Vanessa Karen de Sá

Biomarcadores de prognóstico no câncer de pulmão : caracterização do perfil de expressão gênica das hialuronidades, imunoreatividade das hialuronidases e sintases do ácido hialurônico e interação dessas proteínas com a transição epitélio-mesenquimal

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

Programa de Patologia

Orientadora: Profª Dra. Vera Luiza Capelozzi

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sá, Vanessa Karen de
Biomarcadores de prognóstico no câncer de pulmão : caracterização do perfil de expressão gênica das hialuronidades, imunoreatividade das hialuronidases e sintases do ácido hialurônico e interação dessas proteínas com a transição epitélio-mesenquimal / Vanessa Karen de Sá. -- São Paulo, 2012.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Patologia.
Orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Descritores: 1.Neoplasias pulmonares 2.Hialuronoglucosaminidase 3.Ácido hialurônico 4.Processamento alternativo 5.Fator de crescimento transformador beta 6.E-caderina

USP/FM/DBD-199/12

Dedicatória

À minha filha, Sofia, o anjinho sem asas que chegou para iluminar a minha vida.

Aos meus pais, Pedro e Inês (In memorian), por me proporcionarem a vida e pelo exemplo de dedicação, coragem e perseverança, fonte de inspiração nas horas de dificuldade.

Às minhas irmãs, Tania e Elaine, apoio perene em todos os momentos, alicerce do meu porto seguro.

Ao meu marido, Tiago, pela realização do sonho de constituir uma família.

Aos meus sobrinhos, Vinicius, Renato e Luiza, fonte de alegria e descontração.

Agradecimentos

À caríssima orientadora Profª Dra. Vera Capelozzi, a quem devo amizade e gratidão por todos os ensinamentos e apoio durante este percurso.

À Profª Dra. Lina Carvalho, pela co-orientação e oportunidade a mim franqueada de ingresso ao Laboratório de Patologia Molecular, do Instituto de Anatomia Patológica da Universidade de Coimbra, para realização da etapa do estágio de doutoramento no exterior.

Ao Dr. Fernando Augusto Soares, pela importante colaboração no desenvolvimento do projeto através da disponibilização dos casos contidos no banco de tumores do Hospital do Câncer AC. Camargo.

À Dra. Dirce Maria Carraro, pela contribuição científica e fornecimento das amostras do biobanco de tumores do Hospital do Câncer AC. Camargo.

À Dra. Eloisa Olivieri, pela amizade e grande auxílio na realização do processamento das amostras do biobanco de tumores.

À Dra Maria Reis Silva, à Dra. Patricia Couceiro e à Dra. Ana Gomes, pelo apoio e auxílio na realização das coletas e imunohistoquímica, no Instituto de Anatomia Patológica da Universidade de Coimbra

À Dra. Manuela Lacerda, diretora do departamento de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, pela disponibilização do sistema de digitalização de imagens ACISIII.

À Profª. Dra. Maria Irma Seixas, à Dra. Claudia Zerbini e à Dra. Teresa Takagaki, pela contribuição científica no exame de qualificação.

À Dra. Suely Nanogaki e Dra. Ana Alarcão, pela realização das imunohistoquímicas no Hospital do Câncer AC. Camargo e no Instituto de Anatomia Patológica da Universidade de Coimbra, respectivamente.

Aos colegas do Laboratório de Patologia e Genômica Pulmonar, Dr. Alexandre Ab´saber, Dr. Charles Godói, Dr. Alexandre Fabro, Dr. Edwin Parra-Cuentas, pelo incentivo, apoio e amizade.

Aos secretários da Patologia, Thiago, Weluma e Mariely pela prestatividade.

A todos os amigos que adquiri durante a minha experiência em Portugal, especialmente à Lorena Falco, pela amizade imensurável e, Ismael Moraes, pelos momentos de diversão durante os nossos passeios pela bela europa.

À FAPESP, pela concessão da Bolsa de Doutorado e Auxílio à Pequisa.

À CAPES, pela concessão da Bolsa de estágio de doutorado no exterior.

Aos pacientes, pela valiosa contribuição e motivo principal da realização deste projeto.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....1

1.1 Generalidades.....2

1.2 Transição epitélio-mesenquimal.....7

1.3 Conceitos gerais sobre glicosaminoglicanos e proteinoglicanos.....11

1.4 Ácido Hialurônico.....14

1.5 Hialuronidases.....19

1.6 *Splicing* Alternativo.....22

1.7 *Splicing* alternativo das HYAL.....27

1.8 Hipótese.....31

2 OBJETIVOS.....32

3 MÉTODOS.....34

3.1 Casuística.....35

3.2 Exame Macroscópico.....36

3.2.1 Processamento da amostra.....37

3.2.2 Exame Microscópico.....37

3.2.3 Cultura de Células Tumorais.....41

3.3 Extração do RNA total.....42

3.3.1 Tratamento do RNA total com DNAse.....43

3.4 Transcrição reversa (RT).....44

3.5 PCR qualitativa.....45

3.6 Purificação de DNA.....47

3.6.1 Re-amplificação de DNA purificado.....48

3.7 Seqüenciamento de DNA.....48

3.7.1 Precipitação da Reação de Seqüenciamento com glicogênio.....49

3.8 Técnica de Imunohistoquimica empregada para detecção dos antígenos Hyal 1 e 3, HAS1, HAS2 e HAS3 em tecido congelado. 51
3.8.1 Técnica de Imunohistoquimica empregada para detecção dos antígenos Hyal 1 e 3, HAS1, HAS2 e HAS3, TGF-β e E-caderina em tecido parafinado. 53
3.9 Histomorfometria para quantificação das células (expressão de HAS 1, HAS 2 e HAS 3, Hyal 1 e 3, TGF-β e E-Caderina) 55
3.10 Tabulação dos dados e análise estatística 56
4 RESULTADOS 58
4.1 Pacientes 59
4.2 Avaliação da Expressão Gênica das HYAL 1, 2 e 3 62
4.2.1 Associação entre expressão das HYAL1, 2 e 3 e subtipos de adenocarcinoma 65
4.2.2 Análise da sobrevida 66
4.3 Avaliação Imunoproteica das Hyal-1 e 3, HAS 1, 2, 3 dos casos do Hospital das Clínicas/ Hospital do Câncer AC Camargo 68
4.3.1 Associação entre expressão das Hyal1 e 3, HAS1, 2 e 3 e carcinomas de células escamosas e subtipos de adenocarcinoma 74
4.3.2 Análise da sobrevida 76
4.4 Avaliação Imunoproteica da E-caderina, TGF-b, HAS 1, HAS 2 e HAS 3, Hyal 1 e Hyal 3 nos tumores de pacientes do Hospital Universitário de Coimbra 78
4.4.1 Histomorfometria 84
4.4.2 Análise da sobrevida 88
4.5 Comparação entre a Imunoexpressão das HAS 1,2,3 e Hyal 1,3 nos tumores de pacientes do Hospital das Clínicas/ Hospital AC Camargo e Hospital Universitário de Coimbra 91
5 DISCUSSÃO 93
6 CONCLUSÕES 104
7 ANEXOS 107
8 REFERÊNCIAS 121
Apêndices

Lista de abreviaturas

ADC	-	Adenocarcinoma
AIS	-	Adenocarcinoma in situ
BAC	-	Carcinoma bronquioloalveolar
cDNA	-	DNA complementar
CP	-	Câncer de pulmão
CPPC	-	carcinoma pulmonar de pequenas células
CPNPC	-	carcinoma pulmonar não pequenas células
DEPC	-	Dietil Pirocarbonato
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	-	Deoxiribonuclease
dNTPs	-	deoxinucleotídeos
DTT	-	Ditiotreitol
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HA	-	Ácido hialurônico
HAS	-	Sintase do ácido hialurônico
HAases	-	Hialuronidades
HYAL	-	Gene da hialuronidase
Hyal	-	Proteína da hialuronidase
KPS	-	Karnofsky Performance Status
LNCaP	-	Câncer de próstata linfonodo-positivo
MgCl2	-	Cloreto de magnésio
MIA	-	Adenocarcinoma minimamente invasivo

mM	-	Milimolar
NaCl	-	Cloreto de sódio
NaOAc	-	Acetato de sódio
NCI	-	National Cancer Institute
PB	-	Pares de bases
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
RNA	-	Ácido ribonucléico
RNAm	-	Àcido ribonucléico mensageiro
RNAnh	-	Ácido ribonucléico nuclear heterogêneo
RNPnh	-	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea
RNAnp	-	Ácido ribonucléico nuclear pequeno
Rnase	-	Ribonuclease
Rpm	-	Rotações por minuto
RPMI	-	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	-	Reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa
SPAM	-	Sperm adhesion molecule
TE	-	Tris EDTA
TNM	-	Tumor Nodes Metastasis
Tris	-	Trishidroximetilaminometano
TrisCl	-	Tris hidroclorídrico
Tris EDTA	-	Ácido acético diaminoetileno
U/mL	-	Unidades por mililitros
Wt	-	Wild type
µm	-	Micrometro

Lista de Figuras

Figura 1. Unidade estrutural dos glicosaminoglicanos. 13

Figura 2. Demonstração esquemática das unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina (GlcNac) e Àcido β-glucourônico (GlcA) que compõem a molécula de HA 18

Figura 3. **(A)** Esquema de distribuição dos genes das hialuronidases no genoma. **(B)** Genes e seus produtos protéicos.....20

Figura 4. Estrutura genômica dos genes das hialuronidases 1, 2 e 3.....22

Figura 5. Representação do processo de retirada do intron pelo spliceossomo 25

Figura 6. Tipos de *splicings* alternativos 26

Figura 7. Esquema de representação das variantes da HYAL 1 originadas por *splicing*. 27

Figura 8. Esquema de representação das variantes da HYAL 3 originadas por *splicing*. 30

Figura 9. Carcinoma de células escamosas. Diferenciação escamosa é evidente pelo processo de queratinização. Atipia celular com núcleo hipercromático indicando malignidade.....38

Figura 10. Adenocarcinoma *in situ* (AIS) com crescimento restrito as células neoplásicas ao longo de estruturas alveolares pré-existentes (padrão lepídico), perda de estroma, invasão vascular ou pleural. 39

Figura 11. Adenocarcinoma predominantemente acinar caracterizado por componentes de padrão glandular ovalado com espaço luminal central circundado por células tumorais,contendo mucina. 39

Figura 12. Adenocarcinoma predominantemente papilífero. Células tumorais evidenciando uma complexa proliferação papilífera ao longo do eixo fibrovascular. 40

Figura 13. Adenocarcinoma predominantemente sólido evidenciando um maior componente de células tumorais poligonais.. 40

Figura 14. A partir de cDNA de linhagem celular (LNCaP) foi realizada a reação de RT-PCR para padronização dos primers para HYAL 1 wt, v2, v3, v4 e v5, HYAL 2 wt e HYAL3 wt, v1, v2 e v3 e (controle positivo). 41

Figura 15. Verificação da qualidade do RNA total em gel de agarose 1%.....43

Figura 16. Expressão de HYAL1, HYAL2, HYAL3-wt, variantes e β-actina (controle positivo) nos tumores. 50

Figura 17. Carcinoma de Células Escamosas. Imunoexpressão de HAS1 pelas células neoplásicas. Imunohistoquímica X 400.....68

Figura 18. Adenocarcinoma. Imunoexpressão de HAS1 pelas células neoplásicas. Imunohistoquímica X 400.....69

Figura 19. Carcinoma de Células Escamosas. Imunoexpressão de HAS2 pelas células neoplásicas. Imunohistoquímica X 400.....69

Figura 20. Adenocarcinoma. Imunoexpressão de HAS2 pelas células neoplásicas. Imunohistoquímica X 40.....70

Figura 21. Carcinoma de células escamosas. Imunoexpressão de HAS3 pelas células neoplásicas. Imunohistoquímica X 400.....70

Figura 22. Adenocarcinoma. Imunoexpressão de HAS3 pelas células neoplásicas. Imunohistoquímica X 400.....71

Figura 23. Probabilidade para sobrevida *versus* tempo de seguimento dos pacientes do Hospital das Clínicas/ Hospital do Câncer AC. Camargo obtida pelas curvas de Kaplan-Meier, de acordo com a imunoexpressão da HAS2.....78

Figura 24. Imunoexpressão de Hyal 1 pelas células neoplásicas.....79

Figura 25. Imunoexpressão de Hyal 3 pelas células neoplásicas e controle. 80

Figura 26. Imunoexpressão de HAS1 pelas células neoplásicas.....81

Figura 27. Imunoexpressão de HAS2 pelas células neoplásicas e controle. 81

Figura 28. Imunoexpressão de HAS3 pelas células neoplásicas e controle. 82

Figura 29. Imunoexpressão de E-caderina pelas células neoplásicas.....83

Figura 30. Imunoexpressão de TGF-β pelas células neoplásicas.....84

Figura 31. Curva de probabilidade para sobrevida *versus* tempo de seguimento dos pacientes do Hospital Universitário de Coimbra obtida pela Regressão de Cox, de acordo com a imunoexpressão da HAS2. 90

Lista de Tabelas

Tabela 1. Caracteristicas estruturais dos Glicosaminoglicanos 14

Tabela 2. Seqüência de primers para os genes das HYAL 1, 2 e 3 e seus produtos 46

Tabela 3. Relação dos anticorpos empregados em imunohistoquímica. ...52

Tabela 4. Relação dos anticorpos empregados em imunohistoquímica 55

Tabela 5. Características demográficas dos 69 pacientes do Hospital das Clinicas da FMUSP/ Hospital do Câncer AC. Camargo, quanto ao sexo, idade, estadiamento, tratamento e sobrevida. 60

Tabela 6. Características demográficas dos 56 pacientes do Hospital da Universidade de Coimbra, quanto ao sexo, idade, estadiamento, tratamento e sobrevida 61

Tabela 7. Expressão das HYAL1, 2, e 3, estratificadas por tecidos tumorais (69 casos) e controles (25 casos) obtidos dos pacientes do Hospital das Clinicas/ Hospital do Câncer AC. Camargo. 62

Tabela 8. Correlação entre HYAL1, 2, 3 e variantes. 64

Tabela 9. Expressão das HYAL1, 2, 3 e variantes, de acordo com tipos histológicos e subtipos de tumores oriundos dos pacientes do Hospital das Clinicas/ Hospital do Câncer AC. Camargo. 65

Tabela 10. Modelo de sobrevida para os pacientes do Hospital das Clínicas / Hospital do Câncer AC. Camargo pela regressão de Cox para risco relativo de morte, controlado para idade, estadio N, tratamento e tipos histológicos (log-likelihood 109,749, p=0.0001). 67

Tabela 11. Risco relativo de morte para pacientes Hospital das Clinicas / Hospital do Câncer AC. Camargo pela regressão de Cox controlados para idade , estadio N e tipos histológicos de acordo com a expressão das HYAL 1, 2 , 3 e sua variantes. 67

Tabela 12. Sumário dos resultados morfométricos* nas amostras de tumores e controles 72

Tabela 13. Expressão das Hyal 1 e 3, Has 1, 2 e 3 estratificadas por tecidos tumorais e controles obtidos dos pacientes do Hospital das Clínicas da FMUSP/ Hospital do Câncer AC. Camargo. 73

Tabela 14. Correlação de imunoexpressão entre Hyal 1 e 3, HAS1, 2 e 3. 74

Tabela 15. Sumário dos resultados morfométricos* de acordo com tipos histológicos e subtipos de ADC oriundos dos pacientes do Hospital das Clínicas / Hospital do Câncer AC. Camargo 75

Tabela 16. Análise multivariada da sobrevida para os pacientes do Hospital das Clínicas/ Hospital do Câncer AC. Camargo pelo modelo matemático de Cox para avaliação do risco relativo de morte sob controle de idade, estádio, tratamento e tipos histológicos dos (log-likelihood 99,96 p=0.01) 77

Tabela 17. Sumário dos resultados morfométricos de acordo com a intensidade de expressão nos tumores, estroma e controles. ...85

Tabela 18. Associação entre as expressões dos marcadores e as variáveis clínicas. 87

Tabela 19. Análise multivariada da sobrevida para os pacientes do Hospital da Universidade de Coimbra pelo modelo matemático de Cox para avaliação do risco relativo de morte sob controle de idade, estadio, tratamento e tipos histológicos (log-likelihood 99,96 p=0.01). 89

Tabela 20. Comparação entre a Imunoexpressão das HAS1,2 e 3 e Hyal 1 e 3 nos tumores de pacientes do Hospital das Clínicas/ Hospital do Câncer AC. Camargo e Hospital Universitário de Coimbra. 91

Resumo

Sá VK. *Biomarcadores de Prognóstico no Câncer de Pulmão : Caracterização do perfil de expressão gênica das hialuronidades, imunoreatividade das hialuronidases e sintases do àcido hialurônico e interação dessas proteínas com a transição epitélio-mesenquimal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 135p.

Em virtude dos pobres resultados obtidos no tratamento do Câncer de Pulmão, seja em estágios iniciais ou na doença avançada localmente, há a necessidade de se desenvolver marcadores moleculares e imunohistoquímicos que possam prever o comportamento tumoral. Ácido Hialurônico (HA) é um componente da matriz extracelular, responsável pela hidratação e manutenção do equilíbrio osmótico tecidual. Concentrações de HA estão elevadas em vários tipos de cânceres, incluindo pulmão. Hialuronidases (HAases), são uma família de enzimas relacionadas com a propagação de infecções bacterianas, toxinas de venenos e progressão tumoral. A quebra do HA em pequenos fragmentos (3-25 dissacarídeos) promovidos pela ação das HAases tipo Hyal1, Hyal2 e Hyal3, está relacionada à promoção do câncer através da indução da angiogênese e estímulo a proliferação através de ativação da via tirosina quinase. Algumas isoformas de HAases, descritas como produto de *splicing* alternativo, possuem atividade enzimática diversificada. A heterogeneidade de expressão das HAases foi identificada em alguns tipos de câncer e pode ser correlacionada com o comportamento diferenciado dos tumores. Em uma primeira instância, o perfil de expressão das HYAL foi avaliado em tecidos pulmonares tumorais e normais de 69 tumores ressecados de pacientes com adenocarcinomas (ADC) e carcinomas de células escamosas (CCE) oriundos do Hospital das Clinicas e Hospital do Câncer AC. Camargo. A expressão da HYAL1-selvagem (wt) e variantes 1 a 5, HYAL2-wt, HYAL3-wt e variantes 1 a 3 foi identificada por PCR e seqüenciamento direto. Diferentes proporções de HYAL3-wt e variantes foram expressas em tecidos pulmonares tumorais e controles. HYAL1-wt esteve associada com prognóstico desfavorável e HYAL3-v1 com prognóstico favorável. Diante dos resultados obtidos dos tumores de pacientes do Hospital das Clínicas e Hospital AC. Camargo, prosseguimos a investigação para estudar a imunoexpressão das Hyal 1 e 3 e HAS 1, 2 e 3 nos CCE e ADC. Observamos que a intensidade de expressão de Hyal 3 foi maior pelas células tumorais quando comparada aos controles, porém esta diferença foi marginalmente significante. Já o resultado da análise da freqüência de imunoexpressão das Hyal 1 e 3, e HAS1, 2 e 3 demonstrou expressão na maioria dos espécimes tumorais e controles. A associação entre as variáveis foi testada e evidenciou imunoexpressão concomitante de HYAL e HAS nos tumores. O modelo matemático de sobrevida , controlado para sexo, idade e estadiamento mostrou risco de morte associado com adenocarcinoma sólido e imunoreatividade para HAS2 e HAS3. Para validar os resultados obtidos, sobretudo com a imunoexpressão das Hyal e HAS nos CCE e ADC, estudamos a população de pacientes do Hospital Universitário

de Coimbra. Documentamos pela primeira vez uma via pela qual a hiperexpressão de HAS3 e Hyal 3 respectivamente por células epiteliais neoplásicas e mesenquimais, podem favorecer a invasão nos ADC e CCE. Surpreendentemente, demonstramos que a imunoexpressão de HAS1 e 3 pelas células epiteliais neoplásicas confere mais agressividade aos ADC acinares e papilares, mas uma expressão negativa de HAS1 pelas células mesenquimais confere um papel protetor a MEC auxiliando-a a evitar a invasão pelas células tumorais em ambos os tipos subtipos histológicos. A interação entre a expressão das hialuronidades e sintases do àcido hialurônico foi avaliada em relação à expressão de proteínas da transição epitélio-mesênquimal nos tumores de pacientes do Hospital Universitário de Coimbra. Hyal, HAS, E-caderina e TGF-β modularam uma via invasiva tumor-induzida nos ADC e CCE de pulmão, e estiveram associados a um espectro diferente de agressividade, uma vez que houve uma relação inversa entre a expressão de biomarcadores epiteliais e mesenquimais. Enquanto a hiperexpressão de HAS1 e HAS3 provê uma agressividade aos CCE e ADC, uma hiperexpressão de TGF- β e E-caderina, confere um efeito protetor à MEC ao evitar a invasão por células tumorais em ambos os tipos histológicos. Comparamos os níveis de imunoexpressão das Hyal1 e 3 e HAS 1, 2 e 3 nos tumores ressecados no Hospital das Clínicas e Hospital AC. Camargo com os níveis obtidos em tumores do Hospital Universitário de Coimbra. Verificamos que a imunoexpressão das HAS 1, 2, 3 e Hyal1 foi significativamente maior nos tumores de pacientes do Hospital Universitário de Coimbra, enquanto que a imunoexpressão de Hyal 3 foi significativamente maior nos tumores de pacientes brasileiros. Por todas essas razões, nossos resultados sugerem que estratégias direcionadas à modulação dos níveis de HYAL1-wt e HYAL3-v1, da hiper imuno expressão de HAS3 e Hyal 3 respectivamente por células epiteliais neoplásicas e mesenquimais, da alta síntese de HAS3 e Hyal 1, ou a resposta local baixa de TGF- β e E-caderina, poderão ter grande impacto no câncer de pulmão.

Descritores: 1.Neoplasias do pulmão 2.Hialuronoglusaminidase 3.Ácido hialurônico 4.Processamento alternativo

Summary

Sá VK. *Prognostic Biomarkers in Lung Cancer : Characterization of gene expression profile of hialuronidades, immunoreactivity of hyaluronidases and hyaluronan synthases and the interaction of these proteins with the epithelial-mesenchymal transition* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012. 135p.

Given the poor results obtained in the treatment of Lung Cancer, in early stages or locally advanced disease, there is a need to develop molecular markers and immunohistochemical studies that can predict tumor behavior. Hyaluronic Acid (HA) is a component of extracellular matrix is responsible for hydration and maintenance of tissue osmotic equilibrium. Concentrations of HA are elevated in several types of cancers, including lung. Hyaluronidases (HAases) are a family of enzymes involved in the spread of bacterial toxins, poisons and tumor progression. The breakdown of HA into small fragments (3-25 disaccharides) promoted by the action of type HAases Hyal1, Hyal 2 and Hyal 3 is related to the promotion of cancer by inducing angiogenesis and stimulate proliferation through activation of the tyrosine kinase. Some isoforms HAases, described as the product of alternative splicing, have diverse enzymatic activity. The heterogeneity of expression of HAases was identified in some cancers and can be correlated with the different behavior of tumors. In a first instance, the expression profile of Hyal spliced forms was evaluated in tumor and normal lung tissue of 69 tumors resected from patients with adenocarcinomas(ADC) and squamous cell carcinomas (SqCC) from the Hospital das Clínicas and Hospital AC. Camargo. Gene expression of HYAL1 wild-type (wt) and variants 1 to 5 HYAL2-wt, and HYAL3-wt and variants 1 to 3 was identified by PCR and direct sequencing. Different proportions of HYAL3-wt and variants were expressed in tumor and normal lung tissue. HYAL1-wt was associated with unfavorable prognosis and HYAL3-v1 with favorable prognosis. Given the genetic abnormalities found in tumors of patients from Hospital das Clinicas and Hospital AC. Camargo, we continued our research to study the expression of Hyal 1.3 and HAS 1, 2, 3 in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas. We observed that the intensity of expression of Hyal 3 was higher in tumor cells compared to controls, but this difference was marginally significant. Since the result of frequency analysis of immunoreactivity of Hyal 1 and 3, and HAS1, 2 e 3 showed expression in the majority of tumor samples and controls. The association between variables was tested and showed concomitant immunoexpression of the HAS and HYAL in tumors. The mathematical model of survival, adjusted for sex, age and staging showed risk of death associated with adenocarcinoma and solid and HAS3 HAS2 immunoreactivity.To validate the results, especially with the immunostaining of Hyal and HAS in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the lung, the patient population studied at the University Hospital of Coimbra. Documented for the first time a route by which the overexpression of HAS3 and Hyal 3 respectively by neoplastic epithelial and mesenchymal cells may

favor the invasion in ADC and SqCC, respectively. Surprisingly, we demonstrated that hyper HAS1 and 3 immunoreactivity by neoplastic epithelial cells confers more aggressiveness to the ADC acinar and papillary, but a negative expression of HAS1 by mesenchymal cells confers a protective role ECM-helping to prevent the invasion by tumor cells in both types histological subtypes.The interaction between the expression of hialuronidades and hyaluronic acid synthases was evaluated for protein expression of epithelial-mesenchymal transition in tumor patients at the University Hospital of Coimbra. Hyaluronidase, hyaluronan synthase, E-cadherin, and TGF-β modulated via an invasive tumor-induced in the ADC and SqCC lung, and were associated with a different spectrum of aggressiveness, since there was an inverse relationship between the expression of epithelial biomarkers and mesenchymal cells. While overexpression of HAS1 and HAS3 provides an aggressiveness to SqCC and ADC, an overexpression of TGF-β and E-cadherin confers a protective effect by preventing the ECM invasion by tumor cells in both histological types. We compared the levels of immunostaining Hyal 1, 3 and HAS1, 2 and 3 in tumors resected at the Hospital AC. Camargo, and the levels obtained in tumors of the Hospital Universitário de Coimbra. We found that the immunostaining of HAS 1, 2, 3 and Hyal1 was significantly higher in tumors from patients of Coimbra, while Hyal 3 immunoreactivity was significantly. higher in tumors of patients in Brazil. For all these reasons, our results suggest that strategies directed at modulating the levels of HYAL1-wt and HYAL3-v1, the immunohistochemical expression of HAS3 and Hyal 3 respectively by neoplastic epithelial and mesenchymal cells, the synthesis of HAS3 and Hyal1 or the local response of low TGF-β and E-cadherin, may have great impact on lung cancer.

Descriptors: 1.Neoplasms of the lung 2.Hyaluroglucosaminidase 3.Hyaluronic acid 4.Alternative splicing

1 INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão (CP) é a causa mais comum de morte por neoplasia e apresenta um aumento de 2% ao ano na incidência mundial. Estão previstos para o ano de 2011, 1. 095,200 novos casos em homens e 513.000 em mulheres no mundo, com mais de 1.200,000 casos de óbitos (American Cancer Society, 2010). No Brasil, as estimativas de incidência e mortalidade em 2012, do Instituto Nacional do Câncer revelam que esta neoplasia deve atingir mais de 30.000 pessoas (www.inca.gov.br). De acordo com o INCA, cerca de 90% dos casos de CP estão associados ao tabagismo. Isso quer dizer que cerca de 24 mil casos novos poderiam ser evitados, caso as pessoas não fumassem.

Histologicamente, o CP é classifcado como carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC) e carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC). O termo CPNCP é usado para qualquer tumor epitelial do pulmão que não apresente componente de pequenas células. Representa cerca de 80% de todos casos de neoplasia pulmonar (Janssen-Heijnen et al, 2001).

A partir de dados obtidos em séries publicadas sobre Incidência de Câncer em 5 Continentes (Travis et al., 2004), CPNPC 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 (ADCs) compreendem 28% dos casos em homens e 42% em mulheres.

Para a grande maioria dos autores as excepcionais taxas de morbidade e mortalidade associadas à doença devem-se aos seguintes fatores prognósticos: Karnofsky Performance Status (KPS), estadiamento, tipo histológico, sexo, etnia, idade e estado nutricional (Brundage et al., 2002).

No entanto, mesmo sob controle de tais fatores prognósticos, aproximadamente 40% dos pacientes com CP apresentam-se com doença estabelecida e avançada e não obstante os avanços no tratamento multidisciplinar, a taxa de sobrevida global em 10 anos permanece entre 8-10% (Schrump et al., 2005).

ADC invasivos são classificados por padrão predominante após o uso de subtipos histológicos abrangente como lepídico (anteriormente BAC), acinar, papilar e padrões sólidos; micropapilar é adicionado como um novo subtipo histológico. Variantes incluem adenocarcinoma mucinoso invasivo (Anteriormente CBA mucinoso), colóides, fetal e adenocarcinoma entérico.

Os termos carcinoma bronquioloalveolar (BAC) e subtipo misto adenocarcinoma não são mais usados. Para amostras de ressecção, novas conceitos foram introduzidos, como adenocarcinoma in situ (AIS) e adenocarcinoma minimamente invasivo (MIA), para pequenos ADC solitários com um crescimento lepídico puro (AIS) ou crescimento predominante lepídico com 5mm de invasão (MIA) (Travis et al., 2011).

O Termo BAC inclui um largo espectro de tumores: pequenos tumores periféricos solitários não invasivos com sobrevida em 5 anos em 100%, ou, doença avançada disseminada com baixas taxas de sobrevida. Diferenças clínicas, radiológicas, imunohistoquimicas e moleculares estão presentes entre os vários padrões de BAC. Como resultado, os estudos são difíceis de comparar (Travis et al., 2011).

Com a doença estabelecida, os pacientes com CP podem ser divididos em três grupos que de maneira diferenciada refletem a extensão da doença e a abordagem de tratamento.

O primeiro grupo compreende aqueles tumores cirurgicamente ressecáveis, em geral estádio I e II. Este é o grupo de melhor prognóstico, com taxas de sobrevida em cinco anos de 67% para o estádio I, 37% para o estádio IIA e 24% para o estádio IIB . (Macchiarini et al., 1993). No estádio I e II, o prognóstico é influenciado adversamente pela presença de sintomas pulmonares, tamanho do tumor maior que 3 cm, acometimento linfonodal, sexo masculino, idade maior que 60 anos e positividade da oncoproteína c-erbB2 (Harpole et al.,1995; Ichinose et al., 1995; Strauss et al.,1995; Graziano et al.,1997; Slebos et al.,1990). Outros fatores que têm sido identificados e relacionados a um prognóstico adverso em algumas séries de pacientes com CP operáveis incluem: mutação do gene K-ras, invasão vascular, aumento no número de vasos sanguíneos no espécimen tumoral, diminuição da expressão de e-caderinas, níveis elevados de CYFRA-21 e dosagem do antígeno carcino-embrionário no pós-operatório (Fontanini et al., 1995; Deeb et al., 2004; Pujol et al., 2004; Sawabata et al., 2004;

Andre et al., 2000). A radioterapia pode ser uma opção para aqueles pacientes com contra-indicação médica à cirurgia, tais como: baixo desempenho clínico (KPS), idade avançada, doença cardiovascular, baixa reserva pulmonar e recusa do paciente. As metástases à distância representam um padrão comum de falha após ressecção curativa dos ADC. O tratamento adjuvante sistêmico, baseado em platina é uma estratégia racional que visa a diminuir o risco de recidiva e aumentar a sobrevida.

O segundo grupo de pacientes com adenocarcinoma inclui tumores avançados local ou regionalmente. Segundo Mountain et al (1997), este grupo compreende o estádio III, que é subdividido em IIIA e IIIB. O estádio IIIA é classificado pela presença de linfonodo mediastinal ipsilateral acometido (N2) ou por lesão T3 com linfonodo hilar positivo (N1). O estádio IIIB é caracterizado pela presença de envolvimento de linfonodo mediastinal contra-lateral ou supra-clavicular (N3) ou tumor T4. A taxa de sobrevida global em cinco anos para pacientes com IIIA N2 varia de 10 a 15%, ao passo que em pacientes com comprometimento extenso do mediastino a sobrevida é de 2 a 5% (www.cancer.gov). O melhor tratamento para o estádio III ainda não está claro e muitos aspectos são controversos. Historicamente a cirurgia era indicada para o tratamento do EC IIIA sem envolvimento extenso do mediastino. No entanto, em virtude dos altos índices de recorrência local e à distância, além da melhora do estadiamento patológico do mediastino através da mediastinoscopia, a cirurgia não é mais considerada padrão para este subgrupo de pacientes (NCI) National Cancer Institute. Non-small cell lung cancer (www.cancer.gov). A radioterapia combinada à quimioterapia (baseada

em platina) é o tratamento padrão no estádio III ([NCCN] National Compreensive Cancer Network. Non-small cell lung cancer (www.cancer.gov). A administração concomitante dessas duas abordagens leva a um tratamento precoce das micrometástases além de explorar o efeito sinérgico da combinação da quimioterapia com a radioterapia.

O último grupo de pacientes apresenta metástases (M1) ao diagnóstico. Este grupo pode ser tratado com quimioterapia exclusiva ou radioterapia (casos especiais) para paliação dos sintomas, além de cuidados de suporte. Neste estágio o prognóstico é pior em pacientes com baixo KPS e perda de peso maior que 10% (www.cancer.gov).

Diferentes esquemas envolvendo agentes citotóxicos de terceira geração tiveram resultados semelhantes. Schiller et al., estudaram prospectivamente 1207 pacientes com adenocarcinoma estágio IIIB (com derrame pleural ou pericárdico malignos), IV ou com recidiva de doença. Os pacientes foram submetidos a randomização para receber um entre quatro esquemas de quimioterapia: (1) cisplatina e paclitaxel; (2) cisplatina e gencitabina; (3) cisplatina e docetaxel ou (4) carboplatina e paclitaxel. Dentre os quatro grupos avaliados, não foi verificada diferença estatisticamente significativa em termos de sobrevida (Schiller et al., 2002). Infelizmente, o estudo não incluiu análise de custo-efetividade, avaliação da qualidade de vida, ou de condutas após a progressão.

Desde então, os esforços se direcionam para o desenvolvimento de novas drogas, em particular aquelas cujo alvo molecular já tenha sido estabelecido, no sentido de optimizar a taxa de controle de doença e

minimizar os efeitos indesejáveis do tratamento. Entretanto, a escolha de uma dada estratégia está na dependência de uma seleção criteriosa dos pacientes envolvidos, e da determinação de fatores tais como potencial prognóstico, potencial preditivo, ou ambos. O melhor conhecimento da biologia tumoral permitiu a introdução de novas drogas e estratégias no arsenal terapêutico, principalmente no universo de doentes que apresentam metástases (metastáticos). Para tanto, faz-se necessária a utilização de marcadores moleculares que possam identificar, principalmente, tumores candidatos a terapias conservadoras.

Atualmente, com os avanços das técnicas em biologia molecular e embasados cientificamente no fato de que o Àcido Hialurônico, as Hialuronidases e a interação dessas proteínas com fatores relacionados à transição epitélio/mesenquima, tais como a E-caderina e o TGF-β, podem estar relacionados com a invasão tumoral abrindo assim novas perspectivas para o tratamento da doença neoplásica pré-estabelecida, propomos o câncer de pulmão como alvo de estudo.

1.2 Transição epitélio-mesenquimal

A morte decorrente da progressão do CP é secundária ao desenvolvimento da doença metastática, e a capacidade que um CP tem de desenvolver uma metástase à distância, acaba sendo um importante fator prognóstico da doença.

O processo de formação metastática é complexo e se dá através de uma sequência de passos distintos, que resulta da interação entre as células tumorais e o microambiente tecidual onde elas se encontram. Em cada um desses passos, as células neoplásicas tem de superar os sistemas de controle do organismo, modificar seu comportamento e suas características fenotípicas principais, e se adaptar a novos ambientes para desenvolver tumores em sítios distantes da neoplasia original.

O primeiro passo nesta cascata de metastização envolve a aquisição de invasividade local. A organização normal dos epitélios é incompatível com a motilidade e invasividade apresentada pelas células de carcinomas malignos. Na tentativa de adquirirem estas propriedades as células sofrem um profunda alteração no seu fenótipo, passando a apresentar características de células mesenquimatosas, num processo designado transição epitélio-mesenquimal (EMT). Este fenômeno é encontrado em situações fisiológicas, como a embriogênese e a regeneração epitelial. (Thierry et al., 2002).

Um típico epitélio é uma camada de células, frequentemente com espessura de apenas uma célula, onde cada uma se dispõe individualmente em relação à célula vizinha de uma maneira uniforme. Junções celulares regularmente espaçadas e adesões entre células epiteliais vizinhas as mantém firmemente unidas e inibem o movimento das células individuais além da monocamada epitelial. Uma adesividade interna permite à camada epitelial apresentar um espaço tridimensional e mantê-lo com definição estrutural e rigidez mecânica. A camada epitelial é polarizada, isso significa que as superfícies apical e basal são claramente diferentes, aderindo à diferentes substratos ou apresentando diferentes funções.

