor (T)				
T1	50,20	3,64	15,76	<0,01
T2	55,36	8,89		
T3	16,00	4,00		
Metástase à distância (M)				
M0	51,05	5,05	0,89	0,3
M1	31,66	2,99		
Tipo Histológico				
Adenocarcinoma	46,24	4,16	0,006	0,93
Carcinoma Células Escamosas	49,53	8,23		
mRNA Biglicam				
≤4.14	46,41	4,98	0,68	0,4
>4.14	38,31	3,91		
mRNA Glipicam				
≤1.97	43,11	5,27	0,01	0,8
>1.97	38,78	4,95		
mRNA Perlecam				
≤2.58	41,05	4,46	0,001	0,9
>2.58	41,79	4,79		
mRNA Sindecam				
≤3.40	41,20	3,34	0,32	0,5
>3.40	38,96	5,46		
mRNA Versicam				
≤1.95	47,50	4,52	1,65	0,1
>1.95	36,74	4,18		
Expressão proteica Biglicam				
≤1.87	92,58	16,42	0,003	0,9
>1.87	89,05	10,25		
Expressão proteica Perlecam				
≤2.84	94,97	16,89	0,018	0,8
>2.84	87,93	9,13		
Expressão proteica Versicam				
≤1.02	78,15	14,23	0,36	0,8
>1.02	83,07	10,29		

Tabela 15. Análise de sobrevida pelo modelo de risco proporcional de Cox (Chi-Square=38,121, p<0,01)

	Coeficiente β	Erro padrão	Método Wald	Significância	Risco (β)	Intervalo de confiança	
						Inferior	Superior
Idade							
≤66							
>66	-0,36	0,44	0,66	0,41	0,69	0,29	1,67
Sexo							
Masculino							
Feminino	2,75	0,73	14,10	0,000	15,73	3,73	66,28
Tamanho do tumor (T)			12,78	0,005			
T1	-2,65	0,91	8,36	0,004	0,07	0,01	0,42
T2	-0,51	0,72	0,50	0,47	0,59	0,14	2,46
T3	-1,14	1,01	1,27	0,25	0,31	0,04	2,32
Metástase Linfonodal (N)			12,66	0,002			
N0	-2,29	0,68	11,32	0,001	0,10	0,02	0,38
N1	-1,02	0,77	1,76	0,18	0,35	0,07	1,62
Tipo Histológico							
Adenocarcinoma							
CEC	-0,01	0,55	0,001	0,97	0,98	0,33	2,89
mRNA de Biglicam							
≤4.14							
>4.14	-0,59	0,88	0,46	0,49	0,54	0,09	3,08
mRNA de Glipicam							
≤1.97							
>1.97	-0,59	0,88	0,44	0,50	0,55	0,09	3,11
mRNA de Perlecam							
≤2.58							
>2.58	2,45	1,12	4,74	0,02	11,64	1,27	105,90
mRNA de Sindecam							
≤3.40							
>3.40	0,73	0,63	1,32	0,24	2,08	0,59	7,24
mRNA de Versicam							
≤1.95							
>1.95	-2,16	0,76	8,09	0,004	0,11	0,02	0,51

5.8 Pacientes selecionados para amostras de escarro: características demográficas

Setenta e três pacientes foram selecionados para a coleta prospectiva de escarro no ICESP e no HCB dos quais 49 homens e 24 mulheres, todos portadores de carcinomas primários de pulmão. A mediana de idade dos pacientes estudados foi de 60 anos (variação 37 a 89 anos). Quanto ao estadiamento, 3 pacientes eram T1, 18 estadio T2, 14 estadio T3, 29 estadio T4. Quanto ao comprometimento de linfonodos, 10 pacientes eram estadio N0, 5 estadio N1, 22 estadio N2 e 27 estadio N3. Vinte e quatro dos casos selecionados não apresentava metástase (M0) e 40 eram estadio M1. Em relação ao estadiamento clínico, 1 paciente era estadio IB, 2 pacientes eram estadio IIA, 1 era IIB, 5 eram estadio IIIA, 16 eram IIIB e 39 eram estadio IV. Nove pacientes não apresentavam informações de estadiamento nos prontuários. Em relação ao tabagismo consta que 18 pacientes eram tabagistas, 12 não eram fumantes, 43 eram ex-fumantes. Foram considerados como ex-fumantes os pacientes que abandonaram o hábito tabagista há mais de 1 ano. Quanto ao tipo histológico, 30 eram carcinomas de células escamosas, 33 adenocarcinomas, 1 carcinomas de grandes células, 5 carcinomas de pequenas células e 4 não tinham essa informação. Até o presente momento, 10 pacientes faleceram e 63 estão vivos. Na tabela 16 estão descritas suas características demográficas.

Para o grupo de risco (portadores de DPOC) foram selecionados 13 pacientes dos quais 9 homens e 4 mulheres, todos portadores de doença

pulmonar obstrutiva crônica. A mediana de idade dos pacientes estudados foi de 62 anos (variação 32 a 78 anos). Em relação ao tabagismo consta que 2 pacientes eram tabagistas, 4 não eram fumantes, 6 eram ex-fumantes e 1 não tinha esta informação no prontuário. Foram considerados como ex-fumantes os pacientes que abandonaram o hábito tabagista a mais de 1 ano. Suas características demográficas encontram-se descritas na Tabela 17.

Para o grupo controle foram selecionados 8 voluntários saudáveis para a coleta de escarro. Suas características demográficas estão apresentadas na Tabela 18. Foram selecionados 8 voluntários, dos quais 1 homem e 7 mulheres, todos sem nenhum histórico de doença pulmonar crônica e raio-X de tórax documentado. A mediana de idade dos voluntários avaliados foi de 73,5 anos (variação de 65 a 78 anos). Em relação ao tabagismo consta que 2 voluntários eram tabagistas e 6 não eram fumantes.

Tabela 16. Características demográficas dos 73 pacientes selecionados para coleta de escarro quanto ao sexo, idade, localização do tumor, estadiamento, tabagismo e sobrevida.

Total de pacientes	73
Idade (anos)	60 (37-89) ^a
Sexo	49 homens, 24 mulheres
Estadio T	
1	3
2	18
3	14
4	29
Não consta	9
Estadio N	
0	10
1	5
2	22
3	27
Não consta	9
Estadio M	
0	24
1	40
Não consta	9
Estadiamento clínico	
IB	1
IIA	2
IIB	1
IIIA	5
IIIB	16
IV	39
Não consta	9
Tipo histológico	
Carcinoma de células escamosas	30
Adenocarcinoma	33
Carcinoma de grandes células	1
Carcinoma de pequenas células	5
Não consta	4
Tabagismo	
Sim	18
Não	12
Ex-fumantes	43

Tabela 17. Características demográficas dos 13 pacientes portadores de DPOC quanto à idade, sexo e tabagismo.

Total de pacientes	13
Idade (anos)	62 (32-78) ^a
Sexo	9 homens, 4 mulheres
Tabagismo	
Sim	2
Não	4
Ex-fumantes	6
Não consta	1

Tabela 18. Características demográficas dos 8 voluntários saudáveis quanto à idade, sexo e tabagismo.

Total de voluntários	8
Idade (anos)	73,5 (65-78) ^a
Sexo	1 homens, 7 mulheres
Tabagismo	
Sim	2
Não	6

5.9 Análise dos níveis de cofilina-1 no escarro

Primeiramente foi realizada a análise descritiva de cada um dos grupos avaliados em relação a concentração de cofilina-1. Os dados obtidos encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19. Análise descritiva dos valores de **Cofilina-1** presente no escarro dos grupos selecionados (pg/mL).

Grupo	Nº casos	Média	Erro padrão	Mínimo	Máximo
Controle	6	415,25	3,68	78,10	1154,8
DPOC	13	662,63	5,74	78,10	1521,7
Câncer	73	1484,31	145,35	78,10	4239,4

Após a análise descritiva, a concentração de cofilina foi comparada entre os 3 grupos e foi observado um aumento significativo na concentração desta proteína no escarro de pacientes com câncer de pulmão ($1475.83\text{pg/mL} \pm 145.35$) quando comparado ao escarro de pacientes de alto risco ($662.63\text{pg/mL} \pm 5.74$) e de voluntários saudáveis ($415.25\text{pg/mL} \pm 3.68$) ($p=0.01$) (Figura 12A).

A análise univariada demonstrou que a alta concentração de cofilina-1 no escarro tem relação com o estadiamento T4 ($P= 0.01$), presença de metástase ($P=0.03$), histórico tabagista ($P=0.01$) e carcinoma de células escamosas ($p=0.04$).

Na análise do escarro de pacientes com câncer foi encontrada uma associação entre altos níveis de cofilina-1 e solCD44 ($R=0.21$; $P=0.04$) assim como entre AH e solCD44 ($R= 0.46$; $P<0.01$).

A análise de regressão logística controlada pela história tabágica, tipos histológicos, estadiamento, concentração de AH e solCD44 mostrou que a concentração de cofilina-1 no escarro de pacientes com câncer é um fator preditivo independente de metástases [$OR= 5.77$ ($0.78-42.74$)] (2 Log likelihood=41.32; $P<0.01$). Os pacientes com cofilina-1 $>1.475.83$ pg/mL apresentaram maior risco de metástase.

5.10 Análise dos níveis de solCD44 no escarro

A análise descritiva de cada um dos grupos avaliados em relação a concentração de solCD44 e os dados obtidos encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20. Análise descritiva dos valores de **solCD44** presente no escarro dos grupos selecionados (pg/mL).

Grupo	Nº casos	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Controle	6	70,11	18,65	62,50	108,2
DPOC	13	92,68	70,68	62,50	255,7
Câncer	73	830,18	1758,53	62,50	9228,0

Após a análise descritiva, a concentração de solCD44 foi comparada entre os 3 grupos e foi observado um aumento significativo na concentração desta proteína no escarro de pacientes com câncer de pulmão ($830.18\text{pg/mL} \pm 1758.53$) quando comparado ao escarro de pacientes de alto risco ($92.68\text{pg/mL} \pm 70.68$) e de voluntários saudáveis ($70.11\text{pg/mL} \pm 18.65$) ($p=0.01$) (Figura 12B).

Figura 12. **A.** Diferença na concentração de cofilina-1 (pg/mL) presente no escarro de cada um dos grupos estudados ($p=0.01$). **B.** Diferença na concentração de solCD44 (pg/mL) presente no escarro de cada um dos grupos estudados ($p=0.01$).

5.11 Análises de Curva ROC

Curva ROC - COFILINA-1

Curvas ROC (receiver operating characteristic) foram construídas para demonstrar a habilidade diagnóstica da cofilina-1 presente no escarro em discriminar pacientes com câncer de pacientes de risco e de pessoas saudáveis. Os níveis de cofilina-1 encontrados no escarro dos indivíduos do grupo controle e do grupo com câncer foram analisados usando a sensibilidade e especificidade. A curva ROC construída com esses dados apresentou uma área abaixo da curva de 0.78. Os valores de sensibilidade e especificidade encontrados em cada ponto de corte estão demonstrados na Tabela 21 (Anexo 8). O ponto de corte que apresentou maiores valores de especificidade e sensibilidade simultaneamente foi para valores de cofilina-1 maiores ou iguais a 248.9 pg/mL. Neste ponto, a especificidade foi de 67% e a sensibilidade foi 80% (Figura 13 A).

A cofilina-1 presente no escarro também foi capaz de distinguir os pacientes de alto risco dos pacientes com câncer de pulmão. Nesta situação, a curva ROC apresentou uma área abaixo da curva de 0.69 e com um ponto de corte de 802.5 pg/mL a curva apresentou 60% de sensibilidade e 54% de especificidade. Os valores de sensibilidade e especificidade encontrados em cada ponto de corte estão demonstrados na Tabela 22 (Anexo 9) (Figura 13B).

Figura 13. Curvas ROC representando a habilidade diagnóstica da dosagem da cofilina-1 no escarro para **(A)** diferenciar pacientes com câncer de pessoas saudáveis. Área = 0.78. e **(B)** para diferenciar pacientes com câncer de pacientes com alto risco. Área = 0.69.

Curva ROC – SolCD44

Curvas ROC (receiver operating characteristic) foram construídas para demonstrar a habilidade diagnóstica do solCD44 presente no escarro em discriminar pacientes com câncer de pacientes de risco e de pessoas saudáveis. O solCD44 presente no escarro foi capaz de distinguir os pacientes de alto risco dos pacientes com câncer de pulmão (Figura 14). Nesta situação, a curva ROC apresentou uma área abaixo da curva de 0.67 e com um ponto de corte de 65.8 pg/mL a curva apresentou 50% de sensibilidade e 84% de especificidade. Os valores de sensibilidade e especificidade encontrados em cada ponto de corte estão demonstrados na Tabela 23 (Anexo 10).

Figura 14. Curva ROC representando a habilidade diagnóstica da dosagem do solCD44 no escarro para diferenciar pacientes com câncer de pacientes com alto risco. Área = 0.67.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, após considerarmos as evidências que envolvem os glicosaminoglicanos e os proteoglicanos como componentes importantes no desenvolvimento e progressão de algumas neoplasias como o câncer de mama, cólon e pâncreas, levantamos a hipótese de que esses componentes da MEC poderiam ter um papel relevante no câncer de pulmão como marcadores prognósticos e/ou diagnósticos. Verificamos a relação entre a expressão do ácido hialurônico presente em espécimes tumorais e a angiogênese, a relação entre a expressão bioquímica de glicosaminoglicanos sulfatados e a expressão gênica de seus respectivos proteoglicanos no desenvolvimento e progressão das neoplasias e finalmente a expressão proteica de solCD44 e da cofilina-1 como indicadores diagnósticos presentes no escarro dos pacientes com CP.

As implicações dos GAGs, PGs e proteínas estudados no desenvolvimento e progressão das neoplasias, além do impacto no prognóstico e/ou diagnóstico passamos a discutir.

Expressão de ácido hialurônico nos espécimes tumorais

Na análise imuno-histoquímica encontramos uma significativa expressão de AH e microvasos co-localizada na interface célula-MEC nos tecidos tumorais. Tal achado sugere que o aumento na síntese de AH acontece através das interações entre o endotélio e os receptores de AH. Estes receptores encontram-se

expressos nas células endoteliais (Antonelli e D'Amore, 1991), fibroblastos pulmonares e músculos (Hall *et al.*, 1995), e são abundantes na interface célula-MEC. Essa expressão combinada de receptores de AH e da molécula de AH na interface epitelial célula-MEC sugere que esses dois componentes interagem entre si. Essa interação pode ter um papel na adesão das células epiteliais respiratórias à lâmina basal mantendo sua morfologia polarizada. Quando as transformações malignas começam a ocorrer nas células do epitélio respiratório, o desbalanceamento entre a hiperexpressão de AH e as AH sintases (Dentener *et al.*, 2005) dificulta a adesão das células à lâmina basal levando à invasão tumoral e sua esfoliação para fluidos como o escarro. A associação direta que encontramos entre uma alta expressão de AH e microvasos na interface célula-estroma dos tumores é corroborada pelo fato de que as hialuronidases (HYAL1 e HYAL2) (Dentener *et al.*, 2005), enzimas responsáveis pela degradação do AH, estimulam a neovascularização tumoral para o crescimento do tumor e desenvolvimento de metástases (Deed *et al.*, 1997). Além disso, quando analisamos o tumor inteiro, encontramos uma associação direta entre os tumores em estadio T4 e N1 com altos níveis de expressão de AH nas células cancerosas o que nos permite sugerir que a ressecção cirúrgica falha em curar os pacientes com câncer de pulmão localizado em função das metástases. No presente estudo, uma forte intensidade de marcação em células tumorais foi significativamente associada com Carcinomas de Células Escamosas quando comparado aos adenocarcinomas e os carcinomas de grandes células. Achados similares foram descritos por Pirinen *et al.* (2005), que analisou o valor prognóstico do AH em um

amplo grupo de pacientes com carcinoma não-pequenas células de pulmão usando sondas biotiniladas específicas para AH. Como já antes demonstrado por Wang *et al.* (1996), células tumorais tem níveis altos de AH, mas elas mostram diferenças consideráveis nesta expressão dependendo da origem da célula e do tipo histológico do tumor. Nossos achados suportam a ideia de que células escamosas normais e carcinomas com diferenciação escamosa expressam grandes quantidades de AH (Hirvikoski *et al.*, 1998). Apesar disso, tumores derivados de epitélio não estratificado tais como, cólon (Ropponen, 1998) e ovário (Antilla *et al.*, 2000), demonstram uma baixa ou nenhuma expressão de AH. Em concordância com esses artigos, nossos resultados mostraram uma expressão menor de AH nos tumores do tipo adenocarcinoma.

Além disso, encontramos que uma expressão elevada de AH em células tumorais está associada com um mau prognóstico assim como está descrito na literatura (Pirinen *et al.*, 2005; Ropponen *et al.*, 1998; Antilla *et al.*, 2000). Considerando que somente três artigos anteriores relacionaram a imunomarcção do AH com a sobrevida (Pirinen *et al.*, 2005; Ropponen *et al.*, 1998; Antilla *et al.*, 2000), entendemos que a análise do AH nos tecidos tumorais traz informações prognósticas valiosas sobre as transformações cancerígenas nos tecidos e o AH, usado como uma variável contínua, fornece mais informação prognóstica do que o estadiamento clínico-patológico.

Expressão bioquímica dos glicosaminoglicanos, condroitim e heparam sulfato, nos espécimes tumorais

No presente estudo demonstramos uma elevação significativa nos níveis de condroitim e heparam sulfato nos espécimes tumorais quando comparados com a quantidade existente nos espécimes não tumorais. A elevação dos níveis de heparam sulfato manteve-se altamente significativa mesmo quando os espécimes tumorais foram histologicamente categorizados como carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas. Foram utilizados como espécimes não tumorais amostras provenientes da margem livre da ressecção cirúrgica e a utilização destas amostras pode ser considerada como uma limitação do estudo, uma vez que, apesar de não apresentarem células tumorais, este tecido pode ter sofrido alguma modificação pelo fato de fazer parte de um órgão já acometido pelo carcinogênese. Presume-se, portanto que a diferença nas quantidades destes GAGs encontradas entre espécimes tumorais e não tumorais poderia ser ainda maior se os espécimes utilizados como controles fossem provenientes de um pulmão saudável.

No presente estudo, a alta quantidade de CS presente nos tecidos tumorais é corroborada pelo fato de que elevados níveis de CS são encontrados em diferentes tipos de tumores, incluindo osteosarcoma, câncer de mama, de pâncreas e de cólon (Nikos et al., 2012). Tais resultados sugerem que os glicosaminoglicanos sulfatados possam exercer um papel fundamental no desenvolvimento e progressão do câncer de pulmão uma vez que a interação

entre as células tumorais e o microambiente neoplásico, representado pela MEC, influencia as propriedades invasivas e metastáticas dos tumores. Após a transformação neoplásica, as proteínas da MEC são secretadas localmente pelas próprias células neoplásicas ou por células da própria matriz, o fibroblasto, organizando-se em uma rede nos espaços que circundam as células neoplásicas. A MEC ocupa um volume significativo no tecido e não representa uma massa inerte que somente proporciona suporte estrutural (Raghow et al., 1994), visto que possui informações que orientam a migração, ligação, diferenciação e organização das células neoplásicas, modulando assim uma série de processos. Outros componentes do microambiente tumoral tais como as citocinas, fatores de crescimento, células do sistema imunológico, fibroblastos entre outros, apresentam interação com as células tumorais e entre si criando sistemas extremamente complexos que também contribuem para o remodelamento da MEC.