As células mesenquimais, por outro lado, geralmente não apresentam estrutura bem organizada e também não possuem uma compacta adesão intracelular. Elas dão origem à estruturas com forma irregular e não uniformes em composição e densidade. As células mesenquimais possuem uma formação mais alongada em relação às células epiteliais e a adesão entre as células é muito menor, o que fornece à elas uma importante capacidade migratória. Ao contrário do epitélio, a estrutura irregular do mesênquima não permite uma rígida função especializada. Além disso, a migração mesenquimal é mecanicamente diferente do movimento epitelial. Células epiteliais se movem como uma camada em bloco. Por outro lado, a migração mesenquimal é muito mais dinâmica e pode acontecer célula a célula, individualmente (Lee et al., 2002). Hay (2005), quem primeiro descreveu a transição epitélio-mesenquimal, ilustra a diferença fundamental de tais movimentos na embriogênese (sutil/ controlado) e tumorigênese (agressivo/ não controlado) para definir os mecanismos distintos na EMT. Transformar uma célula epitelial em uma célula mesenquimal requer alterações na morfologia, arquitetura celular, aderência e capacidade de migração.

A aquisição destas propriedades não está dependente da formação de novas mutações ou outras alterações, baseia-se antes na ativação de um programa já existente na célula a quando da embriogênese ou da regeneração tecidual. As principais alterações que se verificam são a repressão da expressão de E-caderina e citoqueratinas, o que é substituído pela expressão de N-caderina e vimentina, as quais conferem um fenótipo

mesenquimatoso à célula. A e-caderina é um componente importante da “zônula adherens” e regula a adesão celular homofílica dependente de cálcio. A sua perda, parece representar o papel principal nesta transição, o que possivelmente se deve à sua função de adesão entre as células e potencialização da estrutura epitelial. A perda desta molécula permite uma motilidade celular, o que acompanhado pela expressão de N-caderina conduz a célula em direção ao estroma. A EMT é controlada por fatores peptídicos (fatores de motilidade ou dispersão) que interagem com receptores específicos, muitos deles com atividade tirosino-quinase, que além de atuar nesta transição de fenótipos, também podem atuar como fatores de crescimento. São exemplos destas moléculas: HGF *(hepatocyte growth factor*), membros da família de EGF (*epidermal growth factor)*, e seus receptores, respectivamente (EGF-R e $p185^{neu}$ /Her2 ou erB-2) e o TGF-β *(transforming growth factor).* Os macrófagos iniciam a liberação desses fatores de crescimento, no qual o TGF-β exerce papel crucial, e em resposta a ligação do TGF-β ao seu receptor celular há a fosforilação do Smad2 e Smad3, membros da família de proteínas Smad. O aumento da expressão de Smad2 e Smad3 resulta em aumento da EMT (Dai, Liu, 2004). Outras vias também ativadas por TGF-β, bem como RAS/MAPK e PI3K/AKT também estimulam a EMT. (Oft et al.; 1996, Bhowmick et al.; 2001). Devido a essas informações, resolvemos em nosso estudo, avaliar a imunoexpressão de TGB-β e E-caderina e sua relação com as hialuronidades e sintases do HA no CP.

1.3 Conceitos gerais sobre glicosaminoglicanos e proteinoglicanos

Glicosaminoglicanos são polímeros lineares de açúcares constituídos por unidades dissacarídicas repetitivas. Estas unidades dissacarídicas são formadas alternadamente, por uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina) unidas através de ligação glicosídica a um ácido urônico (D-glucourônico o L-idurônico) ou um açúcar neutro (galactose). A maioria destes compostos apresentam grupamentos sulfatados, que juntamente com os grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos conferem a esses polissacarídeos uma alta densidade aniônica (Mathews, 1975; Lindhal et al., 1994).

Os glicosaminoglicanos diferem entre si quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não nitrogenado, quanto ao grau de sulfatação e a posição em que são sulfatados, bem como quanto ao tipo de ligação glicosídica inter e intrassacarídica (Mathews, 1975).

Essa variedade resulta nos seguintes glicosaminoglicanos: heparina, heparan sulfato, condroitim-4-sulfato, condroitim-6-sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico. A unidade estrutural dos glicosaminoglicanos está representada na Figura 1. As diferenças entre eles estão representadas na Tabela 1.

Esses polissacarídeos, com exceção do ácido hialurônico são sintetizados na forma de proteoglicanos, nos quais cadeias sacarídicas estão ligadas covalentemente ao “core” protéico. (Kjellén , Lindhal, 1991). Os proteoglicanos são, portanto, compostos de alto peso molecular

formados por um esqueleto protéico ao qual ligam-se, covalentemente, cadeias de glicosaminoglicanos e oligossacarídeos N- e/ou O-ligados (Thonar e Sweet, 1977; Lohmander et al., 1980; Nilsson et al., 1982).

Os proteoglicanos estão presentes na matriz extracelular, membrana basal, superfície celular como também intracelularmente em grânulos secretórios (Dietrich, 1984; Poole, 1986; Nader e Dietrich, 1989; Esko 1991; Iozzo, 1998).

A atividade biológica de cada proteoglicano depende das propriedades do seu esqueleto protéico, da estrutura química do glicosaminoglicano covalentemente ligado e sua localização. No entanto, o tipo de cadeia de glicosaminoglicanos ligada exerce uma grande importância na função biológica (Dietrich, 1984; Esko, 1991; Yanagishita e Hascall, 1992; Porcionatto, Nader e Dietrch, 1999). São capazes de interagir com várias moléculas, o que confere a estes compostos a participação em muitos mecanismos celulares (Kjellén e Lindahl, 1991). Muitas das propriedades funcionais dos proteoglicanos dependem da interação entre o glicosaminoglicano e proteínas (Kjellén e Lindahl, 1991; Lindahl et al., 1994; Bernfield et al., 1992; 1999). Estas interações são geralmente de natureza eletrostática, podendo ocorrer outros tipos de ligação (Lindahl et al., 1994).

Os proteoglicanos atuam como organizadores de tecidos influenciam o crescimento celular e a maturação dos tecidos especializados, têm um importante papel como filtro biológico, modulam a atividade de determinados fatores de crescimento, regulam a fibrinólise de colágeno, afetam o crescimento e invasão tumoral. O estudo de suas funções biológicas,

utilizando animais transgênicos, tem indicado que certos proteoglicanos são essenciais para a vida (Iozzo, 1998; Bernfield et al., 1992; 1999).

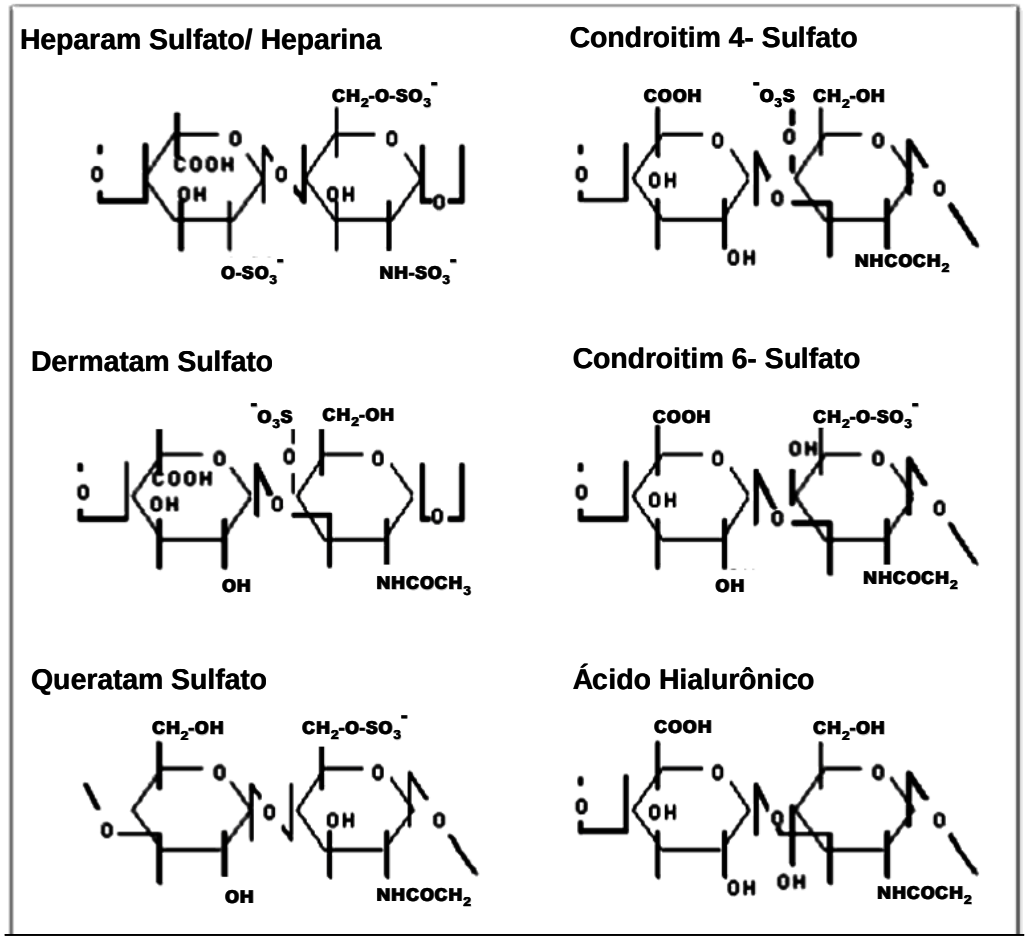


Figura 1. Unidade estrutural dos glicosaminoglicanos. A figura ilustra a unidade estrutural dos glicosaminoglicanos. A D-glucosamina é a hexosamina da heparina, heparam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico e a D-galactosamina está presente em condroitim 4 e 6-sulfatos e dermatan sulfato. O açúcar não nitrogenado é um ácido urônico (D-glicourônico e L-idurônico), exceto no queratam sulfato que apresenta D-galactose. A posição dos grupamentos sulfatados podem estar em C-2 e C-6 na hexosamina e C-2 no ácido urônico. A hexoxamina está unida ao ácido urônico por ligação α em heparina e heparam sulfato e β nos demais compostos (Dietrich, 1989)

Tabela 1. Caracteristicas estruturais dos Glicosaminoglicanos

Glicosaminoglicano	***Açúcares[1]***	***Posição do sulfato***	***Ligação glicosídica***
Ácido Hialurônico	N-acetilglucosamina	-	β (1→4)
	ácido glucourônico	-	α(1→3)
Condroitim 4-sulfato	N-acetilgalactosamina	4	β (1→4)
	ácido glucourônico	-	α(1→3)
Condroitim 6-sulfato	N-acetilgalactosamina	6	β (1→4)
	ácido glucourônico	-	α(1→3)
Dermatam sulfato	N-acetilgalactosamina	4	β (1→4)
	ácido idurônico	-	α(1→3)
	ácido glucourônico	-	β (1→3)
Queratam sulfato	N-acetilglucosamina	6	β (1→3)
	Galactose	-/6	β (1→4)
Heparam sulfato	Glucosamina	2/6	α(1→4)
	N-acetilglucosamina	6	α(1→4)
	ácido glucourônico	-	β (1→4)
	ácido idurônico	-	β (1→4)
Heparina	Glucosamina	2/6	α(1→4)
	ácido glucourônico	-	β (1→4)
	ácido idurônico	2	β (1→4)

[1]Todos os açúcares estão na configuração D, exceto o ácido idurônico que está na configuração L.

1.4 Ácido Hialurônico

Estruturalmente, o ácido hialurônico (HA) é o mais simples dos glicosaminoglicanos. É um polímero linear longo de dissacarídeos repetidos, constituído por unidades alternadas de ácido β-D-N-acetilglucosamina,

unidos por ligações glicosídicas do tipo (1-3) e (1-4), respectivamente (Laurent et al., 1970; Laurent e Fraser, 1992; Scott e Heatley, 2002) (Figura 2). O número de repetições do dissacarídeo pode atingir 10.000 ou mais, chegando a massa molecular do composto a 4.000 kDa (cada dissacarídeo pesa aproximadamente 400 daltons) e medindo aproximadamente 2 µm, dependendo do tecido de origem (Laurent, Fraser, 1992; Lee, Spicer, 2000).

O HA apresenta uma estrutura helicoidal, mantida por pontes de hidrogênio e interações com o solvente, possuindo, portanto uma forma não-polar, hidrofóbica e uma forma polar hidrofílica que fazem com que assuma uma forma expandida em soluções fisiológicas; está presente em todos os vertebrados, bem como na cápsula de algumas bactérias estreptocócicas, que usam de seus hospedeiros para sintetizá-lo.

É o único glicosaminoglicano que não apresenta sulfatação e também não se encontra associado a um esqueleto protéico, formando proteoglicano.

Nos tecidos, o HA apresenta-se como uma estrutura espiral polidispersa de alto peso molecular e interage através de ligações não covalentes com regiões específicas do esqueleto protéico de proteoglicanos de condroitim sulfato e queratam sulfato (agrecam), formando agregrados presentes na cartilagem, que são estabilizados por uma proteína denominada proteína de ligação. Este mesmo tipo de interação ocorre entre o HA e proteoglicanos de condroitim sulfato e dermatan sulfato (versicam), presentes na matriz de fibroblastos (Krusius, Gehlsen e Ruoslahti, 1987; Zimmerman e Ruoslahti, 1989).

O HA é um dos principais constituintes da matriz extracelular (MEC) dos tecidos diferenciados, sendo, portanto um componente essencial de

tecidos maduros (Fraser et al., 1997), como por exemplo, humor vítreo, fluído da articulação sinovial, e cartilagem hialina.

O metabolismo do HA é muito dinâmico, sendo que em algumas células, como condrócitos e queratinócitos , há síntese e catabolização ao mesmo tempo. A síntese e o catabolismo são balanceados, mantendo, portanto a concentração no tecido. Estudos metabólicos mostraram que a vida média na cartilagem está ao redor de 3 semanas e, surpreendentemente, na epiderme a vida média é inferior a 1 dia. Algumas células predominantemente sintetizam mais do que catabolizam e uma grande porção escapa do tecido para ser capturada em receptores de células reticulo-endoteliais nos linfonodos e no fígado para subseqüente catabolismo nos lisossomos. Apenas 10% do HA do tecido sinovial atinge o sistema vascular.

Estima-se que cerca de 10 a 100 mg/dia de HA entre na circulação de um homem adulto.

A concentração sérica de HA normalmente encontrado é menor que 0,1 mg/l, sendo a média de 30 a 40 µg/litro (Engström-Laurent et al., 1985), refletindo um metabolismo extremamente rápido. A vida média do HA no sangue é muito curta, apenas alguns minutos. Estima-se que quase um terço do total do HA no corpo humano seja metabolizado e reposto em média em um dia (Fraser et al., 1997).

Muitas funções foram atribuídas ao HA, como estabilizador de matriz extracelular, lubrificação articular, homeostasia aquosa, regulação da distribuição das proteínas plasmáticas, barreira contra disseminação de infecções e macromoléculas, formação de grandes agregados quando unido

aos agrecans, bem como a regulação da atividade celular pela interação com proteínas receptoras da superfície celular (Fraser et al., 1997).

Interação do HA com outras 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 (Knudson, Knudson, 2004; Knudson et al., 2002).

Segundo Toole (1990), proteínas que se ligam ao HA são denominadas como hialaderinas.

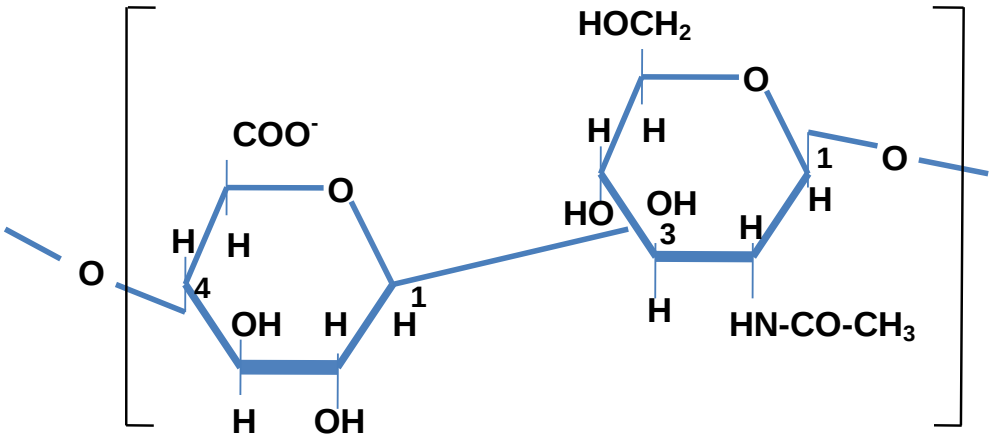
A síntese de HA ocorre na membrana plasmática pela enzima transmembranica ácido hialurônico sintase (HAS). Existem três isoformas HAS 1, HAS 2 e HAS 3, as quais sintetizam o HA em diferentes tamanhos (36). Foi demonstrado que o aumento da expressão de HAS 1 e HAS 2 está envolvido com crescimento tumoral devido ao bloqueio do ciclo celular e o silenciamento do gene HAS 2 inibe a migração celular (37, 38).

A primeira etapa na degradação do HA ocorre sob a ação das hialuronidases (HAases), levando à formação de oligossacarídeos. As HAases foram detectadas e caracterizadas em diversos tecidos e fluidos animais (Frost et al., 1996; Stern, 2003) estando presente normalmente no interior dos lisossomos (Vaes, 1967). Os oligossacarídeos são então, clivados a partir do terminal não redutor da molécula, por ação da β-glucoridase e β-N-acetilhexosaminase, resultando em ácido D-glucourônico e N-acetil-D glucosamina, respectivamente. As HAases também participam do catabolismo de condroitim sulfatos (Roden et al., 1989).

Existe uma aparente contrariedade na literatura quanto a associação do HA a neoplasias. Alguns estudos defendem que o HA aumentado na MEC está

envolvido na promoção da migração das células tumorais pela suas características hidrofílicas, auxiliando ainda na perda de inibição por contato, comportamento típico dos tecidos normais, promovendo o crescimento tumoral e facilitando a ocorrência de metástases (Tammi et al., 2002; Delpech et al., 1997; Turley et al., 2002). Outros autores porém defendem que a migração das células tumorais na matriz celular rica em HA ocorre após a sua degradação em fragmentos de 2-25 dissacarideos e é mediada por receptores de superfície celular específicos, CD44 e RHAMM (receptor de ácido hialurônico mediador de motilidade) (Ichikawa et al., 1999; Herrlich et al., 2000). Por outro lado, acredita-se que o HA intacto possa atuar como uma barreira para neovascularização, conseqüentemente inibindo o crescimento e progressão tumoral (Rahmnaiam, 2002).

Ácido Hialurônico



Àcido β-glucourônico N-acetilglucosamina

Figura 2. Demonstração esquemática das unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina (GlcNac) e Àcido β-glucourônico (GlcA) que compõem a molécula de HA

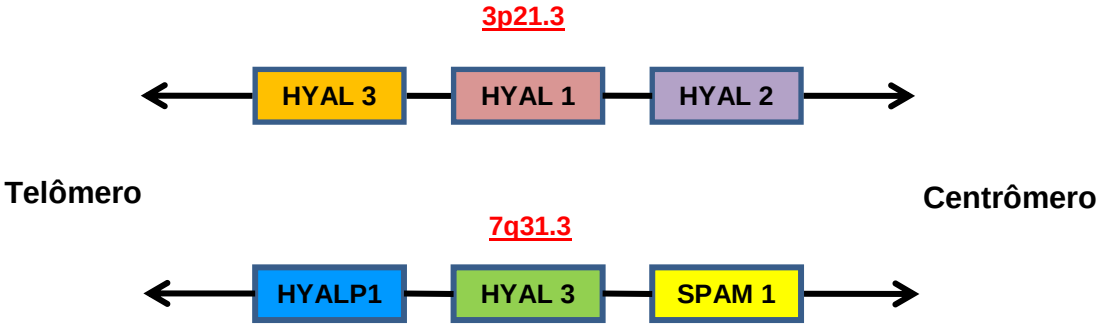
1.5 Hialuronidases

As HAases são enzimas que degradam o HA (Roden et al.,1989). Existem três tipos de HAases, originalmente classificadas de acordo com a análise bioquímica das enzimas e seus produtos de reação.

1) Hialuronidases de mamíferos – são endo-beta-N-acetil-glicosaminases com tetrassacarídeos e hexassacarídeos como principal produto final. Possuem atividade de hidrólise e transglicosidase e podem degradar HA e condroitim sulfato (CS), especificamente C4-S and C6-S, bem como Dermatan Sulfato (DM).
2) Hialuronidases bacterianas - degrada HA, CS e DS. Também são endo-beta-N-acetilglicosaminases que operam pela reação de beta eliminação que produz primeiramente dissacarídeos como produtos finais.
3) Hialuronidases de crustáceos e de parasitas são endo-beta-glucoronidases que geram tetrassacarídeos e hexassacarídeos como produtos finais.

As HAases humanas são codificadas por uma família composta por seis genes agrupados em dois cromossomos, onde: HYAL1, HYAL2 e HYAL3 estão localizados no cromossomo 3p21.3 e, PH20, HYAL4 e HYALP1 no cromossomo 7q31.3 (Figura 3). Com exceção de HYAL4 e HYALP1, as demais HAases degradam HA (Stern, 2003; Csóka et al., 1997).

A. Orientação Cromossômica dos Genes das Hialuronidases



B. Genes das Hialuronidases e seus produtos

	Gene	Proteína
3p21.3	HYAL 1	Hyal-1
	HYAL 2	Hyal-2
	HYAL 3	Hyal-3
7q31.	HYAL 4	Hyal-4
	SPAM 1	PH-20
	HYALP 1	None

Figura 3. (A) Esquema de distribuição dos genes das hialuronidases no genoma. HYAL3, HYAL 1 e HYAL 2 são codificados no lócus 3p21.3. HYALP 1, HYAL 4 e SPAM 1, são codificados no lócus 7q31.3. **(B)** Genes e seus produtos protéicos. HYAL3, HYAL 1 e HYAL 2, originam proteínas que degradam HA. HYALP 1 é um pseudogene que não é traduzido em proteína. HYAL 4, origina a proteína hyal 4, responsável pela degradação de condroitim sulfato. SPAM 1 é traduzido em PH-20, proteína responsável pela degradação do HA presente na zona pelúcida do oócito

A HAase tipo Hyal 1 foi originalmente purificada de urina e plasma humano (Frost et al., 1997; Csoka et al., 1997). Entretanto, a Hyal 1 é a principal HAase identificadas em tumores (Tan et al., 2011; Nykopp et al.,2010; Lokeshwar et al., 2001; Ekici et al.,2004). O pH ideal para atividade desta enzima é de 4.5 (Lokeshwar et al., 2001). A perda de sua função resulta em uma desordem chamada mucopolissacaridose IX (Triggs-Raine et al., 1999).

A Hyal 2 é codificada em um sítio cromossômico adjacente. É uma HAase lisossômica que participa da primeira etapa de degradação do HA, dando origem a fragmentos de 50 Kda. A expressão do gene HYAL2 foi identificada em modelos animais de astrocitomas cerebrais (46) e como marcador diagnóstico pelo escarro no câncer de pulmão (47).

A Hyal 3 ainda é muito pouco conhecida no que diz respeito as suas atividades nos tecidos. Já foi identificada em testículo de mamíferos e em medula óssea.

Quanto a estrutura genômica dos genes das hialuronidases, o gene HYAL1 possui três exons separados por dois introns, HYAL2 é constituído por 4 exons e 3 introns, onde o primeiro exon é subdivido pelo intron 1 e, HYAL3 constituido por 4 exon separados por três introns (NT_006014.7/HS3_6171, homo sapiens, cromossomo 3) (Figura 4).

Os três genes dão origem a variantes produzidas por um processo denominado *splicing* alternativo, que será explanado no próximo item.

Estrutura Genômica dos Genes das Hialuronidases

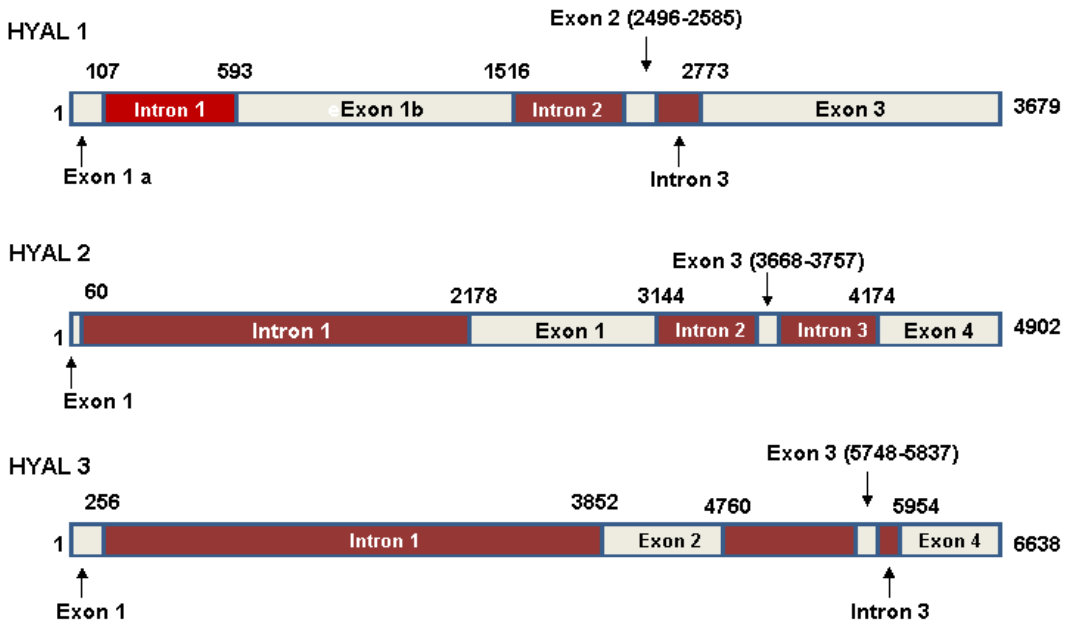


Figura 4. Estrutura genômica dos genes das hialuronidases 1, 2 e 3. O gene HYAL 1 possui 3679 pb e é composto por 3 exons e 3 introns. HYAL 2 possui 4902 pb e é constituído por 4 exons e 3 introns. O primeiro exon é subdividido pelo intron 1. HYAL 3 possui 4 exons e 3 introns, compondo um DNA de 6638 pb

1.6 *Splicing* Alternativo

Nas células a molécula de RNA mensageiro (RNAm) recém transcrita a partir do DNA é denominada RNA primário ou precursor. Esses RNA precursores de RNAm são chamados de RNA nuclear heterogêneo (RNAnh). As RNAnh são moléculas grandes e instáveis que se encontram associadas a proteínas, as ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas

(RNPnh), que por sua vez fazem parte da matriz nuclear. O processamento desses RNAnh envolve modificações que acabam por aumentar a estabilidade do RNAm e transformá-lo em RNAm maduro. Dentre essas modificações podemos citar a adição de quepe (caping-CAP) 7-metil guanosina (7mG) na extremidade 5' do RNAnh. Esse quepe tem um papel importante na iniciação da síntese protéica e também na proteção de degradação do RNA recém transcrito. Esta mudança ocorre em todos os RNAm eucarióticos presentes no citoplasma. Outro processamento é a adição da cauda poli-A (poliadenilação) na extremidade 3' do RNAnh. Um aspecto comum que ocorre em eucariotos (exceto levedura) é a presença da seqüência conservada AAUAAA, 11 a 30 nucleotídeos antes do sítio de poliadenilação, denominada seqüência sinal para poliadenilação. A cauda poli-A parece ter várias funções, entre elas a de auxiliar no transporte do RNAm maduro do núcleo para o citoplasma. Acredita-se também que ela afeta a estabilidade de pelo menos alguns RNAm no citoplasma e ainda pode servir como um sinal de reconhecimento para o ribossomo (Molecular Biology, 2005). Há um grupo de RNAm em células de mamíferos que é transportado ao citoplasma e não possui cauda poli-A, são os RNAm das histonas, proteínas que participam do empacotamento do DNA. Muitos organismos vivos, na maioria mamíferos, possuem o nitrogênio 6 dos resíduos de adenina metilado, sendo que essa metilação ocorre apenas nos exons antes da retirada dos introns.

O RNAnh sofre frequentemente outro processamento denominado *splicing*, que consiste na retirada e digestão de segmentos denominados

introns (seqüências não codificadoras), e a junção e permanência de segmentos funcionais, os exons (seqüências codificadoras), que vão constituir a molécula de RNAm maduro (Molecular Biology of the Gene, 2004).

O *splicing* é um processo muito complexo e preciso, pois a molécula inicialmente transcrita deve ser clivada em locais exatos e as partes funcionais (exons) ligadas também de maneira exata. A retirada de um intron da molécula de RNAnh ocorre após duas reações de transesterificação. Esse processo é mediado por estruturas complexas denominadas spliceossomos que são constituídos pela associação de pequenas ribonucleoproteínas (RNPsn) e outras proteínas como as ricas em serina (pRS) (Molecular Biology of the Gene, 2004). As RNPnhs são formadas por 6 a 10 proteínas associadas a pequenas moléculas de RNA nuclear (RNAn). Há seis tipos de RNAs: U1, U2, U3, U4, U5 e U6. As U1, U2 e U5 formam separadamente o core de uma determinada RNPsn, enquanto que a U4 e U6 fazem parte de uma única RNPsn (Figura 5). O spliceossomo começa a ser montado assim que o intron é transcrito para que o *splicing* ocorra. Essa associação pode ser auxiliada pelo pareamento de bases que ocorre entre as seqüências conservadas do intron e os RNAn (Reed et al., 2000). A formação do spliceossomo está associada a hidrólise do ATP, embora esta estrutura seja montada ainda durante a síntese do RNA, e, geralmente o intron não é retirado antes do término da transcrição. O spliceossomo impede que o exon 5’ afaste-se do exon 3’ após a primeira clivagem. Por ser uma estrutura grande e estável, o spliceossomo não atravessa os poros nucleares, e talvez por isso os RNAm não passem ao citoplasma antes de serem processados (Zhou et al., 2002). Após estas

transformações o RNAm maduro é transportado para o citoplasma, onde ocorre a tradução das proteínas através dos ribossomos, RNA transportadores e RNA polimerases. O RNAm pode sofrer um processamento diferenciado e ou alternativo, assim um mesmo transcrito primário pode ser processado de diferentes maneiras. Deste modo um mesmo RNAnh pode gerar RNAm maduros de tamanhos diferentes e consequentemente proteínas com funções fisiológicas diferentes (Graveley et al., 2001), (Figura 6).

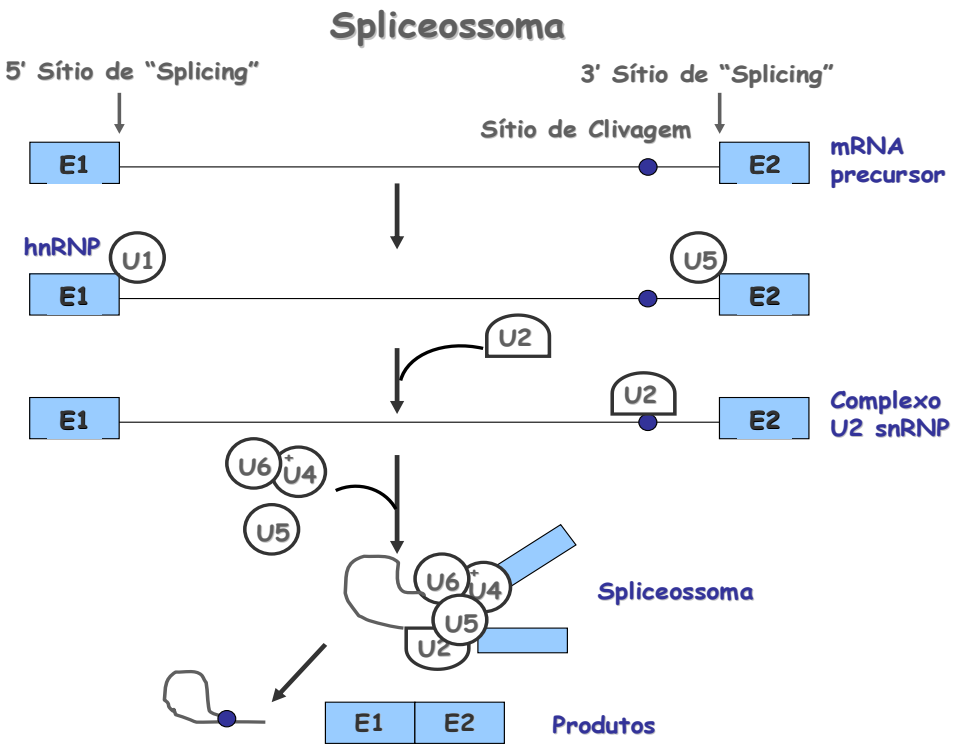


Figura 5. Representação do processo de retirada do intron pelo spliceossomo onde U1, U2, U4 U5 e U6 são diferentes ribonucleoproteínas que constituem o complexo. A primeira linha mostra os sítios de *splicing* 5' e 3' do intron e o sítio de clivagem. A U1 liga-se à região 5' do intron e U5 se liga provavelmente na região 3'do intron. A seguir, há a ligação da U2 no sítio de clivagem e U4+U6 se unem ao complexo formando o spliceossomo. Após a primeira clivagem entre o primeiro exon e a região 5' do intron ocorre a segunda clivagem. Os exons são unidos e o intron liberado na forma de laço

Tipos de *Splicings* Alternativos

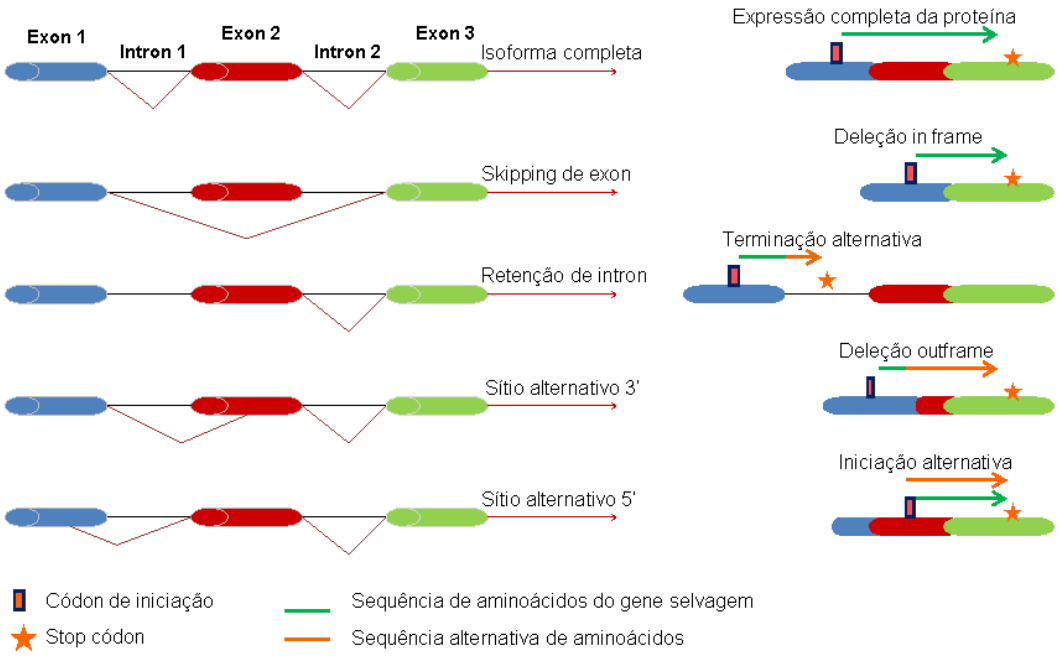


Figura 6. No topo da figura é demonstrado um transcrito primário de RNAm constituído por 3 exons. O primeiro exemplo mostra a transcrição completa do RNAm do gene selvagem. O segundo exemplo mostra o processo chamado de *skipping* onde o exon 1 é unido ao exon 3, desconsiderando o exon 2, originando um RNAm incompleto maduro. No terceiro exemplo, o intron 1 é retido completamente, permanecendo ligado ao exon 1 e ao exon 2 no RNAm maduro. O quarto exemplo mostra a união do exon 1 com uma parte do exon 2 que contém um sítio de terminação de *splicing* aberrante, também chamado de deleção out frame. Por outro lado, o primeiro exon pode conter um sítio de iniciação de *splicing* aberrante, provocando a deleção de uma parte do primeiro exon e sua ligação com os demais exons, como é demonstrado no último exemplo. Todos esses processos alternativos dão origem a proteínas com estruturas e atividades diversificadas

1.7 *Splicing* alternativo das HYAL

O gene HYAL1 possui cinco variantes originadas por *splicing*: HYAL1-v1, HYAL1-v2, HYAL1-v3, HYAL1-v4 e HYAL1-v5, e o transcrito completo HYAL1-wt. A proteína Hyal1-wt possui 435 aminoácidos (aa), as isoformas possuem alterações em suas seqüências: Hyal 1-v1: deleção de 30 aminoácidos (aa) (301-330 aa). Hyal1-v2: deleção de 182 aa (1-182 aa), Hyal1-v3: deleção de 226 aa (210-435 aa), Hyal1-v4: deleção de 259 aa (1-259 aa) e Hyal1-v5: deleção de 339 aa (1-339 aa) (Figura 7).

HYAL 1 e Variantes

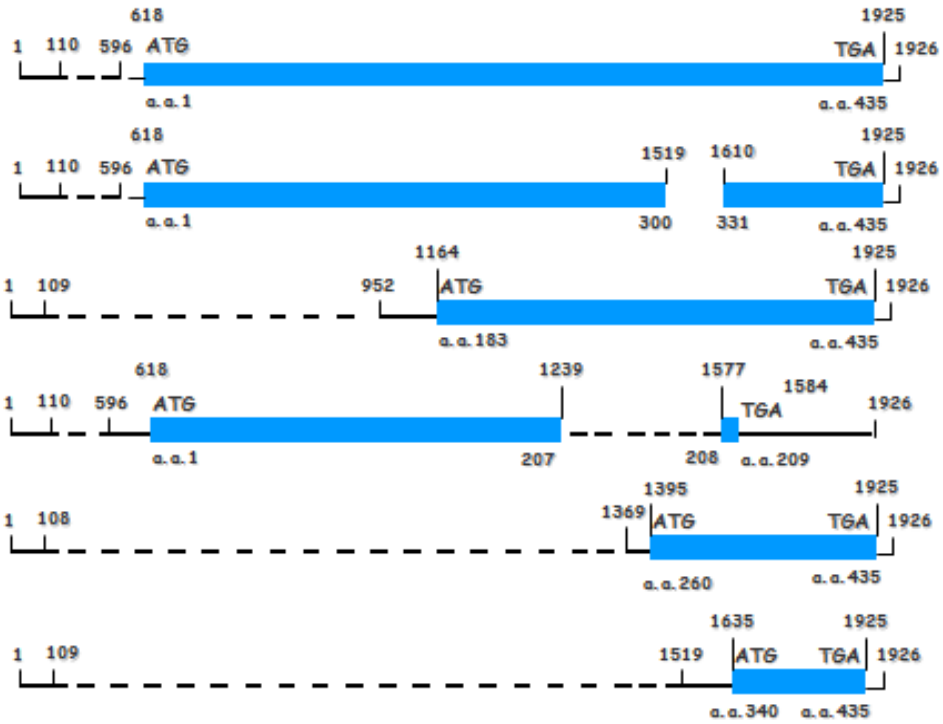


Figura 7. Esquema de representação das variantes da HYAL 1 originadas por *splicing*. A figura mostra as estruturas dos RNAm de HYAL1-wt e as variantes 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. As regiões codificadoras são representadas pelas caixas azuis. Regiões não codificantes são representadas pelas linhas contínuas e as regiões que foram excisadas, estão demonstradas pelas linhas pontilhadas

Estas variantes não são ativas devido a perda de regiões do gene responsáveis pela codificação de sítios de atividade das HAases (Lokeshwar et al., 2002). Mais especificamente, a seqüência de 30 aa que é perdida nas variantes Hyal1-v1, v3 e v5 é codificada por um único exon composto por 90 pares de bases, presente em ambos os genes HYAL1 e 3, é responsável pela composição do substrato de ligação ao sítio de clivagem do HA (Markovic-Housley et al., 2000). O sítio catalítico do HA está localizado nas pontes glicosídicas entre N-acetil-D-glucosamina e ácido D-glucurônico (Markovic-Housley et al., 2000) Como o HA é um polímero longo, constituído dessas unidades repetidas, as isoformas de Hyal1 e 3, originadas por *splicing*, não conseguem degradá-lo, tornando esta função restrita as Hyal selvagens. Os produtos originados pela degradação do HA em fragmentos constituídos por 2 a 25 dissacarídeos estimulam a proliferação de células endoteliais, sendo esse um processo essencial para indução de angiogênese, fundamental no processo de progressão das neoplasias (Halici et al., 2004). Digestão da matriz extracelular pela HAase tumoral, libera fatores de crescimento contidos no microambiente, alguns desses como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator básico de crescimento de fibroblasto (FGFb) são essenciais para promoção do crescimento tumoral e vascularização (Lokeshwar et al., 2000; Rahmnaiam, 2002) .

Chao et al., 2007, caracterizaram um novo domínio EGF-like (fator de crescimento epidérmico) presente na estrutura das HAases, que está provavelmente envolvida em interação proteína-proteina e outros processos regulatórios como crescimento e desenvolvimento tecidual. Este domínio

EGF-like permanece intacto em quatro variantes, visto que o domínio catalítico esta comumente apresentado nestas isoformas. As variantes Hyal1 v1, v2 e v4 retêm o domínio EGF-like, enquanto a Hyal1-v3 perde este domínio EGF-like juntamente com uma parte do domínio catalítico.

Lokeshwar et al. (2002), identificaram que há expressão das variantes de HYAL1 e 3 em tecidos normais e linhagens de carcinomas de baixo grau da bexiga, enquanto o tipo selvagem HYAL 1 é expressa por linhagens de tumores de alto grau e invasivos.

O gene HYAL2 possui duas variantes que, possivelmente, não perdem atividade devido à perda de apenas dois nucleotídeos na região não traduzida (UTR). A expressão do gene HYAL2 foi identificada em modelos animais de astrocitomas cerebrais (Novak et al., 1999).

O gene HYAL3 possui três variantes: HYAL3-v1, HYAL3-v2 e HYAL3-v3 que dão origem a isoformas: Hyal3-v1 com perda de 30 aa (299-328) presente na proteína da Hyal3-wt (417 aa), que é homólogo aos 30 aa da seqüência da Hyal1-wt. Hyal3-v2 com perda de 250 aa (2-250), presente no tipo selvagem da Hyal3 e Hyal3-v3 com perda de 281 aa (2-250 e 299-328) (Lokeshwar et al., 1999; Lokeshwar et al., 2002), (Figura 8).

Em estudo anterior, verificamos que a expressão de HYAL1-v3, HYAL3-v1 e HYAL3-v2 está relacionada a tumores de próstata mais diferenciados e com menores taxas de recidiva (de Sá et al, 2009).

HYAL 3 e variantes

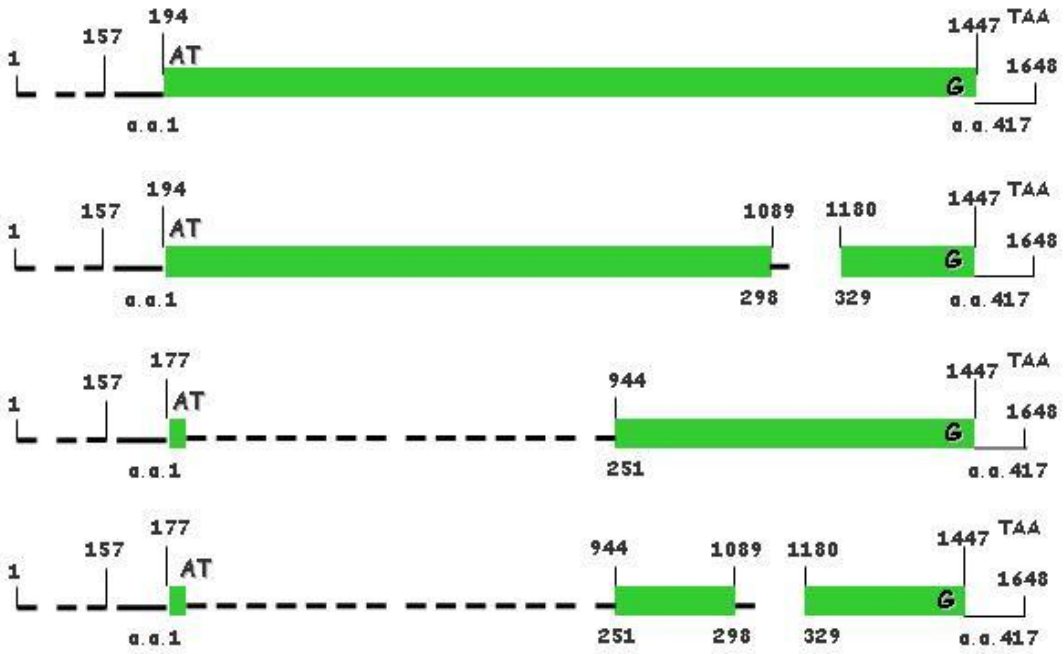


Figura 8. Esquema de representação das variantes da HYAL 3 originadas por *splicing*. A figura mostra as estruturas dos RNAm de HYAL3-wt e as variantes 1, 2 e 3, respectivamente. As regiões codificantes são representadas pelas caixas verdes. Regiões não codificantes são representadas pelas linhas contínuas e as regiões que foram excisadas, estão demonstradas pelas linhas pontilhadas

Apesar de todo este conhecimento, as funções específicas dessas variantes proteicas e sua interação com as proteínas de transição epitélio/mesênquima no processo de crescimento e invasão tumoral ainda permanecem desconhecidas e a relação com os fatores prognósticos e comportamento do CP nunca foi antes estudada.

1.8 Hipótese

Através dos achados da literatura em que o padrão de expressão das *HYAL*s apresenta-se diferenciado dentre os tipos de tumores, levantamos a hipótese que as variantes originadas por *splicing* possam estar relacionadas com o comportamento tumoral, devido a sua incapacidade de degradar o HA auxiliando na inibição do desenvolvimento neoplásico. Hipotetizamos também que o Àcido Hialurônico, as Hialuronidases e a interação dessas proteínas com fatores relacionados à transição epitélio-mesenquimal, tais como a E-caderina e o TGF-β, podem estar relacionados com a invasão tumoral abrindo assim novas perspectivas para o tratamento da doença neoplásica pré-estabelecida, propomos o câncer de pulmão como alvo de estudo.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar o perfil de expressão das formas alternativas de RNAm dos genes HYAL 1 e HYAL 3 e HYAL 2-wt no câncer de pulmão.

   1.1 Correlacionar os resultados de expressão das diferentes formas de HYAL, resultado de *splicing* alternativo com os tipos histológicos da doença.

   1.2 Correlacionar os resultados de expressão com os subtipos de adenocarcinomas.

   1.3 Correlacionar os resultados de expressão das HYAL, resultado de *splicing* alternativo com a evolução da doença

2. Avaliar o perfil de expressão imunoproteica das hialuronidades 1 e 3 e sintases do ácido hialurônico no câncer de pulmão.

   2.1 Correlacionar os resultados de expressão imunoproteica com os tipos histológicos.

   2.2 Correlacionar os resultados de expressão imunoproteica com a evolução da doença.

   2.3 Correlacionar os resultados de expressão imunoproteica com as proteínas envolvidas na transição epitélio-mesenquimal.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Integraram este estudo 125 pacientes com CP submetidos a ressecção cirúrgica de janeiro de 2001 a outubro de 2010. Sessenta e nove pacientes foram oriundos do serviço de cirurgia torácica do Hospital das Clínicas da FMUSP / Hospital do Câncer AC. Camargo e, 56 pacientes do serviço de Cirurgia torácica do Hospital do Universitário de Coimbra. A mediana de idade foi de 63 (variação 44-83) e 65 (43-84) anos, respectivamente. Foi criado um banco de dados com diversas informações sobre os pacientes, desde terapêuticas associadas à cirurgia como radioterapia e quimioterapia, hábitos de vida como tabagismo, inclusive o diagnóstico anatomopatológico estabelecido na ocasião da cirurgia. A partir desse banco de dados, foram selecionados os casos que não apresentaram metástases à distância, ou seja, estadiados como (M0).

Todos pacientes foram estadiados $T_{1–3}N_{0–2}M_0$ e considerados curáveis pela ressecção cirurgica. Estadiamento clínico incluiu radiografias de tórax, broncoscopia, tomografia computadorizada de tórax e abdomen, ultrasson abdominal e mapeamento osseo. Mediastinoscopia e biopsia de linfonodos foi realizada nos pacientes cujos linfonodos foram maiores que 1 cm. Foram primariamente divididos em dois grupos com as seguintes características:

Carcinoma de células escamosas – 22 e 25 pacientes

Adenocarcinoma – 47 e 31 pacientes

Como controle foi utilizado tecido de borda não tumoral de 35 pacientes portadores de CP que sofreram ressecção cirúrgica, sendo 25 casos do Hospital das Clínicas da FMUSP / Hospital do Câncer AC. Camargo e 10 casos do Hospital Universitário de Coimbra. A mediana de idade dos pacientes estudados foi de 69 anos. O estudo foi analisado e aprovado pelo Comite de Etica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (no. 369/06), pelo Hospital AC. Camargo (no. 1214/09) e pelo Hospital da Universidade de Coimbra (nº 0172/10).

Foi definido como não tabagista, pacientes com menos de 100 cigarros consumidos em toda a vida. Os indivíduos que interromperam o hábito de fumar há mais de 12 meses antes da data do diagnóstico, foram definidos como ex-tabagistas, enquanto os que contuaram fumando ou pararam a menos de 12 meses, foram considerados tabagistas ativos. A carga tabágica foi calculada utilizando o número de maços consumidos por dia (1 maço=20 cigarros), multiplicado pelo número de anos que o paciente fumou (Fishman et al., 2003).

3.2 Exame Macroscópico

Tecidos tumorais e normais dos espécimes foram examinados dentro de 15 minutos após a ressecção; os tumores foram macroscopicamente localizados e 1 a 3 especimes foram colhidos do tecido tumoral e normal e congelados em nitrogênio liquido a −170°C.

3.2.1 Processamento da amostra

Dez cortes de 10 µm foram feitos em criostato, com temperatura de –20ºC, e acondicionados em microtubos de 1,5 ml, autoclavados, sendo tomados todos os cuidados para evitar a contaminação entre as amostras ou degradação do RNA. Um dos cortes foi colocado em lâmina, fixado em formalina 10%, corado pela Hematoxilina e Eosina e examinado ao microscópio para comprovação da existência de tumor com a porcentagem mínima de 75%.

3.2.2 Exame Microscópico

Os espécimes foram submetidos a processamento habitual com desidratação em álcool e clareamento em xilol, seguido por inclusão em parafina. Cortes de 4 a 6 µm foram corados pela Hematoxilina e Eosina e analisados em microscópio óptico para confirmar adequada representatividade tumoral nos especimes congelados. Os especimes foram revisados pelo próprio pesquisador e por mais dois patologistas experientes na área: Vera Capelozzi e Lina Carvalho e classificados como carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas por imunohistoquimica e de acordo com a nova classificação para CPNPC recentemente proposta (Travis et al., 2011).

De acordo com a nova classificação, os carcinomas de células escamosas foram caracterizados pela queratinização, formação de pérolas córneas e pontes intercelulares (Figura 9), Adenocarcinoma *in situ* (AIS)

exibiu crescimento restrito as células neoplásicas ao longo de estruturas alveolares pré-existentes (padrão lepídico), perda de estroma, invasão vascular ou pleural (Figura 10). Adenocarcinoma predominantemente acinar revelou a maioria dos seus componentes de padrão glandular ovalado com espaço luminal central circundado por células tumorais, contendo mucina (Figura 11). Adenocarcinoma predominantemente papilífero demonstrou um maior componente de células glandulares crescendo ao longo de um eixo fibrovascular (Figura 12). Adenocarcinoma predominantemente sólido exibiu maior componente de células tumorais poligonais com presença de mucina por imunohistoquímica (Figura 13).

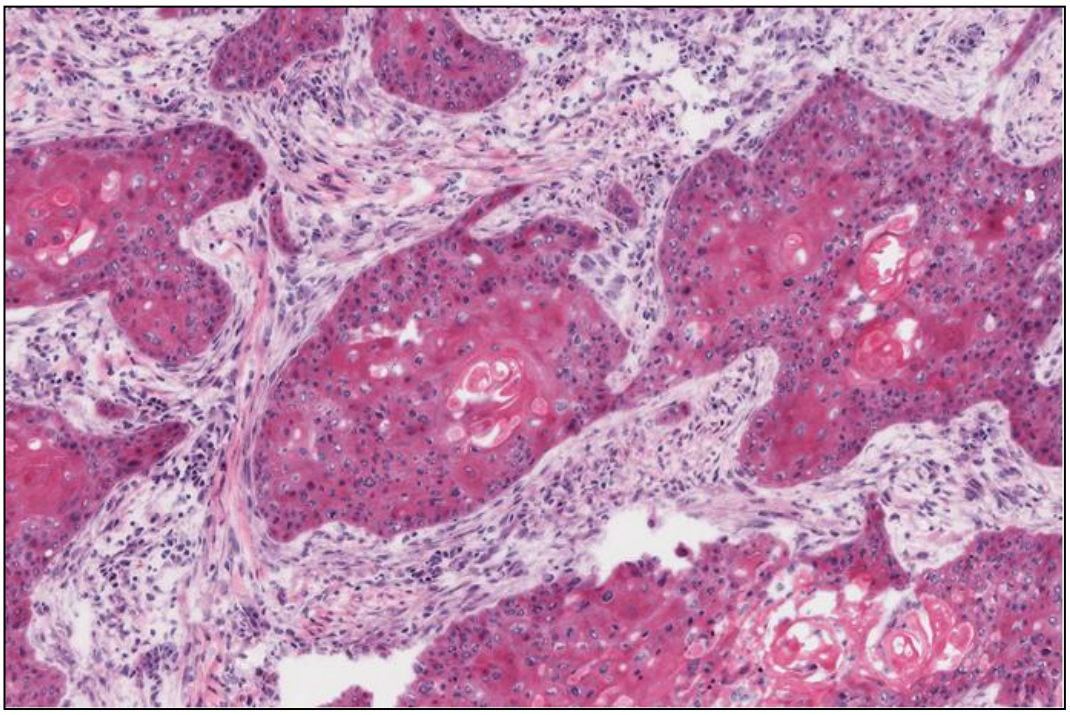


Figura 9. Carcinoma de células escamosas. Diferenciação escamosa é evidente pelo processo de queratinização. Atipia celular com núcleo hipercromático indicando malignidade. H&E X 400

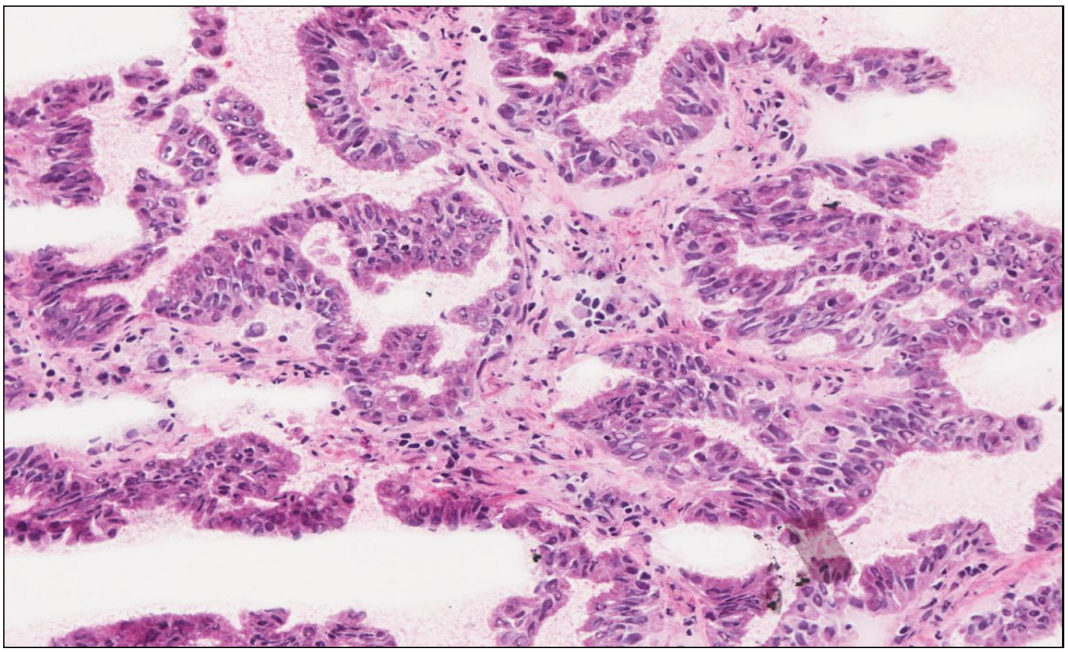


Figura 10. Adenocarcinoma *in situ* (AIS) com crescimento restrito as células neoplásicas ao longo de estruturas alveolares pré-existentes (padrão lepídico), perda de estroma, invasão vascular ou pleural. H&E X 400

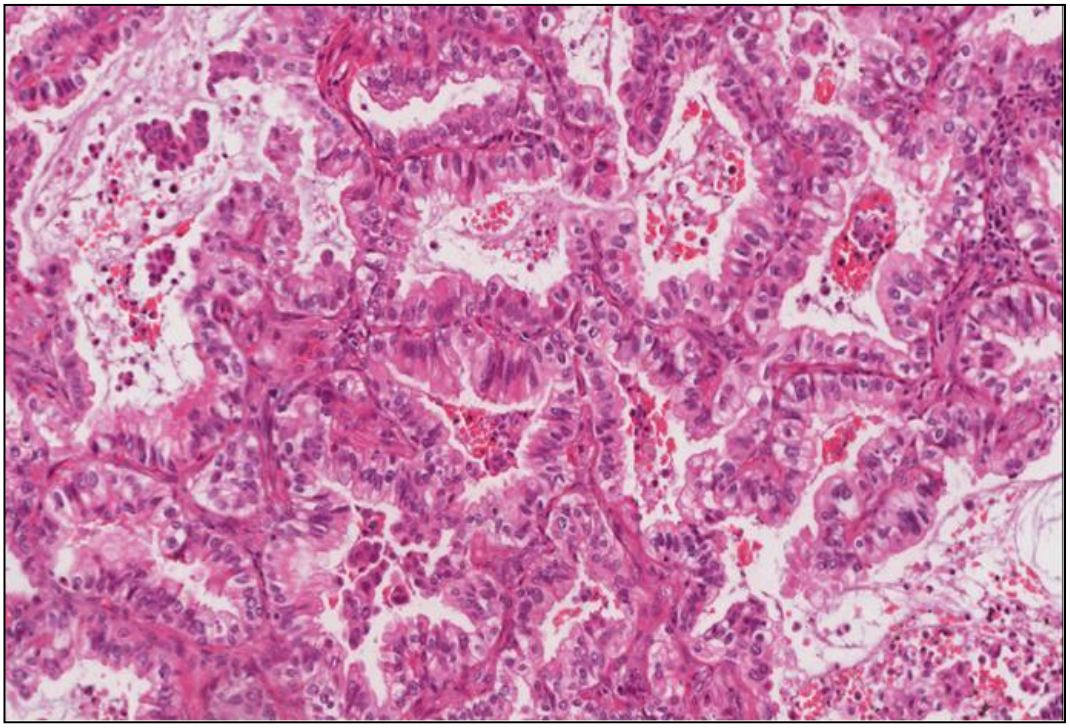


Figura 11. Adenocarcinoma predominantemente acinar caracterizado por componentes de padrão glandular ovalado com espaço luminal central circundado por células tumorais,contendo mucina. H&E X 400

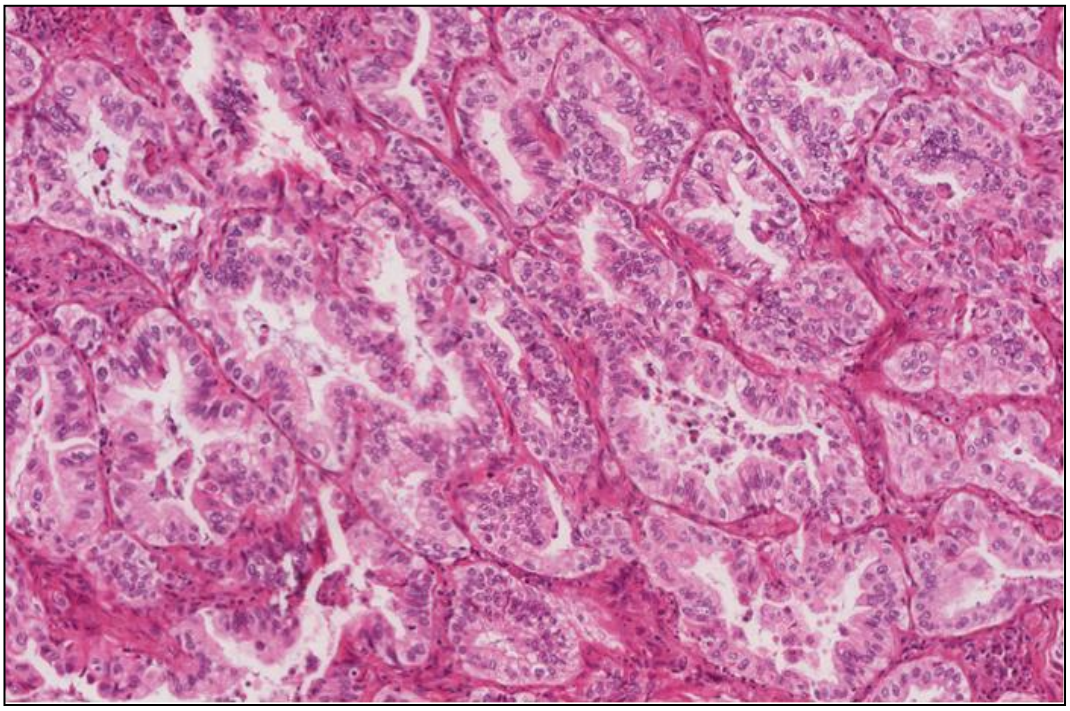


Figura 12. Adenocarcinoma predominantemente papilífero. Células tumorais evidenciando uma complexa proliferação papilífera ao longo do eixo fibrovascular. H&E X 400

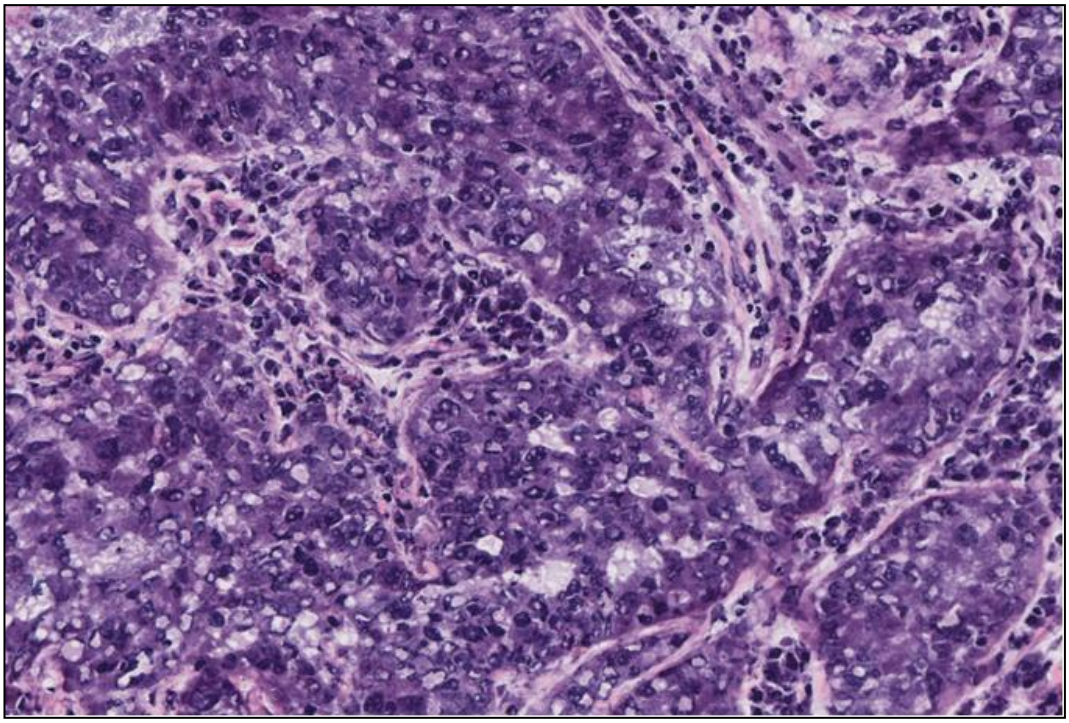


Figura 13. Adenocarcinoma predominantemente sólido evidenciando um maior componente de células tumorais poligonais. H&E X 400

3.2.3 Cultura de Células Tumorais

Para a padronização da reação de RT-PCR, foi utilizado o RNA da linhagem celular comercial LNCaP. A linhagem celular LNCaP foi obtida da American Type Culturet allection (Rockville, MD) e cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino 10%, 100mg/mL de estreptomicina e 100U/mL de penicilina a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO2. O meio de cultivo foi trocado a cada 3 dias até que a cultura atingisse subconfluência em monocamada (70% da área cultivável recoberta por células). Depois de atingida subconfluência as células foram desprendidas da garrafa através de tratamento com tripsina 0,25% e EDTA 0,02% e utilizadas para extração de RNA seguindo o protocolo de extração no íten 3.3 e transcrição reversa segundo o protocolo descrito no item 3.4. Nesta linhagem, obtivemos a expressão dos três genes wt, onde pudemos acertar as melhores concentrações e condições de ciclagem (Figura 14).

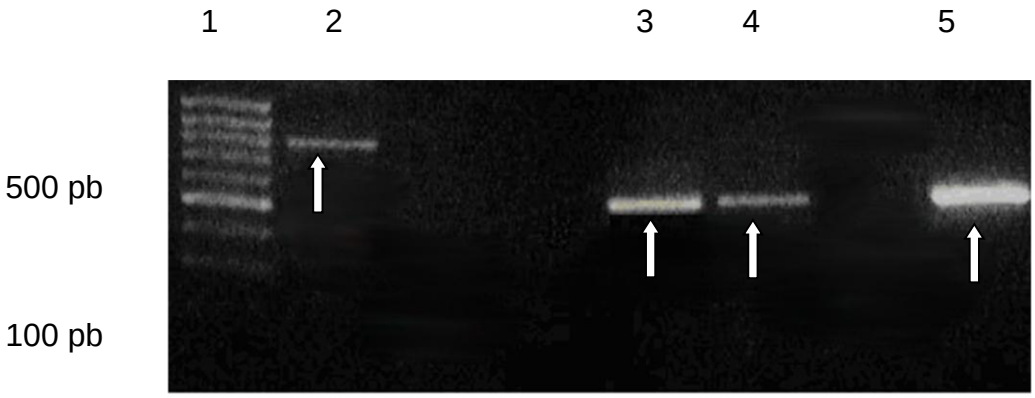


Figura 14. A partir de cDNA de linhagem celular (LNCaP) foi realizada a reação de RT-PCR para padronização dos primers para HYAL 1 wt, v2, v3, v4 e v5, HYAL 2 wt e HYAL3 wt, v1, v2 e v3 e (controle positivo). (1) padrão de peso molecular de 100 pb, (2) HYAL1-wt (736 pb), (3) HYAL2-wt (510 pb), (4) HYAL3-wt (512 pb), e (5) β-actina (311pb). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2%

3.3 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído dos tecidos pulmonares, criopreservados, a –80°C, usando o reagente Trizol (solução monofásica de isoticianato de guanidina) (Invitrogen Co., Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, a partir de aproximadamente 100mg de tecido congelado, o qual foi macerado e alocado em um microtubo juntamente com 1ml de Trizol sendo homogeneizado por inversão. Esperou-se o descongelamento da amostra e aguardou-se 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi acrescentado 0,2ml de clorofórmio (NUCLEAR, São Paulo, Brasil), homogeneizou-se por inversão aguardando 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugou-se a 12.000g por 15 minutos a 4ºC. Este procedimento foi baseado na habilidade do RNA permanecer solúvel na fase constituída por fenol e clorofómio na presença de isoticianato de guanidina. Retirou-se o sobrenadante constituído pela fase aquosa adicionando-o a 0,6ml de álcool isopropílico (NUCLEAR, São Paulo, Brasil) em novo tubo, ficando em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos para a fase de precipitação. E em seguida, centrifugou-se por 15 minutos a 12.000g e a 4ºC, desprezou-se o sobrenadante, adicionando-se 1 ml de etanol 75% para lavagem, misturando bem e centrifugando a amostra por 5 minutos a 7.500g a 4ºC descartando em seguida o sobrenadante e deixando os tubos escorrendo sobre papel absorvente até a secagem do pellet. Feito isso foi adicionada H_2O miliQ autoclavada tratada com DEPC (Merck, EUA) na quantidade suficiente para diluir o pellet de RNA.

A integridade e qualidade do RNA extraído foi controlada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e a concentração de absorbância foi feita em espectrofotômetro a 260nm e 280nm (Figura 15).

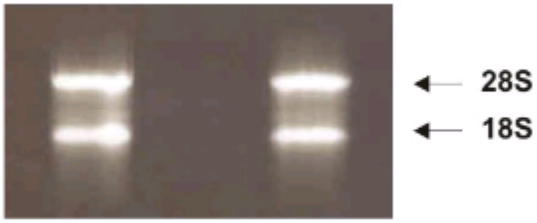


Figura 15. Verificação da qualidade do RNA total em gel de agarose 1%

3.3.1 Tratamento do RNA total com DNAse

O RNA total de tecido pulmonar foi tratado com DNAse Rnase Free 1U/µl , com a finalidade de se evitar contaminação com qualquer tipo de DNA remanescente. A partir de 10ug de RNA total em um microtubo e acertado seu volume para 50µl com TE (10mM TrisCl ,1mM EDTA,pH8,0) pH7,4 sendo adicionado em seguida 1µl de MgCl2 1M, 1µl DTT 0,1M, 10U DNase (Promega Co., Madison, EUA) e 66U Rnasin (Promega Co., Madison, EUA) e incubando a 37ºC por 30 minutos. Sendo adicionado em seguida 2µl proteinase K 2mg/ml e a reação foi incubada por 30 minutos a 37ºC. Adicionado então 2,5µl de EDTA 0,5M, 12,5µl de acetato de sódio 3M pH5,4, 2,5µl de SDS 10% e 107,5µl de H2O DEPC mais 125µl de fenol pH5 e 125µl de clorofórmio, agitando a mistura em vortex por 15 segundos, a fim de retirar DNA e outras proteínas remanescentes.

A amostra foi submetida a uma centrifugação de 12.000g por 15 minutos a 4°C, depois foi recuperado o sobrenadante e transferido para outro microtubo novo ao qual foi adicionado 250µl de álcool isopropílico e NaCl para concentração final de 250mM, com a finalidade de precipitar o RNA. Este material permaneceu em freezer –20°C por 18 horas aproximadamente. Após esse período, o material foi centrifugado a 12.000g a 4ºC por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e em seguida foi adicionado etanol 75% para lavagem do pellet sendo então centrifugando a 12.000g a 4ºC por 5 minutos. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e o tubo foi invertido sobre uma toalha de papel para secagem, o pellet foi ressuspendido com 10ul de H2O DEPEC.

3.4 Transcrição reversa (RT)

A síntese do cDNA foi feita a partir 2µg do RNA tratado com Dnase acertando o volume para 10,25µl com H_2O miliQ autoclavada e adicionando 2,5µg de hexâmeros randômicos iniciadores $pd(N)_6$ (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) .A mistura dos hexâmeros randômicos e o RNA foi submetida a um aquecimento de 70°C por 10 minutos, em seguida colocada em gelo por 2 minutos e então foi adicionado 5ul do tampão 5X da Super Script II (Invitrogen Co., Califórnia, EUA), 2,5µl de dNTPs 2,5mM . A mistura foi incubada a 42ºC por 10 minutos sendo em seguida adicionado 200U da enzima Super Script II (Invitrogen Co., Califórnia, EUA),

permanecendo a reação por 1 hora a 42°C, e após este período foi incubada por 15 minutos a 70ºC para inativar a enzima transcriptase reversa. O cDNA foi mantido a –20°C até o início da reação de PCR.

3.5 PCR qualitativa

A partir de ciclos determinados que estão descritos abaixo foi realizada a mesma reação de PCR para todos os pares de primers descritos na Tabela 1:

Ciclagem

94°C 5 minutos
94° C 30 segundos
60° C 45 segundos } 40x
72°C 45 segundos
72°C 7 minutos
4.0°C ∞

Todas as reações de PCR foram feitas seguindo o protocolo descrito abaixo.

Para o preparo de 50ul de reação para PCR, foi utilizado 1ul de cDNA , 1ul de dntps (10 mM), 1,5 MgCl2 (50mM), 5 ul tampão (10x), 1ul primer senso (10mM), 1ul primer reverso (10mM), 0,25 ul Taq polimerase (5U/µl) e 39,25 H2O estéril.

Os produtos foram aplicados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio, fotografados e digitalizados no Image Máster (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) para análise de densidade óptica (DO).