Apesar disso, o metabolismo dos GAGs sulfatados em um ambiente tumoral é considerado de difícil compreensão e muito pouco das interações entre a síntese e a degradação destas moléculas foi elucidado nas transformações malignas. Em vários tipos tumorais, os genes envolvidos na biossíntese do heparan e condroitim sulfato e seus respectivos proteoglicanos se mostraram hipo- ou hiper-regulados dependendo do tecido. Uma alta regulação de glypican-1 (GPC1) and sindecam-1 (SDC1), e da sulfatase Sulf-2 já foi descrita em câncer de mama (Matsuda *et al.*, 2001; Morimoto *et al.*, 2005) enquanto que uma baixa regulação de outras enzimas presentes no metabolismo do heparan sulfato como

o SULF1 e a HS3ST2 também já foi encontrada em cânceres de mama, cólon, pulmão e pâncreas (Narita *et al.*, 2007; Miyamoto *et al.*, 2003). Dessa forma, o desbalanceamento no comportamento dessas enzimas demonstra a criação de um padrão metabólico específico para cada tipo de tumor (Suhovskihab *et al.*, 2015). Por exemplo, em câncer colo-retal já foi observado que uma alta expressão dos genes precursores de enzimas de síntese de heparam sulfato está associada à baixa sobrevida (Hatabe *et al.*, 2013) enquanto que uma baixa expressão destes genes é associada à progressão de condrosarcomas (Bui *et al.*, 2010).

Dessa maneira, nossos resultados corroboram com trabalhos da literatura deixando claro que o comportamento destes GAGs é específico para cada tipo de tumor. Entretanto, até a presente data as informações sobre o comportamento destas moléculas e sobre o seu maquinário metabólico em câncer de pulmão são pouco compreendidas.

Expressão gênica de proteoglicanos nos espécimes tumorais

Na sequência dos dados obtidos em relação às cadeias de GAGs nos tecidos tumorais, avaliamos o perfil de expressão gênica de HSPGs e CSPGs. Através dessa análise, observamos uma diminuição na expressão de biglicam, glipicam, perlecam e versicam nos tecidos tumorais.

Nossos resultados estão de acordo com outros grupos de pesquisa que também observaram uma hiporegulação de HSPGs e CSPGs em outros tipos de cânceres. Fernández-Vega *et al.* (2013) encontraram uma baixa expressão de

sindecam-1 e perlecan em câncer de mama enquanto que Joo et al. (2014) relatam uma baixa expressão de sindecam-1 e glipicam-3 em câncer de cólon. Tais achados confirmam a já conhecida expressão elevada da Heparanase (Hpa), enzima de degradação do heparam sulfato e seus PGs, na maioria dos cânceres. Sua atividade quebra os HSPGs, aumenta a permeabilidade endotelial, libera FGFs que estavam aderidos à membrana e permite interação entre o heparam sulfato e os FGFs no soro sanguíneo (Miyamoto, 2003).

Em relação aos CSPGs, a diminuição da expressão de biglicam foi detectada em osteosarcoma, melanoma, e em carcinoma escamoso de laringe (Benayahu *et al.*, 2001; Hunzelmann *et al.*, 1995; Skandalis *et al.*, 2004) enquanto que a expressão do versicam demonstrou resultados diferentes conforme o tipo de tumor. Pirinen et al. (2001) encontraram níveis de versicam dependentes do estadiamento tumoral, sendo que quanto mais avançado o tumor, maior o nível de versicam nas células estromais de câncer de pulmão. Já em câncer de colo-retal, Pitule et al. (2013) encontraram uma elevação na expressão dos genes precursores deste CSPG em tecidos tumorais.

Depreende-se que essas múltiplas funções dos HSPGs envolvem a organização da MEC através da ligação com outras moléculas de MEC tais como o colágeno I e IV, fibronectina e laminina, além de organizar o desenvolvimento e consistência estrutural da MEC e membrana basal sendo considerados então como importantes moduladores das ligações célula-célula e célula-MEC. Em meio a isso, já foi demonstrado que a presença dos HSPGs promove a adesão celular

enquanto que sua ausência promove a invasão e migração de células malignas (Sanderson, 2001).

Assim como os HSPGs, os CSPGs participam de diversas interações com a MEC e fatores de crescimento e podem estar localizados livres na MEC, aderidos à membrana celular e também no espaço intracelular. Sua presença ou ausência é crucial na definição de malignidade uma vez que diferentes estudos já encontraram alta e baixa expressão de CSPGs relacionadas tanto com o tecido normal quanto com o tecido tumoral (Nikos *et al.*, 2012).

No presente estudo, uma alta concentração de CS nos tumores contrasta com a baixa expressão gênica do CSPG versicam. Na realidade, a literatura embasa e confronta tais achados. Estudos focados na relação dos CSPGs com a malignidade de tumores demonstram que estes encontram-se elevados, incluindo o versicam, em diferentes tipos de câncer, tais como o osteosarcoma, o câncer mamário, de pâncreas e de cólon (Nikos *et al.*, 2012) enquanto que o decorin, outro CSPG, apresenta uma atividade anti-tumoral (Iozzo e Schaefer, 2011). Apesar disso, em câncer de pulmão as informações sobre os níveis de versicam são escassas e demonstram elevados níveis desta molécula em tecidos tumorais pulmonares somente através de métodos qualitativos (Pirinen *et al.*, 2005). Até nosso conhecimento diante da literatura, não encontramos nenhum dado quantitativo de versicam em câncer de pulmão. Assim, entendemos que, considerando a ambiguidade de comportamento dos CSPGs no desenvolvimento e progressão tumoral, este pode ser um novo achado no que diz respeito à

composição da MEC ao demonstrar um comportamento inverso e diferente do versicam em câncer de pulmão comparado à outros tipos de câncer.

É interessante ressaltar que outros estudos já demonstraram que os efeitos causados pela presença ou ausência dos CSPGs são diferentes dos HSPGs e são também dependentes do padrão de sulfatação dos mesmos (Theocaris et al., 2006). Dessa forma, é de se presumir que para compreender melhor o envolvimento e o papel do versicam no câncer de pulmão, serão necessários estudos bioquímicos estruturais. Tais estudos poderão esclarecer os tipos de sulfatação do mesmo e as implicações dessa sulfatação nas suas interações com as moléculas da MEC.

Com relação ao biglicam e o versicam, associações diretas foram encontradas entre estes e os diferentes tipos histológicos do câncer de pulmão. Surpreendentemente, adenocarcinomas expressaram menores níveis de ambos PGs em comparação aos carcinomas de células escamosas, sugerindo efeitos adversos no potencial agressivo destes tumores. Estes achados novamente corroboram a complexidade e multiplicidade de ações destes componentes da MEC já discutidas anteriormente.

Nossos resultados tiveram impacto na história natural do câncer de pulmão. A expressão dos PGs foi associada ao sexo, estadió T, sobrevida e recidiva da lesão. De fato, pacientes do sexo feminino, em estadió T limitado (T1 e T2) apresentaram maior sobrevida e menor recidiva da lesão do que pacientes do sexo masculino em estadió T avançado. Cabe ressaltar que quando o modelo

estatístico construído é controlado para idade, tipo histológico e expressão gênica de biglicam, sindecam e glipicam os pacientes do sexo feminino com elevada expressão gênica de perlecam apresentaram alta taxa de sobrevida enquanto que os pacientes em estadio T1, ausência de metástases nodais e expressão gênica de versicam apresentaram menor risco de óbito.

Tais resultados são difíceis de comparar com a literatura em função da escassez de estudos investigando estes PGs e sua interação com o prognóstico dos pacientes em câncer de pulmão.

Expressão de proteínas no escarro

Demonstramos que pacientes com câncer de pulmão apresentam elevações altamente significativas da produção de solCD44 e cofilina-1 no escarro, despontando como potenciais marcadores diagnósticos de malignidade. Em ordem decrescente, constatamos que o escarro de pacientes com câncer de pulmão contém altas concentrações de solCD44 e cofilina-1, vindo a seguir o escarro de pacientes com alto risco para câncer de pulmão e finalmente os voluntários saudáveis. Esse fenômeno, em virtude da alta significância estatística encontrada, é de extrema relevância, pois até onde temos conhecimento, trata-se de inédita constatação de potenciais marcadores diagnósticos de câncer de pulmão em espécimes obtidos por técnica não-invasiva. A significância manteve-se elevada mesmo quando as concentrações do solCD44 e cofilina-1 no escarro foram comparadas entre pacientes com câncer vs voluntários saudáveis, pacientes com câncer vs pacientes de alto risco e pacientes de alto risco vs

voluntários saudáveis. Claramente, houve elevação da produção de ambas as moléculas no escarro de pacientes de alto risco, porém a produção no escarro de pacientes com câncer de pulmão foi ainda maior. Até onde conhecemos, tais moléculas nunca foram dosadas em escarro, mas nossos resultados são corroborados pelos estudos de Zheng *et al* (2013) que demonstraram o potencial diagnóstico da cofilina-1 no soro de pacientes com câncer de pulmão assim como Franzmann *et al* (2012) demonstraram a habilidade do solCD44 como potencial marcador diagnóstico na saliva de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

Além de encontrarmos elevação nos níveis de cofilina-1 no escarro, constatamos uma relação da produção desta proteína com os carcinomas de células escamosas. Em estudos anteriores, nosso grupo também demonstrou que outro componente de MEC, o AH, um GAG não sulfatado abundante na MEC pulmonar, pode atuar como um proeminente marcador diagnóstico de câncer de pulmão no escarro (Rangel *et al.*, 2015) e que este também tem relação com carcinoma de células escamosas o que nos faz acreditar que estes tumores tendem a secretar mais moléculas de matriz para o escarro em função de sua localização mais central na árvore respiratória. Além disso, outros exames realizados no escarro como a citologia, por exemplo, tem mais rentabilidade nos casos de carcinomas de células escamosas exatamente pelo fato da sua localização mais central ser capaz de influenciar mais de perto a produção do escarro (Fernandez *et al.*, 2002).

No presente estudo a cofilina-1 e o solCD44 despontam como importantes marcadores de rastreamento do câncer de pulmão e exclusão de doenças pulmonares como a DPOC. Esse potencial foi avaliado através da construção de curvas ROC. Para a discussão dos resultados apresentados é importante ressaltar que a curva ROC é uma ferramenta estatística destinada a descrever quantitativamente o desempenho de um teste diagnóstico cujo resultado é expresso sob a forma de variável contínua ou ordinal. Ao construir uma curva ROC valores de sensibilidade e especificidade são gerados. Os valores de especificidade correspondem à probabilidade do teste em fornecer resultados verdadeiros negativos e a sensibilidade representa a probabilidade do teste em fornecer resultados verdadeiros positivos. Martinez et al. (2003) discorrem que a regra básica de decisão para a busca de um ponto de corte que gere uma resposta dicotômica (doente ou não doente) em geral é definida pelo ponto onde sensibilidade e especificidade são simultaneamente maiores.

Em nosso trabalho, com valores de concentração de cofilina-1 acima de 248.9 pg/mL, encontramos sensibilidade de 80% e especificidade de 67% para rastreamento de pacientes com câncer de pulmão e voluntários saudáveis. Já com valores de concentração do AH acima de 1619.8 pg/mL encontramos especificidade de 100% e sensibilidade de 40%. Estabelecendo este ponto, o teste do AH no escarro se mostra altamente relevante, pois tem potencial para diagnosticar o câncer de pulmão com certeza em 40% dos pacientes permitindo o início do tratamento antes dos procedimentos diagnósticos invasivos disponíveis. A especificidade de 100% significa que para valores acima deste ponto não há

falsos positivos, logo, o paciente que tiver um valor igual ou superior a 1619.8pg/mL tem câncer e pode iniciar o tratamento. A desvantagem desse ponto de corte é que 60% das pessoas com câncer podem apresentar um diagnóstico falso negativo tornando o teste inconclusivo quando valores abaixo de 1619.8pg/mL de cofilina-1 no escarro forem detectados. Sendo assim, a aplicação clínica correta implica que qualquer paciente submetido a esse teste, com obtenção de cofilina-1 menor que 1619.8pg/mL no escarro, seja conduzido para a realização dos testes diagnósticos convencionais para esclarecimento.

Além disso, o teste de cofilina-1 no escarro conseguiu distinguir com sensibilidade de 41% e especificidade de 100%, os pacientes de alto risco em relação aos pacientes com câncer de pulmão para um ponto de corte de concentração de AH acima de 1525.0 pg/mL. Estabelecendo este ponto, o teste do AH no escarro se mostra significativo, pois tem capacidade para determinar a presença do câncer em considerável parte dos casos permitindo o início do tratamento dos pacientes antes dos procedimentos diagnósticos invasivos.

Da mesma forma, a curva ROC construída para avaliar a habilidade diagnóstica do solCD44 presente no escarro foi capaz de distinguir os pacientes de alto risco dos pacientes com câncer de pulmão. Com ponto de corte de 65.8 pg/mL a curva apresentou 50% de sensibilidade e 84% de especificidade. Acima de 279.00 pg/mL foi possível distinguir 100% dos casos de câncer de pulmão, porém neste ponto a sensibilidade foi de 30%.

Os resultados apresentados no presente trabalho têm extrema relevância, pois a busca por marcadores diagnósticos relacionados ao câncer de pulmão tem sido alvo de muitos pesquisadores nas últimas décadas. Segundo Fernandez *et al.* (2002) diversos grupos de estudos têm tentado encontrar algum marcador sérico ou no escarro para a detecção da doença, mas até o presente momento nenhum desses marcadores apresentou aplicação ampla na prática clínica. Essa ânsia pela descoberta de marcadores diagnósticos novos está relacionada com o fato de que as técnicas diagnósticas para o câncer de pulmão disponíveis são invasivas e causam grande desconforto e ansiedade nos pacientes. Isso se dá principalmente pelo fato da maioria das técnicas necessitarem aplicação de anestésias, internação, e, na maioria dos casos, são metodologias que trazem efeitos colaterais dolorosos ao paciente (Collins *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2002).

No presente trabalho, demonstramos uma associação direta entre os altos níveis de cofilina-1 e solCD44 no escarro de pacientes com câncer de pulmão sugerindo que altas taxas de divisão celular nas células neoplásicas induzidas pela cofilina-1 associadas ao aumento de expressão do receptor CD44 propiciam maior adesão e movimentação celular facilitando as metástases à distância.

A detecção de cofilina e solCD44 no escarro tiveram impacto na história natural dos pacientes com câncer de pulmão. Surpreendentemente, demonstramos que a alta concentração de cofilina-1 no escarro tem também relação com o estadiamento T4, presença de metástase e histórico tabagista. De fato, através da análise de regressão logística controlada pelo histórico tabagista,

tipos histológicos, estadiamento, concentração de AH e solCD44 mostrou que a concentração de cofilina-1 no escarro de pacientes com câncer é um fator preditivo independente de alto risco de metástases. Tais resultados permitem vislumbrar que a concentração desta proteína no escarro depende da fase de progressão tumoral, provavelmente como reflexo das modificações sofridas pela MEC já no início da carcinogênese, ou seja, na fase das transformações neoplásicas. De acordo com Wistuba e Gazdar (2006) desde essa fase já há um remodelamento do tecido e da MEC que podem surtir efeitos na composição do escarro e na produção dos componentes de MEC. Como já dito anteriormente, a interação entre as células tumorais e o microambiente neoplásico, representado pela MEC, influencia as propriedades invasivas e metastáticas dos tumores.

Apesar dessa elevada diferença observada entre os grupos, um dos fatores limitantes desta parte do estudo foi o recrutamento de pessoas saudáveis na mesma faixa etária dos pacientes com câncer de pulmão e com radiografias de tórax documentadas para a coleta de amostras de escarro para o grupo controle. Em função desta dificuldade, existe uma grande diferença entre o número de casos doentes e o número de casos normais. Independente disto, o considerável aumento de solCD44 e cofilina-1 no escarro de pacientes com câncer de pulmão e a constatação de alterações ocorridas já no início da carcinogênese conferem a estas proteínas um perfil promissor como marcadores diagnósticos de CP.

Considerando os resultados aqui apresentados, fica claro que os testes de cofilina-1 e solCD44 no escarro são promissores para aplicação na prática clínica

uma vez que trazem ao médico e ao paciente uma alternativa para a detecção da doença através de um teste não invasivo. Além disso, trata-se de um método de simples quando comparado com os testes diagnósticos ou preventivos do câncer de pulmão tidos como padrão ouro tais como as radiologias, tomografias computadorizadas e broncoscopias. Sem dúvida, para que essa aplicação prática seja incorporada na rotina do paciente seria interessante e indispensável que novos grupos designados para o desenvolvimento do teste fossem recrutados e dentro da situação mais real possível. Independente disto, frente aos resultados observados e discutidos até aqui, é indiscutível que tais proteínas apresentam um papel na história natural do câncer de pulmão e, devido ao seu aumento no escarro, despontam como promissores alvos diagnósticos da doença.

7. CONCLUSÕES

No presente estudo houve impacto dos GAGs não-sulfatados (ácido hialurônico) e GAGs sulfatados (condroitim e heparam) e seus respectivos PGs na carcinogênese e progressão do câncer de pulmão, conforme demonstrado em níveis bioquímicos, proteicos e gênicos.

A expressão do ácido hialurônico demonstrou ter correlação no processo de crescimento tumoral através da angiogênese.

A relevância dos GAGs sulfatados no comportamento dos vários tipos histológicos de câncer de pulmão ainda precisa ser mais amplamente investigado.

A expressão gênica de PGs, com exceção do sindecam-1, demonstram uma diminuição nos tecidos tumorais, despontando como potenciais biomarcadores prognósticos nos vários tipos histológicos de câncer de pulmão.

Finalmente, o aumento da expressão proteica de solCD44 e da cofilina-1 no escarro de pacientes com câncer de pulmão mostram-se como promissores alvos de detecção da doença.

8. ANEXOS

ANEXO 1 – TABELA 01

Tabela 01. Características demográficas dos 142 pacientes selecionados no hospital AC Camargo para a coleta de amostras de tecido.