Os primers sensos e antisensos para HYAL1 wt,v1,v2,v3,v4 e v5; HYAL2 wt, HYAL3 wt, v1, v2 e v3 e β-actina foram desenhados no programa primer design e estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Seqüência de primers para os genes das HYAL 1, 2 e 3 e seus produtos

Gene *(CG)	Primer	Tamanho do
HYAL 1		
wt (AR 097287)	F- 5' CCACGGCCCTGACATGACAA 3' R- 5' CGCACTCTCCCCCAGGCTGTG 3'	736
	F- 5' CCACGGCCCTGACATGACAA 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	896
V1 (AF 502904)	F- 5' ACCACTTTCTGCCCCTGGAA 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	121
	F- 5' CCACGGCCCTGACATGACAA 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	807
V2 (AF 502905)	F- 5' GGCCCTTCAGCCCCAAGGA 3' R- 5' CGTGAGTGCTGCCGGTAAAT 3'	139
	F- 5' GGCCCT TCAGCCCCA AGG A 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	778
V3 (AF 502906)	F- 5' CTATGGCTTCCCTGACTGCTC 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	155
	F- 5' CCACGGCCCTGACATGACAA 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	560
V4 (AF 502907)	F- 5' GGCCCT TCAGCCCCA AGG A 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	361
V5 (AF 502908)	F- 5' GGCCCT TCAGCCCCA AGG A 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	211
HYAL 2 wt (HSU 09577)	F- 5' GGCACAATATGAGTTTGAGTTCGC3' R- 5' TTGAGGTACTGGCAGGTCTCCG 3'	510
HYAL 3 wt (AF 036035)	F- 5' CCGAGCTTATCAGGCAGCCTCTT 3' R- 5' CCCCTAGTGCTGCACTCACACCA 3'	512
V1 (AF 502909)	F- 5' CCGAGCTTATCAGGCAGCCTCTT 3' R- 5' CCCCTAGTGCTGCACTCACACCA 3'	422
V2 (AF 5029010)	F- 5' CAACGTTGTCGGACCGAGGC 3' R- 5' CCCCTAGTGCTGCACTCACACCA 3'	286
V3 (AF 5029011)	F- 5' CAACGTTGTCGGACCGAGGC 3' R- 5' CCCCTAGTGCTGCACTCACACCA 3'	196

*CG- Código de acesso ao Gene (Gene Bank)

3.6 Purificação de DNA

Os fragmentos amplificados foram purificados com a utilização do kit GFX gel band purificator (Amershan Bioscience, Buckinghamshire, England).

Após a eletroforese em gel de agarose 2%, as bandas correspondentes as variantes das hialuronidases foram recortadas do gel com ajuda de uma lâmina de bisturi e adicionadas, individualmente em tubos eppendorfs previamente identificados e pesados. Em seguida, os tubos com os géis foram novamente pesados e os valores dos pesos iniciais foram subtraídos.

Para cada 10 mg de gel, foi adicionados 10 µL do capture buffer do kit (máximo de 300 µL para 300 mg).

O tubo foi fechado e vortexado fortemente e, em seguida Incubado à 65°C até a total dissolução da agarose (5-10 min), agitando o tubo eventualmente.

Durante a incubação, foi colocada uma coluna GFX em um tubo det aleta (do Kit) para cada purificação. Tanto a coluna quanto o tubo foram devidamente identificados.

Após a dissolução da agarose, os tubos foram centrifugados. Todo conteúdo de cada tubo foi transferido para cada coluna GFX e Incubado à temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida, as colunas foram centrifugadas em velocidade máxima por aproximadamente 35 segundos.

Descartou-se o filtrado et alocou-se as colunas de volta aos tubos.

Adicionou-se 500 µL de wash buffer do kit em cada tubo. Centrifugou-se em velocidade máxima por 35 segundos. O filtrado foi descartado e repetiu-se a centrifugação para retirada de todo o buffer, descartando-se,

novamente o filtrado. As colunas foram transferidas para novos tubos de 1,5 ml devidamente identificados.

Após a transferência, foi adicionado 40 µL de H_2O mQ autoclavada em cada coluna, incubando-se à temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida, o DNA foi eluido e centrifugado em velocidade máxima por 1 minuto. Para verificar a purificação, 3µL do DNA eluído foi aplicado em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio.

3.6.1 Re-amplificação de DNA purificado

Devido a pequena quantidade de material obtido após a purificação, foi realizada uma re-amplificação a partir de 1ul de DNA purificado, seguindo os mesmos padrões de concentração e ciclagem descritos anteriormente, a fim de adquirir-se a quantidade desejada de DNA para a realização do protocolo de seqüenciamento.

3.7 Seqüenciamento de DNA

Para a realização do protocolo de seqüenciamento, foi utilizado em média 200 ng de DNA, 3 ul de primer (3,2pmoles/ul), 3 ul de 5X sequencing buffer e 2 ul de BigDye v3.1 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), completando-se o volume final com H_20 para 15ul, dando, posteriormente, um pulso de 1000 rpm.

Ciclagem

96°C 2 min

96°C 45 seg
50°C 30 seg } 35 x
60°C 4 min

4°C ∞

3.7.1 Precipitação da Reação de Seqüenciamento com glicogênio

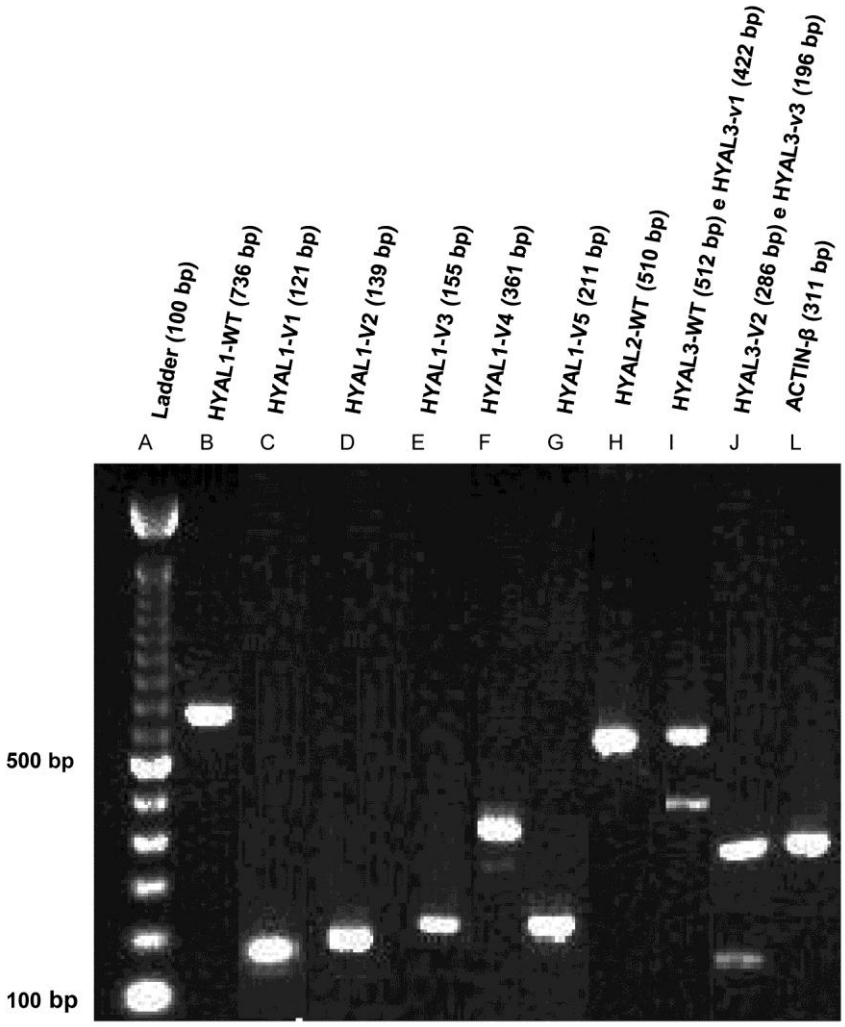
Aos 15 ul da reação de seqüenciamento, adicionou-se 25 ul do coquetel de precipitação, conforme descrito abaixo:

Para uma placa de 96 poços foi utilizado 2750ul de etanol 100% gelado, 110 ul de 3M NaOAc pH5,2 e 110ul de glicogênio 1mg/ml, vortexando e mantendo em gelo por 15 minutos. Em seguida foi centrifugado a 4.000 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente Inverteu-se e descartou-se o excesso, dando a seguir dois pulsos de 1000 rpm com a placa invertida.

Após os pulsos, foram adicionados 50ul de etanol 70% gelado por reação.Repetiu-se a centrifugação e a drenagem dos tubos, secando, posteriormente, por 1 hora em lugar protegido da luz.

Em seguida, as placas foram colocadas no seqüenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (HITACHI, London, UK). As sequências geradas, foram blastadas no GenBank). (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

A expressão da wt e das variantes 1, 2, da HYAL1, HYAL2-wt, HYAL3-wt e HYAL3-v2, estão demonstradas na figura16.



.

Figura 16. Expressão de HYAL1, HYAL2, HYAL3-wt, variantes e β- actina (controle positivo) nos tumores. Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. O padrão de peso molecular utilizado foi de 100bp (A).Os produtos de diferentes amplicons podem ser visualizados de B a J

3.8 Técnica de Imunohistoquímica empregada para detecção dos antígenos Hyal 1 e 3, HAS1, HAS2 e HAS3 em tecido congelado.

Para a imunomarcação dos antígenos específicados, foi utilizada metodologia padronizada no Laboratório de Patologia Molecular do Hospital do Câncer AC. Camargo. Os anticorpos, bem como, suas referências (marca, clone, espécie, titulação e kit de amplificação utilizado), estão descritos na Tabela 3.

Os blocos selecionados foram submetidos a cortes histológicos de 3 a 4 µm de espessura com o uso de um micrótomo e montados sobre lâminas de microscopia, sem a realização de coloração. As amostras congeladas foram fixadas em acetona gelada no freezer por 10 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas primeiramente em água corrente e, por último, em água destilada. Procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 6%, v/v com metanol com 2 trocas de 10 minutos cada. As lâminas foram lavadas em água corrente, destilada e com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em títulos pré-estabelecidos, conforme a tabela x, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1%, por 30 min s 37º C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida. As lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. Em seguida, foram Incubadas por 30 min a 37° C com Advance™ HRP Link (Dako cod K4068, Carpinteria, CA, EUA). Posteriormente, as lâminas foram lavadas com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada e, incubadas com o Advance™ HRP Enzyme por 30 min a

37° C. Foi realizada a lavagem com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada. As lâminas foram incubadas em solução substrato: 100 mg% de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H_2O_2 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37ºC, ao abrigo da luz. Foi observado ao microscópio, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos. Em seguida, foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto. Novamente, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada por 3 minutos. Posteriormente, imergidas 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavadas em seguida com água corrente e destilada. As lâminas foram desidratadas em: etanol 80%, 95% e 100% (2 vezes), 30 segundos cada. Em seguida, as lâminas foram diafanizadas em Xilol: 4 vezes, 30 segundos cada. A Montagem das lâminas foi realizada com lamínula e Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha), rotuladas e mantidas na posição vertical por 24 horas. Controles positivos foram incluídos em cada reação utlizando alguns dos próprios casos selecionados e tumores de próstata, sabidamente positivos e, para controle negativo, foram omitidos os anticorpos primários.

Tabela 3. Relação dos anticorpos empregados em imunohistoquímica

Antícorpos	Marca/Clones	Espécies	Títulos	Kit utilizado
Hyal 1	Santa Cruz /1D10	cabra	1:50	Advance™ HRP Link
Hyal 3	Santa Cruz / N-12	cabra	1:50	Advance™ HRP Link
HAS 1	Santa Cruz / R-15	cabra	1:50	Advance™ HRP Link
HAS 2	Santa Cruz / S15	cabra	1:50	Advance™ HRP Link
HAS 3	Santa Cruz / E-15	cabra	1:50	Advance™ HRP Link

3.8.1 Técnica de Imunohistoquímica empregada para detecção dos antígenos Hyal 1 e 3, HAS1, HAS2 e HAS3, TGF-β e E-caderina em tecido parafinado.

Para a imunomarcação dos antígenos específicados, foi utilizada metodologia padronizada no laboratório de Patologia Molecular do Instituto de Anatomia Patológica da Universidade de Coimbra. Os anticorpos, bem como, suas referências (marca, clone, espécie, titulação, recuperação antigênica, kit de amplificação utilizado e padrão de marcação), estão descritos na Tabela 4.

Para tanto, as etapas que compõem o método estão descritas a seguir:

Os blocos de parafina selecionados foram submetidos a cortes histológicos de 3 a 4 µm de espessura com o uso de um micrótomo e montados sobre lâminas previamente silanizadas com solução 3-aminopropylthiethoxy-silane, (Sigma, código A-3648). Os cortes foram submetidos à desparafinização em banho de 20 minutos em xilol aquecido a 95 º C, seguidos de três banhos de xilol a temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70%) por cinco minutos cada. As lâminas foram lavadas em água corrente, destilada e com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos. Iniciou-se a recuperação antigênica, realizada em panela a vapor, na qual foi colocado o berço com as lâminas em cuba com solução de citrato 10mM, pH 6,0 à 95-100 º C por 35 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas

com os anticorpos primários diluídos em títulos pré-estabelecidos, conforme a tabela 4, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1%, por 30 minutos a 37ºC e por 18 horas a 4ºC em câmara úmida. As lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. Em seguida, foram Incubadas por 30 min a 37° C com Advance™ HRP Link (Dako cod K4068, Carpinteria, CA, EUA). Posteriormente, as lâminas foram lavadas com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada e, incubadas com o Advance™ HRP Enzyme por mais 30 minutos a 37°C. Foi realizada a lavagem com tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada. As lâminas foram incubadas em solução substrato: 100 mg% de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H_2O_2 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS, por 5 minutos a 37ºC, ao abrigo da luz. Foi observado ao microscópio, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos. Em seguida, foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto. Novamente, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada por 3 minutos. Posteriormente, imergidas 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavadas em seguida com água corrente e destilada. As lâminas foram desidratadas em: etanol 80%, 95% e 100% (2 vezes), 30 segundos cada. Em seguida, as lâminas foram diafanizadas em Xilol: 4 vezes, 30 segundos cada. A Montagem das lâminas foi realizada com lamínula e Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha), rotuladas e mantidas na posição vertical por 24 horas.

Controles positivos foram incluídos em cada reação utlizando alguns dos próprios casos selecionados e tumores de próstata, sabidamente positivos e, para controle negativo, foram omitidos os anticorpos primários.

Tabela 4. Relação dos anticorpos empregados em imunohistoquímica

Antícorpos	Marca/Clones	Espécies	Títulos	Recuperação antigênica	Kit utilizado
Hyal 1	Santa Cruz /1D10	cabra	1:50	Citrato	Advance™ HRP Link
Hyal 3	Santa Cruz / N-12	cabra	1:50	Citrato	Advance™ HRP Link
HAS 1	Santa Cruz / R-15	cabra	1:50	Citrato	Advance™ HRP Link
HAS 2	Santa Cruz / S15	cabra	1:50	Citrato	Advance™ HRP Link
HAS 3	Santa Cruz / E-15	cabra	1:50	Citrato	Advance™ HRP Link
TGF-β	Santa Cruz /H-100	coelho	1:100	Citrato	Advance™ HRP Link
E-Caderina	Santa Cruz/67A4	rato	1:100	Citrato	Advance™ HRP Link

3.9 Histomorfometria para quantificação das células (expressão de HAS 1, HAS 2 e HAS 3, Hyal 1 e 3, TGF-β e E-Caderina)

Após coloração das lâminas dos 125 casos do Hospital das Clínicas/Hospital do Câncer AC. Camargo e Hospital Universitário de Coimbra para expressão das Hyal 1 e 3, HAS 1, HAS 2 e HAS 3, TGF-β e E-Caderina, iniciou-se a quantificação utilizando o Sistema Automatizado de Imagem Celular (ACIS III, DAKO,Carpinteria, CA, EUA).

De maneira resumida, os componentes do ACIS III consistem de um microscópio digital automatizado e de um computador com um programa de

captura 26 de imagem e um sistema de processamento de imagens. Cada lâmina corada por imunohistoquímica foi digitalizada e as imagens capturadas foram revisadas na tela do computador. O ACIS III é capaz de detectar, contabilizar e classificar os tipos celulares baseados nos níveis de matiz, saturação e luminosidade. O sinal é então convertido para mensuração de densidade numérica. Para analisar a expressão das proteínas foi utilizado o programa computacional “membrana e citoplasma”, residente no sistema. Este programa mede a intensidade da coloração do citoplasma e da membrana e fornece um resultado em variáveis contínuas que vão de 0 a 256. Para isso é atribuído o threshold, ou seja, indica-se para o software as células com imunorreatividade e as células sem imunorreatividade.

Dez campos de cada lâmina foram selecionados manualmente, sendo cinco campos correspondentes ao tumor e cinco campos correspondentes ao estroma, utilizando-se ferramentas de seleção do ACIS III. Para as análises estatísticas foram utilizados os resultados do cálculo do índice de positividade descrito abaixo:

$$\text{Índice de positividade (\%)} = \frac{\text{média área positiva} - \text{média área negativa}}{\text{Área total}}$$

As médias foram obtidas das duas regiões (estroma e tumor) de cada caso.

3.10 Tabulação dos dados e análise estatística

A planilha completa estruturada no programa Excell contendo dados clínicos, morfológicos e histomorfométricos dos 125 casos foi transferida para o programa SPSS versão 15 (Inc., Chicago, IL). Finalizamos então a análise

descritiva das variáveis categóricas, através de suas freqüências de distribuição. Para variáveis categóricas utilizamos a soma ou número total, para as variáveis numéricas utilizamos média, mediana (idade e sobrevida), desvio padrão, valor mínimo e máximo. Tabelas e gráficos foram construídos após a análise descritiva. Realizamos então a análise estatística formal. Utilizamos teste não-paramétrico para avaliar a associação entre os vários tipos histológicos e as demais variáveis clínicas e morfológicas. O teste T pareado foi utilizado para testar as associações entre as variáveis contínuas, examinando-se os resíduos para assegurar a distribuição normal. Novamente, tabelas e gráficos foram confeccionados. A seguir, iniciamos a análise das curvas de sobrevida de Kaplan-Meier. Para tanto, as variáveis numéricas foram binariamente categorizadas (mínimo e máximo valor), a idade foi categorizada em valores acima e abaixo da mediana. A sobrevida foi definida como o tempo decorrido entre o diagnóstico histológico do tumor e o óbito. O status incluiu os pacientes vivos, categorizados com 0, e que foram a óbito, categorizados como 1. Cada variável clínica (idade, sexo, estadiamento) e morfológica (tipos histológicos, HAS 1, 2 e 3, Hyal 1 e 3, TGF-β e E-caderina) foi analisada na curva de sobrevida como fator dependente. Criaram-se tabelas e gráficos com os resultados obtidos. Finalmente, as variáveis significantes identificadas pelas curvas de sobrevida de Kaplan-Meier foram avaliadas quanto à sua independência no modelo de Regressão de Cox. Tabelas e gráficos foram construídos. O nível de significância foi estabelecido para $p = 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Pacientes

Foram utilizados no estudo, espécimes tumorais de 125 pacientes com CP oriundos do do Hospital das Clinicas da FMUSP /Hospital do Câncer AC. Camargo e Hospital da Universidade de Coimbra, divididos em relação ao tipo histológico. Como controles, foram incluídas bordas não tumorais de 35 pacientes, sendo 25 amostras do Hospital Hospital das Clínicas/ AC Camargo e 10 amostras do Hospital Universitário de Coimbra.

Nas Tabelas 5 e 6 podem ser apreciadas as características demográficas dos pacientes oriundos do Hospital das Clinicas da FMUSP /Hospital do Câncer AC. Camargo e Hospital Universitário de Coimbra, quanto ao sexo, idade, estadiamento, tratamento e seguimento. A mediana de idade dos pacientes estudados foi de 69 anos. O estadiamento patológico final resultou em 76 pacientes no estadio I, 20 pacientes no estadio II, 27 pacientes no estadio III e 2 no estadio IV, respectivamente. Individualmente, quanto ao estadio T, 33 pacientes eram T1, 70 estadio T2, e 9 estadio T3. Do total de 125 pacientes, 33 apresentaram metástases em linfonodos peribrônquicos ipsilaterais e linfonodos subcarinais e mediastinais (18 N1 e 15 N2). Nove tumores recidivaram 1 ano após a cirurgia. A mediana de sobrevida foi de 28 meses. Até o final deste estudo, 24 pacientes faleceram.

Tabela 5. Características demográficas dos 69 pacientes do Hospital das Clinicas da FMUSP/ Hospital do Câncer AC. Camargo, quanto ao sexo, idade, estadiamento, tratamento e sobrevida

Total de pacientes	69
Idade (anos)	69 (44-83)[a]
Sexo	49 males 20 females
Estadiamento patológico	
I	40
II	4
III	25
EstadioT	
1	16
2	36
3	4
Estadio N	
0	50
1	6
2	13
CCE	22
ADC	47
• *AIS*	7
• Acinar	19
• Papilífero	13
• Sólido	8
Tabagismo (maços/ano)	41 (0-120) [a]
Tratamento	
Cirurgia	69
Cirurgia+ quimioterapia	21
Cirurgia+ quimioterapia+ radioterapia	4
Tempo de seguimento (meses)	28 (1-84)[a]
Pacientes censurados para análise da sobrevida até a última data do seguimento	20

[a] Valores representam a mediana (mínimo e máximo)

Tabela 6. Características demográficas dos 56 pacientes do Hospital da Universidade de Coimbra, quanto ao sexo, idade, estadiamento, tratamento e sobrevida

Total de pacientes	56
Idade (anos)	64 (43-84)[a]
Sexo	35 males, 21 females
Estadiamento patológico	
I	36
II	16
III	2
IV	2
EstadioT	
1	17
2	34
3	5
Estadio N	
0	41
1	12
2	2
CCE	25
ADC	31
• *AIS*	03
• Acinar	12
• Papilífero	11
• Sólido	3
Tabagismo (maços/ano)	37 (0-100)
Tratamento	
Cirurgia	56
Cirurgia+ quimioterapia	7
Cirurgia+ quimioterapia+ radioterapia	4
Tempo de seguimento (meses)	16 (3-30)[a]
Pacientes censurados para análise da sobrevida até a última data do seguimento	4

[a] Os valores correspondem às medianas e variação mínima e máxima.

Todas as características anatomo-patológicas dos tumores podem ser contempladas nos anexos 1 e 2.

4.2 Avaliação da Expressão Gênica das HYAL 1, 2 e 3

O resultado de expressão das HYAL em todos os pacientes e grupo controle estão detalhados no anexo 1. O resultado da análise da freqüência de expressão das HYAL 1, 2 e 3 em todos os espécimes de tecidos tumorais e controles foram comparadas (Tabela 7).

Tabela 7. Expressão das HYAL1, 2, e 3, estratificadas por tecidos tumorais (69 casos) e controles (25 casos) obtidos dos pacientes do Hospital das Clinicas/ Hospital do Câncer AC. Camargo

Expressão gênica	Tumores (69)	Controles (25)
HYAL1-wt	22 (26.2%)*	6 (7.1%)
• HYAL1-v1	26 (30.6%)*	4 (4.7%)
• HYAL1-v2	35 (41.2%)*	3 (3.5%)
• HYAL1-v3	19 (22.4%)	10 (11.8%)
• HYAL1-v4	5 (5.9 %)	3 (3.5%)
• HYAL1-v5	0 (00%)*	8 (9.4%)
HYAL2-wt	53 (62.4%)*	5 (5.9%)
HYAL3-wt	25 (29.4%)*	7 (8.2%)
• HYAL3-v1	15 (20.5%)*	1 (1.4%)
• HYAL3-v2	17 (23.3%)	1 (1.4%)
• HYAL3-v3	15 (20.5%)	0 (00%)

Valores expressos em percentagem.

O teste chi-*quadrado* ($\chi 2$) de *Pearson foi utilizado para explorar diferenças de expressão entre tumores e controles.*

* $p \leq 0.05$

Claramente, HYAL1-wt, HYAL1-v1, HYAL1-v2, HYAL2-wt, HYAL3-wt, HYAL3-v1 foram significativamente mais expressas pelos tumores em comparação aos controles. Pelo fato de HYAL 1, 2, 3 e suas variantes apresentarem diferenças de expressão em tecidos tumorais e controles do mesmo paciente, resolvemos investigar a relação existente entre tecidos tumorais e controles e a expressão de HYAL. Encontramos expressão simultânea entre tumor e controle nos seguintes genes: HYAL1-wt (4 casos; 27%), HYAL1-v1 (2 casos; 12%), HYAL1-v2 (um caso; 6%), HYAL1-v3 (4 casos; 25%), HYAL2-wt (5 casos; 30%) e HYAL3-wt (6 casos; 38%), enquanto que para HYAL3-v1, v2 e v3 nenhuma expressão simultânea foi encontrada.

Como já demonstrado na Tabela 6, os tecidos expressaram mais de um tipo de HYAL, conforme demonstrado pela correlação bivariada entre HYAL1, 2, 3 e variantes foi realizada em tumores e controles e pode ser apreciada na Tabela 8.

Tabela 8. Correlação entre HYAL1, 2, 3 e variantes

A. Tumor

	HYAL1-wt	HYAL1-v1	HYAL1-v3	HYAL1-v4	HYAL1-v5	HYAL2-wt	HYAL3-wt	HYAL3-v1	HYAL3-v2	HYAL3-v3
HYAL1-wt		R=0.34 p=0.002			R=-0.23 p=0.03		R=0.30 p=0.006			R=-0.23 p=0.05
HYAL1-v1				R=0.27; p=0.01		R=0.45; p=0.0001	R=0.29; p=0.007	R=0.38; p=0.001		
HYAL1-v2			R=0.52; p=0.03					R=0.32; p=0.005	R=0.25; p=0.03	
HYAL2-wt	R=0.32; p=0.003						R=0.32; p=0.003			
HYAL3-wt		R=0.65; p=0.006						R=100; p=0.0001		

B. Controle

	HYAL1-v2	HYAL1-v4	HYAL1-v5	HYAL2-wt	HYAL3-wt
HYAL1-w	R=0.48 p=0.007	R=100 p=0.0001	R=-0.87 p=0.0001	R=0.74 p=0.002	
HYAL1-v1	R=0.83 p=0.0001			R=0.85 p=0.0001	
HYAL1-v2				R=0.71 p=0.002	R=0.55 p=0.03
HYAL1-w	R=0.48 p=0.007	R=100 p=0.0001	R=-0.87 p=0.0001	R=0.74 p=0.002	
HYAL1-v1	R=0.83 p=0.0001			R=0.85 p=0.0001	
HYAL1-v2				R=0.71 p=0.002	

Associação entre HYAL1, 2, 3 e variantes. O Teste bivariado de Pearson foi utilizado para identificar associações entre variáveis em tumores e controles, estabelecendo-se a significância estatística $p \leq 0.05$. R= coeficiente de correlação; p= significância estatística.

4.2.1 Associação entre expressão das HYAL1, 2 e 3 e subtipos de adenocarcinoma

Como previamente descrito, reclassificamos os ADC em diferentes subtipos incluindo "*in situ*" (padrão lepídico puro) e invasivo com padrão predominante acinar, papilífero e sólido. Dessa forma, nosso próximo passo foi identificar diferenças de expressão das HYAL dentre os diferentes subtipos de ADC. De fato, comparando espécimes tumorais de diferentes tipos histológicos, encontramos uma alta percentagem de carcinomas de células escamosas que expressaram HYAL1-wt e uma elevada fração de adenocarcinomas predominantemente acinares, expressando HYAL3-v1 (Tabela 9).

Tabela 9. Expressão das HYAL1, 2, 3 e variantes, de acordo com tipos histológicos e subtipos de tumores oriundos dos pacientes do Hospital das Clinicas/ Hospital do Câncer AC. Camargo

Hialuronidases	**CCE (N=22)**	**Adenocarcinoma (N=47)**				**P valor**
		In situ	**Invasivo**			
		AIS (N=7)	**Acinar (N=19)**	**Papilífero (N=13)**	**Sólido (N=8)**	
HYAL1-WT	9* (18,8%)	1 (1,4%)	2 (2,9%)	2 (2,9%)	4 (5,8%)	0,04
HYAL1-V1	7 (10,1%)	3 (4,3%)	10**(14,5%)	1 (1,4%)	5 (7,2%)	0,05
HYAL1-V2	11 (15,9%)	3 (4,3%)	7 (10,1%)	10 (14,5%)	4 (5,8%)	0,26
HYAL1-V3	5 (7,2%)	2 (2,9%)	4 (5,8%)	4 (5,8%)	4 (5,8%)	0,60
HYAL1-V4	0	1 (1,4%)	3 (4,3%)	0	1 (1,4%)	0,23
HYAL1-V5	0	0	0	0	0	
HYAL2-WT	18 (26,1%)	4 (5,8%)	15 (21,7%)	9 (13,0%)	7 (10,1%)	0,59
HYAL3-WT	7 (10%)	3 (4,3%)	4 (5,8%)	5 (7,2%)	6 (8,7%)	0,11
HYAL3-V1	2 (2,9%)	2 (2,9%)	5 (7,2%)	4 (5,8%)	2 (2,9%)	0,53
HYAL3-V2	7(10%)	1(1,4%)	5 (7,2%)	1(1,4%)	3 (4,3%)	0,44
HYAL3-V3	2	0	6 (8,7%)	4(5,8%)	33 (4,3%)	0,14

Associação entre HYAL1, 2, 3 e variantes. O Teste bivariado de Pearson foi utilizado para identificar associações entre variáveis em tumores e controles. R= coeficiente de correlação; p= significância estatística.
* Significativamente expressa em CCE ($p \leq 0.05$)
** Significativamente expressa em ADC predominantemente acinar ($p \leq 0.05$)

4.2.2 Análise da sobrevida

Diversas combinações entre variáveis clínicas e morfológicas foram testadas com intuito de construir um modelo matemático de sobrevida relevante.

O resultado da primeira melhor combinação, determinado pela análise multivariada de Cox pode ser contemplado na Tabela 10. Cinco variáveis estiveram significativamente associadas com a sobrevida e incluíram idade, estadiamento N, tratamento, tipo histológico e HYAL1-wt ou HYAL3-v1. Por exemplo, constatamos que estadio N avançado esteve significativamente correlacionado com menor sobrevida ($p = 0.001$). Todavia, quando HYAL1-wt foi incluída no modelo como covariavel, a correlação entre estadio N e sobrevida foi muito mais forte. O modelo matemático resultante mostrou risco de morte associado com expressão gênica de HYAL1-wt (R= 2,07), metástases linfonodais (R = 1.11), idade acima de 69 anos, e tipo histológico adenocarcinoma (R = 2.87) (Tabela 10). A curva de probabilidade de sobrevida *versus* tempo de seguimento dos pacientes obtida pela Regressão de Cox mostrou que o grupo de pacientes com tumores sem expressão de HYAL1-wt apresenta melhor chance de sobrevida do que o grupo com expressão de HYAL1-wt. Em contraste, o grupo com ausência de expressão de HYAL3-v1 apresenta menor chance de sobrevida em relação ao grupo com expressão de HYAL3-v1. A introdução das demais variáveis HYAL no modelo matemático controlado para idade, estadiamento N e tipos histológicos não apresentou impacto na sobrevida (Tabela 11).

Tabela 10. Modelo de sobrevida para os pacientes do Hospital das Clínicas / Hospital do Câncer AC. Camargo pela regressão de Cox para risco relativo de morte, controlado para idade, estadio N, tratamento e tipos histológicos (log-likelihood 109,749, p=0.0001)

	Coeficiente B	Erro Padrão	Método Wald	Sig	Risco (B)	95,0% IC Risco(B)	
						Inferior	Superior
Idade < 69 anos	-1,09	0,62	3,08	0,08	0,33	0,09	1,14
Estadio N_2			9,33	0,009			
Estadio N_0	-1,77	0,61	8,36	0,004	0,17	0,05	0,56
Estadio N_1	0,10	0,74	0,02	0,008	1,11	0,26	0,79
Cirurgia+quimio+ radioterapia			8,89	0,008			
Cirurgia+ quimioterapia	0,09	0,65	7,99	0,003	0,65	0,10	1,25
ADC	1,05	0,94	1,25	0,03	2,87	0,45	1,26
CCE	0,03	0,84	0,001	0,04	1,02	0,19	5,33
HYAL1-wt	0,73	0,85	0,74	0,03	2,07	0,39	0,92
HYAL3-v1	-0,73	0,67	1,19	0,02	0,48	0,13	1,78

Tabela 11. Risco relativo de morte para pacientes Hospital das Clinicas / Hospital do Câncer AC. Camargo pela regressão de Cox controlados para idade , estadio N e tipos histológicos de acordo com a expressão das HYAL 1, 2 , 3 e sua variantes

	B	Erro	Wald	Sig.	Risco (B)	95,0% IC Risco (B)	
						Inferior	Superior
HYAL1-v1	-,374	,585	,409	,522	,688	,218	2,166
HYAL1-v2	-,175	,516	,115	,735	,839	,305	2,309
HYAL1-v3	-,226	,576	,154	,695	,798	,258	2,466
HYAL1-v4	,327	1,114	,086	,769	1,387	,156	12,312
HYAL2-wt	,483	,672	,516	,473	1,621	,434	6,055
HYAL3-wt	,351	,577	,369	,543	1,420	,458	4,403
HYAL3-v2	,621	,606	1,049	,306	1,861	,567	6,110
HYAL3-v3	-,030	,554	,003	,957	,971	,328	2,875

4.3 Avaliação Imunoproteica das Hyal 1 e 3, HAS 1, 2 e 3 dos casos do Hospital das Clínicas da FMUSP/ Hospital do Câncer AC Camargo

Nas figuras 17, 18, 19, 20, 21 e 22 estão representadas respectivamente as células neoplásicas nos carcinomas células escamosas e subtipos de adenocarcinomas, corados com imunohistoquímica para Hyal 1 e 3, HAS 1, 2 e 3.

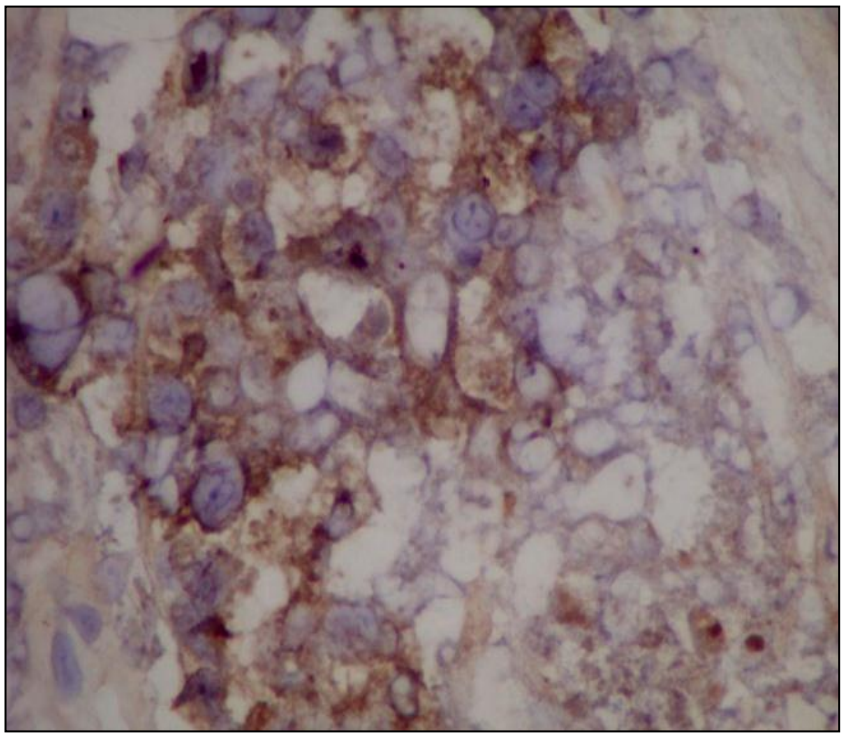


Figura 17. Carcinoma de Células Escamosas. Imunoexpressão de HAS1 pelas células neoplásicas. Imunohistoquímica X 400

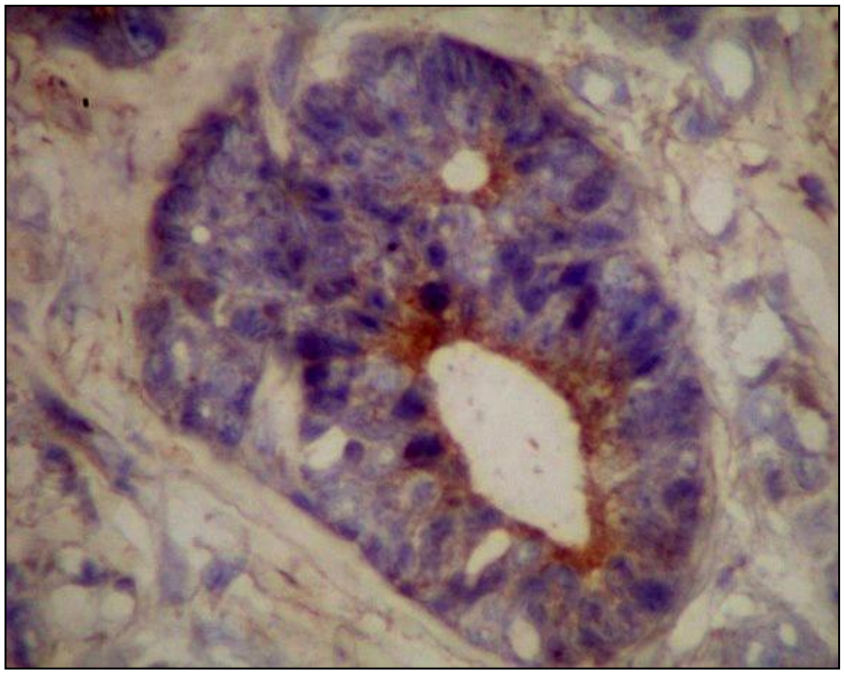


Figura 18. Adenocarcinoma. Imunoexpressão de HAS1 pelas células neoplásicas. Imunohistoquímica X 400

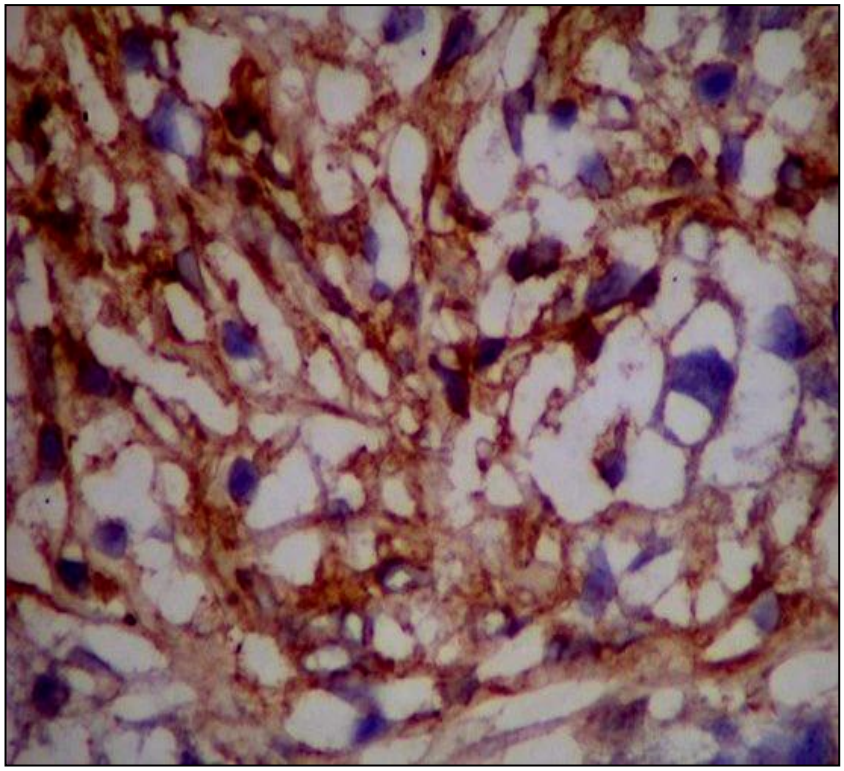


Figura 19. Carcinoma de Células Escamosas. Imunoexpressão de HAS2 pelas células neoplásicas. Imunohistoquímica X 400

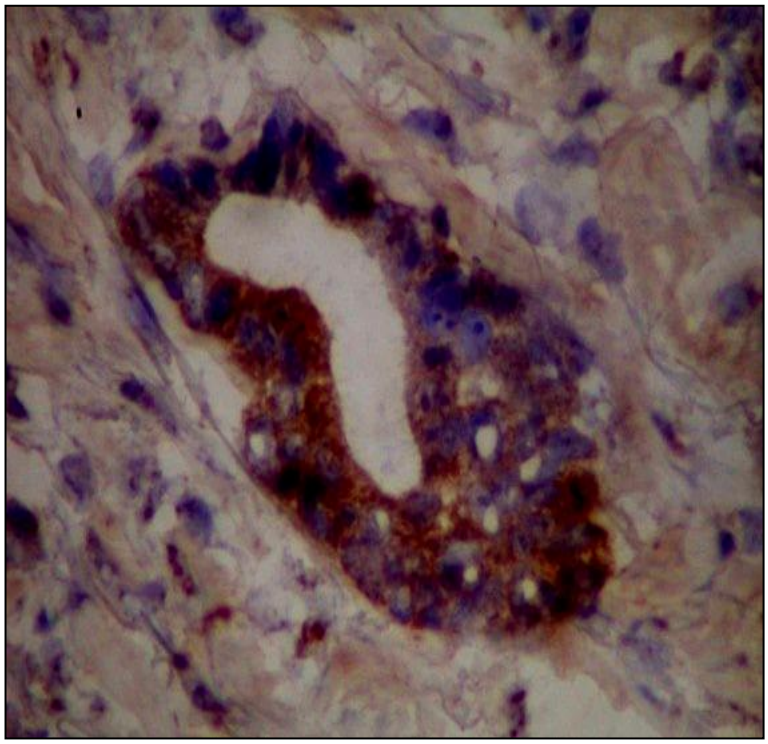


Figura 20. Adenocarcinoma. Imunoexpressão de HAS2 pelas células neoplásicas. Imunohistoquímica X 400

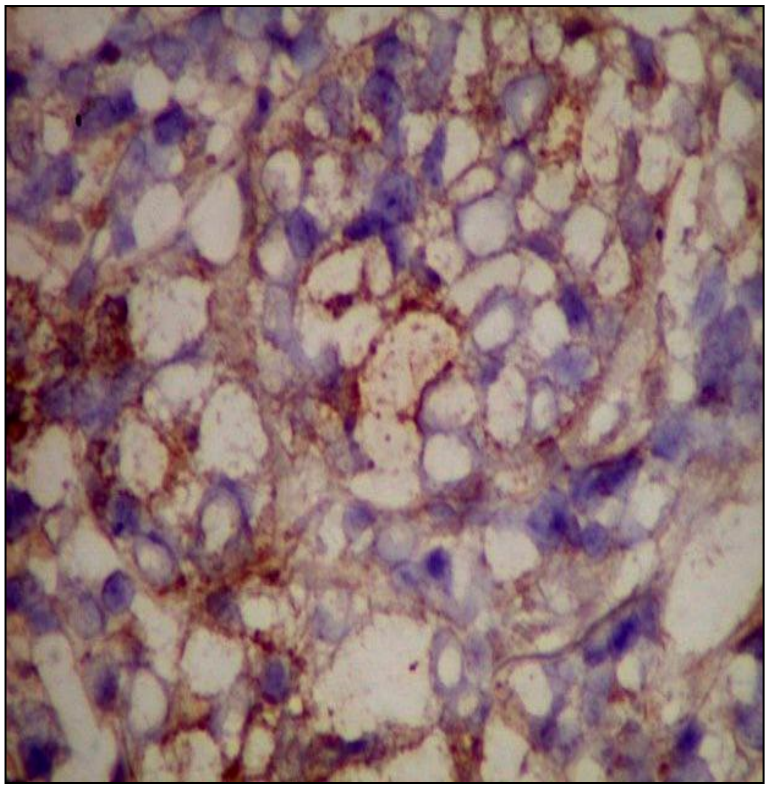


Figura 21. Carcinoma de células escamosas. Imunoexpressão de HAS3 pelas células neoplásicas. Imunohistoquímica X 400

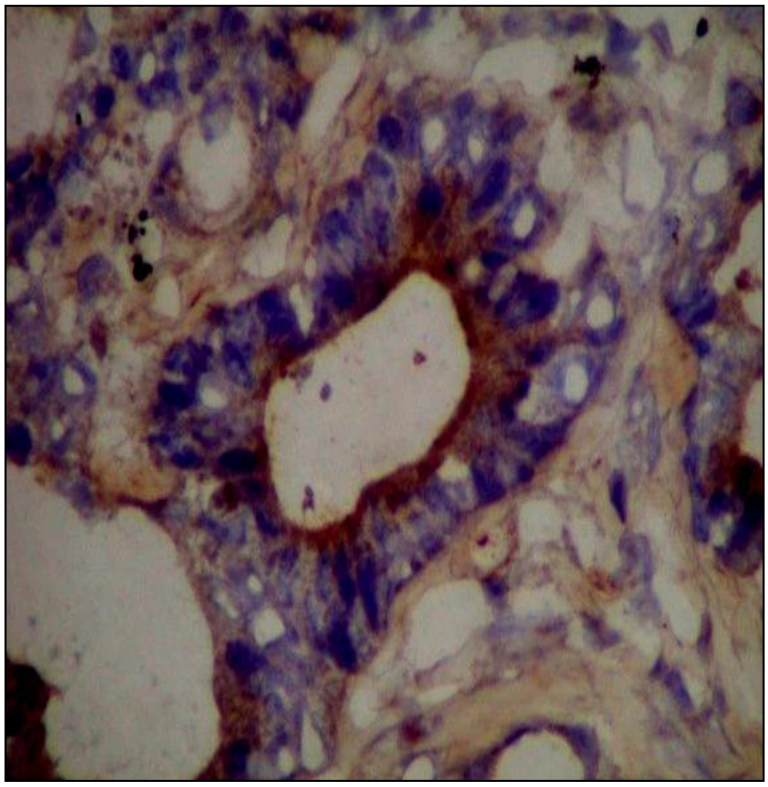


Figura 22. Adenocarcinoma. Imunoexpressão de HAS3 pelas células neoplásicas. Imunohistoquímica X 400

O resultado da média de intensidade de expressão das Hyal em todos os tumores e grupo controle está detalhado na Tabela 12.

Tabela 12. Sumário dos resultados morfométricos* nas amostras de tumores e controles

	Média (%)	**Mínimo-Máximo**
Tumor		
Hyal1	33,4	2.9-62,9
Hyal3	72,6#	5-121,6
HAS1	26,4	0,1-76,9
HAS2	19,5	0,0- 73,2
HAS3	10	0,5-60,4
Controles		
Hyal1	26,7	6,3 - 47
Hyal3	54,1	48,8-59,2
HAS1	37,3	2,6 - 72
HAS2	32,4	26 – 38,8
HAS3	8,3	0,9-15,6

* Densidade numérica de células imunoreativas mensuradas através da intensidade de coloração do citoplasma e da membrana citoplasmática de cada célula residente no sistema ACIS III .
# p=0.09 (Teste T independente)

Houve maior expressão de Hyal 3 no tumor quando comparado aos controles, porém esta diferença foi marginalmente significante.

O resultado da análise da freqüência de imunoexpressão das Hyal 1 e 3, e HAS1, 2, 3 em todos os espécimes de tecidos tumorais e controles foram comparadas (Tabela 13).

Tabela 13. Expressão das Hyal 1 e 3, Has 1, 2 e 3 estratificadas por tecidos tumorais e controles obtidos dos pacientes do Hospital das Clínicas da FMUSP/ Hospital do Câncer AC. Camargo

Expressão proteica	Tumores (69)	Controles (25)
Hyal 1	69 (100%)	22 (88%)
Hyal 3	69 (100%)	19 (76%)
HAS 1	69 (100%)	21 (84%)
HAS 2	66 (95%)	24 (96%)
HAS 3	69(100%)	25 (100%)

Valores expressos em percentagem.
O teste chi-*quadrado* ($\chi 2$) de *Pearson foi utilizado para explorar diferenças de expressão entre tumores e controles.*

A associação entre as variáveis foi testada como demonstra a Tabela 14. Houve associação significante entre Hyal 3 e HAS1 e Hyal 3 e HAS3 e HAS1 e HAS2 e HAS2 e HAS3.

Tabela 14. Correlação de imunoexpressão entre Hyal 1 e 3, HAS1, 2 e 3

		Hyal1	Hyal3	HAS1	HAS2	HAS3
Hyal1	R	1	,097	,171	,013	-,108
	p		,412	,149	,916	,363
Hyal3	R	,097	1	,236*	,070	,298*
	p	,412		,044	,559	,010
HAS1	R	,171	,236*	1	,235*	,080
	p	,149	,044		,045	,500
HAS2	R	,013	,070	,235*	1	,328**
	p	,916	,559	,045		,005
HAS3	R	-,108	,298*	,080	,328**	1
	p	,363	,010	,500	,005	

Associação entre Hyal 1 e 3, HAS1, 2 e 3. O Teste bivariado de Pearson foi utilizado para identificar associações entre variáveis em tumores e controles. R= coeficiente de correlação; p= significância estatística.
* P ≤ 0.05
** P ≤ 0.01 .

4.3.1 Associação entre expressão das Hyal 1 e 3, HAS1, 2 e 3 e carcinomas de células escamosas e subtipos de adenocarcinoma

Na tabela 15 podem ser contempladas as médias e as variações mínima e máxima das diferentes Hyal e HAS. Não houve diferença estatística entre a expressão das Hyal 1 e 3, HAS1, 2 e 3 e os diferentes tipos histológicos de tumor.

Tabela 15. Sumário dos resultados morfométricos* de acordo com tipos histológicos e subtipos de ADC oriundos dos pacientes do Hospital das Clínicas / Hospital do Câncer AC. Camargo

		Média	**Mínimo -Máximo**
Hyal1	*AIS*	38,6	10,7-52,2
	Acinar	40,3	5,8-62,9
	Papilífero	26,1	2,9-52,3
	CCE	30,4	3,8-61,8
	Sólido	33,3	4,8-54,6
Hyal3	*AIS*	78,2	43,5-121,5
	Acinar	76,9	51,3-119,0
	Papilífero	68,2	19,7-110,4
	CCE	75,3	5,0-119,7
	Sólido	55,4	15,3-98,0
HAS1	*AIS*	24,1	3,2-51,3
	Acinar	30,7	3,1-72,1
	Papilífero	32,2	0,8-58,7
	CCE	21,4	0,11-54,7
	Sólido	24,8	0,15-76,9
HAS2	*AIS*	11,4	0-39,7
	Acinar	19,7	0,4-72,2
	Papilífero	23,5	1,0-48,6
	CCE	18,3	0-53,7
	Sólido	22,8	0-73,2
HAS3	*AIS*	8,5	2,4-16,1
	Acinar	10,4	1-60,4
	Papilífero	11,1	0,5-23,1
	CCE	10,2	1,6-39,0
	Sólido	7,7	1,1-18,0

* *Densidade numérica de células imunoreativas mensuradas através da intensidade de coloração do citoplasma e da membrana citoplasmática de cada célula residente no sistema ACIS III= Índice de Positividade (IP) (IP=Intensidade de coloração X área positiva/área total).*

p=0.09 (Teste T independente)

4.3.2 Análise da sobrevida

Diversas combinações entre variáveis clínicas e morfológicas foram testadas com intuito de construir um modelo matemático de sobrevida relevante.

O resultado da melhor combinação, determinado pela análise multivariada de Cox pode ser contemplado na Tabela 16. Seis variáveis estiveram significativamente associadas com a sobrevida e incluíram idade, sexo, estadiamento, tipo histológico, HAS2 e HAS3. O modelo matemático resultante mostrou risco de morte associado com sexo masculino (R=2,2), idade ≤ 65 anos (R=3,6), adenocarcinoma sólido (R=4,4), estadio III (R=3,1), imunoreatividade para HAS2 (R=8,7) e HAS3 (R=6,8). A curva de probabilidade de sobrevida *versus* tempo de seguimento dos pacientes obtida por Kaplan-Meier mostrou que o grupo de pacientes com tumores exibindo alta expressão de HAS2 e HAS3 apresenta melhor chance de sobrevida do que o grupo com imunoreatividade baixa (Figura 23).

Tabela 16. Análise multivariada da sobrevida para os pacientes do Hospital das Clínicas/ Hospital do Câncer AC. Camargo pelo modelo matemático de Cox para avaliação do risco relativo de morte sob controle de idade, estádio, tratamento e tipos histológicos dos (log-likelihood 99,96 p=0.01)

						95,0% CI for Exp(B)	
	B	**SE**	**Wald**	**Sig.**	**Exp(B)**	**Inferior**	**Superior**
Sexo masculino	-2,183	1,151	3,596	,058	,113	,012	1,076
ADC Sólido			4,393	,355			
AIS	-11,980	187,532	,004	,949	,000	,000	2,660
ADC Acinar	-,503	1,201	,175	,676	,605	,057	6,371
ADC Pailífero	1,526	1,302	1,374	,241	4,598	,359	58,940
CCE	,346	1,244	,077	,781	1,413	,123	16,201
Estadio			3,115	,211			
Estadio (N1)	-1,705	,967	3,112	,078	,182	,027	1,208
Estadio (N2)	-15,125	269,630	,003	,955	,000	,000	8,730
Idade ≤65 anos	-3,627	1,299	7,792	,005	,027	,002	,340
Hyal1			,745	,689			
Hyal 1(1)	-,216	,949	,052	,820	,806	,126	5,175
Hyal 1(2)	-,637	,739	,743	,389	,529	,124	2,251
Hyal 3			2,657	,265			
Hyal 3(1)	1,573	1,008	2,434	,119	4,822	,668	34,793
Hyal3(2)	1,618	1,090	2,202	,138	5,045	,595	42,759
HAS1			,601	,740			
HAS1(1)	,330	,926	,127	,721	1,391	,226	8,547
HAS1(2)	-,440	,922	,228	,633	,644	,106	3,923
HAS2 (4,2%)			4,301	,116			
HAS2(32,6%)	2,163	1,054	4,215	**,040**	8,698	1,103	68,577
HAS2(14,6%)	1,017	,858	1,407	,235	2,766	,515	14,850
HAS3 (0.49%)			5,701	,058			
HAS3(1) (60,44%)	-,808	1,074	,566	,452	,446	,054	3,656
HAS3(2) (10,01%)	1,917	,874	4,815	,028	6,802	1,227	37,704

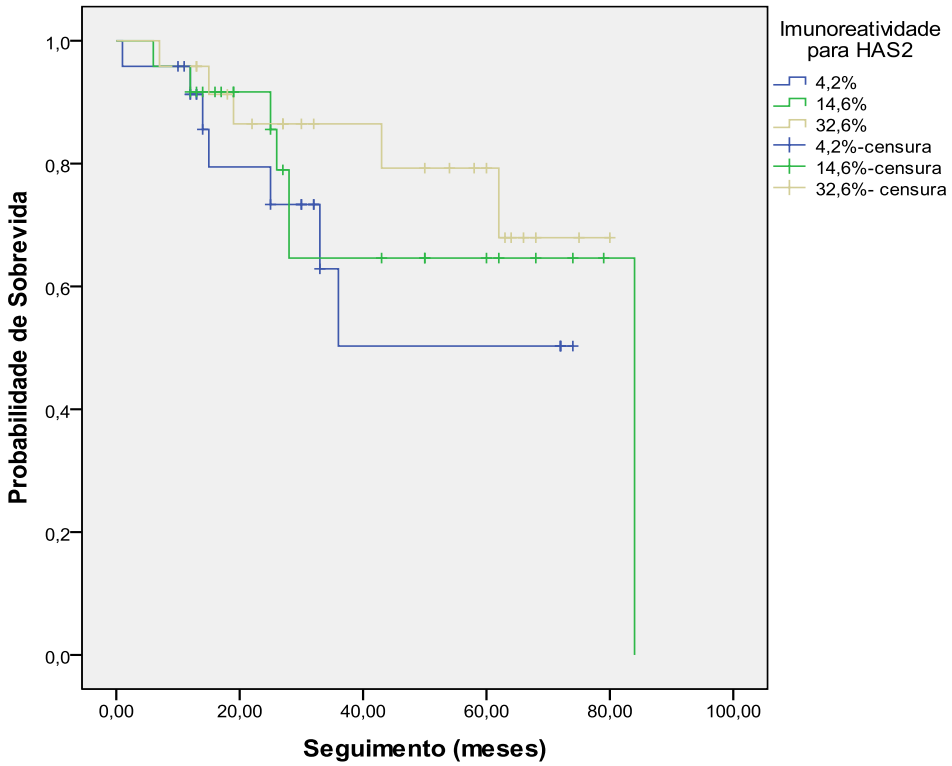


Figura 23. Probabilidade para sobrevida *versus* tempo de seguimento dos pacientes do Hospital das Clínicas/ Hospital do Câncer AC. Camargo obtida pelas curvas de Kaplan-Meier, de acordo com a imunoexpressão da HAS2. O grupo de pacientes com tumores exibindo imunoexpressão de HAS2 >= 32,6 % apresenta melhor chance de sobrevida do que o grupo com imunoreatividade baixa

4.4 Avaliação Imunoproteica da E-caderina, TGF-β, HAS 1, HAS 2 e HAS 3, Hyal 1 e Hyal 3 nos tumores de pacientes do Hospital Universitário de Coimbra

Nas figuras, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30, estão representadas respectivamente as células neoplásicas nos carcinomas de células escamosas e subtipos de adenocarcinoma, corados com imunohistoquímica

para E-caderina, TGF-β, HAS1, HAS2 e HAS3, Hyal 1 e Hyal 3 dos pacientes do Hospital Universitário de Coimbra.

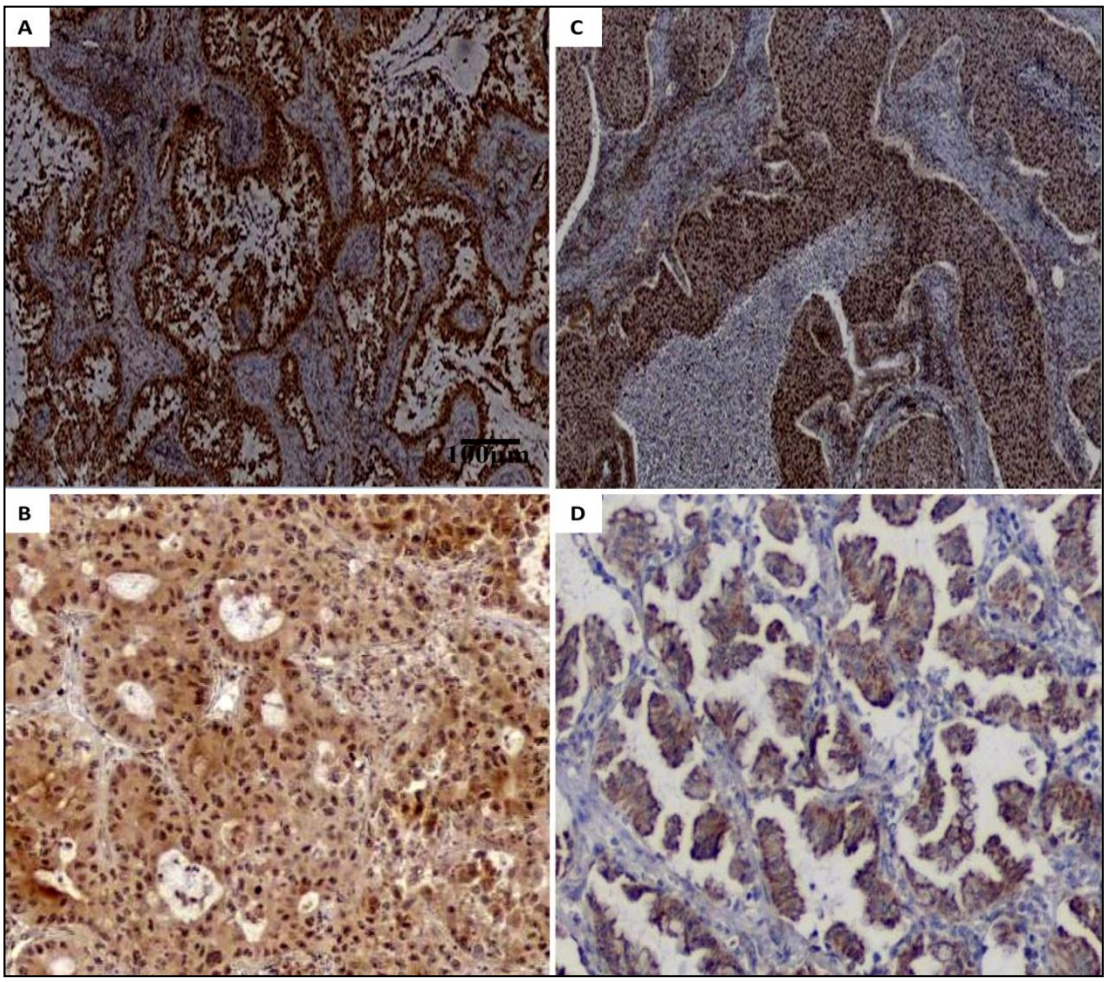


Figura 24. Imunoexpressão de Hyal 1 pelas células neoplásicas. **(A)** Adenocarcinoma *in situ* (*AIS*), **(B)** adenocarcinoma predominatemente acinar, **(C)** Carcinoma de células escamosas e **(D)** adenocarcinoma predominantemente papilífero. Imunohistoquímica X100 µm

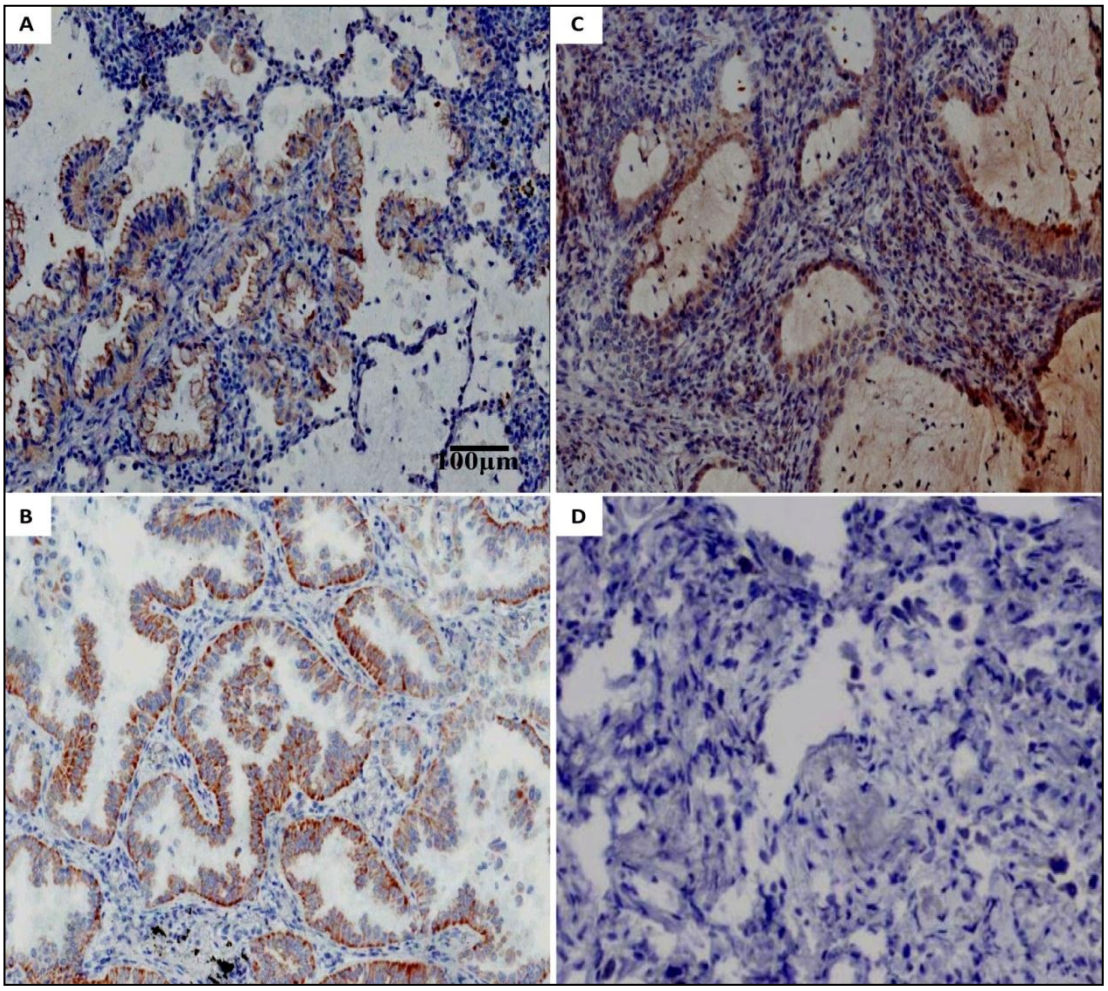


Figura 25. Imunoexpressão de Hyal 3 pelas células neoplásicas e controle. **(A, B)** adenocarcinoma predominatemente predominantemente papilífero, **(C)** adenocarcinoma predominatemente acinar e **(D)** Parenquima normal. Imunohistoquímica X100 µm

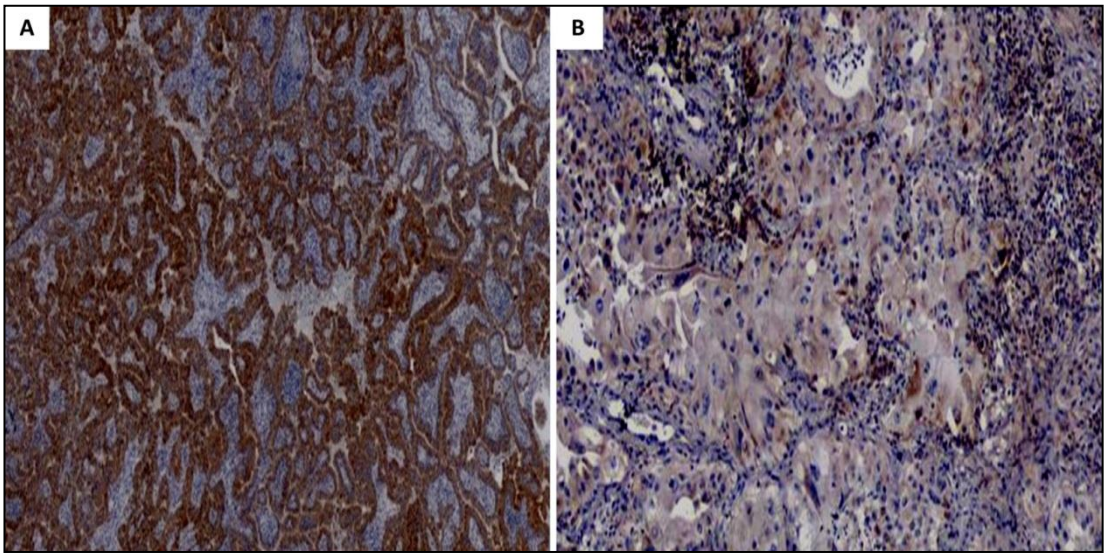


Figura 26. Imunoexpressão de HAS1 pelas células neoplásicas. **(A)** adenocarcinoma predominatemente predominantemente papilífero, e **(B)** Carcinoma de células escamosas. . Imunohistoquímica X 100

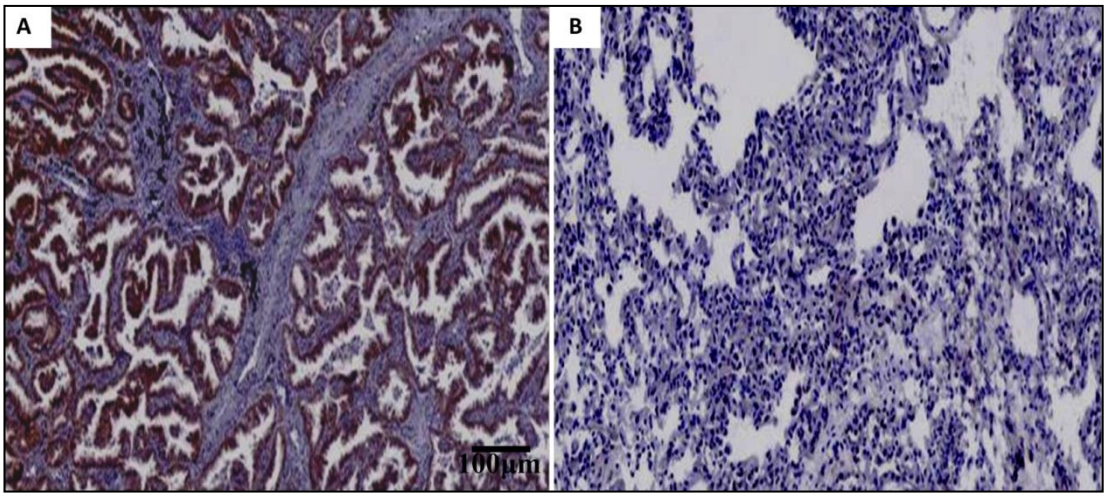


Figura 27. Imunoexpressão de HAS2 pelas células neoplásicas e controle. **(A)** Adenocarcinoma *in situ* (*AIS*) e **(B)** Parenquima normal. Imunohistoquímica X 100 µm

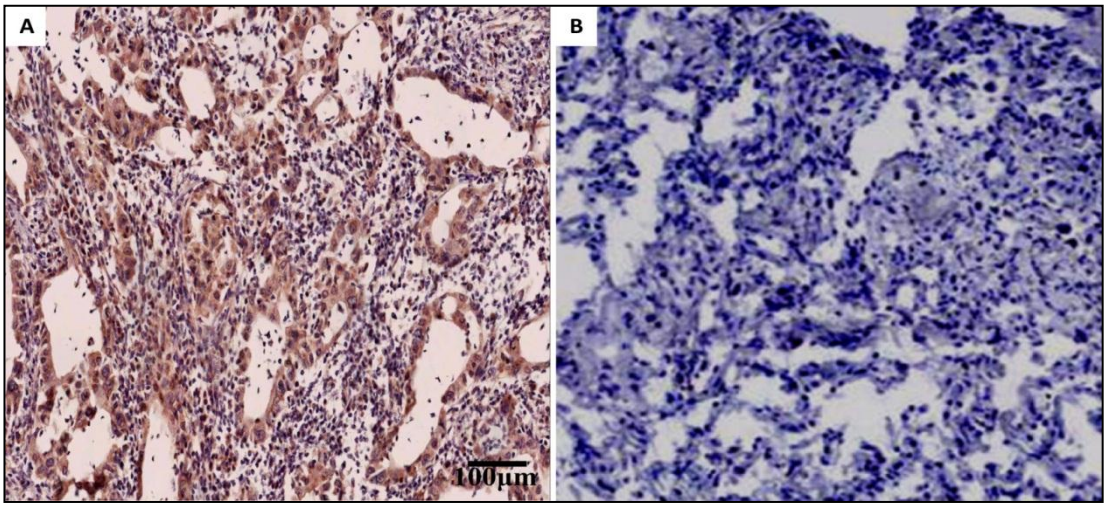


Figura 28. Imunoexpressão de HAS3 pelas células neoplásicas e controle. **(A)** Adenocarcinoma *in situ (AIS)* e **(B)** parenquima normal. Imunohistoquímica X 100 µm

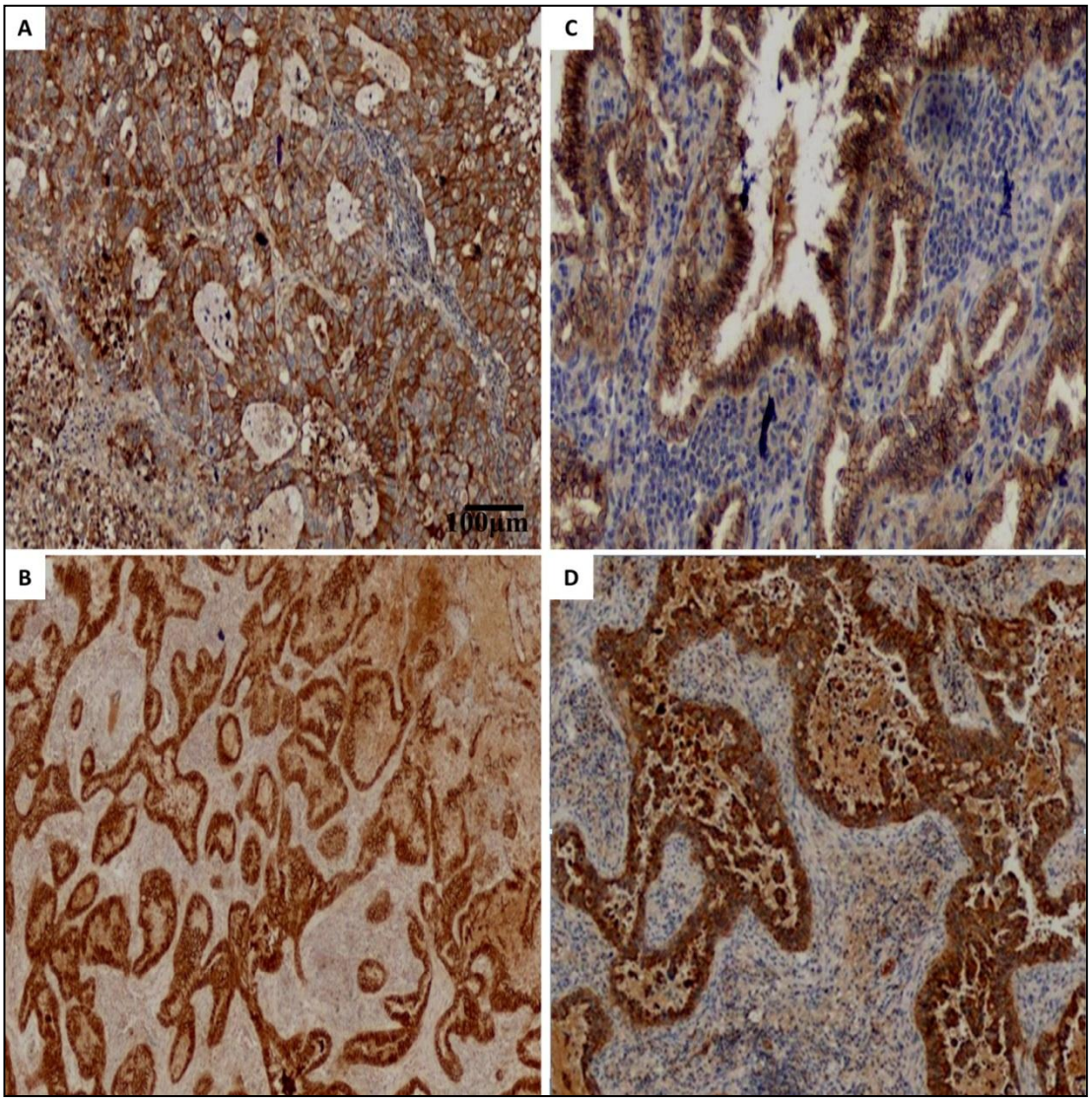


Figura 29. Imunoexpressão de E-caderina pelas células neoplásicas. **(A)** adenocarcinoma predominantemente Acinar, **(B)** adenocarcinoma predominantemente papilífero, **(C)** carcinoma de células escamosas **(D)** Adenocarcinoma *in situ* (*AIS*). Imunohistoquímica x100 µm

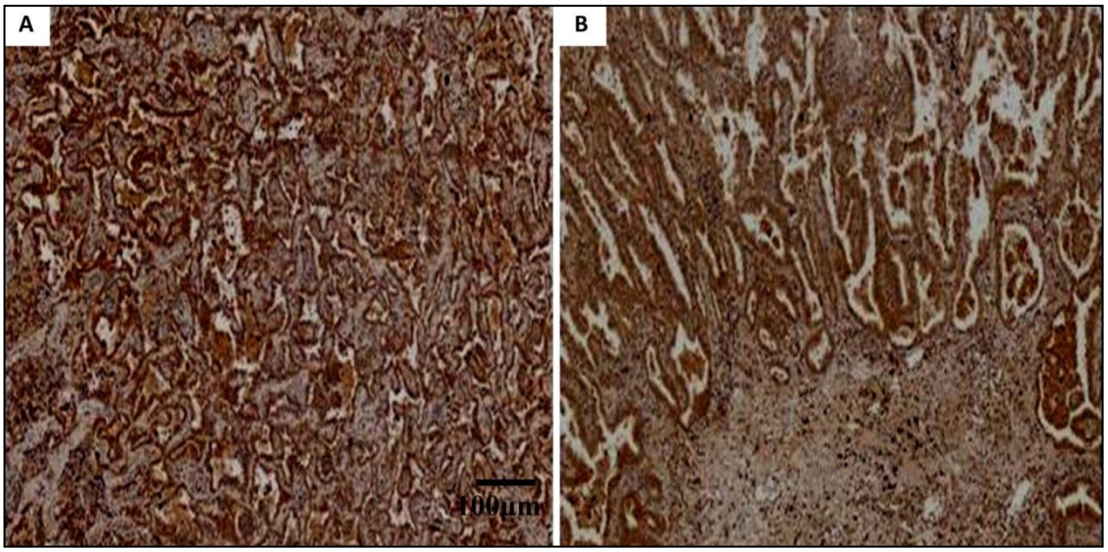


Figura 30. Imunoexpressão de TGF-β pelas células neoplásicas. **(A)** adenocarcinoma predominantemente acinar, e **(B)** adenocarcinoma predominantemente papilífero. Imunohistoquímica x 100 µm

4.4.1 Histomorfometria

O resultado da média de intensidade de expressão das HAS1, 2 e 3, Hyal 1,3, TGF- β e E-caderina em todos os tumores e grupo controle está detalhado na Tabela 17. Os tumores tiveram maior intensidade de expressão para HAS1, 2 e 3, e Hyal 1 e 3, quando comparados ao estroma e controles ($p<0,05$). A expressão de TGF-β e E-caderina foi significativamente maior nos tumores em relação ao estroma.