RNA(ID tubo)	Idade	Sexo	Data Cirurgia	Status	Estadiamento	Tabagismo	Tipo histológico	Identificação Amostra Normal
PU 1T	78	M	nov/08	ÓBITO	T2N1M0	SIM	Adenocarcinoma	PU 1N
PU 2T	73	M	dez/03	ÓBITO	T3N0M0	NE	Adenocarcinoma	PU 2N
PU 4T	52	F	jun/05	VIVO	T1N0M0	EX	Adenocarcinoma	PU 4N
PU 9T	65	M	ago/10	vivo	NE	NE	Adenocarcinoma	PU 9N
PU 12T	76	M	nov/08	Vivo	T2 N0 M0			PU 12N
PU 17T	72	M	dez/05	ÓBITO	T2N1M0	NE	Adenocarcinoma	PU 17N
PU 27T	48	M	jan/01	VIVO	T2N0M0	NE	Adenocarcinoma	PU 27N
29T	70	F	abr/06	ÓBITO	T2N0M0	NÃO	Adenocarcinoma	29N
31T	78	F	out/06	vivo	T1N0M0	ND	Adenocarcinoma	31N
32T	73	M	ago/08	ÓBITO	T2N2M0	SIM	CEC	32N
PU 33T	79	M	set/04	ÓBITO	T2N1M0	NE	Adenocarcinoma	PU 33N
PU 35T	77	F	set/04	VIVO	T2N0M0	NE	Adenocarcinoma	PU 35N
36T	84	M	jul/08	vivo	T2N0M0	SIM	CEC	36N
40T	71	M	mar/06	ÓBITO	T2N2M0	SIM	Adenocarcinoma	40N
PU 42T	63	M	out/04	VIVO	T2N0M0	NE	Adenocarcinoma	PU 42N
PU 43T	63	F	set/08	VIVO	NE	NÃO	Adenocarcinoma	PU 43N
PU 44T	78	M	jan/05	ÓBITO	NE	NE	Adenocarcinoma	PU 44N
45T	74	M	jan/04	ÓBITO	T3N0M0	SIM	Adenocarcinoma	45N
PU 46T	83	F	mai/05	VIVO	T4N1M0	NE	Adenocarcinoma	PU 46N
50T	68	F	mai/04	vivo	ND	NÃO	Grandes Células	50N
PU 51T-2	43	F	ago/05	ÓBITO	T2N2M0	NE	Adenocarcinoma	PU 51N-2
PU 52T	57	M	set/05	ÓBITO	T2N1M1	NE	CEC	PU 52N

53T	77	F	set/04	vivo	T2N0M0	NÃO	Adenocarcinoma	53N
PU 54T-2	66	F	nov/05	VIVO	T1N0M0	NE	Adenocarcinoma	PU 54N-2
PU 55T	80	M	nov/05	ÓBITO	T2N0MX	NE	Adenocarcinoma	PU 55N
PU 56T	70	M	abr/06	ÓBITO	IIA	SIM	Adenocarcinoma	PU 56N
PU 59T	55	M	ago/08	ÓBITO	T2N0M0	EX	Adenocarcinoma	PU 59N
PU 65T	66	F	jun/06	ÓBITO	T2N2M1	NE	Adenocarcinoma	PU 65N
PU 66T	75	M	jul/06	ÓBITO	T1N2M0	NE	Adenocarcinoma	PU 66N
69T	44	F	jan/05	ÓBITO	T2N2M0	NÃO	Adenocarcinoma	69N
PU 71T	48	F	set/06	VIVO	T2N0M0	SIM	Adenocarcinoma	PU 71N
PU 72T	46	F	dez/06	VIVO	T2N1M0	NE	CEC	PU 72N
PU 77T	83	M	mai/07	ÓBITO	T2N0M0	EX	CEC	PU 77N
78T	53	F	jun/06	vivo	T2N1M0	NÃO	Adenocarcinoma	78N
80T	78	M	fev/06	ÓBITO	T2N0M0	NÃO	Adenocarcinoma	80N
PU 81T	63	M	jun/07	VIVO	T3N0M0	SIM	CEC	PU 81N
PU 82T	47	M	jul/07	VIVO	T1N0M0	NE	Adenocarcinoma	PU 82N
84T	51	F	set/06	vivo	T2N0M0	SIM	Adenocarcinoma	84N
85T	46	F	dez/06	vivo	T2N1M0	SIM	CEC	85N
86T	63	F	abr/07	ÓBITO	ND	ND	Adenocarcinoma	86N
PU 87T	64	M	fev/05	ÓBITO	T4N0MX	NE	CEC	PU 87N
PU 88T	58	M	mar/06	ÓBITO	T3N2MX	NE	CEC	PU 88N
89T	65	F	fev/07	vivo	T1N0M0	NÃO	Adenocarcinoma	89N
90T	62	F	out/07	ÓBITO	T2N2M0	ND	CEC	90N
91T	68	M	fev/08	vivo	T1N0M0	SIM	CEC	91N
PU 94T	50	M	abr/09	Vivo	NE	NE	Adenocarcinoma	PU 94N
95T	72	M	mai/08	vivo	T2N0M0	NÃO	Adenocarcinoma	95N
98T	69	M	set/07	vivo	T2N0M0	SIM	CEC	98N
PU 105T	75	M	jul/08	Vivo	T2 N0 Mx		CEC	PU 105N
113T	82	M	jul/09	vivo	T1N0M0	SIM	Adenocarcinoma	113N
114T	72	M	jul/00	ÓBITO	T1N2M0	NÃO	Adenocarcinoma	114N

115T	66	M	fev/05	vivo	T4N0M0	SIM	CEC	115N
111T	74	M	out/09	vivo	T1N0M0	SIM	CEC	111N
118T	68	M	abr/09	vivo	T2N0M0	SIM	CEC	118N
119T	53	M	jun/05	vivo	T2N2M0	SIM	CEC	119N
126T	83	M	mar/06	ÓBITO	T2N1M0	SIM	Grandes Células	126N
127T	58	M	mar/06	ÓBITO	ND	ND	CEC	127N
128T	64	M	fev/06	ÓBITO	T4N0M0	NÃO	CEC	128N
129T	64	M	ago/08	vivo	ND	SIM	Adenocarcinoma	129N
132T	60	F	jun/07	vivo	T2N0M0	SIM	Adenocarcinoma	132N
133T	70	F	mai/07	vivo	T2N2M1	NÃO	Adenocarcinoma	133N
134T	52	F	ago/07	vivo	T1N0M0	NÃO	Adenocarcinoma	134N
136T	79	M	dez/07	vivo	ND	SIM	Grandes Células	136N
137T	60	M	mar/08	ÓBITO	T2N1M0	SIM	Adenocarcinoma	137N
140T	59	M	out/09	vivo	T3N0M0	NÃO	Carcinoma Pouco Diferenciado	140N
143T	58	M	jan/09	vivo	T2N0M0	SIM	CEC	143N
146T	62	M	mai/09	vivo	T1N0M0	SIM	Adenocarcinoma	146N
147T	51	M	abr/09	vivo	ND	ND	Adenocarcinoma	147N
151T	61	m	ago/09	ÓBITO	T2N3M0	SIM	Adenocarcinoma	151N
154T	64	M	dez/09	vivo	T3N0M0	NÃO	Adenocarcinoma	154N
156T	76	M	fev/10	vivo	ND	SIM	CEC	156N
157T		F	jan/10	vivo	ND	SIM	Adenocarcinoma	157N
158T	63	M	fev/10	vivo	ND	SIM	CEC	158N
PU 71T	58	M	set/05	VIVO	T2N1M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 71N
PU 72T	76	M	set/05	VIVO	T2N1M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 72N
PU 73T	67	F	mar/05	VIVO	T1N0M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 73N
PU 74T	80	M	nov/05	ÓBITO	T2N0M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 74N
PU 75T	68	M	ago/04	ÓBITO	T1N1M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 75N
PU 77T	71	M	nov/08	VIVO	T1N0M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 77N

PU 79T	62	M	set/06	VIVO	T2N2M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 79N
PU 81T	76	M	mai/06	ÓBITO	T2N2M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 81N
PU 82T	52	F	jul/06	VIVO	T1N0M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 82N
PU 84T-2	49	F	ago/06	VIVO	T2N0M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 84N-2
PU 85T	46	F	abr/06	VIVO	T2N1M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 85N
PU 87T	54	M	jan/07	VIVO	T2N1M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 87N
PU 88T	63	M	mar/08	VIVO	T3N0M0	ND	CEC	PU 88N
PU 89T	65	M	ago/07	ND	T2N2M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 89N
PU 90T	62	F	mai/07	ÓBITO	T2N2M0	ND	CEC	PU 90N
PU 91T	68	F	ago/08	VIVO	T1N0M0	ND	CEC	PU 91N
PU 92T	71	M	ago/07	VIVO	T3N0M0	ND	CEC	PU 92N
PU 94T	62	M	fev/07	VIVO	T2N2M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 94N
PU 98T	69	M	fev/07	VIVO	T2N0M0	ND	CEC	PU 98N
PU 105T	75	M	jul/08	VIVO	T2N0MX	ND	CEC	PU 105N
421	80	F	out/00	ND	ND	ND	OUTROS	421
236 T	63	M	ND	ND	ND	ND	OUTROS	236 N
239 T	85	F	ago/04	ND	T2N0M0	ND	OUTROS	239 N
256 T	65	M	ND	ND	ND	ND	CEC	256 N
PU 151T	ND	M	ND	ND	ND	ND	ND	PU 151N
PU 156T-2	79	M	fev/10	ND	T2N0M0	EX	CEC	PU 156N-2
PU 169T-2	64	M	dez/08	ND	T1N2M0	EX	ADENOCARCINOMA	PU 169N-2
PU 172T	72	F	fev/06	ÓBITO	T2N1M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 172N
PU 181T	65	F	set/10	VIVO	T3N1M0	SIM	ADENOCARCINOMA	PU 181N
PU 182T	67	M	abr/10	VIVO	T2N2M0	EX	CEC	PU 182N
PU 185T	76	M	set/10	ÓBITO	T1N0M0	EX	ADENOCARCINOMA	PU 185N
PU 186T	70	M	nov/10	ÓBITO	T4N0M0	EX	ADENOCARCINOMA	PU 186N
PU 188T	62	M	jan/11	VIVO	T1N0M0	SIM	ADENOCARCINOMA	PU 188N
PU 189T	76	M	jan/11	VIVO	T1N0M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 189N
PU 190T-2	70	M	fev/11	VIVO	T1N1M0	SIM	ADENOCARCINOMA	PU 190N-2
PU 191T	66	F	mar/11	VIVO	T2N0M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 191N

PU 192T	80	F	jul/11	VIVO	T1N0M0	EX	CEC	PU 192N
PU 193T	60	M	ago/11	ND	ND	EX	ADENOCARCINOMA	PU 193N
PU 194T-2	80	M	set/11	VIVO	T1N0M0	EX	ADENOCARCINOMA	PU 194N-2
PU 195T	79	M	nov/11	VIVO	TXN2M0	ND	CEC	PU 195N
PU 196T	76	M	nov/11	VIVO	T1N0M0	EX	CEC	PU 196N
PU 197T	48	M	dez/11	ÓBITO	ND	EX	OUTROS	PU 197N
PU 198T	60	M	nov/11	ÓBITO	T2N0M0	SIM	ADENOCARCINOMA	PU 198N
PU 199T	87	M	mar/12	ÓBITO	T1N1M0	EX	CEC	PU 199N
PU 200T	78	M	mar/12	ÓBITO	ND	EX	CEC	PU 200N
PU 201T	60	M	mai/12	VIVO	T1N0M0	EX	ADENOCARCINOMA	PU 201N
PU 202T-2	72	F	jun/12	VIVO	T2N0M0	SIM	ADENOCARCINOMA	PU 202N-2
PU 203T	63	M	jul/12	VIVO	T1N0M0	SIM	CEC	PU 203N
PU 204T	67	F	jul/12	VIVO	T2N0M0	SIM	CEC	PU 204N
PU 205T	82	M	jun/12	VIVO	ND	NÃO	ADENOCARCINOMA	PU 205N
PU 206T	62	F	ago/12	VIVO	T1N0M0	EX	ADENOCARCINOMA	PU 206N
PU 207T	55	M	set/12	VIVO	T1N0M0	ND	ADENOCARCINOMA	PU 207N
PU 208T	61	M	set/12	VIVO	T1N0M0	SIM	ADENOCARCINOMA	PU 208N
PU 209T	63	F	nov/12	VIVO	T2N0M0	SIM	ADENOCARCINOMA	PU 209N
PU 210T	53	F	dez/12	VIVO	T2N2M0	NÃO	ADENOCARCINOMA	PU 210N
PU 211T	58	F	dez/12	ÓBITO	ND	SIM	ADENOCARCINOMA	PU 211N
PU 213T-2	64	M	jan/13	VIVO	T1N0M0	EX	CEC	PU 213N-2
PU 214T	75	M	fev/13	VIVO	T1N0MX	ND	ADENOCARCINOMA	PU 214N
PU 215T	72	M	mar/13	ÓBITO	ND	ND	CEC	PU 215N
PU 216T	58	F	mar/13	VIVO	T1N0MX	SIM	ADENOCARCINOMA	PU 216N
PU 218T	61	F	nov/13	VIVO	ND	EX	ADENOCARCINOMA	PU 218N
PU 220T-2	69	M	abr/13	VIVO	T2N0M0	EX	ADENOCARCINOMA	PU 220N-2
PU 221T	64	F	abr/13	VIVO	T2N0MX	EX	CEC	PU 221N
PU 222T	67	F	mai/13	VIVO	ND	SIM	ADENOCARCINOMA	PU 222N
PU 223T	71	F	mai/13	VIVO	T2N0M0	SIM	ADENOCARCINOMA	PU 223N

PU 224T	73	F	jun/13	VIVO	T1N0M0	SIM	CEC	PU 224N
PU 226T	72	F	ago/13	VIVO	T2N0M0	ND	CEC	PU 226N
PU 227T	75	F	ago/13	VIVO	T2N0M0	SIM	ADENOCARCINOMA	PU 227N
PU 230T	62	M	set/13	ÓBITO	T3N2M0	SIM	OUTROS	PU 230N

* ND: não disponível; CEC: carcinoma de células escamosas.

ANEXO 2 – TABELA 02

Tabela 02. Dados demográficos dos 73 pacientes portadores de carcinomas de pulmão selecionados no ICESP e no HCB para a coleta de escarro.

ID Amostra	Idade	Sexo	Estadiamento	Tabagismo	Anos- maco	Tipo Histológico (clínico)	Estadio (clínico)	Óbito	Fonte
ICESP 01	43	F	T4N2M1	NAO	0	SCLC	IV	-	ICESP
ICESP 02	45	F	T4N3M2	EX	40	ADENO	IV	-	ICESP
ICESP 03	70	M	T3N1M1	SIM	50	CEC	IV	-	ICESP
ICESP 04	37	F	T1N2M1	EX	1	ADENO	IV	-	ICESP
ICESP 05	57	M	T2N2M1	EX	25	ADENO	IV	-	ICESP
ICESP 06	56	M	T3N2M0	EX	30	CEC	IIIA	-	ICESP
ICESP 07	55	F	T4N1M1	SIM	20	CEC	IV	-	ICESP
ICESP 09	56	M	T4N2M1	SIM	ND	ADENO	IV	-	ICESP
ICESP 10	52	F	T2N3M1	EX	40	ADENO	IV	SIM	ICESP
ICESP 12	50	M	T4N0M1	SIM	51	CEC	IV	SIM	ICESP
ICESP 13	63	M	T4N3M1	SIM	50	CEC	IV	-	ICESP
ICESP 14	46	M	T4N3M0	EX	ND	GNDS CÉLS	IIIB	-	ICESP
ICESP 16	57	F	T3N3M0	SIM	120	CEC	IIIB	SIM	ICESP
ICESP 17	60	F	T4N2M0	SIM	ND	CEC	IIIB	-	ICESP
ICESP 22	72	M	T4N1M1	NAO	0	CEC	IV	SIM	ICESP
HCB 26	75	M	T4N2M1	EX	50	ADENO	IV	-	HCB
HCB 27	89	M	T2N0M1	EX	100	CEC	ND	-	HCB
HCB 29	59	M	T4N3M1	SIM	90	SCLC	IV	-	HCB
HCB 30	49	M	T4N2M1	EX	30	SCLC	IV	-	HCB
HCB 31	58	M	T3N2M1	EX	37	CEC	IV	-	HCB
HCB 32	61	F	T4N0M1	EX	23,5	ADENO	IV	-	HCB
HCB 33	68	M	T4N0M0	EX	18,3	CEC	IIIB	-	HCB
HCB 36	62	F	T2N2M0	NAO	0	NEUROENDOCRINO	IIIA	-	HCB
HCB 37	60	F	T2N0M0	NAO	0	ADENO	IIA	-	HCB
HCB 39	55	F	T1N2M1	SIM	80	ADENO	IV	-	HCB
HCB 40	74	M	T4N3M0	EX	59	CEC	IIIB	-	HCB
HCB 41	65	F	ND	NÃO	0	ADENO	IV	-	HCB
HCB 42	44	F	T1N2M1	EX	30	ADENO	IV	-	HCB
HCB 44	65	M	T4N3M0	EX	26	ADENO	IIIB	-	HCB
HCB 45	56	M	T2N3MX	EX	54	ADENO	IIIB	-	HCB
HCB 51	48	M	T4N2M1	SIM	70	ADENO	IV	-	HCB

HCB 53	50	M	T2N2M0	SIM	38	CEC	IIIA	-	HCB
HCB 54	71	M	T3N3M1	NAO	0	ADENO	IV	SIM	HCB
HCB 55	64	M	T3N3M1	EX	72	ADENO	IV	-	HCB
HCB 59	64	F	T2N3M0	EX	48	ADENO	IIIB	-	HCB
HCB 60	66	M	T3N1M1	EX	56	ADENO	IV	-	HCB
HCB 61	74	M	T2N3M0	EX	57	CEC	IIIB	-	HCB
HCB 62	75	F	T2N3MX	EX	30	ADENO	IIIB	-	HCB
HCB 63	53	M	T4N3M1	EX	72	CEC	ND	SIM	HCB
HCB 64	59	F	TXN3M0	EX	1,5	ADENO	ND	-	HCB
HCB 65	76	M	T3N3M0	EX	68	CEC	ND	SIM	HCB
HCB 66	59	M	T3N2M1	EX	63	CEC	IV	-	HCB
HCB 67	62	F	T4N2M1	EX	26	CEC	IIIB	-	HCB
HCB 68	81	M	T2N3M0	EX	45	CEC	IIIB	SIM	HCB
HCB 69	59	M	T4N0M1	EX	43	ADENO	IV	-	HCB
HCB 70	76	M	ND	EX		SCLC	IV	-	HCB
HCB 71	66	M	T2N2M0	EX	43	CEC	IIIA	-	HCB
HCB 72	52	F	T4N3M1	NAO	0	ADENO	IV	-	HCB
HCB 73	72	M	ND	NAO	0	ADENO	IV	SIM	HCB
HCB 75	45	F	T2N3M0	EX	60	ADENO	IIIB	-	HCB
HCB 77	58	M	T4N3M1	EX	9	CEC	IIIB	-	HCB
HCB 78	76	M	T4N2M0	EX	84	CEC	IIIB	-	HCB
HCB 79	64	F	T2N0M0	SIM	49	CEC	IB	-	HCB
HCB 82	77	M	ND	NAO	0	CEC	IV	-	HCB
HCB 83	57	M	T2N3M1	SIM	14,4	CEC	ND	-	HCB
HCB 85	65	M	ND	EX	126	ADENO	IV	-	HCB
HCB 87	64	M	T3N3M1	EX	10	ND	ND	-	HCB
HCB 88	59	M	T4N3M1	EX	7,5	ADENO	ND	-	HCB
HCB 89	59	M	T3N2M1	SIM	100	ADENO	IV	-	HCB
HCB 90	54	M	T2N3M0	EX	74	ADENO	ND	-	HCB
HCB 93	64	M	T4N3M1	NÃO	0	ADENO	IV	-	HCB
HCB 94	54	F	ND	EX	7,6	NSCLC	ND	-	HCB
HCB 95	46	F	T3N0M0	SIM	10,2	CEC	IIB	-	HCB
HCB 96	78	M	T4N0M1	SIM	34	CEC	IV	-	HCB
HCB 97	60	F	ND	SIM	24	ND	ND	SIM	HCB
HCB 98	70	F	ND	NÃO	0	ADENO	IV	-	HCB
HCB 100	39	M	T4N3M1	NÃO	0	ADENO	IV	-	HCB
HCB 102	52	M	T4N2M0	EX	80	CEC	IIIB	-	HCB
HCB 103	78	M	T2N2M1	EX	15	ADENO	IV	-	HCB
HCB 105	65	M	T2N0M0	EX	54	CEC	IIA	-	HCB

HCB 107	73	M	T3N2M0	SIM	56	CEC	IIIA	-	HCB
HCB 108	68	M	T3N1M1	EX	125	ADENO	IV	-	HCB
HCB 109	63	M	<i>ND</i>	EX	15,3	SCLC	<i>ND</i>	-	HCB

*ND: não disponível; CEC: carcinoma de células escamosas; ADENO: Adenocarcinoma; SCLC: Carcinoma de pequenas células; NSCLC: Carcinoma de células não pequenas.

ANEXO 3 – TABELA 03

Tabela 03 – Dados demográficos dos 13 pacientes portadores de DPOC selecionados no HC-FMUSP para o grupo de alto risco.