Tabela 17. Sumário dos resultados morfométricos de acordo com a intensidade de expressão nos tumores, estroma e controles

	Média			Variação		
Marcadores*	**Tumor**	**Estroma**	**Controle**	**Tumor**	**Estroma**	**Controle**
HAS 1	42.72#	13.92	2.18	0.00-137.6	0.00-75.71	0.07-9.15
HAS 2	30.72##	10.45	4.83	0.01-124.25	0.30-38.34	0.00-23.24
HAS 3	53.98###	11.70	9.14	0.00-109.05	0.20-56.32	0.00-34.56
Hyal 1	91.75####	27.30	3.57	42.51-136.95	0.11-62.27	0.20-9.65
Hyal 3	34.42#####	12.72	17.49	0.00-114.45	0.02-68.37	0.00-76.61
TGF-β	85.70######	57.8	-	32.32-138.20	2.65-87.65	-
E-caderina	57.78#######	64.31	-	5.69-146.11	3.2-96.35	-

**Densidade numérica de células imunoreativas mensuradas através da intensidade de coloração do citoplasma e da membrana citoplasmática de cada célula residente no sistema ACIS III= Índice de Positividade (IP) (IP=Intensidade de coloração X área positiva/área total).*
HAS1: # tumor VS estroma (p=0.002); tumor VS controle (p=0,002)
HAS2: ## tumor VS estroma (p=0.001); tumor VS controle (p=0,004)
HAS3: ### tumor VS estroma (p=0,0001); tumor VS controle (p=0,0001)
Hyal 1: #### tumor VS estroma (p=0,0001); tumor VS controle (p=0,0001)
Hyal 3: ##### tumor VS estroma (p=0,0001); tumor VS controle (p=0,002)
TGF-β: ###### tumor VS estroma (p=0,0001);
E-caderina: ####### tumor VS estroma (p=0,0001)

Em relação ao tipo histológico, HAS3 esteve predominantemente expressa nas células tumorais dos adenocarcinomas (p=0, 016), enquanto que Hyal 3 teve maior expressão nas células estromais dos carcinomas de células escamosas (p=0,002). Em relação aos subtipos de adenocarcinoma, houve diferença estatística entre a maior expressão de TGF-β e HAS3 pelas células do adenocarcinoma in situ (p≤0,05) em relação aos demais subtipos. Igualmente significante foi a maior expressão de HAS1 pelas células neoplásicas dos adenocarcinomas papilíferos (p≤0,05). Não houve associação entre os demais marcadores e os tipos e subtipos histológicos.

A correlação feita dentre todas as variantes demonstrou que os pacientes que expressaram TGF-β no estroma também apresentaram alta expressão de E-caderina no estroma (R: 0,49; p=0,008).O mesmo fenômeno ocorreu em relação a TGF-β no tumor e HAS2 no estroma (R: 0.40, p=0.03), e-caderina no estroma e HAS2 no tumor (R: 0.47, p=0.11), Hyal 1 no tumor e HAS1 no estroma (R: 0.33, p=0.03), Hyal3 e HAS 1 no estroma (R: 0.58 p= 0.02), Hyal 3 no tumor e HAS 1 no estroma (R: 0.44, p=0.01) e Hyal 3 e HAS1 no tumor (R: 0.35, p=0.10).

No entanto, correlações negativas ocorreram entre TGF- β, HAS3 e Hyal 1, onde a expressão de TGF-β foi menor na presença de HAS3 no estroma (R: 0.54, p=0.004) e quando Hyal 1 estava expressa no tumor (R: 0.40, p=0.03). Igualmente significativas foram as associações negativas entre HAS1 e os subtipos acinar e papilífero (R= -0,35, p=0,02 e R=-0,49, p=0,05, respectivamente).

Em relação ao histórico de tabagismo, as proteínas que estiveram mais expressas em pacientes com história positiva foram HAS1 (p=0,10), HAS3 (p=0,01) e Hyal 1 (p=0,03). Interessantemente, os pacientes com história de tabagismo, tiveram uma correlação negativa com os adenocarcinomas acinares (R:-0.35, p=0.02), Tabela 18.

Em relação ao estadiamento, E-caderina esteve mais expressa nos casos que não tiveram metástases linfonodais (p=0.30).

Tabela 18. Associação entre as expressões dos marcadores e as variáveis clínicas

		Estadio N	TGF-β	E-cad	HAS1	HAS2	HAS3
Hist. Tabagimo	R				0.38		0.40
	p				0.01 **		0.05 *
ADC Acinar	R				-0.35		
	p				0.02*		
ADC Papilífero	R				-0.49		0,27
	p				0.05*		0,04*
TGF- β	R			0.49		0.40	-0.54
	p			0,008 **		0.03	0.004
E-cad	R					0.47	
	p					0,011**	
Hyal1	R				0.33		
	p				0,03*		
Hyal3	R				0.35		
	P				0,01**		

Associação entre TGF-β, E-caderina, HAS1, 2 e 3. O Teste bivariado de Pearson foi utilizado para identificar associações entre variáveis em tumores e controles. R= coeficiente de correlação; p= significância estatística.

* P ≤ 0.05

** P ≤ 0.01 .

4.4.2 Análise da sobrevida

Verificamos o impacto na sobrevida da imunoexpressão de Hyal 1e 3, HAS1, 2 e 3, TGF-β e E-caderina pelos tumores dos pacientes do Hospital Universitário de Coimbra. Cinco variáveis estiveram significativamente associadas com tempo de sobrevida, ao se controlar o modelo para estádio e tipos histológicos, e incluíram idade, sexo, estadio N , e níveis de imunoexpressão proteica de HAS2 e HAS3 (Tabela 19). Por exemplo, constatamos que o estadio não esteve associado a sobrevida. Todavia, quando a imunoexpressão proteica de HAS2 e HAS3 estiveram presentes como covariadas, a correlação entre estadio e sobrevida foi marginalmente significativa (p=0.07). A analise multivariada mostrou menor risco de morte para sexo feminino (R=0,11), idade < 69 anos (R= 0,02), estádio I e II (R=0,18 e 0,00) e maior risco de morte para tumores com imunoexpressão proteica de HAS2 < 14.6% (R=8,69) e HAS3 > 7.4% (R=6,80). A curva de probabilidade para sobrevida *versus* tempo de seguimento dos pacientes mostra que o grupo com imunoexpressão proteica de HAS2 > 14,6% apresenta melhor chance de sobrevida do que o grupo com menor imunoexpressão (Figura 31). Em contraste, o grupo com menor imunoexpressão de HAS2 apresenta menor chance de sobrevida em relação ao grupo com maior imunoexpressão .

Tabela 19. Análise multivariada da sobrevida para os pacientes do Hospital da Universidade de Coimbra pelo modelo matemático de Cox para avaliação do risco relativo de morte sob controle de idade, estadio, tratamento e tipos histológicos (log-likelihood 99,96 p=0.01)

	Coeficiente B	**Erro Padrão**	**Método Wald**	**Sig**	**Risco (B)**	**95,0% IC para Coef (B)**	
						Inferior	**Superior**
Sexo feminino	-2,18	1,15	3,59	0,05	0,11	0,01	1,07
Idade < 69 a	-3,62	1,29	7,79	0,005	0,02	0,002	,34
ADC solido			4,39	0,35			
ADC *in situ*	-11,98	187,53	0,00	0,94	0,00	0,00	2,66
ADC acinar	-0,50	1,20	0,17	0,67	0,60	0,05	6,37
ADC papilífero	1,52	1,30	1,37	0,24	4,59	0,35	58,94
CCE	0,34	1,24	0,07	0,78	1,41	0,12	16,20
Estadio III			3,11	0,21			
Estadio I	-1,70	0,96	3,11	0,07	0,18	0,02	1,20
Estadio II	-15,12	269,63	0,00	0,95	0,00	0,00	8,73
Hyal 1			0,74	0,68			
Hyal1 < 31,9%	-0,21	0,94	0,05	0,82	0,80	0,12	5,17
Hyal1> 31,9%	-0,63	0,73	0,74	0,38	0,52	0,12	2,25
Hyal 3			2,65	0,26			
Hyal 3 < 70,8%	1,57	1,00	2,43	0,11	4,82	0,66	34,79
Hyal 3 > 70,8%	1,61	1,09	2,20	0,13	5,04	0,59	42,75
HAS1			0,60	0,74			
HAS1 < 22,8%	0,33	0,92	0,12	0,72	1,39	0,22	8,54
HAS1 > 22,8%	-0,44	0,92	0,22	0,63	0,64	0,10	3,92
HAS2			4,30	0,11			
HAS2 < 14,6%	2,16	1,05	4,21	0,04	8,69	1,10	68,57
HAS2 > 14,6%	1,01	0,85	1,40	0,23	2,76	0,51	14,85
HAS3			5,70	0,05			
HAS3 < 7,4%	-0.80	1,07	0,56	0,45	0,44	0,05	3,65
HAS3 > 7,4%	1,91	0,87	4,81	0,02	6,80	1,22	37,70

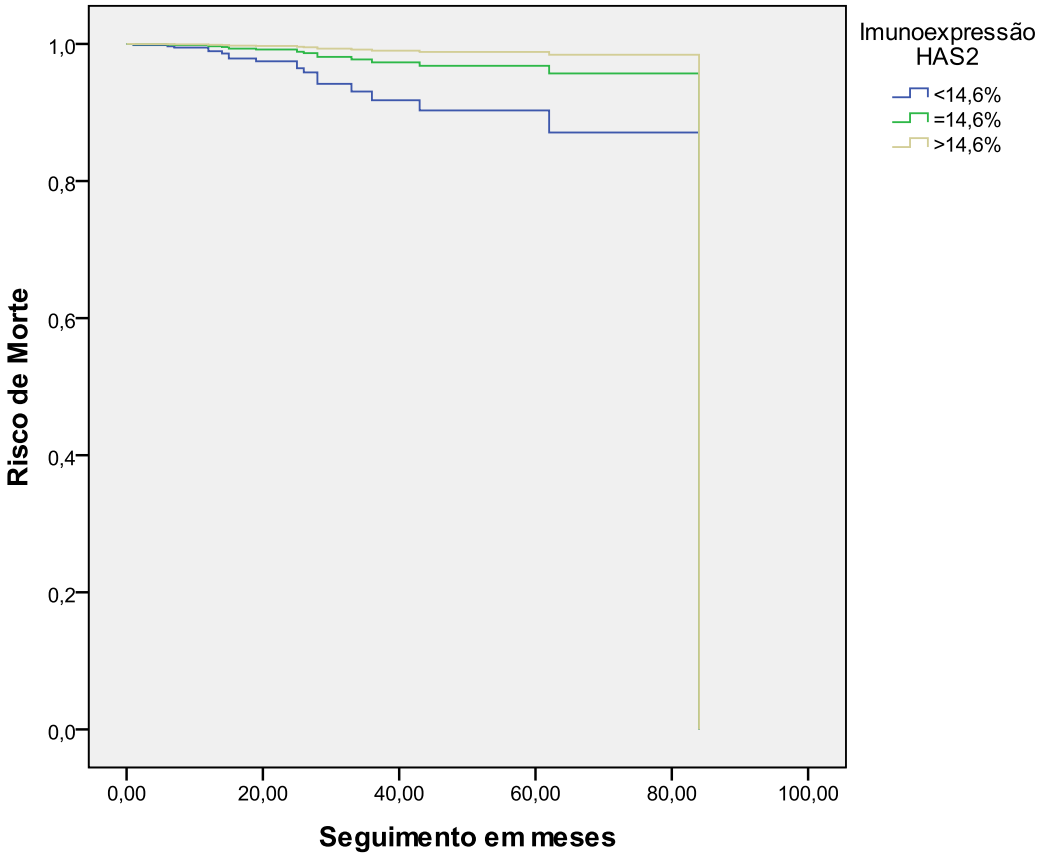


Figura 31. Curva de probabilidade para sobrevida *versus* tempo de seguimento dos pacientes do Hospital Universitário de Coimbra obtida pela Regressão de Cox, de acordo com a imunoexpressão da HAS2

4.5 Comparação entre a Imunoexpressão das HAS 1,2 e 3 e Hyal 1 e 3 nos tumores de pacientes do Hospital das Clínicas/ Hospital do Câncer AC. Camargo e Hospital Universitário de Coimbra

Os resultados da imunoexpressão das HAS1, 2 e 3 e Hyal 1 e 3, obtidos dos dois grupos de pacientes foram comparados e estão dispostos na tabela 20.

Tabela 20. Comparação entre a Imunoexpressão das HAS1,2 e 3 e Hyal 1 e 3 nos tumores de pacientes do Hospital das Clínicas/ Hospital do Câncer AC. Camargo e Hospital Universitário de Coimbra

Pacientes		Média	Desvio Padrão	Significância
HAS1 tumor	Coimbra*	42,71	38,05	0,002
	Brasil	26,41	20,76	
HAS2 tumor	Coimbra*	30,71	33,22	0,02
	Brasil	19,49	17,75	
HAS3 tumor	Coimbra*	53,97	34,45	0,0001
	Brasil	10,01	10,26	
Hyal1 tumor	Coimbra*	91,74	18,67	0,0001
	Brasil	33,37	16,20	
Hyal 3 tumor	Coimbra	34,41	33,25	0,0001
	Brasil*	72,61	26,15	

Densidade numérica de células imunoreativas mensuradas através da intensidade de coloração do citoplasma e da membrana citoplasmática de cada célula residente no sistema ACIS III= Índice de Positividade (IP) (IP= média da intensidade de coloração X média da área positiva/área total).

* Significância estatística: $p \leq 0,05$.

A imunoexpressão das HAS1, 2 e 3 e Hyal 1 foi significativamente maior nos tumores de pacientes do Hospital Universitário de Coimbra, enquanto que a imunoexpressão de Hyal 3 foi significativamente maior nos tumores de pacientes brasileiros.

5 DISCUSSÃO

Estudamos a expressão gênica das HYAL selvagens e variantes, moléculas estas envolvidas no processo de invasão e angiogênese tumoral, nos carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas ressecados de pacientes atendidos e acompanhados no Hospital das Clínicas e Hospital AC Camargo. Demonstramos que HYAL1-wt, HYAL1-v1, HYAL1-v2, HYAL2-wt, HYAL3-wt, e HYAL3-v1 foram expressas preferencialmente em tecidos tumorais comparados com os respectivos controles. A expressão de HYAL associou-se aos tipos histológicos, especificamente a HYAL1-wt nos CCE, HYAL3-v1 nos ADC, e HYAL1-v1 nos subtipos acinares. A expressão de HYAL1-v4 e HYAL1-v5 foram raras, tanto nos tecidos controles como tumorais. Demonstramos também que a expressão de HYAL1-wt esteve associada com prognóstico desfavorável. HYAL1-wt produz a HYAL enzimaticamente ativa responsável pela degradação do acido hialurônico em pequenos fragmentos indutores da mobilização e invasão das células neoplásicas. Nossos achados são concordantes com estudo prévio que demonstrou a HYAL1-wt somente em tumores de bexiga de alto grau, linfonodos e linhas celulares de câncer de próstata (Lokeshwar et al, 2002). Nossos resultados revelaram ainda que a expressão de HYAL3-v1 em amostras tumorais é preditiva de longa sobrevida para os pacientes. Durante o evento de *splicing* alternativo, as variantes se tornam enzimaticamente inativas devido à perda de pelo menos 30 aminoácidos da proteína (Mackovic-

Housley et al., 2000). Esta seqüência é codificada por um éxon de 90-pb presente em ambos os genes HYAL1 e HYAL3. Estes 30 aminoácidos formam o sítio catalítico de clivagem da ligação glicosídica entre N-acetil-D-glicosamina e o ácido D-glicurônico. Desde que o HA é um polímero formado de unidades dissacarídeos repetidas de N-acetil D-glicosamina e ácido D-glicurônico, ele não é degradado por HAases codificadas pelas variantes de HYAL1 and HYAL3. Conseqüentemente, a degradação do HA é restrita as HAases que assim se originam das transcritas selvagens (Mackovic-Housley et al., 2000). Os produtos originados pela degradação do HA em fragmentos constituídos por 2 a 25 dissacarídeos, estimulam a proliferação de células endoteliais através da indução da atividade da proteína tirosino-quinase e ativação de vias de transdução de sinal, sendo esse um processo essencial para indução de angiogênese, fundamental no processo de progressão das neoplasias (Halici et al., 2004; Slevin et al., 1998).

Demonstramos previamente que a expressão das variantes HYAL em tumores de próstata está associada com baixos escores de Gleason diminuindo a recorrência dos tumores. Especificamente, HYAL3-v1 esteve presente em tumores com baixos escores de Gleason e na hiperplasia prostática benigna enquanto que HYAL3-v2 e HYAL1-v3 foram expressas preferencialmente por tumores que não recorreram (de Sá et al, 2009). Outro estudo, mencionado anteriormente, que caracterizou um domínio EGF-like, presente na estrutura das HAases, nos auxilia a compreender a correlação entre HYAL3-v1 e tumores de bom comportamento. Por esta variante ser a única que perde o domínio EGF-like, é possível que este domínio atue em

processos de interação proteína-proteína, célula-célula e célula-matriz, promovendo a proliferação (Chao et al., 2007).

HYAL2-wt foi expressa em proporções similares de CCE e ADC. No entanto, detecção de HYAL2 e deleções de FHIT (tríade histidina frágil) em tabagistas está associada com o diagnóstico de câncer de pulmão (Li et al, 2007). Em adição, foi demonstrada a correlação entre a presença de HA clivado em fragmentos de 50 a 60 dissacarídeos gerados pela HYAL2-wt e linfomas não Hodgkin B de bom prognóstico (Bertrand et al, 2006).

Apesar dessas demonstrações de que as formas inativas das Hyal 1 e 3 ou a Hyal 2 selvagem que degrada o HA em fragmentos maiores estão correlacionadas a tumores de melhor prognóstico, existem evidências na literatura de que os níveis aumentados de HA favoreceriam o crescimento e a invasão tumoral, além de oferecer proteção contra o sistema imunológico (Pure e Cuff, 2001). Porém esses dados são provenientes de estudo de tumores cavitários, mesoteliomas, diferente de tumores de órgãos parenquimatosos.

É importante citar que outros componentes presentes na MEC que interagem com o HA, podem interferir no mecanismo de desenvolvimento tumoral, causando esta aparente contrariedade. Entre eles, citam-se os proteoglicanos de condroitim sulfato e dermatam sulfato (versican), agrecam e sindecam 1, que atuam em diversos mecanismos celulares dependendo de sua interação com outros glicosaminoglicanos; além de modular a atividade de fatores de crescimento celular, poderiam facilitar o desenvolvimento tumoral, mesmo sem a degradação do HA.

Nesta primeira etapa do trabalho, concluímos que a expressão das variantes de HYAL está associada com morfologia, estadiamento e sobrevida de pacientes com ADC e CCE. Particularmente, HYAL1-wt e HYAL3-v1 afetam a motilidade e invasividade tumorais, sugerindo que estratégias direcionadas a modulação dos níveis de HYAL1-wt e HYAL3-v1 podem ser promissoras no tratamento do câncer de pulmão. A validação de tais resultados deverá ser realizada em larga escala de estudos randomizados e prospectivos.

Diante das variações de expressão gênica constatadas nos tumores de pacientes do Hospital das Clínicas e Hospital AC. Camargo, prosseguimos a investigação para estudar a imunoexpressão das Hyal 1 e 3 e HAS1, 2 e 3 nos CCE e ADC, oriundos dos mesmos pacientes. Observamos que a intensidade de expressão de Hyal 3 foi maior pelas células tumorais quando comparada aos controles, porém esta diferença foi marginalmente significante. Já o resultado da análise da freqüência de imunoexpressão das Hyal 1 e 3, e HAS1, 2 e 3 demonstrou expressão na maioria dos espécimes tumorais e controles. A associação entre as variáveis foi testada e evidenciou imunoexpressão concomitante de HYAL e HAS nos tumores. Com relação aos tipos histológicos, não houve diferença estatística entre a expressão das Hyal 1 e 3, HAS1, 2 e 3 pelos tumores na população de pacientes do Hospital das Clínicas e Hospital AC. Camargo. O impacto da imunoexpressão de Hyal e HAS foi testado com intuito de construir um modelo matemático de sobrevida relevante. O modelo matemático resultante, controlado para sexo, idade e estadiamento mostrou risco de

morte associado com adenocarcinoma sólido e imunoreatividade para HAS2 e HAS3.

Para validar os resultados obtidos, sobretudo com a imunoexpressão das Hyal 1 e 3 e HAS1, 2 e 3 nos CCE e ADC de pulmão, estudamos a população de pacientes do Hospital Universitário de Coimbra. Documentamos pela primeira vez uma via pela qual a hiperexpressão de HAS3 e Hyal 3 respectivamente por células epiteliais neoplásicas e mesenquimais podem favorecer a invasão respectivamente nos ADC e CCE. HAS3 representa a mais ativa forma das HAS, responsável pela síntese de HA de baixo peso molecular (2 x 10^6 Da), o qual contribui na formação autônoma da matriz pericelular e interação com receptores CD44 e RHAMM, ativando cascatas sinalizadoras celulares e conduzindo a alterações no comportamento tumoral. HAS3 é reconhecida como contribuinte ao fenótipo maligno de diversos tumores (Teng et al., 2011; Lai et al., 2010; Itano et al., 2004). Metástases tumorais representam uma serie complexa de eventos nas quais as células migram através dos compartimentos teciduais, disseminando-se a sítios distantes. O HA desempenha um importante papel regulatório do crescimento tumoral e metástases através de seus receptores de superfície celular CD44, mediando a adesão celular a MEC, um pré-requisito para a migração tumoral (Knudson, Knudson, 2004). A invasão tumoral envolve movimento ativo das células através da MEC (Kohn et al., 1995). A adesão a MEC, um passo critico no processo metastático, tem sido atribuída a dependência das HAases em muitos tumores como já mencionado. Nossos achados indicam que a alta expressão de HAS3 e Hyal 1 em ADC e CCE, representam uma

importante força diretriz para a invasão das células neoplásicas. Assim, a imunoexpressão de HAS3 e Hyal 1 pode compor a base para uma importante via invasiva tumor-induzida. Surpreendentemente, demonstramos que ADC predominantemente acinares e papilares estiveram inversamente associados com a imunoexpressão de HAS1 pelas células mesenquimais, enquanto que uma associação direta foi constatada entre ADC predominantemente papilífero e imunoexpressão de HAS3 e Hyal 1 pelas células tumorais. Esses achados sugerem que uma alta imunoexpressão de HAS1 e 3 pelas células epiteliais neoplásicas confere mais agressividade aos ADC acinares e papilares, mas uma expressão negativa de HAS1 pelas células mesenquimais confere um papel protetor a MEC auxiliando-a a evitar a invasão pelas células tumorais em ambos os tipos subtipos histológicos. Nossos achados ganham suporte na recente validação da nova classificação dos ADC de pulmão proposta pela IASLC/ATS/ERS em uma série Norte americana (Yoshizawa et al., 2011) e uma série de pacientes australianos (Russell et al., 2011). De acordo com ambas as séries, os novos subtipos de ADC *in situ*, minimamente invasivo e predominantemente lepídico, apresentam taxa de sobrevida em 5 anos de aproximadamente 100%, enquanto que os subtipos predominantemente micropapilíferos e sólido estão associados com sobrevida desfavorável, sendo intermediário o prognóstico dos predominantemente acinares e papilares. Como previamente mencionado por Golshani et al. (2008), a hiperexpressão de HAS é um provável contribuinte do acúmulo de HA nos tecidos, assim promovendo o crescimento tumoral e as metástases na carcinogênese experimental.

A interação entre a expressão das Hyal 1 e 3 e HAS1, 2 e 3 foi avaliada em relação à expressão das proteínas de transição epitélio-mesenquimal nos tumores de pacientes do Hospital Universitário de Coimbra. No presente estudo, uma associação positiva foi demonstrada entre a expressão de TGF-β pelas células tumorais e HAS2 pelas células mesenquimais, assim como a expressão entre a E-caderina pelas células mesenquimais e HAS2 pelas células tumorais. Todavia, uma associação negativa foi demonstrada entre TGF-β, HAS3, e Hyal 1, onde a expressão de TGF-β foi inferior na presença da HAS3 nas células mesenquimais dos tumores pulmonares, e Hyal 1 em células tumorais. O fato que HAS2 tem a capacidade de ativar TGF-β latente sugere uma via autócrina e parácrina na qual a deposição do colágeno e a invasão posterior podem ser potencializadas (Taipale et al., 1998). A ativação do TGF-β latente também providencia uma via adicional para a supressão imunológica tumor-induzida (Beck et al., 2001). Em adição, Sun et al. (2001), demonstraram que os fragmentos de HA tem a capacidade de regular TGF-β por uma via CD44-dependente. Com relação à E-caderina, alguns estudos relatam que TGF-β afeta o complexo adesão celular mediada por E-caderina-catenina nas células tumorais. Todavia, um estudo em cultura de células pancreáticas conduzido para avaliar a indução do complexo E-caderina-catenina por adição de TGF-β ao meio de cultura, demonstrou que o tratamento das células do tumor pancreático com TGF-β resultava em redução da adesão celular devido à dissociação da E-caderina-catenina do citoesqueleto (Vogelmann et al., 2005). Sayo et al. (2002), demonstrou em queratinocitos

cultivados humanos que TGF-β pode também regular a expressão de HAS por supressão HAS3. Esses resultados dão suporte a nossos achados de hiperexpressão de HAS3 e Hyal 1 na ausência de TGF-β, assim sugerindo que uma diminuição na expressão do TGF-β poderia também conferir um fenótipo mais invasivo já que HAS3 e Hyal1 estão mais expressos nesta situação. Como previamente mencionado, HAS3 sintetiza HA de baixo peso molecular, e interessantemente, Hyal1 é a enzima responsável por sua degradação. Outras associações positivas encontradas neste estudo foram aquelas associando Hyal 1 nas células tumorais e HAS1 nas células mesenquimais, Hyal 3 e HAS1 nas células mesenquimais, Hyal 3 nas células tumorais e HAS1 nas células mesenquimais, e Hyal 3 e HAS1 nas células tumorais. A correlação direta entre HAS1 e Hyal 3 indica que a expressão simultânea dessas duas enzimas pode conferir um prognóstico melhor, devido a habilidade do HAS1 sintetizar uma longa cadeia de HA, enquanto Hyal 3 cliva o HA em grandes fragmentos, ajudando assim a preservar a estrutura da MEC. Com relação à imunoreatividade da Hyal 3 encontrada em células mesenquimais do CCE, não há estudos prévios avaliando a expressão desta enzima em tumores pulmonares. A expressão desta proteina pelas células mesenquimais pode contribuir à degradação do HA, favorecendo o crescimento cellular, a migração e consequentemente a invasão. Nossos achados mostram um impacto clínico. As variantes mais expressas nos tumores de pacientes tabagistas foram HAS1, HAS3, e Hyal 1. De fato, Caslino-Matsuda et al. (2009), relatam que o estresse oxidativo causado pelo tabaco (fumo do cigarro) *in vivo* ou *in vitro* induz ativação da

via MAPK por aumento na interação entre HA e seus receptores, interessantemente, e como esperado, pacientes com história de tabagismo portadores de ADC apresentaram uma correlação negativa com o subtipo acinar. Com relação ao estadiamento, E-caderina foi expressa na maioria dos casos sem metástases linfonodais. De fato, Wang et al. (2011), estudaram a expressão do Twist e E-caderina no câncer primário e metastático. Esses autores mostraram que a expressão da E-caderina foi mais elevada nos tumores primários que nas metástases. Concluímos que as hialuronidases, as sintases do ácido hialurônico, E-caderina, e TGF-β modulam uma via invasiva tumor-induzida nos ADC e CCE de pulmão, e estiveram associados a um espectro diferente de agressividade, uma vez que houve uma relação inversa entre a expressão de biomarcadores epiteliais e mesenquimais. Enquanto a hiperexpressão de HAS1 e HAS3 provê uma agressividade aos CCE e ADC, uma hiperexpressão de TGF-β e E-caderina, confere um efeito protetor à MEC ao evitar a invasão por células tumorais em ambos os tipos histológicos. Verificamos o impacto na sobrevida da imunoexpressão de Hyal 1 e 3, HAS1, 2 e 3, TGF-β e E-caderina pelos tumores dos pacientes do Hospital Universitário de Coimbra. A análise multivariada mostrou menor risco de morte para sexo feminino, idade < 69 anos, estádio I e II e maior risco de morte para tumores com imunoexpressão proteica de HAS2 < 14.6% e HAS3 > 7.4%.

Finalmente, comparamos os níveis de imunoexpressão das Hyal1e 3 e HAS1, 2 e 3 nos tumores ressecados no Hospital das Clínicas /Hospital AC. Camargo e Hospital Universitário de Coimbra. Verificamos

que a imunoexpressão das HAS1, 2 e 3 e Hyal 1 foi significativamente maior nos tumores de pacientes do Hospital Universitário de Coimbra, enquanto que a imunoexpressão de Hyal 3 foi significativamente maior nos tumores de pacientes brasileiros. Esses resultados demonstram que essas proteínas podem variar a sua expressão de acordo com o grupo étnico a que pertencem.

Nossos resultados sugerem que estratégias direcionadas à prevenção de alta síntese de HAS3 e Hyal 1, ou a resposta local baixa de TGF-β e E-caderina, poderão ter grande impacto no CP. Para finalizar essa conclusão, estudos prospectivos e randomizados em grande escala serão necessários.

6 CONCLUSÕES

A expressão das variantes de HYAL 1 e 3 associou-se a morfologia, estadiamento e sobrevida de pacientes com ADC e CCE operados no Hospital das Clínicas e Hospital do Câncer AC. Camargo. HYAL1-wt e HYAL3-v1 podem afetar a motilidade e a invasividade tumoral, sugerindo que estratégias direcionadas a modulação dos níveis de HYAL1-wt e HYAL3-v1 podem ser promissoras no tratamento do câncer de pulmão.

Na população de pacientes do Hospital das Clínicas e Hospital do Câncer AC. Camargo, a maioria dos espécimes tumorais e controles expressaram Hyal 1 e 3 e HAS1, 2 e 3. O modelo matemático de sobrevida, controlado para sexo, idade e estadiamento mostrou risco de morte associado com adenocarcinoma sólido e imunoreatividade para HAS2 e HAS3.

A hiperexpressão de HAS3 e Hyal 3 respectivamente por células epiteliais neoplásicas e mesenquimais pode favorecer a invasão respectivamente nos ADC acinares e papilíferos e CCE. No entanto, expressão negativa de HAS1 pelas células mesenquimais confere um papel protetor a MEC auxiliando-a a evitar a invasão pelas células tumorais em ambos os tipos subtipos histológicos.

Nos tumores de pacientes do Hospital de Coimbra, as imunoexpressões de HYAL 1 e 3, HAS1, 2 e 3, E-caderina e TGF-β, demonstraram estarem correlacionadas e podem modular uma via invasiva tumor-induzida nos ADC e CCE de pulmão, e estiveram associadas a um espectro diferente de

agressividade, uma vez que houve uma relação inversa entre a expressão de biomarcadores epiteliais e mesenquimais.

Estratégias direcionadas à prevenção de alta síntese de HAS3 e Hyal 1, poderão ter grande impacto no câncer de pulmão.

7 ANEXOS

Anexo 1. Câncer de Pulmão -Hospital das Clínicas/Hospital do Câncer AC. Camargo

	idade	sexo	data cirurgia	situção atual	sobrevida	estadiamento	recidiva	Tecido	Diagnóstico / Dissecção (MM)	HYAL 1 WT	HYAL1 V1	HYAL 1 V2	HYAL1 V3	HYAL1 V4	HYAL1 V5	HYAL 2 WT	HYAL 3 WT	HYAL3 V1	HYAL3 V2	HYAL3 V3
PU 1T	72	M	16.03.2007	MORTO	14 meses	T2 N1 MX	NÃO	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 20% da amostra. Foi removido, por microdissecção manual, o excesso de contaminantes.	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
PU 2T	69	F	27.03.2007	VIVO	33 meses	T1 N0 MX	SIM	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra.	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0
PU 4T	46	M	25.06.2007	MORTO	25 meses	T3N2M0	SIM	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 70% da amostra. Foi removido, por microdissecção manual, o excesso de contaminantes.	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
PU 5T	70	M	16.04.2007	VIVO	32 meses	T2N0M0	SIM	Pulmão	Carcinoma em 100% da amostra.	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
PU 6T	66	M	20.04.2007	MORTO	1 mês	T4N2M1	SIM	Pulmão	Carcinoma em 80% da amostra. Foi removido, por microdissecção manual, o excesso de contaminantes.	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0
PU 8T	68	F	09.11.2007	VIVO	25 meses	T2 N0 M0	NÃO	Pulmão	Carcinoma em 60% da amostra com borda de necrose. Foi removida, por microdissecção manual, a borda de necrose.	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
PU 9T	69	M	12.11.2007	MORTO	13 DIAS	T1 N1 MX	NÃO	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 95% da amostra com borda de necrose. Foi removida, por microdissecção manual, a borda de necrose.	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0

Continua...

Continuação Anexo 1

	idade	sexo	data cirurgia	situção atual	sobrevida	estadiamento	recidiva	Tecido	Diagnóstico / Dissecção (MM)	HYAL 1 WT	HYAL1 V1	HYAL 1 V2	HYAL1 V3	HYAL1 V4	HYAL1 V5	HYAL 2 WT	HYAL 3 WT	HYAL3 V1	HYAL3 V2	HYAL3 V3
PU 12T	76	M	17.11.2008	VIVO	13 meses	T2 N0 M0	NÃO	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 70% da amostra com borda de necrose. Foi removida, por microdissecção manual, a borda de necrose.	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
PU 14T	71	M	19.12.2008	VIVO	12 meses	T3N0M0	NÃO	Pulmão	Carcinoma em 95% da amostra com borda de necrose. Foi removida, por microdissecção manual, a borda de necrose.	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
PU 17T	70	M	08.10.2008	VIVO	14 meses	T2N0M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra.	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
PU 20T	64	F	02.02.2009	vivo	10 meses	T2N1M0	não	Pulmão	Carcinoma em 85% da amostra. Foi removido, por microdissecção manual, o excesso de contaminantes.	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
PU 23T	67	M	12/11/2008	vivo		T1N0M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
PU 24T	58	M	9/29/2008	vivo		T1 N0M0	NÃO	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 100% da amostra	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	
PU 27T	73	M	30/06/2001	vivo	25 meses	T2 N2 M0	sim	Pulmão	Adenocarcinoma em 80% da amostra com excesso de pleura e parênquima pulmonar não neoplásico ao redor da área tumoral. Foi retirado excesso de pleura e parênquima pulmonar não neoplásico ao redor da área tumoral	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Continua...

Continuação Anexo 1

	idade	sexo	data cirurgia	situção atual	sobrevida	estadiamento	recidiva	Tecido	Diagnóstico / Dissecção (MM)	HYAL 1 WT	HYAL1 V1	HYAL 1 V2	HYAL1 V3	HYAL1 V4	HYAL1 V5	HYAL 2 WT	HYAL 3 WT	HYAL3 V1	HYAL3 V2	HYAL3 V3
PU 29T	70	F	4/1/2006	morto	28 meses	T2N0M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 90% da amostra com excesso de pleura e parênquima pulmonar não neoplásico ao redor da área tumoral. Foi retirado excesso de pleura e parênquima pulmonar não neoplásico ao redor da área tumoral	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
PU 30T	82	M	1/23/2006	vivo		T1 N0 M0	NÃO	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 80% da amostra	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
PU 31T	74	F	10/23/2006	vivo		T1 N0 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma mucinoso em 100% da amostra	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
PU 32T	73	M	8/5/2008	morto	12 meses	T2 N2 M0	NÃO	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 100% da amostra	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
PU 33T	72	M	5/12/2005	morto	25 meses	T2N1 Mx	sim	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0		0	0		0	1	1	0	0	0
PU 35T	75	M	11/24/2008	vivo		T2N0Mx	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma bronquíolo-alveolar em 100% da amostra	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
PU 36T	72	M	7/24/2008	vivo		T2 N0 M0	NÃO	Pulmão	Carcinoma adenoescamoso em 100% da amostra	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
PU 40T	71	M	3/13/2006	vivo		T2 N2 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
PU 41T	61	M	11/1/2001	morto	33 meses	T2 N2 Mx	sim	Pulmão	Carcinoma múltiplos	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
PU 42T	49	M	1/29/2001	vivo		T1N0Mx	NÃO	Pulmão	adeocarcinoma	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0

Continua...

Continuação Anexo 1

	idade	sexo	data cirurgia	situção atual	sobrevida	estadiamento	recidiva	Tecido	Diagnóstico / Dissecção (MM)	HYAL 1 WT	HYAL1 V1	HYAL 1 V2	HYAL1 V3	HYAL1 V4	HYAL1 V5	HYAL 2 WT	HYAL 3 WT	HYAL3 V1	HYAL3 V2	HYAL3 V3
PU 43T	64	M	10/27/2003	vivo		T1 N0 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma bronquíolo-alveolar em 90% da amostra											
PU 44T	77	M	15/07/2004	morto	6 meses	T2 N2 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
PU 45T	74	M	1/15/2004	morto		T3 NO M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
PU 46T	63	M	2/9/2004	vivo		T1N1M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma bronquíolo-alveolar em 100% da amostra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PU 49T	61	F	4/26/2004	vivo		T2 N2 M0	sim	Pulmão	Carcinoma adenoescamoso em 90% da amostra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PU 51T	62	F	5/3/2004	vivo		T2 N0 M0	NÃO	Pulmão	Carcinoma de grandes células em 100% da amostra. 30% desse tumor corresponde a necrose (ou seja, tumor necrótico), não separável	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
PU 51T-2	71	M	12/1/2008	vivo		T2N0M0	NÃO	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 100% da amostra. 30% desse tumor corresponde a necrose (ou seja, tumor necrótico), não separável	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
PU 52T	80	M	1/6/2003	morto	28 meses	T2 N2 M0	sim	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
PU 53T	77	M	9/18/2004	vivo		T2 N0 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
PU 54T-2	75	M	19/09/2004	morto	36 meses	T2 N2 M0	sim	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 100% da amostra	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1

Continua...

Continuação Anexo 1

	idade	sexo	data cirurgia	situção atual	sobrevida	estadiamento	recidiva	Tecido	Diagnóstico / Dissecção (MM)	HYAL 1 WT	HYAL1 V1	HYAL 1 V2	HYAL1 V3	HYAL1 V4	HYAL1 V5	HYAL 2 WT	HYAL 3 WT	HYAL3 V1	HYAL3 V2	HYAL3 V3
PU 55T	64	F	10/14/2004	vivo		T2 N0 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1
PU 56T	63	F	9/8/2008	vivo		T2 N0 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 90% da amostra misturado com parênquima pulmonar não neoplásico (10%), não separável	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
PU 57T	73	M	12/16/2004	vivo		T2 N0 M0	NÃO	Pulmão	Carcinoma adenoescamoso em 100% da amostra com excesso de tecido fibroso (desmoplasia) ao redor da área tumoral. Foi retirado excesso de tecido fibroso (desmoplasia) ao redor da área tumoral	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
PU 59T	75	M	1/10/2005	vivo		T1 N0 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 80% da amostra com excesso de parênquima pulmonar não neoplásico ao redor da área tumoral. Foi retirado excesso de parênquima pulmonar não neoplásico ao redor da área tumoral	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
PU 61T	72	M	31/01/2005	morto	26 meses	T1N0 M0	sim	Pulmão	Adenocarcinoma em 50% da amostra com excesso de tecido fibroso (desmoplasia) ao redor da área tumoral. Foi retirado excesso de tecido fibroso (desmoplasia) ao redor da área tumoral	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0

Continua...

Continuação Anexo 1

	idade	sexo	data cirurgia	situção atual	sobrevida	estadiamento	recidiva	Tecido	Diagnóstico / Dissecção (MM)	HYAL 1 WT	HYAL1 V1	HYAL 1 V2	HYAL1 V3	HYAL1 V4	HYAL1 V5	HYAL 2 WT	HYAL 3 WT	HYAL3 V1	HYAL3 V2	HYAL3 V3
PU 65T	83	F	5/23/2005	vivo		T2N1M0	sim	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
PU 66T	44	F	6/2/2005	vivo		T1 N0 M0		Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
PU 69T	44	F	1/8/2005	morto	7 meses	T2 N2M0	sim	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1
PU 70T	65	M	8/11/2005	vivo		T2 N0 M0		Pulmão	Carcinoma não-pequenas células em 100% da amostra	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
PU 71T	58	M	9/29/2005	vivo		T2 N1 M0		Pulmão	Adenocarcinoma bronquíolo-alveolar em 100% da amostra	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
PU 72T	76	M	9/29/2005	vivo		T2 N1 M0	sim	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
PU 73T	67	F	11/3/2005	vivo		T1 N0 M0		Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
PU 74T	80	M	10/11/3005	morto	43 meses	T2 N0 M0	sim	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
PU 75T	68	M	16/08/2004	morto	62 meses	T1 N1 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 80% da amostra com tecido fibroso (desmoplasia) ao redor da área tumoral. Foi retirado tecido fibroso (desmoplasia) ao redor da área tumoral	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
PU 76T	74	F	4/20/2006	vivo		T1 N0 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Continua...

Continuação Anexo 1

	idade	sexo	data cirurgia	situção atual	sobrevida	estadiamento	recidiva	Tecido	Diagnóstico / Dissecção (MM)	HYAL 1 WT	HYAL1 V1	HYAL 1 V2	HYAL1 V3	HYAL1 V4	HYAL1 V5	HYAL 2 WT	HYAL 3 WT	HYAL3 V1	HYAL3 V2	HYAL3 V3
PU 77T	71	M	8/11/2008	vivo		T1N0M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
PU 78T	49	F	6/12/2006	vivo		T1 N0 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
PU 79T	62	M	6/29/2006	vivo		T2 N2 M0	sim	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
PU 80T	78	M	2/7/2006	morto	15 meses	T2 N0 M0	NÃO	Pulmão	Carcinoma adenoescamoso em 100% da amostra	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1
PU 81T	76	M	7/5/2006	morto	19 meses	T2 N2 M0	sim	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
PU 82T	52	F	8/17/2006	vivo		T1 N0 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
PU 84T-2	49	F	9/18/2006	vivo		T2 N0 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
PU 85T	46	F	12/4/2006	vivo		T2 N1 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
PU 86T	63	F	4/2/2007	morto	15 meses	T2 N0 M0	NÃO	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 100% da amostra	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
PU 87T	54	M	3/1/2007	vivo		T2 N1 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 90% da amostra misturado com 10% de cartilagem, não separável	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
PU 88T	63	M	7/31/2008	vivo		T3 N0 M0	sim	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 70% da amostra misturado com 30% de cartilagem, não separável	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0

Continua...

Continuação Anexo 1

	idade	sexo	data cirurgia	situção atual	sobrevida	estadiamento	recidiva	Tecido	Diagnóstico / Dissecção (MM)	HYAL 1 WT	HYAL1 V1	HYAL 1 V2	HYAL1 V3	HYAL1 V4	HYAL1 V5	HYAL 2 WT	HYAL 3 WT	HYAL3 V1	HYAL3 V2	HYAL3 V3
PU 89T	65	M	2/8/2007			T2 N2 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
PU 90T	62	F	10/5/2007	morto	12 meses	T2 N2 M0	sim	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 100% da amostra	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
PU 91T	68	F	2/18/2008	vivo		T1 N0 MO	NÃO	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 100% da amostra	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
PU 92T	71	M	6/18/2007	vivo		T3 N0 M0	NÃO	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 100% da amostra	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
PU 94T	62	M	7/2/2007	vivo		T2 N2 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma bronquíolo-alveolar em 100% da amostra	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
PU 95T	72	M	5/15/2008	vivo		T2 N0 M0	NÃO	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
PU 96T	68	M	5/19/2008	vivo		T1 N0 MO	sim	Pulmão	Adenocarcinoma em 100% da amostra	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
PU 97T	63	M	9/17/2007	vivo		T2 N2 M0	sim	Pulmão	Carcinoma adenoescamoso em 100% da amostra	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
PU 98T	72	F	9/20/2007	vivo		T2 N0 M0	sim	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 100% da amostra	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
PU 105T	75	M	11/17/2008	vivo		T2 N0 Mx	sim	Pulmão	Carcinoma epidermóide em 100% da amostra	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	59	M	17.11.2008	VIVO	13 MESES	T2N0M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
PU 17T	70	M	08.10.2008	VIVO	14 MESES	T2N0M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
PU 18N	67	M	15.01.2009	VIVO	11 MESES	T2N2M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0

Continua...

Continuação Anexo 1

	idade	sexo	data cirurgia	situção atual	sobrevida	estadiamento	recidiva	Tecido	Diagnóstico / Dissecção (MM)	HYAL 1 WT	HYAL1 V1	HYAL 1 V2	HYAL1 V3	HYAL1 V4	HYAL1 V5	HYAL 2 WT	HYAL 3 WT	HYAL3 V1	HYAL3 V2	HYAL3 V3
PU 20T	64	F	02.02.2009	vivo	10 MESES	T2N1M0	não	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
PU 23T	67	M	12/11/2008	vivo		T1N0M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
PU 24T	58	M	9/29/2008	vivo		T1 N0M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
PU 25N	64	M	12/18/2008	vivo		T2N0M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
PU 27T	73	M	30/06/2001	vivo	25 meses	T2 N2 M0	sim	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
PU 29T	70	F	4/1/2006	morto	28 meses	T2N0M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
PU 30T	82	M	1/23/2006	vivo		T1 N0 M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
PU 31T	74	F	10/23/2006	vivo		T1 N0 M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
PU 32T	73	M	8/5/2008	morto	12 meses	T2 N2 M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
PU 33T	72	M	5/12/2005	morto	25 meses	T2N1 Mx	sim	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0		0	0		0	1	1	0	0	0
PU 35T	75	M	11/24/2008	vivo		T2N0Mx	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
PU 36T	72	M	7/24/2008	vivo		T2 N0 M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
PU 40T	71	M	3/13/2006	vivo		T2 N2 M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
PU 41T	61	M	11/1/2001	morto	33 meses	T2 N2 Mx	sim	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0

Continua...

Conclusão Anexo 1

	idade	sexo	data cirurgia	situção atual	sobrevida	estadiamento	recidiva	Tecido	Diagnóstico / Dissecção (MM)	HYAL 1 WT	HYAL1 V1	HYAL 1 V2	HYAL1 V3	HYAL1 V4	HYAL1 V5	HYAL 2 WT	HYAL 3 WT	HYAL3 V1	HYAL3 V2	HYAL3 V3
PU 42T	49	M	1/29/2001	vivo		T1N0Mx	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
PU 43T	64	M	10/27/2003	vivo		T1 N0 M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PU 44T	77	M	15/07/2004	morto	6 meses	T2 N2 M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
PU 45T	74	M	1/15/2004	morto		T3 NO M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
PU 46T	63	M	2/9/2004	vivo		T1N1M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PU 49T	61	F	4/26/2004	vivo		T2 N2 M0	sim	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PU 51T	62	F	5/3/2004	vivo		T2 N0 M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
PU 51T-2	71	M	12/1/2008	vivo		T2N0M0	NÃO	Pulmão	Tecido não neoplásico em 100% da amostra.	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1

Anexo 2. Câncer de pulmão - Hospital Universitário de Coimbra

N Banco	Nome	Sexo	Idade	data cirurgia	tabagismo	anos/carga tabagica	TTO/ QT OU RD	Recidiva	Estadiamento	Diagnóstico
380	FJFS	M	62	10/07/2008	sim	40 uma	n	não	T1N1MX	Adenocarcinoma sólido do pulmão.
389	MMP	F	74	18/07/2008				não		Adenocarcinoma misto primitivo do pulmão.
394	AASB	F	68	25/07/2008	n	não	n	não	T1N0MX	Adenocarcinoma misto do pulmão sem metástases ganglionares regionais.
405	MCSG	F	57	02/09/2008		não		não	T2N0MX	Adenocarcinoma misto (acinar e sólido)
427	AST	M	71	02/10/2008	n	não	n	não	T2N1MX	Adenocarcinoma misto (padrões bronquíolo-alveolares, micro-papilar, acinar e sólido)
433	AMA	F	80	16/10/2008	não	não	QT carbo+gencit.+radio.	não	T1NXMX	Adenocarcinoma misto com padrões acinar e micropapilar do pulmão.
434	MMAC	M	49	21/10/2008			não	não	T3N0MX	Adenocarcinoma acinar do pulmão.
453	EFF	M	81	07/11/2008	sim	60 uma	não	não	T2N1M0	Adenocarcinoma misto (papilar e acinar) sem metástases glandulares hilares.
463	AJFS	M	59	20/11/2008			não	não	T2N1M0	Adenocarcinoma papilar do pulmão com metástase num gânglio linfático hilar.
469	MFCN	F	58	02/12/2008			não	não	T1N0MX	Carcinoma pleomórfico (adenocarcinoma acinar e papilar e padrões fusiformes) sem metástases ganglionares hilares.
525	MJAS	M	58	17/02/2009	sim	40	não	não	T2N0MX	Carcinoma epidermóide bem diferenciado do pulmão.
537	VARM	M	63	27/02/2009	sim	30	carbo+paclitacel+erlotin	sim	T1N2MX	Carcinoma pleomórfico (adenocarcinoma acinar, micropapilar e bronquiolo-alveolar e carcinoma de células grandes)
542	RFVO	M	74	10/03/2009	sim	60	não	não	T2N0MX	Carcinoma epidermóide brônquico.
556	VLPG	M	62	24/03/2009	sim	3 uma	não	não	T1N1MX	Carcinoma epidermóide pouco diferenciado
564	MASF	F	77	02/04/2009	sim	?	não	não	T2N1MX	Adenocarcinoma misto com metástases em gânglios linfáticos hilares.
601	AMT	F	72	12/05/2009			não	não	T2N0MX	Adenocarcinoma mucinoso do pulmão
607	MHCT	F	55	14/05/2009	sim	20	não	não	T2N0MX	Adenocarcinoma pleomorfico do pulmão - Padrão de adenocarcinoma acinar e papilar e carcinoma de células grandes
619	RBRL	F	42	05/06/2009	sim	20	carbo+gencit.	não	T1N0MX	Adenocarcinoma acinar do pulmão.
623	MPCR	F	54	23/06/2009	sim	não	cispla+permetre	não	T2N0MX	Adenocarcinoma acinar do pulmão.
633	NJPA	F	69	03/07/2009	sim	?	não	não		Adenocarcinoma acinar do pulmão.
634	JMS	M	75	03/07/2009	sim	100	não	não	T1N0MX	Adenocarcinoma acinar do pulmão.
636	MTB	F	64	07/07/2009	não	não	não	não	T2N0MX	Adenocarcinoma acinar do pulmão.
637	JSG	M	66	07/07/2009	sim	45	não	não	T2N1MX	Carcinoma epidermóide pulmonar.

Continua...

Continuação Anexo 2

N Banco	Nome	Sexo	Idade	data cirurgia	tabagismo	anos/carga tabagica	TTO/ QT OU RD	Recidiva	Estadiamento	Diagnóstico
642	ACM	M	68	09/07/2009	sim	76	não	não	T1NXMX	Carcinoma pleomórfico do lobo inferior do pulmão direito com diferenciação neuroendócrina de grandes células e de carcinoma adenoescamoso
647	ALA	M	65	16/07/2009	sim	45	não	não	T2N0MX	Carcinoma epidermóide bem diferenciado.
650	AJL	F	49	16/07/2009	sim	60	não	não	T2N0MX	Adenocarcinoma misto do pulmão (acinar e sólido com produção de muco)
651	MJMT	M	58	21/07/2009	sim	80	não	não	T2N0MX	Carcinoma epidermóide bem diferenciado
654	JGS	M	71	23/07/2009	sim	?	não	não	T2N0MX	Adenocarcinoma misto do pulmão (papilar e bronquiolo-alveolar).
658	DTP	M	68	20/08/2009	sim	90	não	não	T2N2MX	Adenocarcinoma misto do pulmão com metástases ganglionares hilares e nos gânglios linfáticos recolhidos da região da janela aorta-pulmonar.
687	ARS	M	65	24/09/2009	sim	?	não	não	T2N1MX	Carcinoma epidermóide bem diferenciado do brônquio.
690	APA	M	48	25/09/2009	sim	60	não	não	T2N0MX	Carcinoma epidermoide bem diferenciado do brônquio.
697	MSRG	F	62	01/10/2009	não		não	não	T2N0MX	Carcinoma pleomórfico do pulmão com padrões de carcinoma de células grandes e carcinoma adenoscamoso.
699	JMRM	M	69	01/10/2009	não		não	Sim	T2N1MX	Carcinoma epidermóide bem diferenciado do pulmão.
726	LHPM	F	51	24/11/2009	sim	30	RT+GENCIT	Sim	T2N1MX	Adenocarcinoma misto do pulmão com invasão da pleura parietal e metástases ganglionares regionais.
732	FRCF	M	73	03/12/2009	sim	20	n	não	T2N0MX	Adenocarcinoma misto do pulmão.
738	MCAA	M	43	11/12/2009	sim	?	carbo+paclitacel	não	T1N0MX	Carcinoma epidermóide bem diferenciado do pulmão.
755	ACF	M	66	07/01/2010	sim	25	carbo+gencit.	não	T3N0MX	Carcinoma epidermóide do pulmão.
760	MCVN	F	70	14/01/2010	não	não	não	não	T2N1MX	Adenocarcinoma misto do pulmão - acinar, microacinar e micropapilar.
788	DASS	M	71	18/02/2010	sim	60	não	não	T2N0MX	Carcinoma epidermóide bem diferenciado do pulmão.
797	MRRS	F	65	11/03/2010	sim	não	não	não	T3N0MX	Adenocarcinoma misto do pulmão com padrões acinar, papilar e micropapilar e sem metástases ganglionares regionais.
798	JFAM	M	61	12/03/2010	sim	100	não	não	T1N0MX	Carcinoma pleomórfico do pulmão.

Continua...

Conclusão Anexo 2

805	ACOM	M	60	25/03/2010	sim	50	não	não	T1N0MX	Adenocarcinoma misto do pulmão com padrões acinar e sólido e sem metástases ganglionares regionais.
807	MDMF	M	68	30/03/2010	sim	50	não	não	T2N0MX	Carcinoma pleomórfico do pulmão com padrões de carcinoma bronquiolo alveolar não mucinoso e células grandes.
846	OPP	F	60	08/06/2010	sim	45	não	não	T4N0MX	Dois carcinomas distintos do pulmão esquerdo: adenocarcinoma sólido do lobo superior; adenocarcinoma acinar do lobo inferior.
860	JMSN	M	69	01/07/2010	sim	não	não	não	T3N0MX	Carcinoma pleomórfico do pulmão (células grandes e células gigantes) sem metástases ganglionares regionais.
864	MCCV	F	71	13/07/2010	não	não	não	não	T1N0MX	Carcinoma bronquiolo-alveolar mucinoso do lobo inferior do pulmão esquerdo.
866	RMEM	M	64	13/07/2010	não	não	carbo+gencit. +radio	não	T2N1MX	Carcinoma epidermóide do pulmão com metástases ganglionares hilares.
871	JLP	M	57	29/07/2010	sim	30	não	não	T1N0MX	Carcinoma pleomórfico do pulmão, com componente de adenocarcinoma, carcinoma de células grandes e fusocelular.
874	CMGL	F	59	05/08/2010	sim	60	não	não	T2N0MX	Adenocarcinoma misto primitivo do pulmão (com padrões micro-acinar e sólido).
875	MPGF	F	54	10/08/2010	sim	32	não	não	T1N0MX	Adenocarcinoma primitivo do pulmão
877	AMG	M	64	12/08/2010	não	não	não	não	T2N0MX	Carcinoma epidermóide bem diferenciado do pulmão.
879	VMC	M	59	24/08/2010	sim	40	carbo+vinorrelbina	não	T1N0MX	Carcinoma epidermóide bem diferenciado - variante papilar.
884	JSP	M	60	02/09/2010	sim	45	não	não	T2N0MX	Carcinoma epidermóide pouco diferenciado, justapleural.
904	EMR	F	76	18/10/2010	não	não	não	não	T2N0MX	Adenocarcinoma misto acinar e bronquiolo-alveolar primitivo do pulmão com invasão da pleura visceral adjacente.
905	MRP	M	62	20/10/2010	sim	80	não	não	T2N0MX	Carcinoma epidermóide bem diferenciado do brônquio sem metástases ganglionares.
909	JSG	M	84	21/10/2010	?		carbo+gencit.	não	T2N0MX	Carcinoma epidermóide bem diferenciado.

8 REFERÊNCIAS

American Cancer Society (ACS).Cancer facts and figures. Atlanta; 2010. [cited 2012 jun 4]. Available from: http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveilance/documents/document/acspc-026238.pdf.

Andre F, Grunenwald D, Pignon JP, Pujol JL, Brichon PY, Brouchet L, Quoix E, Westeel V, Le Chevalier T. Survival of patients with resected N2 non-small cell lung cancer: evidence for a subclassification and implications. *J ClinOncol.* 2000;18:2981-9.

Beck C, Schreiber H, Rowley DA. Role of TGF-β in immune-evasion of cancer. *Microsc Res Technol.* 2001;52:387-95.

Bernfield M, Gotte M, Park PM, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. Function of cell surface heparin sulfate proteoglicans. *Annu Rev Biochem.*1999; 68:729-77.

Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. Biology of the syndecan. *Annu Rev Biochem*.1992;8:365-93.

Bertrand P, Courel MN, Maingonnat C, Jardin F, Tilly H, Bastard C. Expression of HYAL2 mRNA, hyaluronan and hyaluronidase in B-cell non-Hodgkin lymphoma. Relationship with tumor aggressiveness. *Int J Cancer.* 2006;113:207-2.

Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakreb M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL. Transforminggrowth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymaltransdifferentiationthrough a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell.* 2001;12: 27-36.

Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest.*2002;122:1037-57.

Casalino-Matsuda SM, Monzon ME, Day AJ, Forteza RM. Hyaluronan fragments/CD44 mediate oxidative stress-induced MUC5B up-regulation in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40:277-85.

Chow G, Knudson W. Characterization of promoter elements of the human HYAL-2 gene. *J Biol Chem.* 2005;280:26904-12.

Clark DP. *Molecular biology. Understending the genetic revolution*. 2nd ed. London: Elsevier; 2005. p.306-9.

Csoka TB, Frost GL, Stern R. Hyaluronidases in tissue invasion. *Invasion Metastasis*. 1997;17:297-311.

Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor antagonizes the profibrotic action of TGF-β1 in mesangial cells by stabilizing Smadtranscriptional corepressor TGIF. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:1402-12.

Sá VK, Canavez FC, Silva IA, Srougi M, Leite KR. Isoforms of hyaluronidases can be a predictor of a prostate cancer of good prognosis. *Urol Oncol*. 2009;27:377-81.

Deeb G, Wang J, Ramnath N, Slocum HK, Wiseman S, Beck A, Tan D. Altered E-cadherin and epidermal growth factor receptor expressions are associated with patient survival in lung cancer: a study utilizing high-density tissue micro-array and immunohistochemistry. *Mod Pathol*. 2004;17:430-9.

Delpech B, Girard N, Bertrand P, Courel NM, Chauzy C, Delpech A. Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. *J Int Med*.1997;242:41-8.

Dietrich CP. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglicans. *Braz. J Med Biol Res*. 1984;17:5-15.

Ekici S, Cerwinka WH, Duncan RI. Comparison of the prognostic potential of hyaluronic acid, hyaluronidase (HYAL-1), CD44v6 and microvessel density for prostate cancer. *Int J Cancer.* 2004;112:121-9.

Engström-Laurent A, Laurent UB, Lilja K, Laurent TC. Concentration of sodium hyaluronate in serum. *Scand J Clin Lab Invest.* 1985;45:497-504.

EOft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E. TGFbeta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev.*1996;10:2462-77.

Esko JD. Genetic analysis of proteoglicans structure, function and metabolism. *Curr Opin Cell Biol*. 1991;3:805-16.

Fontanini G, Bigini D, Vignati S, Basolo F, Mussi A, Lucchi M, Chine S, Angeletti CA, Harris AL, Bevilacqua G. Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. 1995;177:57-63.

Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Int Med.* 1997;242:27S-33S.

Frost GI, Csoka TB, Stern R. The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview. *Trends in Glycosci Glycotechnol.* 1996;8:419-34.

Frost GI, Csoka TB, Wong T, Stern R. Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochem Biophys Res Commun*.1997;236:10-5.

Golshani R, Lopez L, Estrella V, Kramer M, Iida N, Lokeshwar VB. Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44. *Cancer Res*. 2008;68:483-91.

Graveley, BR. Alternative *splicing*: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.* 2001;17:100-7.

Graziano SL. Non-small cell lung cancer: clinical value of new biological predictors. *Lung Cancer.* 1997;17(Suppl 1):S37-58.

Halici M, Karaoglu S, Canoz O, Kabak S, Baktir A. Sodium hyaluronate regulating angiogenesis during Achilles tendon healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2004;12:562-7.

Harpole DH Jr, Herndon JE, 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.* 1995;55:51-6.

Hay ED. The mesenchymal cell: its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn.* 2005;233:706-20.

Herrlich P, Morrison H, Sleeman J, Orian-Rousseau V, Konig H, Weg-Remers S, Potan H. CD44 acts both as a growth- and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor. *Ann NY Acad Sci*. 2000;910:106-18; discussion 118-20.

Hobarth K, Maier U, Marberger M. Topical chemoprophylaxis of superficial bladder cancer with mitomycin C and adjuvant hyaluronidase. *Eur Urol*. 1992;21:206-10.

Ichikawa T, Itano N, Sawai T, Kimata K, Koganehira Y, Saida T, Taniguchi S. Increased synthesis of hyaluronate enhances motility of human melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 1999;113:935-9.

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.* 1995;110:601-5.

Instituto Nacional do Câncer. INCA Câncer de pulmão. [citado 5 maio 2012]. Disponível em: http://www.inca.com.br.

Iozzo RV. Matrix bproteoglicans: from molecular design, to cellular function. *Annu Rev Biochem.*1998;67:609-52.

Itano N, Sawai T, Atsumi F, MiyaishiO, Taniguchi S, Kannagi R, Hamaguchi M, Kimata K. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. *J Biol Chem.* 2004;279:18679-87.

Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW, Klinkhamer PJ, Schipper RM, Splinter TA, Mooi WJ. Is there a common etiology for the rising incidence of and decreasing survival with adenocarcinoma of the lung? *Epidemiology.* 2001;12:256-8.

JemalA, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69-90.

Kjellén L, Lindahl V. Proteoglicans: structure and interactions. *Annu Rev Biochem*.1991;60:443-75.

Knudson, CB, Knudson, W. Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism. *Clin Orthop Rel Res.* 2004;427:152-62.

Knudson, W, Chow, G, Knudson, CB. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biol. .*2002;21:15-23.

Kohn EC, Liotta LA. Tumor cell invasion involves the active movement of cells across the extracellular matrix. *Cancer Res*. 1995;55:1856-62.

Krusius T, Gehlsen K, Ruoslahti E. A fibroblast chondroitin sulfate proteoglicans core protein contain lectin-like and growth factor sequences. *J Biol Chem.* 1987;262:13120-5.

Lai E, Singh R, Teng B, Zhao Y-L, Sharratt E, Howell G, Rajput A, Bullard Dunn K. Inhibition of hyaluronan synthase-3 decreases subcutaneous colon cancer growth in mice. Dis Colon Rectum. 2010;53:475-82.

Latchman D. Gene regulation. A eukaryotic perspective. 2nd ed. London: Chapman Hall; 1995.

Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J*.1992;6:2397-404.

Laurent TC. Chemistry and molecular biology of the Intercellular matrix. New York: Academic Press; 1970. p.703–32.

Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan: a multifunctional, megadalton, stealth molecule. *Opin Cell Biol*. 2000;12:581-6.

Li R , Todd NW, Qiu Q, Fan T, Zhao RY, Rodgers WH, Fang H, Katz' RL, Stass S, Jiang F. Genetic deletions in sputum as diagnostic markers for early detection of stage I non–small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13:482-7.

Lindahl V, Kidholt K, SpillmanD ,Kjellén L. More to “heparin” than antigoagulation. *Tromb Res.* 1994;75:1-32.

Llinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grunert S. Ras and TGF_ cooperatively regulate epithelialcell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol.*2002;156:299-313.

Lohmander LS, De Luca S, Nilsson B, Hascall VC, Caputo CP, Kimura JH, Heinegard D. Oligossaccharide on proteoglicans from the swarm rat chondrosarcoma.*J Biol Chem*. 1980;255:6084-91.

Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, Forgacsi E, Minnai JD, Block NL, Nadji M, Lokeshwar BL. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. *J Biol Chem.* 2001;276:11922-32.

Lokeshwar VB, Schroeder GL, Carey RI, Soloway MS, Lida N. Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing. *J Biol Chem*. 2002;277:33654-63.

Lokeshwar VB, Selzer MG. Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessel, and vein-derived human endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275:27641-9.

Lokeshwar VB, Young MJ, Goudarzi G. Identification of bladder tumor-derived hyaluronidase: its similarity to HYAL1. *Cancer Res.* 1999;59:4464-70.

Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Chuanchieh H, Bigini D, Vignati S, Pingitore R. Blood vessel invasion by tumor cells predicts recurrence in completely resected T1 N0 M0 nos-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;106:80-9.

Markovic-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Muller U. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure.* 2000;8:1025-35.

Mathews, MB. Molecular biology, biochemistry and biophysics of connective tissue.Macromolecular structure and evolution. In: Kleinzeller A, Springer GK. Wittman HG, editors. New York: Springer-Verlag; 1975. 19:99, 135, 175, 213.

Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem.* 1934;107:629-34.

Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*.1997;111:1710-7.

Nader HB, Dietrich CP. Natural occurrence and possible biological role of heparin. Heparin chemical and biological properties, clinical applications. In: Lane, DA, Lindahl V, editors. London: Edward-Arnold; 1989. p.81-6.

National Cancer Institute (NCI). Non-small cell lung cancer (Physician Data Query) treatment. Available from: http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell- lung/healthprofessional/page1, 2010. [cited 2012 abril 10]

National Cancer Institute (NCI). Non-small cell lung cancer treatment (Physician Data Query). Available from: http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell- lung/healthprofessional/page1, 2007. [cited 2011 dez 6]

Nilsson B, De Luca S, Lohmander S, Hascall VC. Structures of N-linked and O-linked oligosaccharides on proteoglicans monomer isolated from the swarm rat chondrosarcoma. *J Biol Chem*. 1982;257:10920-7.

Novak U, Stylli SS, Kaye AH, Lepperdinger G. Hyaluronidase-2 over expression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. *Cancer Res.* 1999;59:6246-50.

Pham HT, Block NL, Lokeshwar VB. Tumor-derived hyaluronidase: a diagnostic urine marker for high-grade bladder cancer. *Cancer Res.* 1997;57:16-22.

Poole AR. Proteoglicans in health and disease: distribuition and functions. *Biochem J.* 1986;236:1-4.

Porcionatto MA, Nader HB, Dietrich CP. Heparansulfato and cell division. *Br J Med Biol Res*. 1999;32:539-44.

Pujol JL, Molinier O, Ebert W,Daurès JP, Barlesi F, Buccheri G. CYFRA 21-1 is a prognostic determinant in non-small cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients. *Br J Cancer.* 2004;90:2097-105.

Pure E, Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med*. 2001;7:213-21.

RahmnaiamM ,Heldin P. Testicular hyaluronidase induces tubular structure of endothelial cells grown in three-dimensional colagen gel through a CD44-mediated mechanism. *Int J Cancer.* 2002;97:601-7.

Reed R. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12:340-45 .

Roden L, Campbell P, Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Thompson JN.Enzymatic pathways of hyaluronan catabolism. *CIBA Found Symp.* 1989;143:60-86.

Russell PA, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams RA. Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival? A clinicopathologic study based on the New International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thorac Oncol*. 2011;6:1456-504.

Sawabata N, Maeda H, Yokota S, Takeda S, Koma M, Tokunaga T, Ito M. Postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with pathologic stage IA non-small cell lung carcinoma: subnormal levels as an indicator of favorable prognosis. *Cancer.* 2004;101:803-9.

Sayo T, Sugiyama Y, Takahashi Y, Ozawa N, Sakai S, Ishikawa O, Tamura M, Inoue S. Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2002;118:43-8.

Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, Zhu J, Johnson DH, Eastern Cooperative Oncology Group. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non–small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2002;346:92-8.

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 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 753-54.

Scott JE, Heatley F. Biological properties of hyaluronan in aqueous solution are controlled and sequestered by reversible tertiary structures, defined by NMR spectroscopy. *Biomacromolecules.* 2002;3:547-53.

Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med*.1990;323:561-5.

Slevin M, Krupinski J, Kumar S, Gaffney A. Angiogenic oligosaccharides of Hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmatic signal transduction pathway resulting in proliferation. *Lab Invest*. 1998;78:987-1003.

Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology.* 2003;13:105-15.

Strauss GM, Kwiatkowski DJ, Harpole DH, Lynch TJ, Skarin AT, Sugarbaker DJ. Molecular and pathologic markers in stage I non-small cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol*. 1995;13:1265-79.