ID Amostra	Idade	Sexo	Tabagismo	Anos-maço
DPOC 02	32	M	NÃO	0
DPOC 04	48	M	SIM	6,6
DPOC 05	68	F	SIM	61
DPOC 09	75	F	NÃO	0
DPOC 10	66	M	EX	100
DPOC 11	65	M	EX	40
DPOC 13	49	M	EX	10
DPOC 14	78	F	EX	30
DPOC 15	78	M	NÃO	60
DPOC 16	57	M	EX	30
DPOC 18	ND	M	ND	ND
DPOC 19	59	M	EX	20
DPOC 20	56	F	NÃO	0

ANEXO 4 – TABELA 04

Tabela 04. *Dados demográficos dos 8 pacientes sem histórico de doença pulmonar crônica selecionados no HC-FMUSP para o grupo controle.*

Amostra	Idade	Sexo	Tabagismo
AGD 01	65	F	NÃO
AGD 02	77	F	NÃO
AGD 03	86	F	NÃO
AGD 04	58	M	SIM
AGD 05	70	F	SIM
AGD 07	57	F	NÃO
AGD 09	78	F	NÃO
AGD 10	78	F	NÃO

ANEXO 5 – TABELA 05

Tabela 05. Critérios de inclusão e exclusão para cada um dos grupos selecionados para a coleta de escarro.

GRUPO	Critérios inclusão	Critérios exclusão
<i>Câncer de Pulmão</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes com câncer de pulmão confirmado por biópsia e/ou CT-tórax com tratamento em andamento ou não • Maiores de 18 anos 	<ul style="list-style-type: none"> • Sem confirmação da neoplasia de pulmão • Pacientes com outras comorbidades pulmonares • Menores de 18 anos
<i>Alto risco (DPOC)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes com DPOC confirmada por história clínica, RX de tórax e espirometria • Maiores de 18 anos 	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes com suspeita de neoplasia • Pacientes com tuberculose • Menores de 18 anos
<i>Controle (HC-FMUSP)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes sem histórico de doenças pulmonares crônicas • Pacientes com RX-tórax documentado • Pacientes sem histórico tabagista 	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes com histórico de doenças pulmonares crônicas • Pacientes sem RX-tórax documentado • Pacientes com histórico tabagista atual ou passado

ANEXO 6 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – HC-FMUSP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐ DATA
NASCIMENTO:...../...../.....

ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐ DATA
NASCIMENTO:...../...../.....

ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

“Relevância Clínica da concentração do ácido hialurônico em espécimens tumorais de pacientes portadores de carcinomas de pulmão”

ANEXO 6 – Termo de consentimento informado (continuação)

PESQUISADOR RESPONSÁVEL : Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi

CARGO/FUNÇÃO: Médica / Profa. Associada do Departamento de Patologia FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL : CRM N° 25789

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Anatomia Patológica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☒

RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

1 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que quer avaliar a importância de um tipo de açúcar (ácido hialurônico) no diagnóstico do câncer de pulmão.

Leia cuidadosamente este documento e faça todas as perguntas que quiser antes de decidir se quer participar do estudo. Sua decisão de consentir em participar deste estudo é voluntária e você pode sair do estudo a qualquer momento. Se decidir não participar ou retirar-se do estudo, você não perderá os benefícios a que teria direito de outra forma.

O objetivo desta pesquisa é investigar se o ácido hialurônico presente no escarro pode auxiliar no diagnóstico de pacientes com câncer de pulmão.

ANEXO 6 – Termo de consentimento informado (continuação)

2- PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS E PROPÓSITOS

Coleta do escarro

Para coletar o escarro faremos inalações com soro salgado (mais ou menos como a água do mar) por um tempo de no máximo 15 minutos. Esta inalação faz os pulmões soltarem catarro. O catarro coletado será processado em laboratório para examinar a quantidade de ácido hialurônico presente na amostra.

3- DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS

O risco envolvendo este estudo é baixo.

Durante as inalações você pode ter boca seca, aumento da produção de saliva (cuspe) e enjôo. Esses sintomas podem ser evitados lavando a boca com água.

Pode também acontecer tosse, leve falta de ar e chiado no peito, mas geralmente esses efeitos são passageiros.

4- BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Não há benefício direto ou compensação financeira aos participantes do estudo.

Entretanto, no futuro, outros pacientes com suspeita de câncer de pulmão poderão ser beneficiados.

5- PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS QUE POSSAM SER VANTAJOSOS PARA O INDIVÍDUO

Não se aplica.

6- ACESSO, A QUALQUER TEMPO, ÀS INFORMAÇÕES SOBRE PROCEDIMENTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS RELACIONADOS À PESQUISA, INCLUSIVE PARA ESCLARECER EVENTUAIS DÚVIDAS.

Você poderá ter acesso a qualquer informação e esclarecer qualquer dúvida sobre seu caso e de todos os exames que estão sendo realizados, em qualquer etapa do estudo, através dos profissionais responsáveis pela pesquisa. O principal investigador desta pesquisa é a Dra. Vera Luiza Capelozzi que pode ser encontrada no 1º andar, sala 1143, da Faculdade de Medicina da USP (Av. Dr. Arnaldo, 455) - tel 3061-7427 e a pesquisadora executante será:

ANEXO 6 – Termo de consentimento informado (continuação)

Maristela Peres Rangel, que pode ser encontrada no mesmo endereço e telefones 3061-7427 e 9998-2524.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Núcleo de Pesquisa do ICESP – Av. Dr. Arnaldo 251, 12.º andar - Sala 5 – tel: 3893-3515

7- LIBERDADE DE RETIRAR SEU CONSENTIMENTO A QUALQUER MOMENTO E DE DEIXAR DE PARTICIPAR DO ESTUDO, SEM QUE ISTO TRAGA PREJUÍZO À CONTINUIDADE DA ASSISTÊNCIA.

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária.

Você pode desistir do estudo a qualquer momento e isso não prejudicará o seu tratamento no hospital.

8- SALVAGUARDA DA CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE.

Qualquer informação coletada é estritamente confidencial. Todas as informações que o senhor(a) prestar ou o que os exames revelarem só serão de conhecimento do médico que o(a) atende ou de seu médico particular. Seu nome nunca será revelado nos relatórios do estudo e sua identidade não será comunicada a terceiros, podendo ser fornecido apenas aos médicos envolvidos nesta pesquisa.

9- DISPONIBILIDADE DE ASSISTÊNCIA NO ICESP, POR EVENTUAIS DANOS À SAÚDE, DECORRENTES DA PESQUISA.

Seu atendimento continuará a ser realizado no Hospital durante ou após o fim desta pesquisa.

10- VIABILIDADE DE INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS À SAÚDE DECORRENTES DA PESQUISA

Os pesquisadores e o Hospital não possuem meios de indenização material em caso de problemas que possam ocorrer durante a realização destes exames.

ANEXO 6 – Termo de consentimento informado (continuação)

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou

prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Declaro, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado consinto em participar do Protocolo de Pesquisa.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

ANEXO 7 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – HCB

Espaço para etiqueta

CDG 9

Termo de Informação e Consentimento

Para obter um maior conhecimento clínico e científico do câncer, o corpo clínico deste Hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica científica. Através dessa pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Ainda mais, este trabalho envolve a busca, em tumores, de novos genes ou lesões em genes já existentes. Estes estudos são realizados em fragmentos de tumores removidos em cirurgias, ou em material biológico colhido.

Você está sendo admitido(a) neste Hospital para estabelecimento de diagnóstico e /ou tratamento de alguma forma de tumor. Para fins de diagnóstico, fator prognóstico e/ou como parte de seu tratamento, há a necessidade de remoção do tumor e/ou material biológico relacionado à enfermidade. É prática rotineira deste Hospital usar parte do tumor e/ou material biológico retirado, para exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. O restante do tumor que é retirado, ou do material biológico, não é utilizado, sendo então congelado e armazenado para novos exames se necessários. Caso contrário, são descartados, conforme legislação sanitária regulamentar sobre o assunto.

A obtenção e o estudo dos referidos fragmentos de tumor e material biológico não implicarão em riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem tampouco, em aumento no tempo da operação ou na extensão da mesma. O projeto de pesquisa proposto que vier utilizar este material será previamente apresentado à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital.

O fragmento de tumor e/ou material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identificação serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com o uso do material para os fins acima descritos, é necessário esclarecê-lo(a) que não existem quaisquer benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu tratamento.

Caso você ainda tenha questões a fazer sobre este termo de consentimento ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética Médica, pelo telefone (17) 3321-6600. Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário. Somente assine este termo, se consentir.

Declaração

Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente e concordado com todo o teor.

Barretos, _____ de _____ de _____

Responsável ou Paciente

Nome: _____

R G: _____ RGH: _____

20 bits 100/1s 07/2006 mod 602

ANEXO 8 – TABELA 21

Tabela 19 – Valores de ponto de corte para dosagem de cofilina-1 no escarro com suas respectivas proporções de sensibilidade e especificidade referente à curva ROC entre amostras saudáveis e amostras de pacientes com câncer.

Maior ou Igual que: ^a	Sensibilidade	1 - Especificidade
77,1000	1,000	1,000
79,9000	,877	,500
87,7500	,863	,500
117,0000	,849	,500
169,1500	,822	,500
214,8500	,808	,500
233,9500	,795	,500
248,9000	,795	,333
269,6000	,781	,333
281,8500	,767	,333
290,9500	,753	,333
307,0000	,740	,333
346,9500	,726	,333
420,9500	,712	,333
468,8000	,712	,167
484,7500	,699	,167
506,1000	,685	,167
604,1500	,671	,167
707,0500	,658	,167
729,5500	,644	,167
762,1500	,630	,167
790,9500	,616	,167
802,5000	,603	,167
817,5000	,589	,167
880,9000	,575	,167
949,5500	,562	,167
973,2000	,548	,167
1028,4500	,534	,167
1137,4500	,521	,167
1220,6000	,507	,167
1258,1000	,493	,167
1327,3500	,479	,167
1385,0000	,466	,167
1398,2000	,438	,167

1458,7500	,425	,167
1520,0500	,411	,167
1541,5500	,397	,167
1619,8000	,397	,000
1719,4000	,384	,000
1805,9000	,370	,000
1883,7500	,356	,000
1929,9000	,342	,000
1974,4500	,329	,000
2026,3500	,315	,000
2068,3000	,301	,000
2143,4500	,288	,000
2250,1500	,274	,000
2301,8500	,260	,000
2379,7000	,247	,000
2503,7000	,233	,000
2572,9000	,219	,000
2702,6500	,205	,000
2831,0000	,192	,000
2946,3000	,178	,000
3077,4000	,164	,000
3114,9000	,151	,000
3163,9500	,137	,000
3357,1000	,110	,000
3391,7000	,096	,000
3455,1000	,082	,000
3610,0500	,068	,000
3810,0500	,055	,000
3911,7500	,041	,000
3936,6500	,027	,000
4098,1000	,014	,000
4240,4000	,000	,000

Area sob a curva - Cofilina-1 (ControleXCâncer)				
Área	Erro Padrão ^a	Significância ^b	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite inferior	Limite superior
,787	,086	,020	,618	,955

ANEXO 9 – TABELA 22

Tabela 20 – Valores de ponto de corte para dosagem de cofilina-1 no escarro com suas respectivas proporções de sensibilidade e especificidade referente à curva ROC entre amostras de pacientes de risco e amostras de pacientes com câncer.

Maior ou igual que: ^a	Sensibilidade	1 - Especificidade
77,1000	1,000	1,000
79,9000	,877	,692
87,7500	,863	,692
113,7000	,849	,692
136,9000	,849	,615
169,1500	,822	,615
214,8500	,808	,615
246,5500	,795	,615
269,6000	,781	,615
281,8500	,767	,615
290,9500	,753	,615
307,0000	,740	,615
346,9500	,726	,615
377,2500	,712	,615
425,1000	,712	,538
479,8000	,699	,538
493,0500	,699	,462
506,1000	,685	,462
604,1500	,671	,462
707,0500	,658	,462
729,5500	,644	,462
762,1500	,630	,462
790,9500	,616	,462
802,5000	,603	,462
817,5000	,589	,462
879,3500	,575	,462
933,5500	,575	,385
949,5500	,562	,385
973,2000	,548	,385
1013,5000	,534	,385
1059,5500	,534	,308

1137,4500	,521	,308
1210,3000	,507	,308
1230,5000	,507	,231
1252,0500	,493	,231
1269,3500	,493	,154
1297,5000	,479	,154
1349,4500	,479	,077
1385,0000	,466	,077
1398,2000	,438	,077
1458,7500	,425	,077
1516,7500	,411	,077
1525,0000	,411	,000
1606,5500	,397	,000
1719,4000	,384	,000
1805,9000	,370	,000
1883,7500	,356	,000
1929,9000	,342	,000
1974,4500	,329	,000
2026,3500	,315	,000
2068,3000	,301	,000
2143,4500	,288	,000
2250,1500	,274	,000
2301,8500	,260	,000
2379,7000	,247	,000
2503,7000	,233	,000
2572,9000	,219	,000
2702,6500	,205	,000
2831,0000	,192	,000
2946,3000	,178	,000
3077,4000	,164	,000
3114,9000	,151	,000
3163,9500	,137	,000
3270,6000	,123	,000
3357,1000	,110	,000
3391,7000	,096	,000
3455,1000	,082	,000
3610,0500	,068	,000
3810,0500	,055	,000
3911,7500	,041	,000

3936,6500	,027	,000
4098,1000	,014	,000
4240,4000	,000	,000

Área sob a curva (Alto RiscoXCâncer – Cofilina 1)				
Área	Erro Padrão ^a	Significância ^b	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
,693	,067	,027	,562	,824

ANEXO 10 – TABELA 23

Tabela 21 – Valores de ponto de corte para dosagem de solCD44 no escarro com suas respectivas proporções de sensibilidade e especificidade referente à curva ROC entre amostras de pacientes de risco e amostras de pacientes com câncer.

Maior ou igual a:	Sensibilidade	1 - Especificidade
61,5000	1,000	1,000
65,8000	,507	,167
69,9500	,479	,167
71,2000	,466	,167
78,2500	,438	,167
86,7000	,425	,167
98,3500	,411	,167
114,4000	,397	,167
121,6000	,384	,167
123,5500	,370	,167
126,0000	,356	,167
131,5500	,342	,167
137,1500	,329	,167
154,1000	,315	,167
192,8500	,301	,167
223,8500	,288	,167
243,6000	,288	,083
279,0000	,288	,000
310,6000	,274	,000
392,1500	,260	,000
476,8000	,247	,000
491,2000	,233	,000
681,2000	,219	,000
1058,2000	,192	,000
1269,7500	,178	,000
1303,4000	,164	,000
1376,8500	,151	,000
1466,6500	,137	,000
1751,6500	,123	,000
2096,0500	,110	,000
2286,0500	,096	,000
2505,8500	,082	,000

2695,8500	,068	,000
3813,1500	,055	,000
5539,2000	,041	,000
6855,0500	,027	,000
8358,9000	,014	,000
9229,0000	,000	,000

Área sob a curva (Alto Risco X Câncer – solCD44)				
Área	Erro Padrão	Significância	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
,676	,073	,052	,533	,819

9. REFERÊNCIAS

- Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 123(1 Suppl):21S-49S, 2003.
- Antonelli A, D'Amore PA. Density-dependent expression of hyaluronic acid binding to vascular cells *in vitro*. *Microvasc Res.* 1991;41:239–251. doi: 10.1016/0026-2862(91)90025-7
- Anttila MA, Tammi RH, Tammi MI, Syrjänen KJ, Saarikoski SV, Kosma VM. High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 2000;60:150–155.
- Benayahu D., Shur I., Marom R., Meller I., Issakov J. (2001) Cellular and molecular properties associated with osteosarcoma cells. *J. Cell. Biochem.* 84, 108–114;
- Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest* 2002;122:1037-57.
- Bui C, Ouzzine M, Talhaoui I, Sharp S, Prydz K, Coughtrie MW, Fournel-Gigleux S. Epigenetics: methylation-associated repression of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase gene expression contributes to the invasive phenotype of H-EMC-SS chondrosarcoma cells. *FASEB J.* 2010; 24(2): 436-50.
- Chang CY, Leu JD, Lee YJ. The actin depolymerizing factor (ADF)/cofilin signaling pathway and DNA damage responses in cancer. *Int J Mol Sci.* 2015.13;16(2):4095-120.
- C.K.Weber, G. Sommer, P. Michl, H. Fensterer, M.Weimer, F. Gansauge, G. Leder, G. Adler, T.M. Gress, Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines. *Gastroenterology* (121) 657–667, 2011
- Colby TV, Wistuba II, Gazdar A. Precursors to pulmonary neoplasia. *Adv. Anat. Pathol.* 5:205–15, 1998.
- Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung Cancer: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician.* 2007;1;75(1):56-63.
- Cooney CA, Jousheghany F, Yao-Borengasser A, Phanavanh B, Gomes T, Kieber-Emmons AM, Siegel ER, Suva LJ, Ferrone S, Kieber-Emmons T, Monzavi-Karbassi B. Chondroitin sulfates play a major role in breast cancer metastasis: a role for CSPG4 and CHST11 gene expression in forming surface P-selectin ligands in aggressive breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 13(3):R58, 2011.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins – Pathology Basis of Disease. 6 ed. Pliladelphia, W.B. Saunders, pp. 89-112, 1999
- Deed R, Rooney P, Kumar P, Norton JD, Smith J, Freemont AJ, et al. Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. *Int J Cancer.* 1997;71:251–256.

Dentener MA, Vernooij JH, Hendriks S, Wouters EF. Enhanced levels of hyaluronan in lungs of patients with COPD: relationship with lung function and local inflammation. *Thorax*. 2005;60:114–119. doi: 10.1136/thx.2003.020842.

Fernandez A, Jatene FB, Zamboni M. Diagnóstico e estadiamento do câncer de pulmão. *J Pneumol*. 2002;28(4):219-28.

Fernández-Vega I, García O, Crespo A, Castañón S, Menéndez P, Astudillo A, Quirós LM. Specific genes involved in synthesis and editing of heparan sulfate proteoglycans show altered expression patterns in breast cancer. *BMC Cancer*. 2013; 13-24.

Franzmann EJ, Reategui EP, Pereira LH, Pedroso F, Joseph D, Allen GO, Hamilton K, Reis I, Duncan R, Goodwin WJ, Hu JJ, Lokeshwar VB. Salivary protein and solCD44 levels as a potential screening tool for early detection of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 34(5):687-95, 2012

Gorter A, Zijlmans HJ, van Gent H, Trimbos JB, Fleuren GJ, Jordanova ES. Versican expression is associated with tumor-infiltrating CD8-positive T cells and infiltration depth in cervical cancer. *Mod Pathol*. 23(12):1605-15. 2010

Hall CL, Yang B, Yang X, Zhang S, Turley M, Samuel S, et al. Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation. *Cell*. 1995;82:19–26. doi: 10.1016/0092-8674(95)90048-9.

Handel TM, Johnson Z, Crown SE, Lau EK, Proudfoot AE. Regulation of protein function by glycosaminoglycans-as exemplified by chemokines. *Ann Rev Biochem* 74: 385-410, 2005

Harpole DH Jr, Herndon JE 2nd, Wolf WG, Iglehart JD, Marks Jr. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology and oncoprotein expression. *Cancer Res* 55: 51-6, 1995.

Hatabe S, Kimura H, Arao T, Kato H, Hayashi H, Nagai T, Matsumoto K, DE Velasco M, Fujita Y, Yamanouchi G, Fukushima M, Yamada Y, Ito A, Okuno K, Nishio K. Overexpression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-2 in colorectal cancer. *Mol Clin Oncol*. 2013; 1(5): 845-850.

Hirvikoski P, Tammi R, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Parkkinen JJ, Tammi M, et al. Irregular expression of hyaluronan and its CD44 receptor is associated with metastatic phenotype in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 1999;434:37–44.

Hunzelmann N., Schönher E., Bonnekoh B., Hartmann C., Kresse H., Krieg T. (1995) Altered immunohistochemical expression of small proteoglycans in the tumor tissue and stroma of basal cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol*. 104, 509–513;

Ichinose Y, Yano T, Asoh H, Yokoyama H, Yoshino I, Katsuda Y. Prognostic factors obtained by a pathologic examination in completely resected non-small cell lung cancer: an analysis in each pathologic stage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110: 601-5, 1995;

Iozzo RV & Schaefer L (2011) Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans.

Iozzo RV, Sanderson RD. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 15(5):1013-31, 2011

Iozzo RV. Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J Clin Invest*. 108(2):165-7, 2011

Jang I, Jeon BT, Jeong EA, Kim EJ, Kang D, Lee JS, Jeong BG, Kim JH, Choi BH, Lee JE, Kim JW, Choi JY, Roh GS. Pak1/LIMK1/Cofilin Pathway Contributes to Tumor Migration and Invasion in Human Non-Small Cell Lung Carcinomas and Cell Lines. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2012 Jun;16(3):159-65.

Joo EJ, Weyers A, Li G, Gasimli L, Li L, Choi WJ, Lee KB, Linhardt RJ. Carbohydrate-Containing Molecules as Potential Biomarkers in Colon Cancer. *OMICS*. 2014. 18(4):231-41.

Kajita M, Itoh Y, Chiba T, et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 2001;153:893 – 904.

Lambaerts K, Wilcox-Adelman SA, Zimmermann P. The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Curr Opin Cell Biol*. 21(5):662-9, 2009

Li Y, Miao L, Cai H, Ding J, Xiao Y, Yang J, Zhang D. The overexpression of glypican-5 promotes cancer cell migration and is associated with shorter overall survival in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 6(6):1565-1572, 2013.

Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BB. A curva ROC para testes diagnósticos. *Cadernos de Saúde Coletiva*. Rio de Janeiro 2003. 11 (1): 7-31.

Matsuda K, Maruyama H, Guo F, Kleeff J, Itakura J, Matsumoto Y, Lander AD, Korc M: Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001, 61:5562-5569.

Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, LeBleu VS, Mittendorf EA, Weitz J, Rahbari N, Reissfelder C, Pilarsky C, Fraga MF, Piwnicka-Worms D, Kalluri R. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015. 523(7559):177-82

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA)[online]. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2015 [acesso em 07 set 2016]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA)[online]. Atlas on-line de mortalidade: usos e aplicações. Rio de Janeiro: INCA; 2014 [acesso em 07 set 2016]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/docs/atlas-on-line-de-mortalidade-usos-e-aplicacoes.pdf>

Minna JD. The molecular biology of lung cancer pathogenesis. *Chest*. 1993;103(4 Suppl):449S-456S.

Miyamoto K, Asada K, Fukutomi T, Okochi E, Yagi Y, Hasegawa T, Asahara T, Sugimura T, Ushijima T: Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers. **Oncogene** 2003, 22:274-280.

Morimoto-Tomita M, Uchimura K, Bistrup A, Lum DH, Egeblad M, Boudreau N, Werb Z, Rosen SD: Sulf-2, a proangiogenic heparan sulfate endosulfatase, is upregulated in breast cancer. *Neoplasia*. 2005 Nov;7(11):1001-10.

Narita K, Chien J, Mullany SA, Staub J, Qian X, Lingle WL, Shridhar V: Loss of HSulf-1 expression enhances autocrine signaling mediated by amphiregulin in breast cancer. **J Biol Chem** 2007, 282:14413-14420.

National Cancer Institute (NCI). Non-small cell lung cancer treatment (Physician Data Query) [online], Bethesda, MD, 2007. [acesso em 27 dez 2011]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/healthprofessional/page1>, 2007.

National Lung Screening Trial Research Team (NLSTRT). Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med* 2011; 365(5):395-409.

Nikos A, Chrisostomi G, Dragana N, Theodore T, Evgenia K, Achilleas D.T, Mauro S.P, George NT and Nikos KK. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J*. 2012;279(7):1177-97

Pasqualon T, Pruessmeyer J, Jankowski V, Babendreyer A, Groth E, Schumacher J, Koenen A, Weidenfeld S, Schwarz N, Denecke B, Jahr H, Dreytmueller D, Jankowski J, Ludwig A. A cytoplasmic C-terminal fragment of Syndecan-1 is generated by sequential proteolysis and antagonizes Syndecan-1 dependent lung tumor cell migration. *Oncotarget*. 13;6(31):31295-312, 2015

Passerotti CC, Bonfim A, Martins JR, Dall'Oglio MF, Sampaio LO, Mendes A, Ortiz V, Srougi M, Dietrich CP, Nader HB. Urinary hyaluronan as a marker for the presence of residual transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol*. 2006;49:71-5

Pirinen R, Tammi R, Tammi M, Hirvikoski P, Parkkinen JJ, Johansson R, et al. Prognostic value of hyaluronan expression in non-small-cell lung cancer: Increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 95:12-17, 2001.

Pirinen R, Leinonen T, Böhm J, Johansson R, Ropponen K, Kumpulainen E, Kosma VM. Versican in nonsmall cell lung cancer: relation to hyaluronan, clinicopathologic factors, and prognosis. *Hum Pathol*. 36(1):44-50, 2005.

Pitule P, Vycital O, Bruha J, Novak P, Hosek P, Treska V, Hlavata I, Soucek P, Kralickova M, Liska V. Differential expression and prognostic role of selected genes in colorectal cancer patients. *Anticancer Res*. 2013 Nov;33(11):4855-65.

Raghow R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *The FASEB Journal* 8: 823-831, 1994

Rangel MP, de Sá VK, Martins V, Martins JR, Parra ER, Mendes A, Andrade PC, Reis RM, Longatto-Filho A, Oliveira CZ, Takagaki T, Carraro DM, Nader HB, Capelozzi VL. Tissue hyaluronan expression, as reflected in the sputum of lung cancer patients, is an indicator of malignancy. *Braz J Med Biol Res*. 2015. 48(6):557-67.

Ristamaki R, Joensuu H, Lappalainen K, Teerenhovi L, Jalkanen S. Elevated serum CD44 level is associated with unfavorable outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:4039 – 45.

Ropponen K, Tammi M, Parkkinen J, Eskelinen M, Tammi R, Lipponen P, et al. Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58:342–347.

Sanderson RD. Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin Cell Dev Biol*. 2001 12, 89–98.

Shah L, Walter KL, Borczuk AC, Kawut SM, Sonett JR, Gorenstein LA, Ginsburg ME, Steinglass KM, Powell CA. Expression of syndecan-1 and expression of epidermal growth factor receptor are associated with survival in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 101(7):1632-8, 2004.

Skandalis S. S., Theocharis A. D., Theocharis D. A., Papadas T., Vynios D. H., Papageorgakopoulou N. (2004) Matrix proteoglycans are markedly affected in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta* 1689, 152–161

Snyder LS, Hertz MI, Harmon KR, Bitterman PB. Failure of lung repair following acute lung injury – regulation of the fibroproliferative response. *Chest* 98: 733-738, 1990

Suhovskiy AV, Domanitskaya NV, Tsidulko AY, Prudnikova TY, Kashubac VI, Grigorieva EV. Tissue-specificity of heparan sulfate biosynthetic machinery in cancer. *Cell Adh Migr*. 2015 Jun 29:0.

Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J* 20: 9-22, 2006.

Theocharis AD, Tsolakis I, Tzanakakis GN & Karamanos NK (2006) Chondroitin sulfate as a key molecule in the development of atherosclerosis and cancer progression. *Adv Pharmacol* 53, 281–295.

Travis W, Brambilla E, Hermelink-Muller HK, Harris CC (eds). Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. IARC Press, Lyon 2004.

Travis W, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, Powell CA, Beer D, Riely G, Garg K, Austin JH, Rusch VW, Hirsch FR, Jett J, Yang PC, Gould M. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proc Am Thorac Soc*. 2011 Sep;8(5):381-5.

Varga I, Hutóczki G, Szemcsák CD, Zahuczky G, Tóth J, Adamecz Z, Kenyeres A, Bognár L, Hanzély Z, Klekner A. Brevican, Neurocan, Tenascin-C and Versican are Mainly Responsible for the Invasiveness of Low-Grade Astrocytoma. *Pathol Oncol Res.*, ahead of print, 2011.

Wang B, Li GX, Zhang SG, Wang Q, Wen YG, Tang HM, Zhou CZ, Xing AY, Fan JW, Yan DW, Qiu GQ, Yu ZH, Peng ZH. Biglycan expression correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*. 236(11):1247-53, 2011

Wang C, Tammi M, Guo H, Tammi R. Hyaluronan distribution in the normal epithelium of esophagus, stomach, and colon and their cancers. *Am J Pathol*. 1996;148:1861–1869.

Wistuba I, Gazdar AF. Lung cancer preneoplasia. *Annu Rev Pathol Mechanisms of Disease* 1:331-48, 2006.

Wistuba II, Mao L, Gazdar AF. Smoking molecular damage in bronchial epithelium. *Oncogene* 21:7298–306, 2002.

Yamane N, Tsujitani S, Makino M, Maeta M, Kaibara N. Soluble CD44 variant 6 as a prognostic indicator in patients with colorectal cancer. *Oncology*. 56:232 – 8, 1999.

Yoneda A, Lendorf ME, Couchman JR, Multhaupt HA. Breast and ovarian cancers: a survey and possible roles for the cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Histochem Cytochem*. 60(1):9-21, 2012.

Yu X, Li Y, Chen SW, Shi Y, Xu F. Differential expression of glypican-3 (GPC3) in lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma and its clinical significance. *Genet Mol Res*. 14(3):10185-92, 2015.

Zhao Z, Han C, Liu J, Wang C, Wang Y, Cheng L. GPC5, a tumor suppressor, is regulated by miR-620 in lung adenocarcinoma. *Mol Med Rep*. 9(6):2540-6, 2014.

Zheng Y, Fang Y, Li S, Zheng B. Detection of plasma cofilin protein for diagnosis of lung cancer. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 33(10):1551-3, 2013.

APÊNDICE

Imagem digitalizada do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPESQ)

Hospital das Clínicas da FMUSP
	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR NO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DOS CARCINOMAS NÃO PEQUENAS CÉLULAS DE PULMÃO	Versão: 1
Pesquisador Responsável: Prof Dra. Vera Luiza Capelozzi	CAAE: 09148013.0.0000.0068
Pesquisador Executante: Maristela Peres Rangel	
Co-autores: Edwin Roger Parra Cuentas, Vanessa Karen de Sa, Joao Roberto Maciel Martins, Helena Nader, Adhemar Longatto Filho, Rui Vieira Reis	
Finalidade Acadêmica: Doutorado	
Instituição: HCFMUSP	
Departamento: PATOLOGIA	

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10014

Número do Parecer: 192.311

Data da Relatoria: 01/02/2013 – *ad-referendum*

Apresentação do Projeto: O projeto é um estudo de localização e quantificação de componentes da matriz extracelular em tumores de pulmão, a partir de amostras de biópsias cirúrgicas de pacientes diagnosticados como portadores de carcinoma excetuando os de células pequenas.

Objetivo da Pesquisa: O objetivo da pesquisa é investigar se as características dos componentes da matriz extracelular, especialmente as glicosaminoglicanas, pode indicar o tipo de desenvolvimento de tumores pulmonares, uma vez que a matriz pode influenciar a adesão, motilidade e outras características de células neoplásicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Embora as cirurgias das quais se originam as biópsias impliquem alguns riscos relevantes, estes não podem ser atribuídos à pesquisa em si, uma vez que para fins diagnósticos a obtenção dessas biópsias são um procedimento padrão. Pode-se assim entender que a pesquisa não acrescenta nenhum risco aos seus sujeitos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: As técnicas aplicadas são bem estabelecidas e não induzem a dúvida quanto à obtenção dos dados. Na expectativa de que os dados possam ter impacto na elaboração de prognósticos quanto à evolução da doença, a pesquisa é útil e relevante do ponto de vista clínico, além da sua utilidade intrínseca de obtenção de conhecimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: A linguagem do TCLE é adequada e informa satisfatoriamente os sujeitos.

Recomendações: Não há recomendações de relevância ética a serem feitas com relação a essa pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O projeto tem todas as condições para ser aprovado por esse CEP e atingir seus objetivos científicos.

Situação do Parecer: APROVADO

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Necessita Apreciação da CONEP: NÃO

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 01 de Fevereiro de 2013

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Tissue hyaluronan expression, as reflected in the sputum of lung cancer patients, is an indicator of malignancy

M.P. Rangel¹, V.K. de Sa¹, V. Martins¹, J.R.M. Martins¹, E.R. Parra¹, A. Mendes¹,
P.C. Andrade¹, R.M. Reis^{6,7,9}, A. Longatto-Filho^{6,7,8,9}, C.Z. Oliveira⁹, T. Takagaki³,
D.M. Carraro⁵, H.B. Nader² and V.L. Capelozzi¹

¹Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil ²Disciplina de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil
³Divisão de Pneumologia, Instituto do Coração, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil
⁴Disciplina de Endocrinologia e Metabolismo, Laboratório de Endocrinologia Molecular e Translacional-LEMT, Departamento de Medicina, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil ⁵Centro Internacional de Pesquisa/CIPE, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brasil ⁶Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal ⁷ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Guimarães, Portugal
⁸Laboratório de Investigação Médica (LIM 14), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil ⁹Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, Hospital de Câncer de Barretos, Fundação Pio XII, Barretos, SP, Brasil

Abstract

Hyaluronan (HA) shows promise for detecting cancerous change in pleural effusion and urine. However, there is uncertainty about the localization of HA in tumor tissue and its relationship with different histological types and other components of the extracellular matrix, such as angiogenesis. We evaluated the association between HA and degree of malignancy through expression in lung tumor tissue and sputum. Tumoral tissue had significantly increased HA compared to normal tissue. Strong HA staining intensity associated with cancer cells was significant in squamous cell carcinoma compared to adenocarcinoma and large cell carcinoma. A significant direct association was found between tumors with a high percentage of HA and MVD (microvessel density) in tumoral stroma. Similarly significant was the direct association between N1 tumors and high levels of HA in cancer cells. Cox multivariate analysis showed significant association between better survival and low HA. HA increased in sputum from lung cancer patients compared to cancer-free and healthy volunteers and a significant correlation was found between HA in sputum and HA in cancer tissue. Localization of HA in tumor tissue was related to malignancy and reflected in sputum, making this an emerging factor for an important diagnostic procedure in patients suspected to have lung cancer. Further study in additional patients in a randomized prospective trial is required to finalize these results and to validate our quantitative assessment of HA, as well as to couple it to gold standard sputum cytology.

Key words: Hyaluronic acid; Sputum; Lung cancer; Immunohistochemistry; ELISA

Introduction

Lung cancer (LC) is the major cause of death among other types of cancer in the world (1). Since the last record, LC represented 224,210 new cases with 159,260 deaths according to SEER Cancer Statistic Review (2). Another concerning fact about LC is the mortality rate, which is responsible for 75.2 deaths/100,000 men and 52.3 deaths/ 100,000 women in the United States (2). In Brazil, the National Institute of Cancer (INCA) estimated 27,330 new cases of LC in 2014 (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>).

The high mortality rates are closely related to the diagnosis that is usually performed in the later stages of the disease when the treatment options are only palliative (3). The high incidence and mortality of patients with LC indicate urgency for new diagnostic procedures and prognostic factors for early detection of recurrence and shortening of a patient's life. In this context, sputum is an attractive potential source of biomarkers for LC because it can be obtained noninvasively and may represent the field of

Correspondence: V.L. Capelozzi: vcapelozzi@lim05.fm.usp.br.

Received August 11, 2014. Accepted November 17, 2014. First published online May 8, 2015.
www.bjournal.com.br

Braz J Med Biol Res 48(6) 2015

injury. Consequently, many research groups have been examining sputum for potential biomarkers, but, to date, there are no definitive data indicating that sputum biomarkers are sufficiently sensitive and specific to reliably predict which high-risk patients will go on to develop LC.

Thus, our group studied molecular or other markers in the primary tumor as well as the stroma tissue milieu to determine what might relate to tumor recurrence and shortened survival (4-6). Because cell-extracellular matrix interactions participate in several steps required for tumor cell invasion and formation of metastases, a group of glycosaminoglycans has been targeted as a potentially useful tumor marker (4,5). Among these glycosaminoglycans, hyaluronan (HA) has shown promise. HA is a linear polysaccharide chain, composed of repeating disaccharide units of N-acetyl-D-glucosamine- β (1,4)-D-glucuronic acid- β (7,8), which exists in both a high molecular mass form (1-66106 Da) and a polydisperse lower molecular mass form (0.1-0.56106 Da), with the latter predominating under neoplastic conditions (9). HA has diverse biological functions in migration and proliferation (10), cell growth, and differentiation (11), as well as in disease progression (12). Polymerization of HA is regulated by the action of one or more of three synthases (HAS1, HAS2, and HAS3) (13) and the hyaluronidases (HYAL1 and HYAL2), present in various tissues including the lung, are responsible for its degradation (14). Degradation products of HA may enhance tumor growth by stimulating malignant neovascularization (15). A biotinylated HA probe has shown more sensitivity than gold standard cytology to detect malignant changes in pleural effusion of mesothelioma (16-20) and urine from patients with urologic cancer (21-24), with an impact on prognosis. In some studies, staining for HA in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue has also been found to be significantly associated with survival (25-29), but there has been uncertainty about localization of HA in tumor tissue and its relationship with different histological types and other components of the extracellular matrix, such as angiogenesis, as well as impact of malignancy on prognosis. More important, to our knowledge HA has never been evaluated in the sputum from LC patients.

In the light of previous data, the first step of this work was to evaluate qualitative and quantitative distribution of HA in FFPE tumor tissue and its relationship with histological types and angiogenesis as indicators of malignancy. Hypothesizing an impact of these indicators on prognosis of patients, in a second step we evaluated the reflection of these changes in frozen sputum and cancer tissue specimens. We found that HA expression in tissue is an indicator of malignancy and has a relationship with sputum from patients with LC.

Patients and Methods

Sputum collection

This study was approved by the Institutional Review Board of the Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina,

Universidade de São Paulo (#256/10). Spontaneous sputum was collected from 115 consecutive patients (mean age 63 ± 10 years; 76 male, 39 female), just prior to bronchoscopy, attending the Instituto do Cancer do Estado de São Paulo and the Hospital do Cancer de Barretos for suspected LC. Informed consent to provide a sputum sample was obtained from each patient at a previous clinical appointment. LC was subsequently confirmed through final clinical diagnosis in 90 patients (mean age 61; 59 male, 31 female) whose sputum was included in this study. Table 1 summarizes the clinical features of these 90 LC patients. They included 37 current smokers (median packs/year=48), 38 ex-smokers (median packs/year=39), and 15 never smokers. The final stages (tumor, node, metastasis: TNM) for these patients were T1 (n=8), T2 (n=24), T3 (n=22), T4 (n=36), N0 (n=14), N1 (n=76), M0 (n=46), and M1 (n=44). Histological diagnosis included 32 squamous cell carcinoma (SqCC), 56 adenocarcinoma (AD), and 2 large cell carcinoma (LCC). The median follow-up for these patients was 27 months, and 32 patients were censored for survival analysis at the last time of follow-up.

Sputum induction

Sputum was also collected from 25 patients classified as cancer-free and 15 as healthy volunteers. All 15 healthy volunteers, selected during an investigation for non-pulmonary diseases, such as ophthalmology or endocrinology, and the patients selected underwent sputum induction by 3 inhalations of 4% hypertonic saline for 7 min each (30). The sputum samples were stored on ice during collection, and were macroscopically separated from the saliva in sterile petri dishes with the help of a needle. After separation, the sputum samples were stored at -80°C until HA analysis. The sputum samples were thawed and incubated with 7 M urea at 60°C , until the complete breakdown of the sputum's hydrophobic associations. The protein concentration of each sample was measured using a NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, USA). After protein concentration analysis, the samples were incubated with a proteolytic enzyme for 18 h at 60°C , and HA chains were diluted (1:100) in blocking buffer [0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 1% bovine serum albumin (BSA)].

Frozen lung tissue

Forty-six patients (mean age 65; 25 male, 17 female) of the 90 with confirmed LC were clinically staged as T1-4N1M0 and were considered to have tumors potentially curable by surgical resection. These 46 lung specimens were included in the study for biochemical analysis, histological hematoxylin and eosin staining, and immuno-histochemical and immunofluorescence analyses. Clinical staging used routine chest X-ray, bronchoscopy, computerized tomography of thorax and upper abdomen, abdominal ultrasound, and bone scan. Mediastinoscopy

Table 1. Clinical features of lung cancer patients.

	Sputum analysis (n=90)	Tissue analysis (n=46)
Age	61 (37-89)	65 (44-84)
Gender (M/F)	59/31	25/17
Smoking history		
Yes	37	25
No	15	15
Ex-smoker	38	6
Stage T		
1	8	11
2	24	24
3	22	7
4	36	4
Stage N		
0	14	25
1	76	21
Stage M		
0	46	46
1	44	0
Histologic type		
Squamous cell carcinoma	32	13
Adenocarcinoma	56	27
Large cell carcinoma	2	6
Follow-up (months)	27 (7-88)	27 (7-88)
Patients censored for survival analysis at last time of follow-up	32	32

Data are reported as number or median and range.

and lymph node biopsy were additionally performed on patients whose lymph nodes had a short axis diameter of .1 cm. They included 25 current smokers (median packs/year=48), 6 ex-smokers (median packs/year=39), and 15 never smokers. The final pathological stages (TNM) of these patients included T1 (n=11), T2 (n=24), T3 (n=7), T4 (n=4), N0 (n=25), N1 (n=21), M0 (n=46), and M1 (n=0). The tumors were classified as SqCC (n=13), AD (n=27), and LCC (n=6). Other detailed information about these patients is shown in Table 1.

Tumor tissue and normal lung tissue from the resected specimens were examined during the first 15 min after resection; the tumor was localized macroscopically, and 1-cm³ fragments of tumor and normal lung tissue were stored in liquid nitrogen at -170°C. A mirror fragment was fixed in formalin, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin and eosin for histological evaluation, in order to guarantee the tumor representation. Two investigators (MPR and VLC) reviewed and verified the histological diagnosis in non-small-cell LC to be SqCC, AD, and LCC, classified according to the recently published classification for LC (31), and selected a sample of the paraffin-embedded tumor for immunohistochemical scoring and analyses of the cell-specific localization by immunofluorescence and confocal microscopy.

Biotinylated HA probe in frozen sputum and lung tissue

To determine the levels of HA present in the tumoral and normal lung samples collected, the tissues were dehydrated with acetone, dried, weighed, and incubated with a proteolytic enzyme for 18 h at 60°C. The HA chains were diluted (1:100) in blocking buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 1% BSA). Determination of HA was performed using the same "ELISA-like" fluorometric assay as used on the sputum (32). The dry tissue samples were assayed in triplicate. The levels HA found in the tissue specimens is reported using the dry tissue weight (mg/g of dry tissue) as reference.

Biotinylated HA probe and microvessels in FFPE lung tissue

HA quantification in situ was done in FFPE sections of LC and normal tissue. All sections underwent the following treatment: a) inhibition of endogenous peroxidase activity with 3% hydrogen peroxidase in phosphate-buffered saline (PBS); b) blockage of nonspecific binding sites with 1% BSA in PBS; c) incubation in HA-biotinylated probe solution diluted 1:600 in 1% BSA/PBS for 1 h at 46°C; d) elimination of endogenous biotin in tissue sections by incubation in streptavidin peroxidase solution; and e) visualization of peroxidase activity through incubation with

chromogenic diaminobenzidine (Sigma, USA) and 0.03% hydrogen peroxidase. Brownish staining was considered evidence of HA expression by the cells.

Microvessel evaluation was done by immunostaining using an anti-CD34 monoclonal antibody (Novocastra Laboratory, UK; dilution 1:600), pressure-cooking antigen retrieval, biotinylated rabbit anti-mouse IgG (Dako Corp., USA; dilution, 1:400), streptavidin combined *in vitro* with biotinylated horseradish peroxidase (Dako Corp.; dilution, 1:1000), diaminobenzidine tetrahydrochloride, and counterstaining with hematoxylin. Brownish cytoplasmic staining was considered to be evidence of the antigen expression by cells.

Evaluation of HA and microvessel staining

We evaluated the HA and microvessel staining in nonneoplastic cells, LC cells, and tumor stroma by image analysis. The HA and microvessel quantification was done by recording histological images with a Nikon Eclipse 50i camera (Japan) attached to the microscope, using a 40x objective. The staining measurements were done by computer analysis, using the Image Pro-Plus 6.0 software (Media Cybernetics, USA). All the analyses were performed at a magnification of 400x.

Staining for HA was noted on the cell surface and in the cytoplasm of cancer cells and in peritumoral stroma, whereas microvessel staining was noted on endothelial cells present in tumoral and peritumoral stroma. The percentage of stained tumor parenchyma was evaluated using a continuous threshold (0%-100). For statistical purposes, cases were further divided into two groups according to a receiver operation characteristic (ROC) curve as follows: expression of HA was considered high if >48% of the tumoral area showed a persistent HA signal, whereas cases having <48% staining were classified as low. This cut-off level allowed the most clear-cut separation between high and low expressors. The intensity of HA staining in cancer cells and in peritumoral stromal tissue was classified as weak (<48 and <84%, respectively, of stromal tissue/cancer cells with intense signal) or strong (>48 and >84%, respectively, of stromal tissue/cancer cells with intense signal). Equally, the intensity of microvessel staining in tumoral stroma and peritumoral stroma was classified as weak (<33 and <26%, respectively, of peritumoral stroma/tumoral stroma with intense signal) or strong (>33 and >26%, respectively, of peritumoral stroma/tumoral stroma with intense signal).

HA and microvessel colocalization

HA and microvessel colocalization was evaluated in tumor stroma after immunofluorescence staining using confocal microscopy. Pressure-cooking antigen retrieval was performed followed by incubation with mouse polyclonal anti-human CD34 antibody (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) and an HA-biotinylated probe solution (1:150; kindly donated by Dr. Nader from the

Departamento de Bioquímica, Disciplina de Biologia Molecular, Universidade Federal de São Paulo, Brazil). For negative controls, sections were incubated with PBS instead of the primary antibody. The sections were then incubated with the secondary antibodies, i.e., goat anti-mouse ALEXA 488 and streptavidin ALEXA 546 (Invitrogen, USA; dilution 1:400) for 3 h. Nuclear staining was done with 49,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride for 30 min (Invitrogen; 1:300). Images were obtained using a Zeiss LSM-410 laser-scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Germany). Serial optical sections were performed with the Simple 32 C-imaging computer software (LSM Image Browser software, Carl Zeiss). Z-series sections were collected at 0.6 mm with a 660 Plan Apo lens and a scan zoom of 62. All images were collected at the same photomultiplier tube settings. Images were processed and reconstructed using the US National Institutes of Health Image software.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 18.0 (SPSS Inc., USA). When necessary, the variables were analyzed with the Kolmogorov-Smirnov test to determine the normality pattern. Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to analyze the sputum from 90 patients with LC, 25 cancer-free patients, and 15 healthy volunteers. When nonparametric methods were used, simultaneous comparisons of the confidence levels were corrected with Bonferroni's post hoc test. The Mantel-Haenszel test or Pearson's χ^2 test were used to clarify the relationship between HA and microvessel staining with the tissue and the sputum variables studied. ROC curves were developed for determining the optimal cut-off limits that yielded the best possible sensitivity and specificity values. Data on various biochemical, surgical, and pathological parameters, as well as HA and microvessel staining inferences, were analyzed by the Cox proportional hazards model, using single-variable analysis (univariate analysis). Stratified Kaplan-Meier analyses were performed on the variables found to be significant in the multivariate Cox proportional hazards model. The results with P less than or equal to 0.05 were considered to be significant.

Results

Cancer-free patients and healthy volunteers had a median age of 65 years; there was no significant difference in age between the groups. There were fewer females in the cancer-free group (n=17) than in the malignant group (n=31) or the LC group (Table 1).

Figure 1 shows normal lung, SqCC, AD, and LCC stained by hematoxylin and eosin (A, F, K, P), biotinylated HA probe (B, G, L, Q), immunofluorescence double staining for HA and microvessel colocalization at confocal microscopy (D, I, N, S), and quantification of HA in FFPE, respectively.

Normal lung (Figure 1A) showed a strong HA signal at the epithelial cell-extracellular matrix interface (Figure 1, B and C), coincident with regular microvessel staining (C) and absence of colocalization at confocal microscopy (D). A significant increase in the HA signal was found in tumor tissue compared to normal tissue ($P=0.05$; Figure 1E).

SqCC (F) showed abundant HA signals on the cancer cell-stroma interface (G) coincident with prominent micro-vessel staining (H) and identical colocalization at confocal microscopy (I). Strong HA staining intensity associated with cancer cells was significant in 32.1% of SqCC compared to 17.9% of AD and 0.0% in LCC ($P=0.001$; Table 2; Figure 1J).

ADs (Figure 1K) revealed strong stromal HA staining in remarkable contrast with the HA-poor tumor cells in ADs (L). The foci of strong HA intensity in the stroma was coincident with foci of microvessel staining (M) and foci of colocalization at confocal microscopy (N). Furthermore, AD more often showed a lower percentage of HA-positive cancer cells (35.7% of cases) than LCC (14.3% of cases)

or SqCC (0% of cases; $P=0.001$; Figure 1O). The cancer stroma HA staining intensity was similar among the three histological types ($P=0.3$; Table 2).

For LCC (P), the HA signal in tumor cells was very poor or absent and contrasted with the foci of strong intensity in stroma (Q), coincident with focal microvessel density (R) and focal colocalization at confocal microscopy (S). The poor qualitative distribution of HA in tumor tissue overlapped with the very low HA intensity of staining after quantitation (Figure 1T).

Table 2 shows the morphometric results for microvessels in cancer stroma and normal tissue stratified according to histological type. Microvessels were significantly higher in AD (32.3%) and LCC (16.1%) compared to SqCC (3.2%; $P=0.02$). No difference in microvessels was observed in normal lung stroma of the three histological types.

A significant direct association was found between tumors with a high percentage of HA and MVD in tumor

Figure 1. Strong hyaluronan (HA) signal at the epithelial cell-extracellular matrix interface (B) in normal lung (A), coincident with regular microvessels staining (C), absence of colocalization at confocal microscopy (D) and low signal when compared to tumoral tissue (E). High expression ($> 48\%$) of HA in squamous cell carcinoma (SqCC) (F) on cancer cells-stroma interface (G), coincident with high microvessel ($>33\%$) staining foci (H), identical colocalization at confocal microscopy (I) and higher signal when compared to normal tissue (J). HA-negative in normal lung (K) and cells of adenocarcinoma (AD) (L); note the strong HA staining in tumor stroma (L), coincident with microvessels staining (M), foci of colocalization at confocal microscopy (N) and higher expression compared to normal tissue (O). Very poor signal in normal lung (P) and in large cell carcinoma (LCC) (Q); note strong HA foci staining (Q), coincident with focal microvessels density (R), focal colocalization at confocal microscopy (S) and low signal when compared to normal tissue (T). Arrowheads indicate stromal tissue; asterisks indicate carcinoma cells. H&E: hematoxylin and eosin; MVD: microvessel density

Table 2. Immunohistochemistry analysis and distribution of hyaluronan (HA) and microvessel density (MVD) in cancer cells, stroma and peritumoral stroma stratified according to histologic types of lung cancer.

	Squamous cell carcinoma	Adenocarcinoma	Large cell	P
HA in cancer cells (%)				.001
,48%	0(0)	10(35.7)	4(14.3)	
>48%	9(32.1)	5(17.9)	0(0)	
HA in peritumoral stroma (%)				0.3
,84%	4(14.3)	7(25)	3(10.7)	
>84%	5(17.9)	8(28.6)	1(3.6)	
MVD in tumoral stroma (%)				0.02
,33%	6(19.4)	8(25.8)	1(3.2)	
>33%	1(3.2)	10(32.3)	5(16.1)	
MVD in peritumoral stroma (%)				0.5
,26%	4(14.3)	8(28.6)	1(3.6)	
>26%	3(10.7)	9(32.1)	3(10.7)	

Data are reported as the number of cases with percent in parentheses. Groups were divided as high (>48%) and low (,48%) according to the best cut-off determined by ROC curve. The Pearson χ^2 test (P,0.05) was used for statistical analyses.

stroma (R=0.6; P=0.02). Similarly significant was the direct association between tumors at the N1 stage and high levels of HA in cancer cells (R=0.31; P=0.05). In addition, tumors in the T4 stage presented positive association with a high percentage of HA-positive cancer cells (R=0.80; P=0.01).

At the end of the follow-up, 32 patients of 46 (69.5%) who underwent surgical resection died because of LC. Univariate survival analysis showed that the significant predictors of overall survival (OS) were N stage ($\chi^2=4.3$; P=0.03) and HA expression in cancer cells ($\chi^2=5.2$; P=0.02). A high percentage of HA-positive cells predicted a shortened disease-free survival [n=11 (47.8%), P=0.02] in univariate analysis together with stage (P=0.02). However, among ADs, there was a trend toward poor OS, with tumors showing a high percentage of cancer cell-associated HA (P=0.09). Comparative Cox multivariate analysis controlled by gender, age, and AD showed a significant association between better survival and low cancer cell-associated HA sign (HR=0.08; P=0.03). We ranked the cases according to ROC curve into two groups with distinctly different average survival times as illustrated by Kaplan-Meier plots in Figure 3. The group with ,692.1 mg/mg HA appears as the top curve, and their median survival time was 72 months. Those with >692.1 mg/mg HA (bottom curve) had a median survival time of just 52 months after surgery (log rank=5.3; P=0.02).

Table 2 shows the concentration levels of HA found in normal and cancer lung tissue surgically resected from 46 patients with LC. HA concentration levels were significantly increased in tissue from patients with LC compared to normal lung tissue (P,0.001). HA concentration levels increased seven-fold in cancer tissue compared to normal

lung tissue. Concentration levels of HA were significantly higher in lung tissue from patients with SqCC than AD and LCC (P=0.01; Table 2), coincident with the qualitative and quantitative immunoexpression observed in FFPE (Figure 1, G and J).

The concentration levels of HA in sputum obtained from 90 patients with LC, 25 cancer-free patients, and 15 healthy volunteers are shown in Table 3. HA concentration levels were significantly increased in sputum from LC patients compared to cancer-free and healthy volunteers (P,0.001, Figure 2A). HA levels were higher in the sputum of patients with SqCC compared to other histological types (P=0.01; Table 3, Figure 2B).

The sputum HA analysis capacity to distinguish healthy volunteers from LC patients was analyzed using an ROC curve. The area under the curve for this condition was 0.821 (0.727-0.915). Assuming a cut-off value of 20.06 ng/mg, the specificity was 80% and the sensitivity was 66% (Figure 2C). The sputum HA analysis capacity to distinguish cancer-free patients from LC patients was analyzed by a second ROC curve. The area under the curve for this condition was 0.698 (0.600-0.797), and the cut-off value of 24.04 ng/mg showed 68% specificity and 60% sensitivity (Figure 2D).

A significant correlation was found between the biotinylated HA probe in sputum and biotinylated HA FFPE cancer tissue (R=0.5; P=0.02).

Discussion

The first aim of this research was to evaluate the association between malignant changes and HA through its expression and location in tumor tissue and its

Figure 2. A, Box plots of hyaluronan (HA) in healthy volunteers, cancer-free patients and lung cancer patients (LC). Patients with lung cancer had significantly higher HA levels in sputum than in the cancer-free patients and healthy volunteers (Log10 scale; P,0.001, Mann-Whitney test). B, Box plots of HA in lung cancer patients. Patients with squamous cell carcinoma (SqCC) had higher HA levels compared to adenocarcinoma (AD) and large cell carcinoma (LCC) (log10 scale; P,0.001, Kruskal-Wallis test). C, D, Receiver operating characteristic (ROC) curves for sputum levels of HA. C, The cut-off level of HA that resulted in the highest diagnostic accuracy was .31.44 ng/mg. This cut-off point discriminated between healthy controls and lung cancer patients, with 100% specificity and 51% sensitivity. The diagnostic accuracy was 82%. D, The cut-off level of HA that discriminated cancer-free patients and lung cancer patients with 100% specificity and 33% sensitivity was .48.3 ng/mg. The diagnostic accuracy was 69%.

relationship with histological types, angiogenesis, and metastases. Hypothesizing to get an association between HA and malignant changes on prognosis, the second aim was to evaluate whether these malignant changes were reflected in sputum from patients with LC. We found a significant expression of HA and micro-vessels at the epithelial cell-extracellular matrix interface in tumoral lung tissue, and confocal microscopy confirmed this colocalization, suggesting that an increased synthesis of HA occurs through interactions with HA receptors and endothelium. HA receptors are expressed by endothelial cells (33), lung fibroblasts, and smooth muscle (34), which are abundant at the cell-extracellular matrix interface. This coupled expression of HA receptors and HA at the epithelial cell-extracellular matrix interface suggested that these two components must interact with each other. This interaction could play a role in attaching respiratory epithelial cells to the basement membrane and in maintaining their polarized morphology. When the malignant transformation occurs in respiratory epithelial cells, the imbalance between hyperexpression of HA and HA synthases (14) is unable to attach respiratory epithelial cells to the basement membrane, leading to invasion and

exfoliation in fluids, such as sputum. The direct association that we found between a high percentage of HA and microvessels in the tumor cell-stroma interface is supported by the concept that hyaluronidases (HYAL1 and HYAL2), which are responsible for HA degradation (14), stimulate malignant neovascularization (15) for tumor growth and metastases. Indeed, when we analyzed the entire tumor, we found a direct association between tumors in T4 and N1 stages and high levels of HA in cancer cells, clearly suggesting that surgical resection fails to cure some patients with localized LC because of metastases.

In the current study, a strong HA staining intensity associated with cancer cells was also significant in SqCCs compared to AD and LCC. Similar findings were reported by Pirinen et al. (25), who analyzed the prognostic value of HA in a large series of patients with non-small-cell lung carcinoma using a biotinylated HA-specific probe. As previously reported by Wang et al. (27), tumor cells were enhanced in HA, but they showed considerable differences in HA expression depending on the cellular origin as well as on the histological type of the tumor. Our findings also support the concept that normal squamous

Figure 3. Kaplan-Meier plots of survival probability vs follow-up time in months for all patients. The group with ≤ 692.1 mg/mg HA appears as the top curve, and the group with > 692.1 mg/mg HA appears as the bottom curve.

cells and carcinomas of squamous cell differentiation mostly express large amounts of HA (29). In contrast, tumors derived from nonstratified epithelium, such as colon (28), ovarian (35), and breast (32) tumors, show an absence of or a very poor HA signal. In agreement with these reports, our present results showed a relatively low percentage of high HA expression in AD. Likewise, our findings showed that an elevated HA signal in tumor cells was associated with poor prognosis, similar to results in the literature (25,28,32,35).

Thus, we should not be surprised to learn that a biotinylated HA-specific probe provided important prognostic information about cancerous changes in tissue, and

our results now confirm the prognostic importance of HA in LC. Whereas only four prior studies were able to show a significant relationship between immunostaining for HA in the tumor and survival (25,28,32,35), our results suggest that staining for HA, used as a continuous variable, provides more prognostic information than does routine pathological stage. A binary cut-off point in HA in tumors was the median of 692.1 mg/mg of cells staining for HA, and this point provided a practical way to separate patients into two groups: patients with an expected short survival vs patients with an expected longer survival. Thus, a biotinylated HA-specific probe for HA in the primary tumor offered the potential to show malignant changes in FFPE tissue from patients with LC. The next question of interest was whether these malignant changes gathered from the tumor tissue or its milieu could help us identify patients with LC using a noninvasive procedure such as sputum. We found that HA concentration levels were significantly increased in sputum from LC patients compared to cancer-free and healthy volunteers. One of the mechanisms by which HA increases in sputum may be via the promotion of cell migration, because of the highly expanded, hydrated extracellular space provided by HA, which facilitates cell movement, and by HA signaling through its receptors CD44 and RHAMM (36), as shown in previous studies (34,36). As already discussed, malignant changes induce a disproportion between expression of HA and hyaluronidase by respiratory epithelial cells (14), which become unable to attach cells to the basement membrane, leading to exfoliation and hypersecretion of HA in sputum. Both events lead to detachment of the HA layer that usually covers glands and the respiratory epithelium (14). There is another possible mechanism by which HA is deposited in sputum. Malignant cells affect tumoral stroma remodeling by regulating fibroblasts. The activated stromal

Table 3. Tissue and sputum hyaluronan (HA) analysis.

	Tissue (mg/g)	Sputum (ng/mg)
Lung cancer	713.13 $\pm$ 104.55*	
Squamous cell carcinoma	808.28 $\pm$ 222.03	
Adenocarcinoma	717.97 $\pm$ 135.28	
Large cell carcinoma	241.7 $\pm$ 40.14	
Normal lung	155.39 $\pm$ 39.28	
Lung cancer		31.72 $\pm$ 2.97*
Cancer-free patients		19.78 $\pm$ 2.21
Healthy volunteers		8.72 $\pm$ 2.11

Data are reported as median $\pm$ SE of HA in lung specimens from tumors and sputum. In both specimens, determination of HA was performed using the same "ELISA-like" fluorometric assay. * P,0.001, HA levels in lung cancer tissue specimens were significantly different from normal lung tissue and maintained when categorized by histological types (P,0.001 and P=0.005). *P,0.001, HA levels in sputum of lung cancer patients were significantly different from cancer-free patients and healthy subjects. The Mann-Whitney test was used for statistical analyses.

fibroblasts, termed cancer-associated fibroblasts (CAFs), share some similarities with myofibroblasts, including the expression of alpha smooth muscle actin (37). CAFs play a prominent role in the remodeling process by producing collagen and elastin fibers as well as proteoglycans and glycoproteins (38). It has also been shown that airway fibroblasts from LC patients produce significantly increased concentrations of HA and HA synthase compared to controls (4,5). LC tumors secrete tumor necrosis factor alpha (TNF- α), tumor growth factor beta, and endothelial growth factor, known to be potent stimulators of HA synthesis in lung fibroblasts, and may contribute to the deposition of HA in the airways of LC. In addition, tumors express CD44, which binds HA, and this interaction has been implicated in aggregation, proliferation, and migration of neoplastic cells (24,25,34). Therefore, it is possible that LC patients express a pathological feedback loop where tumors stimulate fibroblast synthesis of HA through the release of tumor growth factor beta and TNF- α , and increase recruitment of additional fibroblasts through upregulation of CD44.

We also found that HA levels were higher in the sputum of patients with SqCC compared to other histological types of tumor. SqCC carcinogenesis depends on epigenetic factors, and it has already been reported that the connection between HA and its receptor CD44 can result in the suppression of several epigenetic regulators and the upregulation of survival proteins. In addition, the greater quantities of HA in the SqCC cancer cells were reflected in the greater quantities of HA found in the sputum from SqCC patients in this study, and that might be explained by the central bronchial location and squamous cell origin of the tumor, whereas AD and LCC are located peripherally and originate from columnar gland cells.

Previous studies have demonstrated that HA is elevated in malignant mesothelioma effusions. In this context, Pettersson et al. (17) found that, with the cut-off level at 100 mg/L, the pleural fluid concentration of HA was increased in 73% of patients with mesothelioma and 23% of patients with nonmalignant inflammatory diseases, but in none of the patients with cancer other than mesothelioma and in none of the patients with congestive heart failure. Other studies have demonstrated that HA is elevated in urine from patients with urologic cancer. Lokeshwar et al. (39) compared levels of HA in the urine of normal individuals and patients with bladder cancer or other genitourinary conditions, and found that the urinary HA measurement by the ELISA-like assay shows a sensitivity of 91.9% and specificity of 92.8% to detect bladder cancer. In inflammatory conditions, such as chronic obstructive pulmonary disease and asthma, HA has also been applied for diagnostic purposes in sputum. Ayars et al. (30) examined levels of HA in the sputum of asthmatics treated with mepolizumab therapy vs those taking a placebo, and found reduced levels of HA as well as improved clinical and

spirometry values in the patients treated with mepolizumab, suggesting that this measurement may serve as a noninvasive biomarker of asthma control.

To our knowledge, the current study is the first to investigate HA as an indicator in the sputum from patients with LC, therefore limiting a comparison of the results, unless they are compared to the current gold standard, sputum cytology. Presently, sputum cytology is the minimum invasive resource for obtaining a diagnosis in a patient who is suspected of having LC. However, the diagnostic accuracy of sputum cytology depends on rigorous specimen sampling and preservation techniques, as well as on the location and size of the tumor (central vs peripheral). In the present study, we showed that, using a single low-cost procedure that is not time consuming and that can be performed routinely in the lab, sputum HA distinguished tumor patients from those without tumor with 80% specificity and 66% sensitivity. Similarly, the sputum HA concentration can distinguish cancer-free patients from LC patients with 68% specificity and 60% sensitivity. According to the literature, sputum cytology sensitivity ranges from 42% to 97% and specificity ranges from 68 to 100% (40). Our findings contrast with a recent study published by Van Rensburg et al. (31) in which the sputum cytology in a high-risk population revealed a sensitivity of 38.9% to detect malignant cells and 100% accuracy. Comparing our findings to the literature, we presume that the sensitivities between 60% and 66% that we found can be within the same limits of variation as cytology sputum. Therefore, HA evaluation in sputum could be superior or similar to the current gold standard, sputum cytology, eventually emphasizing that combined sputum HA and cytology may add considerably to the diagnostic armamentarium currently used in the clinic for LC diagnosis.

Localization of HA in tumor tissue and its relationship with histological types and angiogenesis was related to malignancy of LC and reflected in sputum, which is emerging as an important diagnostic procedure in patients with suspicion of LC. To confirm these results, more studies in a randomized and prospective trial are needed, and we also believe it is important to validate our quantitative assessment of HA and to couple it to gold standard sputum cytology by studying HA in additional patients.

Acknowledgments

We are grateful to Biologist Sandra de Morais Fernelian, Laboratory of Immunohistochemistry for her technical assistance. Research supported by FAPESP (2010/11005-5 and 2010/04462) and CNPq (#471939/2010-2 and 483005/2012-6). Oral Presentation at the 2011 and 2012 European Respiratory Congress (Silver Sponsorship).

References

- Schrump D, Altorki N, Henschke C, Carter D, Turrisi A, Gutierrez M. Non-small cell lung cancer. In: De Vita V, Hellman S, Rosenberg S (Editors), *Cancer: principles and practice of oncology*. 7th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p 753-754.
- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008. http://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2008/. Accessed December 26, 2011.
- Wistuba II, Gazdar AF. Lung cancer preneoplasia. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 331-348, doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100103.
- de Sa' VK, Carvalho L, Gomes A, Alarcão A, Silva MR, Couceiro P, et al. Role of the extracellular matrix in variations of invasive pathways in lung cancers. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46: 21-31, doi: 10.1590/1414-431X20122263.
- de Sa V, Olivieri E, Parra ER, Ab'Saber AM, Takagaki T, Soares FA, et al. Hyaluronidase splice variants are associated with histology and outcome in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol* 2012; 43: 675-683, doi: 10.1016/j.humpath.2011.06.010.
- Souza P, Rizzardi F, Noleto G, Atanazio M, Bianchi O, Parra ER, et al. Refractory remodeling of the microenvironment by abnormal type V collagen, apoptosis, and immune response in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* 2010; 41: 239-248, doi: 10.1016/j.humpath.2009.07.018.
- Zetter BR. Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 1993; 4: 219-229.
- Freemont T. The significance of adhesion molecules in diagnostic histopathology. *Curr Diag Pathol* 1995; 2: 101-110, doi: 10.1016/S0968-6053(00)80006-X.
- Yang C, Cao M, Liu H, He Y, Xu J, Du Y, et al. The high and low molecular weight forms of hyaluronan have distinct effects on CD44 clustering. *J Biol Chem* 2012; 287: 43094-43107, doi: 10.1074/jbc.M112.349209.
- Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Eickelberg O, Perruchoud AP, Block LH, Roth M. A 340 kDa hyaluronic acid secreted by human vascular smooth muscle cells regulates their proliferation and migration. *Glycobiology* 1998; 8: 821-830, doi: 10.1093/glycob/8.8.821.
- Toole BP. Glycosaminoglycans and morphogenesis. In: Hay ED (Editor), *Cell biology and extracellular matrix*. New York: Plenum Press; 1991. p 259-294.
- Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 528-539, doi: 10.1038/nrc1391.
- Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lénas P, Yamada Y, Imagawa M, et al. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* 1999; 274: 25085-25092, doi: 10.1074/jbc.274.35.25085.
- Dentener MA, Vernooy JH, Hendriks S, Wouters EF. Enhanced levels of hyaluronan in lungs of patients with COPD: relationship with lung function and local inflammation. *Thorax* 2005; 60: 114-119, doi: 10.1136/thx.2003.020842.
- Deed R, Rooney P, Kumar P, Norton JD, Smith J, Freemont AJ, et al. Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. *Int J Cancer* 1997; 71: 251-256, doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19970410)71:2<251::AID-IJC21.3.0.CO;2-J.
- Roboz J, Greaves J, Silides D, Chahinian AP, Holland JF. Hyaluronic acid content of effusions as a diagnostic aid for malignant mesothelioma. *Cancer Res* 1985; 45: 1850-1854.
- Pettersson T, Froseth B, Riska H, Klockars M. Concentration of hyaluronic acid in pleural fluid as a diagnostic aid for malignant mesothelioma. *Chest* 1988; 94: 1037-1039, doi: 10.1378/chest.94.5.1037.
- Atagi S, Ogawara M, Kawahara M, Sakatani M, Furuse K, Ueda E, et al. Utility of hyaluronic acid in pleural fluid for differential diagnosis of pleural effusions: likelihood ratios for malignant mesothelioma. *Jpn J Clin Oncol* 1997; 27: 293-297, doi: 10.1093/jjco/27.5.293.
- Welker L, Muller M, Holz O, Vollmer E, Magnussen H, Jorres RA. Cytological diagnosis of malignant mesothelioma--improvement by additional analysis of hyaluronic acid in pleural effusions. *Virchows Arch* 2007; 450: 455-461, doi: 10.1007/s00428-007-0375-x.
- Creaney J, Dick IM, Segal A, Musk AW, Robinson BW. Pleural effusion hyaluronic acid as a prognostic marker in pleural malignant mesothelioma. *Lung Cancer* 2013; 82: 491-498, doi: 10.1016/j.lungcan.2013.09.016.
- Nossier AI, Eissa S, Ismail MF, Hamdy MA, Azzazy HM. Direct detection of hyaluronidase in urine using cationic gold nanoparticles: a potential diagnostic test for bladder cancer. *Biosens Bioelectron* 2014; 54: 7-14, doi: 10.1016/j.bios.2013.10.024.
- Kramer MW, Escudero DO, Lokeshwar SD, Golshani R, Ekwenna OO, Acosta K, et al. Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis. *Cancer* 2011; 117: 1197-1209, doi: 10.1002/cncr.25565.
- Passerotti CC, Srougi M, Bomfim AC, Martins JR, Leite KR, Dos Reis ST, et al. Testing for urinary hyaluronate improves detection and grading of transitional cell carcinoma. *Urol Oncol* 2011; 29: 710-715, doi: 10.1016/j.urolonc.2009.10.006.
- Passerotti CC, Bomfim A, Martins JR, Dall'Oglio MF, Sampaio LO, Mendes A, et al. Urinary hyaluronan as a marker for the presence of residual transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol* 2006; 49: 71-75, doi: 10.1016/j.eururo.2005.09.015.
- Pirinen R, Tammi R, Tammi M, Hirvikoski P, Parkkinen JJ, Johansson R, et al. Prognostic value of hyaluronan expression in non-small-cell lung cancer: Increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001; 95: 12-17, doi: 10.1002/1097-0215(20010120)95:1,12::AID-IJC1002.3.0.CO;2-E.
- Pirinen RT, Tammi RH, Tammi MI, Paakko PK, Parkkinen JJ, Agren UM, et al. Expression of hyaluronan in normal and dysplastic bronchial epithelium and in squamous cell carcinoma of the lung. *Int J Cancer* 1998; 79: 251-255, doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19980619)79:3,251::AID-IJC7.3.0.CO;2-O.
- Wang C, Tammi M, Guo H, Tammi R. Hyaluronan distribution in the normal epithelium of esophagus, stomach, and colon and their cancers. *Am J Pathol* 1996; 148: 1861-1869.

28. Ropponen K, Tammi M, Parkkinen J, Eskelinen M, Tammi R, Lipponen P, et al. Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 342-347.
29. Hirvikoski P, Tammi R, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Parkkinen JJ, Tammi M, et al. Irregular expression of hyaluronan and its CD44 receptor is associated with metastatic phenotype in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 1999; 434: 37-44, doi: 10.1007/s004280050302.
30. Ayars AG, Altman LC, Potter-Perigo S, Radford K, Wight TN, Nair P. Sputum hyaluronan and versican in severe eosinophilic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 161: 65-73, doi: 10.1159/000343031.
31. Van Rensburg A, Neethling GS, Schubert PT, Koegelenberg CF, Wright CA, Bolliger CT, et al. Impact of routine sputum cytology in a population at high risk for bronchial carcinoma. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; 18: 607-612, doi: 10.5588/ijtld.13.0806.
32. Martins JR, Passerotti CC, Maciel RM, Sampaio LS, Dietrich CP, Nader HB. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem* 2003; 319: 65-72, doi: 10.1016/S0003-2697(03)00251-3.
33. Antonelli A, D'Amore PA. Density-dependent expression of hyaluronic acid binding to vascular cells in vitro. *Microvasc Res* 1991; 41: 239-251, doi: 10.1016/0026-2862(91)90025-7.
34. Hall CL, Yang B, Yang X, Zhang S, Turley M, Samuel S, et al. Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation. *Cell* 1995; 82: 19-26, doi: 10.1016/0092-8674(95)90048-9.
35. Anttila MA, Tammi RH, Tammi MI, Syrjänen KJ, Saarikoski SV, Kosma VM. High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 150-155.
36. Knudson W. Tumor-associated hyaluronan. Providing an extracellular matrix that facilitates invasion. *Am J Pathol* 1996; 148: 1721-1726.
37. Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res* 2011; 1: 482-497.
38. Mantoni TS, Lunardi S, Al-Assar O, Masamune A, Brunner TB. Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through beta1-integrin signaling. *Cancer Res* 2011; 71: 3453-3458, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1633.
39. Lokeshwar VB, Obek C, Soloway MS, Block NL. Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 773-777.
40. Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM. Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd edn.: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013; 143: e142S-e165S, doi: 10.1378/chest.12-2353.

Sputum Cofilin-1 and sCD44 as potential biomarker for predicting Lung Cancer and their Metastasis

Maristela Peres Rangel¹, Leila Antonangelo¹, Milena Marques Pagliarelli Acencio², Caroline Faria², Vanessa Karen de Sá¹, Cecília Farhat¹, Alexandre Todorovic Fabro¹, Vera Luiza Capelozzi¹

(1) Departament of Pathology, Research Laboratory (LIM 03) and (2) Pulmonary Division, Heart Institute - Incor - Hospital das Clinicas, University of Sao Paulo, Brazil.

Poster Presentation at 16th World Conference on Lung Cancer 2015

Address correspondence to:

Vera Luiza Capelozzi

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Department of Pathology

Av. Dr. Arnaldo 455, Room 1143

CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brazil

Phone – 55-11 3061-7427; FAX – 55-11 3064-2744

e-mail: vera.capelozzi@fm.usp.br

Abstract

Background: Lung Cancer (LC) is often diagnosed at a late stage with lower survival rate. Cofilin-1 (CFL1) and soluble CD44 molecule (sCD44) have been targeted as potential useful tumor markers because of their ECM interactions in several steps required for tumor cell invasion and formation of metastases. Our aim was to evaluate CLF1 and sCD44 as potential biomarker for predicting LC and their lymph node metastasis by minimally invasive procedures as sputum.

Methods: CLF1 and sCD44 were analyzed by Elisa immunoassay in the sputum of 73 non small cell lung cancer patients, 13 cancer-free patients with obstructive lung disease and 6 healthy individuals. Statistical analyses included ANOVA, ROC curves, Spearman correlation, and logistic regression.

Results: Sputum CLF1 levels are increased in LC patients compared to cancer-free patients and volunteers ($p < 0.05$). High CLF1 levels are correlated with sCD44 in cancer patients ($R = 0.21; p = 0.04$). Univariate analysis demonstrated high expression of sputum CLF1 is correlated to T4 ($p = 0.01$) and M-stage ($p = 0.03$), tobacco history ($p = 0.01$) and squamous cell carcinoma histologic type ($p = 0.04$). Logistic regression analysis controlled for tobacco history, histologic types, stage and sCD44 levels showed that cancer cell-associated CLF1 was an independent predictor of metastases. Patients with $CLF1 > 1475 \text{ pg/ml}$ have a higher risk for lymph node metastasis. CLF1 at a cut off value of 248 pg/mL in differentiating between healthy volunteers and LC patients has sensitivity/specificity of $0.80/0.70$ and AUC of 0.80 . In specific clinical setting, as >25 pack-year smoking history and $sCD44 > 120 \text{ pg/mL}$, CFL1 and sCD44 could be useful to diagnostic of LC lymph node metastasis with AUC of 0.96 . CFL1 and CD44 have a greater diagnostic value in detecting lung cancer and their lymph node metastasis, especially in an appropriate clinical setting. In addition, considering the potential heterogeneity, further research studies with more well-designed and large sample sizes are needed in the future

Key words: Lung cancer, cofilin-1, sCD44, sputum, metastases

Introduction

Lung cancer (LC) is the leading cause of tumor death worldwide and an effective test for early LC detection has been an elusive goal for decades. Early randomized screening trials that assessed combinations of chest radiography, sputum cytology and low-dose helical computed tomography were inconclusive in showing a mortality benefit from screening [1-3]. However, the use of this screening strategy has reduced lung cancer-specific mortality by 20%, while all-cause mortality was reduced by 6.7% [4]. The majority of patients died due to the disease once local or distant metastasis has occurred. This phenomenon may account for the deficiencies in accurate diagnosis and risk stratification. Therefore, the identification and validation of novel biomarkers for LC should be considered a priority [5]. In several types of cancer, intracellular and extracellular proteins have been shown to be potential diagnostic markers present in secretions, especially in the blood, saliva, sputum and urine[6-9]. The acid hyaluronic receptor protein - CD44, present in all body tissues, is emerging as a good biomarker for cancers of the head and neck in saliva[7]. Usually this protein is attached to cell membranes, however, in some circumstances, it is secreted and detected in the circulation by the action of proteases in the form of soluble CD44 molecule (sCD44)[10]; in some tumors, its detection correlates with the development of metastases[11, 12].

Another protein that has attracted the interest of researchers is the Cofilin-1 (CFL1), a non-muscle isoform of the product of the CFL1 gene (Gene ID, 1072). CFL1 is a small ubiquitous protein that is able to bind monomeric globular (G) and filamentous actin and inhibits the polymerization of monomeric G-actin in a pH-dependent manner [13], playing

a key role in cell migration and cytokinesis [14]. This protein has been reported to be directly associated with invasion, local or distant metastasis and chemoresistance of various human malignant solid tumors[15, 16]. Furthermore, it has also been found as a good tumor biomarker present in the plasma of patients with lung cancer at advanced stages [17]. However, no previous studies have considered sputum CFL1 expression as a diagnostic or prognostic marker in LC. The sputum expression of CFL1 and the relationship between this biomarker with sCD44 and its clinical implication in LC are investigated in the present study.

Patients & Method

Patients

This research was carried out in accordance with the Helsinki Declaration and the study was approved by University of São Paulo Ethics Committee with Deliberation n°#256/10. A written Informed consent was obtained from all patients. A cohort of 73 consecutive patients with non small cell lung cancer at the São Paulo State Cancer Institute and the Barretos Cancer Hospital, Brazil were included (Table 1).

Moreover, 13 patients classified as cancer-free and 6 as healthy volunteers were also study. All cancer free patients have chronic obstructive pulmonary disease, being 9 men and 4 women, and median age of 62 years (range 32-78 years). Two patients are smokers, 4 non-smokers, 6 former smokers and one did not have this information. Former smokers were defined as patients who have left the tobacco habit for more than one year. All 6 healthy volunteers (one man and five women) were selected during the investigation for non-

pulmonary diseases. The median age was 73.5 years (range 65-78 years) and 2 patients were smokers.

Obtaining of sputum samples

To produce spontaneous sputum in LC patients, cancer-free and healthy volunteers, we employed a modified protocol described by Fahy et al (Fahy J, Liu J, Wong H, et al. Analysis of cellular and biochemical constituents of induced sputum after allergen challenge: a method for studying allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 93:1031–1039, 1994), subjects inhaled nebulized sterile hypertonic saline (4%) solution for 7 minutes from an Ultra-Neb 99 ultrasonic nebulizer (DeVilbiss, Somerset, PA, USA). This nebulizer generates particles of a mean mass median diameter of 4.5 μm and has an output of 2.4 ml/min. After expelling saliva, subjects were encouraged to cough at 2 minute intervals. The sputum was collected in a sterile plastic container for further processing.

All sputum samples were stored on ice until further processing. To minimize salivary contamination, obtained sputum samples were visually examined in sterile Petri dishes, culls out all viscid or dense portions of the sample to separate airway fluid from saliva, processed with trypsin and then, samples were stored at -80°C until further analyses.

Detection of sCD44 and CFL1 in the sputum

The levels of CFL1 (USCN Business Co. Ltd., Houston, USA) and sCD44 (eBioscience, Inc., San Diego, USA) were determined by using a ‘sandwich’ ELISA test according to the manufacture’s guideline. Sputum samples and control standards were added in pre-sensitized plates with anti-CFL1 or anti-sCD44 antibodies and incubated at room

temperature (RT) for 2 hours. After incubation, a biotinylated conjugate antibody was added and incubated at RT for 2 hours. Then, streptavidine HRP was added to plates and incubated at RT for 30 minutes. For each washing step, the plates were washed with Wash Buffer (PBS + Tween 20) for 6 times. The revelation was done by adding H₂O₂ with tetramethylbenzidine and the reaction was blocked with H₂SO₄ 30%. The reading was taken in an ELISA reader (Power Wave Bio-Tek, USA) using a 450 nm filter. The minimum detectable level for CFL1 was 78.1 pg/mL and for solCD 44 was 62.5 pg/mL. The assays were run in triplicate and the results were expressed as means.

Statistical analysis

The statistical analyzes were performed using SPSS version 18 (Inc., Chicago, IL). Descriptive analysis of quantitative and qualitative data are shown. When necessary variables were analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test to verify the normal distribution. The concentration of sputum CLF1 and CD44 was determined by cut-off point to manage a dichotomous response (low or high, for example) usually defined by the point where sensitivity and specificity are both larger. The association among histological types, demographics data and sputum profile was compared using Fisher's exact test and Chi-square test of Pearson, depending on score. In addition, the general linear model was used to test the relationship between one continuous variable and several others, and the residuals were examined to ensure that they were approximately normally distributed. These variables were included in the multivariate analysis to evaluate the potential effect of them on lymph node metastasis. ROC curves were used to evaluate the accuracy of sputum sCD44 and cofilin-1 in the diagnosis of LC, measured by the area under the curve (AUC).

The cut off values depicted in ROC curves represent the point at which the sensitivity and specificity simultaneously demonstrate higher values[18]. Logistic regression was used to determine the risk of metastases for patients with lung cancer based on the levels of CD44 and CFL1. Bonferroni method was used when necessary. A significant p value was considered as ≤ 0.05 .

Results

Patient characteristics

The clinical and pathological characteristics including age, gender, tumor stage, histological types and tobacco history are shown in Table 1. The NSCLC cohort median follow-up at data of cut-off was 27 months. To date, 10 patients died and 63 are alive until the end of the study.

Cofilin-1 and sCD44 concentration is increased in sputum of lung cancer

The ELISA results of CLF1 and sCD44 stratified by presence or absence of lung cancer are listed in Table 2. A significant increase of CLF1 concentration was found in the sputum of patients with lung cancer (1220, range 4161pg/mL) compared to cancer free patients (488, range 1443pg/ml) and healthy volunteers (157, range 1476pg/ml) ($P=0.012$) (Figure 1A). Equally significant was the increased concentration of sCD44 in the sputum of patients with lung cancer (69, range 9165pg/mL) compared to the sputum of cancer free patients (62, range 193pg/ml) and healthy volunteers (62, range 45pg/ml) ($P=0.012$) (Figure 1B).

For sCD44, as the difference between volunteer and cancer free patients was very small, thus these two groups were combined in further analysis.

CLF1 is an independent predictive factor of metastases

General linear model analysis demonstrated that sputum CLF1 > 1.476 pg/ml related significantly to T4-stage ($P=0.012$), presence of lymph node metastases ($P=0.030$), tobacco history ($P=0.01$) and squamous cell carcinoma ($P=0.045$). The results obtained show a weak association between high levels of CLF1 and sCD44 ($R = 0.21$; $P=0.041$). All these relationships were significant after allowing for the contribution of the others, and for this analysis we used a multivariable model.

The logistic regression analysis controlled for smoking history, histological types, staging, and sCD44 showed that sputum CLF1 of patients with lung cancer is an independent predictive factor of metastases [$OR=5.77$ ($0.78-42.74$)] (Log likelihood $2=41.32$, $p<0.011$). Patients with CLF1>1,475 pg/ml had higher risk of lymph node metastasis (Table 3).

ROC curve help to discriminate lung cancer patients

ROC curves were built to demonstrate the diagnostic accuracy of sputum CLF1 and sCD44 in discriminating cancer patients from cancer free patients and healthy volunteers with an AUC of 0.78 and 0.61, respectively. At a cut off point of sputum CLF1 $\geq$ 248 pg/mL we obtained sensitivity and specificity of 70% and 80%, respectively (Figure 2A). Sputum CLF1 was also able to identify cancer free patients from patients with lung cancer. In this situation, the ROC curve showed an AUC of 0.70 at a cut off point of 802.5pg/mL, with 60% sensitivity and 54% specificity (Figure 2B). Sputum sCD44 identified patients at high

risk of lung cancer. Here, the ROC curve showed an area under the curve of 0.67 at a cutoff of 65.8pg/mL with 50% sensitivity and 84% specificity, respectively.

The ROC curve, built to evaluate the diagnostic ability of sputum sCD44 in identifying patients at high risk of lung cancer, showed that at a cutoff of 65.8pg/mL, the sensitivity and specificity was 50% and 84%, respectively (Figure 3). Above 279pg/mL was possible to distinguish 100% of the cases of lung cancer, but at this point, the sensitivity was only 30%.

Sputum Cofilin-1 and sCD44 for predicting the presence of lymph node metastasis

To achieve higher sensitivity and specificity, CFL1 and sCD44 markers were combined to built a ROC curve. Only patients with sCD44>120pg/mL and >25pack-year smoking were included. Although the correlation between CFL1 and sCD44 has been mild ($r=0.35$; $p=0.050$) (Figure 4A); the AUC has been higher for discrimination between controls and LC patients (AUC=0.96; $p=0.001$) (Figure 4B) than above curves. The best combination of sensitivity (100%) and specificity of (91%) was reached at a cut-off point 468 pg/mL of CFL1.

The CFL1 level was also higher in LC patients compared to controls when only patients with sCD44>120pg/mL and >25pack-year smoking were included ($p<0.001$). The presence of lymph node metastasis in these LC patients increased the CFL1 level compared to patients without lymph node metastasis ($p=0.021$) (Figure 4C). Simultaneously, the AUC of ROC curve was 0.78 ($p=0.031$) (Figure 4D).

Discussion

We demonstrated that patients with lung cancer present significant increases in sCD44 and CLF1 concentration in sputum, emerging as potential markers of malignancy. Furthermore, we found that the sputum LC patients contains high concentrations of sCD44 and CLF1 compared to cancer free patients and healthy volunteers. Depending on smoking history and sCD44 level, LC and their lymph node metastasis could be better predictors for diagnosis. This occurrence is extremely important since it represents unprecedented potential markers of lung cancer diagnoses in specimens obtained by non-invasive technique. The significance remained high even when the concentration of sCD44 and CLF1 sputum were compared between cancer patients *versus* healthy volunteers, cancer patients *versus* cancer free patients and cancer free patients *versus* healthy volunteers. Clearly, we found an increase production of both molecules in the sputum of cancer free patients, but the production in the sputum of patients with lung cancer was even greater. As far as we know, such molecules have never been assayed in the sputum, but our results are corroborated by Zheng studies et al [17] who demonstrated the potential diagnosis of CLF1 in serum of patients with lung cancer and by Franzmann et al [7] who demonstrated the ability of sCD44 as a potential diagnostic marker in the saliva of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.

We also found an association between the sputum concentration of CLF1 protein and squamous cell carcinomas. Previously, our group showed that hyaluronic acid, a GAG not sulfated component of extracellular matrix, can act as a prominent diagnostic marker of lung cancer in sputum [8] particularly in squamous cell carcinoma, secreting more matrix molecules for sputum because of its more central location in the respiratory tree. In

addition, other tests performed in sputum as cytology, for example, is more profitable in cases of squamous cell carcinoma precisely because of its more central location to be able to influence closer to the production of sputum[19].

In our work, with a concentration of CLF1 above 248 pg/mL, we found a sensitivity of 80% and specificity of 70% in discriminating patients with lung cancer from healthy volunteers. The disadvantage of this cut-off point is that around 60% of people with cancer can present a false negative diagnosis making the test inconclusive when values below 1619 pg/mL (sensitivity=0.40; specificity 1-0.00) of sputum CLF1 are detected. Thus, the clinical application of this test implies that any patient, who obtains CLF1 lower than 1619pg/ml in the sputum, should be submitted to conventional diagnostic tests for elucidation, such as bronchoscopy. The results presented in this study are highly relevant, as the search for diagnostic markers related to lung cancer has been subject of many researchers in recent decades. According Gadgeel [19] various study groups have been trying to find a serum or sputum marker for detection of the disease, but to date none of these markers showed broad application in clinical practice. The longing for discovering new diagnostic markers is related to the fact that the available diagnostic techniques are invasive and cause great discomfort and anxiety for patients. This occurs mainly because most of the techniques require application of anesthesia, hospitalization, and in most cases, are procedures that bring painful side effects to the patients[19, 20].

In this paper, we show a direct association between high levels of CLF1 and sCD44 in sputum of patients with lung cancer, suggesting that high rates of cell division in cancer cells induced by CLF1 is associated with increased CD44 receptor expression providing greater cell adhesion and movement, facilitating distant metastases. In specific clinical

setting, i.e. >25pack-year smoking history and sCD44>120pg/mL, CFL1 and sCD44 could be useful to diagnostic of LC lymph node metastasis.

Detection of CFL1 and sCD44 in sputum had an impact on the natural history of patients with lung cancer. Interestingly, we showed that the high concentration of CFL1 also correlates to T4 stage, metastases and tobacco history. In fact, by analyzing logistic regression controlled for tobacco history, histological types, staging and concentration of sCD44, we observed that the concentration of CFL1 in sputum of patients with lung cancer is an independent predictor of high risk of lymph node metastases. These results provide a glimpse that the concentration of this protein in sputum depends on tumor progression stage, probably as a consequence of the modifications made by extracellular matrix (ECM) earlier in the carcinogenesis, i.e., at the stage of tumor transformations. According to Wistuba [21], this is already a phase of ECM tissue remodeling which can take effect in sputum composition and production of ECM components. As we commented earlier, the interaction between tumor cells and the neoplastic microenvironment, as represented by the ECM, influences the invasive and metastatic properties of tumors.

Despite this high difference observed among the groups, one of the limiting factors of this study was to recruit healthy people at the same age of patients with lung cancer for collecting sputum samples for the control group. Because of this difficulty, there is a difference between the number of patient's cases and the number of normal cases. However, the considerable increase in sCD44 and CFL1 in the sputum of patients with lung cancer suggest that changes have already occurred at the beginning of carcinogenesis, giving to these proteins a promising profile as LC diagnostic markers. [Another limitation is related to](#) the sample size is relatively small and a power analysis should be performed to

assess the adequacy of the sample size. However, there are difficulties in recruiting normal volunteers and patients with COPD to collect sputum that require induction by 3 inhalations of 4% hypertonic saline for 7 min. In addition, even with the small sample size we found statistical significance for increased sputum CLF1 levels in LC patients compared to cancer-free patients and volunteers ($p < 0.05$). Considering the large number of autopsies performed in our Department, we try to increase the sample size collecting sputum in autopsies of individuals whose death time was less than 6 hours, and whose cause of death was not related to the lungs, such as stroke. However, the quality of the material was not suitable for detection of levels of cofilin. It is also important to emphasize that the median time from NSCLC detection to biomarkers sample collection was 1-2 years. Certainly, this interval played a role in CLF1 and CD44 expression analyses in sputum. This finding allow to hypothesize that sputum samples collected 1– 2 y before the onset of disease, at the time of CT detection for example, and in disease-free smokers enrolled in the screening study, probably will result in the generation of CLF1 and CD44 signatures with more strong predictive, diagnostic, and prognostic potential with an area under the ROC curve ≥ 0.80 .

Considering the results presented here, it is clear that CLF1 and sCD44 in sputum are promising tests for application in clinical practice since they bring to the patient an alternative to detect the disease by a non-invasive procedure. Unlikely to replace current diagnostic standards, the levels of sputum molecules may be important as a screening tool.

. Undoubtedly, for this practical application to be incorporated into the patient's routine care it would be interesting and essential that other patients assigned to the test development were recruited, including those with metastatic carcinoma from elsewhere to the lung (such as metastatic squamous cell carcinoma, metastatic carcinoma from the breast, colon, etc).

The results observed and discussed so far, put these proteins with indisputable role in the natural history of lung cancer and due to its increase in sputum, emerge as promising targets for lung cancer screening . We concluded that the levels of sputum molecules may be important as a screening tool to differentiate between cancer-free and lung cancer patients.

Abbreviations

LC: lung cancer; sCD44: soluble CD44 molecule; CFL1: Cofilin-1 ; RT: room temperature ; AUC: area under the curve; ECM: extracellular matrix.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

VLC, AL, ATF, CF, MMPA and MPR have made substantial contributions to conception and design of experiments, interpretation of results and have been involved in drafting the manuscript and revising it critically for important intellectual content. MMP, VKS, CF and LA have made substantial contributions to acquisition of clinical data, sputum induction and Elisa immunoassay. VLC and ATF have made substantial contribution to final review of manuscript. Study supervision: VLC. All authors have read and approved the manuscript.

Funding

This research is supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP N°2010/11005-5) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq N° 471939/2010-2 and N° 483005/2012-6).

Author details

¹Departament of Pathology, Research Laboratory (LIM 03) and ² Pulmonary Division, Heart Institute (Incor) – Clinic Hospital, University of Sao Paulo, Brazil.

References

1. Melamed, M.R., *Lung cancer screening results in the National Cancer Institute New York study*. Cancer, 2000. **89**(11 Suppl): p. 2356-62.
2. Tockman, M.S., *Survival and Mortality from Lung Cancer in a Screened Population: The Johns Hopkins Study*. Chest, 1986. **89**(suplement): p. 324S-325S.
3. Fontana, R.S., et al., *Screening for lung cancer. A critique of the Mayo Lung Project*. Cancer, 1991. **67**(4 Suppl): p. 1155-64.
4. Aberle, D.R., F. Abtin, and K. Brown, *Computed tomography screening for lung cancer: has it finally arrived? Implications of the national lung screening trial*. J Clin Oncol, 2013. **31**(8): p. 1002-8.
5. Kelloff, G.J. and C.C. Sigman, *Cancer biomarkers: selecting the right drug for the right patient*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(3): p. 201-14.

6. Melo, S.A., et al., *Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer*. Nature, 2015. **523**(7559): p. 177-82.
7. Franzmann, E.J., et al., *Salivary protein and solCD44 levels as a potential screening tool for early detection of head and neck squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2012. **34**(5): p. 687-95.
8. Rangel, M.P., et al., *Tissue hyaluronan expression, as reflected in the sputum of lung cancer patients, is an indicator of malignancy*. Braz J Med Biol Res, 2015. **48**(6): p. 557-67.
9. Passerotti, C.C., et al., *Urinary hyaluronan as a marker for the presence of residual transitional cell carcinoma of the urinary bladder*. Eur Urol, 2006. **49**(1): p. 71-5.
10. Kajita, M., et al., *Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration*. J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. 893-904.
11. Ristamaki, R., et al., *Elevated serum CD44 level is associated with unfavorable outcome in non-Hodgkin's lymphoma*. Blood, 1997. **90**(10): p. 4039-45.
12. Yamane, N., et al., *Soluble CD44 variant 6 as a prognostic indicator in patients with colorectal cancer*. Oncology, 1999. **56**(3): p. 232-8.
13. Ono, S., *Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics*. Int Rev Cytol, 2007. **258**: p. 1-82.
14. Hotulainen, P., et al., *Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(2): p. 649-64.

15. Zhu, B., et al., *Prohibitin and cofilin are intracellular effectors of transforming growth factor beta signaling in human prostate cancer cells*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8640-7.
16. Wang, W., et al., *The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors*. J Cell Biol, 2006. **173**(3): p. 395-404.
17. Zheng, Y., et al., *[Detection of plasma cofilin protein for diagnosis of lung cancer]*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2013. **33**(10): p. 1551-3.
18. Ma, H., et al., *On use of partial area under the ROC curve for evaluation of diagnostic performance*. Stat Med, 2013. **32**(20): p. 3449-58.
19. Gadgeel, S.M., *Personalized Therapy of Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC)*. Adv Exp Med Biol, 2016. **890**: p. 203-22.
20. Howington, J.A., et al., *Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines*. Chest, 2013. **143**(5 Suppl): p. e278S-313S.
21. Wistuba, II, L. Mao, and A.F. Gazdar, *Smoking molecular damage in bronchial epithelium*. Oncogene, 2002. **21**(48): p. 7298-306.

Figures

Figure 1. Levels of sputum CFL1 e sCD44 in healthy volunteers, free-cancer and LC patients. (A) Difference in concentration of sputum cofilin-1 (pg/ml) in each group ($p = 0.01$). (B) Difference in concentration of sputum solCD44 (pg/ml) in each group ($p = 0.01$).

Figure 2: ROC curves representing the diagnostic ability of the dosage of cofilin-1 in sputum (A) to distinguish cancer patients from healthy people (AUC=0.78) and (B) to differentiate patients with cancer patients at high risk (AUC= 0.69).

Figure 3: ROC curve representing the diagnostic ability sCD44 dosage of sputum. It differentiate patients with cancer patients at high risk. AUC=0.67.

Figure 4 – Analysis of Cofilin-1 protein levels in patients with sCD44>120pg/mL and >25pack-year. (A) Correlation between sCD44 and Cofilin-1. (B) ROC curve for the discrimination of cofilin-1 protein levels between normal controls and patients with lung cancer. (C) Cofilin-1 in patients with lymph node metastasis. (D) ROC curve for the discrimination of cofilin-1 protein levels between presence or absence of lymph node metastasis