Sun LK, Beck-Schimmer B, Oertli B, Wuthrich RP. Hyaluronan-induced cyclooxygenase-2 expression promotes thromboxane A2 production by renal cells. *Kidney Int.* 2001;59:190-6.

Sun QY, Luria A, Rubinstein S, Breitbart H. Protein kinase inhibitors induce interphase transition by inactivating mitogen-activated protein kinase in mouse eggs. *Zygote.*1998;6:277-84.

Taipale J, Saharinen J, Keski-Oja L. Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. *J Adv Cancer Res*. 1998;75:87-134.

Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Bio Chem.* 2002;277:4581-4.

Teng BP, Heffler MD, Lai EC, Zhao Y, LeVea CM, Golubovskaya VT, Bullard Dunn KM. Inhibition of hyaluronan synthase-3 decreases subcutaneous colon cancer growth by increasing apoptosis. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011;11:620-8.

Tengblad V, Laurent UBG, Lilja K, Cahill RJM, Engstrom-Laurent A, Fraser RE, Hansson HE, Laurent TC. Concentration and relative molecular mass of hyaluronate in lymph and blood. *Biochem J.* 1986;236:521-5.

Thierry JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:131-42.

Thierry JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer.*2002; 2:442-54.

Thonwar EJ, Swett MBE. An oligissacharide component in proteoglicans of articular cartilage. *Biochem Biophys Acta.*1977;584:353-7.

Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Rev Cancer.* 2004;4:528-39.

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

Triggs-Raine B, Salo TJ, Zhang H, Wicklow, BA, Natowicz MR. Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Proc Nat Acad Sci.* 1999;96:6296-300.

Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors.J *Biol Chem.* 2002;277:4589-92.

Vaes G. Hyaluronidase activity in lysosomes of bone tissue. *Biochem J.* 1967;103:802-4.

Vogelmann R, Nguyen-tat MD, Giehl K, Adler G, Wedlich D, Menke A. TGFβ-induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. *J Cell Sci.* 2005;118*:* 4901-12*.*

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011;6:244-85.

Wang G, Dong W, Shen H, Mu X, Li Z, Lin X, Liu Y, Du J. A comparison of Twist and E-cadherin protein expression in primary non-small-cell lung carcinoma and corresponding metastases. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011;39:1028-32.

Watson DW, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine J, Losick R. Molecular biology of the gene. 5th ed. San Francisco: Peason; 2004. p. 383-7, 408-9.

Yanagishita M, Hascall VC. Cell surface heparan sulfate proteoglicans. *J Biol Chem.* 1992;267:9451-4.

Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, Park BJ, Rusch VW, Travis WD. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol.* 2011;24:653-64.

Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceossome. *Nature*.2002;419:182-5.

Zimmerman D, Ruoslaht E. Multiple domains of large fibroblast proteoglicans, versican. *Embo J.* 1989;8:2975-81.

Apêndices

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/03/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0171/09**, intitulado: "**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DOS SPLICINGS ALTERNATIVOS DAS HIALURONIDASES E AVALIAÇÃO IMUNOPROTEÍCA DO ÁCIDO HIALURÔNICO, HIALURONIDASE, AGRECAN E VERSICAN COMO MARCADOR DO PROGNOSTICO DO CÂNCER DE PULMÃO**" apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi**
Pesquisador (a) Executante: **Vanessa Karen De Sá**

CAPPesq, 26 de Março de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Human Pathology (2012) **43**, 675–683

ELSEVIER

Human PATHOLOGY

www.elsevier.com/locate/humpath

Original contribution

Hyaluronidase splice variants are associated with histology and outcome in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung☆

Vanessa Karen de Sá PhD[a], Eloísa Olivieri MSc[b], Edwin Roger Parra MD, PhD[a], Alexandre Muxfeldt Ab'Saber MD, PhD[a], Teresa Takagaki MD, PhD[c], Fernando Augusto Soares MD, PhD[b], Dirce Carraro PhD[b], Lina Carvalho MD, PhD[d], Vera Luiza Capelozzi MD, PhD[a,*]

[a]*Department of Pathology, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, 01246903 São Paulo, Brasil*
[b]*Hospital do Câncer AC Camargo, 01509-010 São Paulo, Brasil*
[c]*Discipline of Oncology, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, 01246903 São Paulo, Brasil*
[d]*Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 3004-504 Portugal*

Received 29 March 2011; revised 13 June 2011; accepted 15 June 2011

Keywords:
Hyaluronidases;
Hyaluronan;
Alternative splicing;
Lung cancer;
Prognosis

Summary Heterogeneity of hyaluronidase (HYAL) expression has been identified in tumors and shows promise as an indicator of disease progression. The expression profile of alternatively spliced forms of HYAL was evaluated in tumors and normal lung tissue from 69 resected tumors of patients with adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *HYAL1-wild-type* (wt) and variants 1 to 5, *HYAL2-wt*, and *HYAL3-wt*, and variants 1 to 3 were identified by polymerase chain reaction and direct sequencing. Different proportions of the 3 *HYAL-wt* and variants were expressed in tumor and normal lung tissues. *HYAL1-wt* was associated with a poorer prognosis and *HYAL3-v1* with a better prognosis. HYAL splice variants are associated with histology and outcome, suggesting that strategies aimed at modulating their levels may be effective for lung cancer treatment.
© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths in the United States and worldwide [1]. Adenocarcinoma (ADC) and squamous cell carcinoma (SQCC) are the 2 most common histological subtypes of lung cancer in most countries, accounting for almost 90% of all lung cancers [2]. Particularly within lung ADCs, a widely divergent clinical, radiological, molecular, and pathological spectrum exists. Despite remarkable advances in the past decade, the lung cancer mortality rate remains high primarily since it is often diagnosed at advanced or late stages when the options

Abbreviations: HAase, Hyaluronidases; HA, Hyaluronan; HYAL, hyaluronidase gene; LC, Lung cancer.

☆ This study was supported by the following Brazilian agencies: the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 300430/95-7), Foundation for the Support of Research of the State of São Paulo (FAPESP 08/5791-7 and 08/58557-2), and the Laboratories for Medical Research(LIMs), Hospital das Clinicas, University of São Paulo Medical School.

* Corresponding author. Departament of Pathology, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, SP 01296-903, Brazil.
E-mail address: vcapelozzi@lim05.fm.usp.br (V. L. Capelozzi).

0046-8177/$ – see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.humpath.2011.06.010

for treatment are mostly palliative. Prognosis is determined by histological subtype, performance status, and clinical stage. Although the choice of treatment depends upon these parameters, molecular markers have also been investigated to better predict disease behavior.

Hyaluronidases (HAases) are a family of enzymes that cleave hyaluronan (HA) into small fragments that stimulate endothelial proliferation and activate mitogen-activated protein kinase pathways [3-6]. In humans, 6 HAase genes have been identified, *HYAL1*, *HYAL2*, and *HYAL3* are located on chromosome 3p21.3 and *PH20*, *HYAL4*, and *HYALP1* are located on chromosome 7q31.3. With the possible exception of *HYAL4* and *HYALP1*, all HAases degrade HA [3].

HA is a nonsulfated glycosaminoglycan of repeating D-glucuronic acid and *N*-acetyl-D-glucosamine disaccharide units. HA is present in bodily fluids, tissues, and in the extracellular matrix [3,4]. It keeps tissues hydrated and maintains osmotic balance and cartilage integrity [4]. HA also actively regulates cell adhesion, migration, and proliferation by interacting with specific cell surface receptors such as CD44 and RHAMM [5]. The concentration of HA is elevated in several inflammatory diseases and various carcinomas, including lung, bladder, prostate, breast, and colon [6-13]. In tumors, HA may promote tumor growth and metastasis by actively supporting tumor cell migration and protecting against immune surveillance [9]. Also, HAases generate small, 10 to 15 disaccharide fragments of HA that stimulate angiogenesis [10], initiating endothelial cell proliferation via the cell surface HA receptor, RHAMM [11].

Alternative splicing generates several isoforms of HAases, each of which displays distinct enzymatic activity. Heterogeneity in HAase expression has been observed in tumors and may be related to the differences in their biological behavior [12]. Elevated levels of *HYAL1-wt* coincide with the presence of angiogenic HA fragments in tumor tissue [13]. The aim of our study was to correlate HAases expression profiles in lung tumor tissues with histology, disease behavior, and evolution.

2. Materials and methods

2.1. Patients and tumor specimens

Sixty-nine patients underwent lobectomy for ADCs or SQCCs. The median age was 69 years (44–83 years), and the median follow-up time was 28 months (1–84 months). Lobectomy specimens were evaluated for classical prognostic parameters. All patients had tumors of $T_{1-3}N_{0-2}M_0$ [14], which were considered to be curable by surgical resection. Clinical staging was done using routine chest radiograph, bronchoscopy, computerized tomography of the thorax and upper abdomen, abdominal ultrasound, and bone scan. Mediastinoscopy and lymph node biopsy were performed on patients whose lymph nodes had a short axis diameter of greater than 1 cm. Further details of these patients are summarized in Table 1.

Tumor tissues and normal lung tissues from resected specimens were examined within 15 minutes after resection; the tumor was macroscopically localized, and 1-cm^3 samples were taken from tumor and normal lung tissues and stored in liquid nitrogen at −170°C. Adjacent samples were fixed in formalin, embedded in paraffin, and hematoxylin and eosin stained for histological evaluation, to guarantee adequate tumor representation of the frozen samples. The lobectomy specimens were evaluated for the classical prognostic parameters. Specimens were reviewed (by V.K.S. and V.L.C.) and classified as SQCCs or ADCs by immunohistochemistry and following the new guidelines for classification of non–small cell carcinomas proposed [15].

This study was approved by the Institutional Review Board of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (no. 369/06) and by Hospital AC Camargo (no. 1214/09).

2.2. RNA isolation and complementary DNA synthesis

Total RNA was extracted from frozen lung tissues using TRIzol Reagent (monophasic solution of phenol and

Table 1 Patient characteristics

Total no. of patients	69
Age (y)	69 (44-83) [a]
Sex	49 males, 20 females
Overall stage	
I	40
II	4
III	25
T stage	
1a	6
1b	10
2a	16
2b	20
3	4
N stage	
0	50
1	6
2	13
Treatment	
Surgery	69
Surgery + chemotherapy	21
Surgery + chemotherapy + radiotherapy	4
Histological type	
SQCC	22
ADC	47
Follow-up (mo)	28 (1-84) [a]
Patients censored for survival analysis at last time of follow-up	20

[a] Values represent median (range).

guanidine) (Invitrogen, Carlsbad, CA). All RNA preparations were made DNA-free before subsequent experiments. The integrity and stability of each RNA sample was verified by capillary electrophoresis using the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). RNA was subjected to first-strand complementary DNA (cDNA) synthesis using Superscript-III (Invitrogen) following the manufacturer's protocol with 2 μg of total RNA in 40 μL of RT reaction buffer.

2.3. PCR analysis

Primer sequences were designed for each HYAL variant, including *HYAL1-wt, HYAL1-v1, HYAL1-v2, HYAL1-v3, HYAL1-v4, and HYAL1-v5; HYAL2-wt; and HYAL3-wt, HYAL3-v1, HYAL3-v2, and HYAL3-v3* (Figs. 1 and 2). The β-actin gene was amplified as a positive control for each reaction. PCR amplification conditions for *HYAL1, HYAL2, and HYAL3* cDNAs were 5 at 94°C followed by 40 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 45 seconds, and 72°C for 45 seconds. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Isoforms were identified by the size band generated by each primer pair.

2.4. DNA sequencing

Amplicons were purified from agarose gels using the GFX gel band purification kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). All variants were sequenced directly using the PCR primers and the BigDye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied BioSystems, Foster City, CA) on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Hitachi, Kokubunji-shi, Tokyo).

2.5. Statistical analysis

Initial analyses were done using Kaplan-Meier curves, and final multivariate analyses were done using the Cox

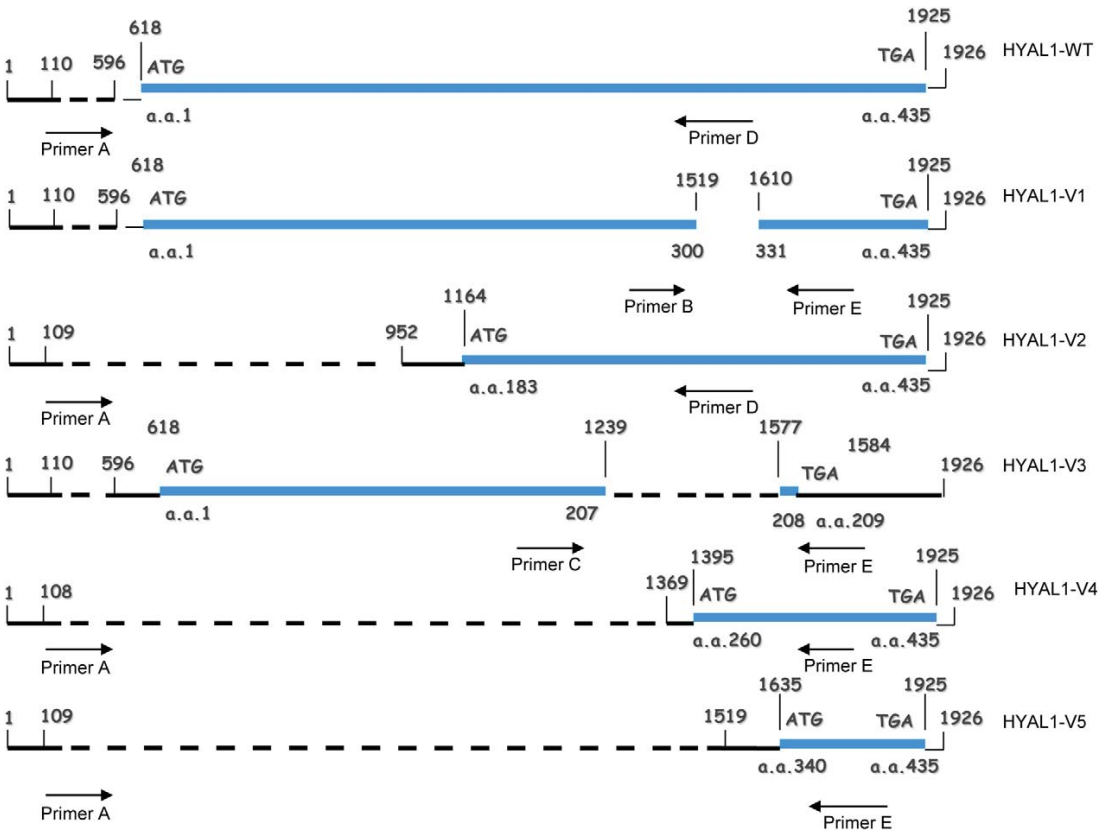


Fig. 1 Representation of the *HYAL1* variants. The figure shows *HYAL1-wt* and different splice variants. The coding region is shown as a dotted block. The dashed line shows the region that is spliced out, and solid line represents untranslated regions. Each splice junction is marked by the nucleotides at the 5′ and 3′ boundaries that are joined because of splicing. The translation initiation and termination codons for *HYAL1-wt* and *HYAL1* variants are marked. The figure also shows the position of the forwards (ie, A, B, and C) and the reverses complementary (ie, D and E) primers pairs used to amplify *HYAL1* variants.

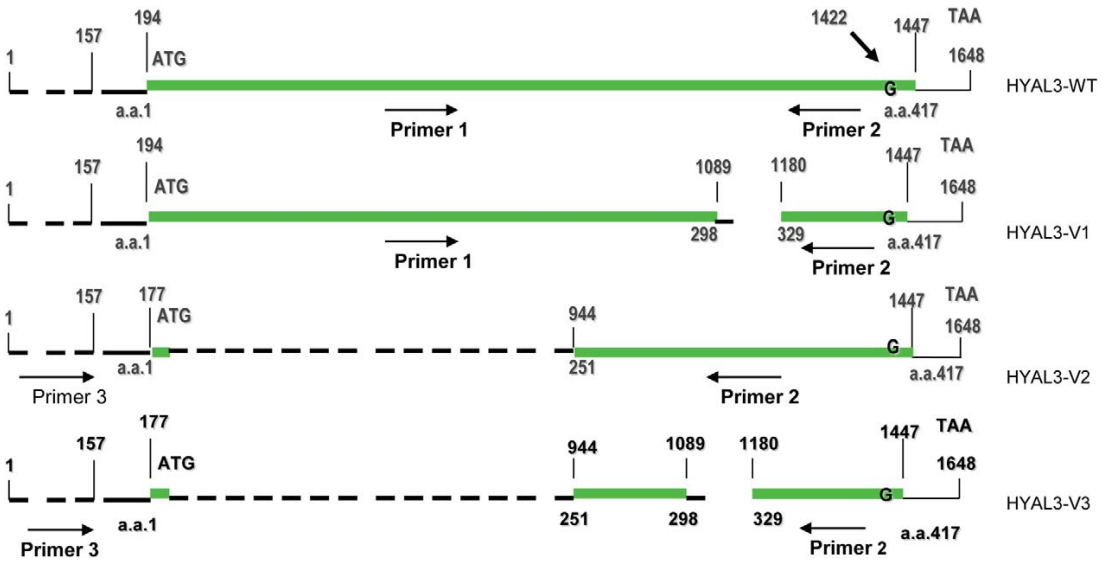


Fig. 2 Representation of the *HYAL3* variants. The figure shows *HYAL3-wt* and different splice variants. The coding region is shown as a dotted block. The dashed line shows the region that is spliced out, and solid line represents untranslated regions. Each splice junction is marked by the nucleotides at the 5′ and 3′ boundaries that are joined because of splicing. The translation initiation and termination codons for *HYAL3-wt* and *HYAL3* variants are marked. The figure also shows the position of the forwards (ie, 1 and 3) and the reverses complementary (ie, 2) primers pairs used to amplify *HYAL3* variants.

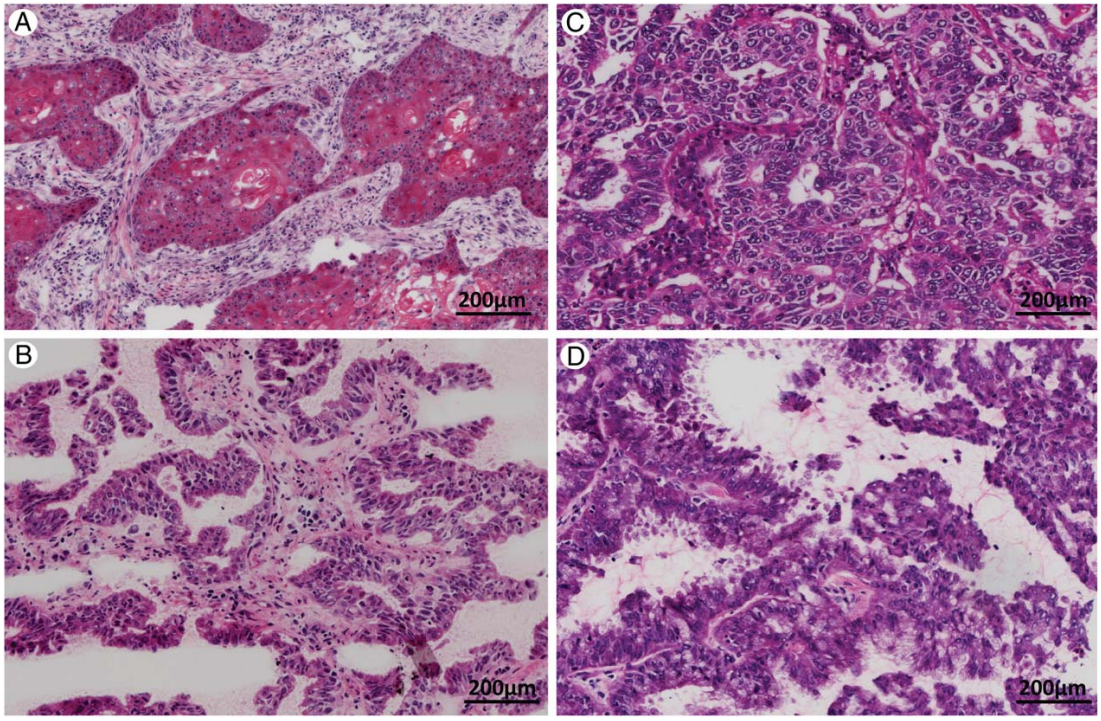


Fig. 3 A, SQCC was characterized by keratinization, pearl formation, and intercellular bridges. B, AIS exhibited growth restricted to neoplastic cells along preexisting alveolar structures (lepidic growth), lacking stromal, vascular, or pleural invasion. C, Acinar-predominant ADC revealed a majority component of round to oval-shaped glands with a central luminal space surrounded by tumor cells. D, Papillary predominant ADC showed a major component of a growth of glandular cells along central fibrovascular cores.

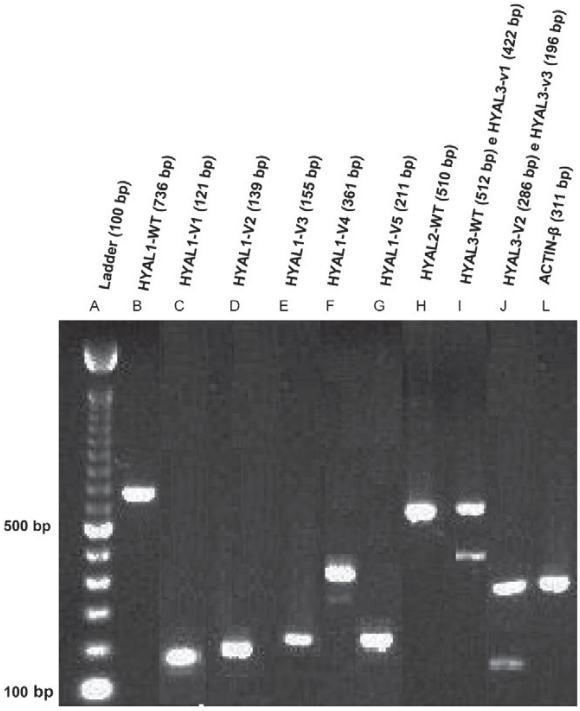


Fig. 4 Expression analysis of *HYAL1, HYAL2*, and *HYAL3-wt* and variants and β-actin (positive control). The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. A 100-bp DNA ladder was applied (A). PCR products of different lengths are shown in tumors from B to J.

proportional hazard model. In addition, χ^2, Fisher test, Pearson bivariate correlations, and paired sample *t* test were used to measure the relationship between one categorical variable and several others, and the residuals were examined to ensure that they were normally distributed. All analyses were done with SPSS statistical software (version 18, Chicago, IL). The threshold for statistical significance was chosen as $P < .05$.

3. Results

Wildtype and variant HYAL transcripts are differentially expressed among histological subtypes SQCCs were characterized by keratinization, pearl formation, and intercellular bridges (Fig. 3A). ADC in situ (AIS) exhibited growth restricted to neoplastic cells along preexisting alveolar structures (lepidic growth) and lacked stromal, vascular, or pleural invasion (Fig. 3B). Acinar-predominant ADCs were characterized by round to oval-shaped glands with a central luminal space surrounded by tumor cells and contained mucin. Some cases had rounded aggregates of tumor cells with peripheral nuclear polarization and central cytoplasm without a clear lumen or cribriform arrangements (Fig. 3C). Papillary-predominant ADCs had growth of glandular cells along central fibrovascular cores (Fig. 3D). Solid-predominant ADCs exhibited polygonal tumor cells that formed sheets, lacked the recognizable patterns for ADC, and contained mucin as determined by histochemistry.

After the amplification of *HYAL1, HYAL2*, and *HYAL3* cDNAs, PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. As shown in Fig. 4, isoforms were identified in accordance with size of the band generated by each primer pair and tumors exhibited HYAL products of different lengths.

The percentage of tumor and normal lung tissue specimens expressing each variant and wild-type transcript was determined (Table 2). *HYAL1-wt, HYAL1-v1, HYAL1-v2, HYAL2-wt, HYAL3-wt,* and *HYAL3-v1* were expressed in significantly more tumors than normal lung tissues. We found simultaneous expression in matched tumor and normal lung tissue in 4 cases (27%) for *HYAL1-wt*, 2 cases (12%) for *HYAL1-v1*, 1 case (6%) for *HYAL1-v2*, 4 cases (25%) for *HYAL1-v3*, 5 cases (30%) for *HYAL2-wt*, and 6 cases (38%) for *HYAL3-wt*, whereas no simultaneous expression was found for *HYAL3-v1, HYAL3-v2*, or *HYAL3-v3*. The bivariate correlations among *HYAL1*, *2, 3*, and their variants were determined in tumor and normal lung tissues (Table 3). We found that, for the most part, there was a positive association among wild-type HYAL transcripts and their variants as well as among the HYAL variants themselves in tumor and normal lung tissues.

When we analyzed the expression patterns in the different histological subtypes, we found that a significantly high percentage of SQCCs expressed *HYAL1-wt* and an elevated fraction of ADCs expressed *HYAL3-v1* (Table 3).

Table 2 Summary of *HYAL1, 2*, and *3* genic expression, stratified by tumor and normal lung tissue specimens

Genic expression	Lung specimens	
	Tumor	Normal tissue
HYAL1-wt	22 (26.2) *	6 (7.1)
• *HYAL1-v1*	26 (30.6) *	4 (4.7)
• *HYAL1-v2*	35 (41.2) *	3 (3.5)
• *HYAL1-v3*	19 (22.4)	10 (11.8)
• *HYAL1-v4*	5 (5.9)	3 (3.5)
• *HYAL1-v5*	0 (0) *	8 (9.4)
HYAL2-wt	53 (62.4) *	5 (5.9)
HYAL3-wt	25 (29.4) *	7 (8.2)
• *HYAL3-v1*	15 (20.5) *	1 (1.4)
• *HYAL3-v2*	17 (23.3)	1 (1.4)
• *HYAL3-v3*	15 (20.5)	0 (0)

Expression of *HYAL1-wt, HYAL2-wt* and *HYAL3-wt* and variants, stratified according tumor and nontumor specimens. Values are number (percentage) of lung specimens expressing *HYAL-wt* and variants. Pearson χ^2 test was used to explore differences between tumor and nontumor specimens.

* Significantly different from nontumor lung specimen ($P < .05$).

Table 3 Correlation among *HYAL1, 2, 3*, and variants

A. Tumor lung tissue

	HYAL1-wt	*HYAL1-v1*	*HYAL1-v3*	*HYAL1-v4*	*HYAL1-v5*	*HYAL2-wt*	*HYAL3-wt*	*HYAL3-v1*	*HYAL3-v2*	*HYAL3-v3*
HYAL1-wt		$R = .34$; $P = .002$			$R = -.23$; $P = .03$		$R = .30$; $P = .006$			$R = -.23$; $P = .05$
HYAL1-v1				$R = .27$; $P = .01$		$R = .45$; $P = .0001$	$R = .29$; $P = .007$	$R = .38$; $P = .001$		
HYAL1-v2			$R = .52$; $P = .03$					$R = .32$; $P = .005$	$R = .25$; $P = .03$	
HYAL2-wt	$R = .32$; $P = .003$						$R = .32$; $P = .003$			
HYAL3-wt		$R = .65$; $P = .006$						R = 100; $P = .0001$		

B. Normal lung tissue

	HYAL1-v2	HYAL1-v4	HYAL1-v5	HYAL2-wt	HYAL3-wt
HYAL1-w	$R = .48$; $P = .007$	R = 1.0 $P = .0001$	$R = -.87$; $P = .0001$	$R = .74$; $P = .002$	
HYAL1-v1	$R = .83$; $P = .0001$			$R = .85$; $P = .0001$	
HYAL1-v2				$R = .71$; $P = .002$	$R = .55$; $P = .03$

NOTE. Bivariate Pearson test was used to explore associations among variables in tumor and normal lung tissue.

Table 4 HYAL expression according to histological types and subtypes

HYALs	SQCC (n = 22)	ADC (n = 47)				*P*
		In situ	Invasive			
		AIS (n = 7)	Acinar (n = 19)	Papillary (n = 13)	Solid (n = 8)	
HYAL1-wt	9 * (18.8)	1 (1.4)	2 (2.9)	2 (2.9)	4 (5.8)	.004
HYAL1-v1	7 (10.1)	3 (4.3)	10 ** (14.5)	1 (1.4)	5 (7.2)	.054
HYAL1-v2	11 (15.9)	3 (4.3)	7 (10.1)	10 (14.5)	4 (5.8)	.266
HYAL1-v3	5 (7.2)	2 (2.9)	4 (5.8)	4 (5.8)	4 (5.8)	.600
HYAL1-v4	0	1 (1.4)	3 (4.3)	0	1 (1.4)	.228
HYAL1-v5	0	0	0	0	0	
HYAL2-wt	18 (26.1)	4 (5.8)	15 (21.7)	9 (13.0)	7 (10.1)	.590
HYAL3-wt	7 (10)	3 (4.3)	4 (5.8)	5 (7.2)	6 (8.7)	.114
HYAL3-v1	2 (2.9)	2 (2.9)	5 (7.2)	4 (5.8)	2 (2.9)	.530
HYAL3-v2	7 (10.1)	1 (1.4)	5 (7.2)	1 (1.4)	3 (4.3)	.438
HYAL3-v3	2 (2.9)	0	6 (8.7)	4 (5.8)	3 (4.3)	.142

NOTE. Values are number (percentage) of lung tumors expressing *HYAL-wt* and variants. Pearson χ^2 test was used to explore differences between HYAL *vs* histological subtypes.

* Significantly different from SQCC ($P < .05$).

** Significantly different from acinar-predominant ADC ($P < .05$).

When we subclassified ADCs, we found that *HYAL1-v1* was predominantly expressed in the acinar-predominant tumors (Table 3).

3.1. Survival analysis

Several combinations of clinical and morphological variables were tested to generate a mathematical model relevant to patient survival. The results of the best combination, determined by Cox model analysis, appear in Table 4. Five variables were significantly associated with survival time, including age, pathological N stage, treatment, histological subtype, and *HYAL1-wt* or *HYAL3-v1* levels. For example, we found that an increase in N stage was significantly correlated with decreased survival time (P = .001). However, when *HYAL1-wt* was present as a covariate, the correlation between N stage and survival was much stronger. Multivariate analyses show a high risk of death associated with expression of *HYAL1-wt* (odds ratio [OR] = 207), lymph node metastasis (OR = 1.11), older than 69 years, and ADC (OR = 2.87) (Table 5). Regression plots of the probability of survival versus follow-up time in months in patients with lung cancer show that the group lacking *HYAL1-wt* expression has a better chance of survival than the group with *HYAL1-wt* expression. In contrast, the group lacking *HYAL3-v1* expression has a worse chance of survival compared with the group with *HYAL3-v1* expression. Introduction of the remaining HYAL variables into a mathematical model controlled for age, pathological N stage, histological subtypes did not impact survival (Table 6).

4. Discussion

Small fragments (2–25 disaccharide units) from the degradation of HA stimulate endothelial cell proliferation, which is an essential process in the induction of angiogenesis

Table 5 Survival model by Cox regression for relative risk of death controlled for age, N stage, treatment, and histological subtypes (log-likelihood 109,749, P = .0001)

	B Coefficient	SE	Wald	*P* value	Risk (*B*)	95% CI for exp(*B*)	
						Lower	Upper
Age (younger than 69 y)	−1.09	0.62	3.08	.08	0.33	0.09	1.14
N stage 2			9.33	.009			
N stage 0	−1.77	0.61	8.36	.004	0.17	0.05	0.56
N stage 1	0.10	0.74	0.02	.008	1.11	0.26	0.79
Surgery + chemotherapy+ radiotherapy			8.89	.008			
Surgery + chemotherapy	0.09	0.65	7.99	.003	0.65	0.10	1.25
ADC	1.05	0.94	1.25	.03	2.87	0.45	1.26
Squamous cell	0.03	0.84	0.001	.04	1.02	0.19	5.33
HYAL1-wt	0.73	0.85	0.74	.03	2.07	0.39	0.92
HYAL3-v1	−0.73	0.67	1.19	.02	0.48	0.13	1.78

Table 6 Relative risk of death for patients controlled for age, N stage, and histological subtypes according to HYAL expression

	B	SE	Wald	*P* value	Exp(*B*)	95% CI for exp(*B*)	
						Lower	Upper
HYAL1-v1	−0.374	0.585	0.409	.522	0.688	0.218	2.166
HYAL1-v2	−0.175	0.516	0.115	.735	0.839	0.305	2.309
HYAL1-v3	−0.226	0.576	0.154	.695	0.798	0.258	2.466
HYAL1-v4	0.327	1.114	0.086	.769	1.387	0.156	12.312
HYAL2-wt	0.483	0.672	0.516	.473	1.621	0.434	6.055
HYAL3-wt	0.351	0.577	0.369	.543	1.420	0.458	4.403
HYAL3-v2	0.621	0.606	1.049	.306	1.861	0.567	6.110
HYAL3-v3	−0.030	0.554	0.003	.957	0.971	0.328	2.875

in vivo and fundamental to tumor progression [16]. Digestion of the extracellular matrix by tumor HYAL results in the release of growth factors stored in the microenvironment, which enhances the availability of these factors to target cells. Some of these factors, such as vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor, are essential for angiogenesis and for neovascularization, promoting tumor growth, and progression [16].

We studied the expression of HYAL wild-type and splice variants in SQCC and ADC because these molecules have been found to be important in tumor invasion and angiogenesis. We found that *HYAL1-wt, HYAL1-v1, HYAL1-v2, HYAL2-wt, HYAL3-wt*, and *HYAL3-v1* were expressed preferentially in tumor tissues compared with matched normal lung tissues. HYAL expression was related to histological subtype, specifically *HYAL1-wt* in SQCCs, *HYAL3-v1* in ADCs, and *HYAL1-v1* in acinar-prevalent ADCs. Expression of *HYAL1-v4* and *HYAL1-v5* was rare in both normal and malignant lung tissues. *HYAL2-wt* was expressed in a similar proportion of SQCCs and ADCs. Low expression of *HYAL2* is associated with high-grade lymphomas and may be related to the aggressiveness of B-cell non-Hodgkin lymphomas [17]. In addition, detection of *HYAL2* and fragile histidine triad deletions in smokers' sputum is associated with a diagnosis of lung cancer [18]. We also found that expression of *HYAL1-wt* was associated with poor prognosis. *HYAL1-wt* produces the enzymatically active HYAL responsible for degrading hyaluronic acid into small fragments, inducing mobilization, and invasion of neoplastic cells. Our finding is in agreement with a previous study that found *HYAL1-wt* only in high-grade bladder tumors, lymph node specimens, and prostate cancer cell lines [19].

Our results revealed that expression of *HYAL3-v1* in tumor samples is predictive of long-term patient survival. During alternative splicing, the variants are rendered enzymatically inactive due to the loss of 30 amino acids from the protein [20]. This sequence is encoded by one 90-bp exon present in both the *HYAL1* and *HYAL3* genes. These 30 amino acids constitute the substrate-associated catalytic cleavage site of the glycosidic bond between *N*-acetyl-D-glucosamine and D-glucuronic acid [20]. Since HA is a polymer consisting of repeating disaccharide units of *N*-acetyl D-glucosamine and D-glucuronic acid, it is not degraded by HAases encoded by the *HYAL1* and *HYAL3* variants. Therefore, HA degradation is restricted to HAases that originate from wild-type transcripts [20].

We have previously shown that expression of HYAL variants in prostate tumors is associated with low Gleason score and reduced tumor recurrence. Specifically, *HYAL3-v1* was present in tumors with low Gleason scores and in benign prostatic hyperplasia and *HYAL3-v2* and *HYAL1-v3* were expressed preferentially by tumors that had not recurred [21]. A novel EGF-like domain present in the HYAL structure [22] is retained in *HYAL1* and *HYAL1-v1, HYAL1-HYAL1-v2*, *HYAL1-v4*, and *HYAL1-v5* splice variants but is lacking in *HYAL1-v3*. The exact role of the EGF domain has yet to be determined but is probably involved in protein-protein interactions and regulatory processes.

We conclude that expression of HYAL splice variants is associated with morphology, stage, and long-term outcome in patients with ADC and SQCC. Particularly, *HYAL1-wt* and *HYAL3-v1* affect tumor motility and invasiveness, suggesting that strategies aimed at modulating the levels of *HYAL1-wt HYAL3-v1* may be useful for lung cancer treatment. To realize this will require a larger scale study in a randomized and prospective trial.

References

[1] American Lung Association Epidemiology and Statistics Unit Research and Program Services Division. Trends in Lung Cancer Morbidity and Mortality. 2010. http://www.lungusa.org/finding-cures/our-research/trend-reports/lc-trend-report.pdf [Accessed April 2010].
[2] Curado MP, Edwards B, Shin HR, et al. Cancer incidence in five continents, vol. 9. Lyon: IARC Scientific Publications; 2007.
[3] Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? Glycobiology 2003;12:105-15.
[4] Delpech B, Girard N, Bertrand P, et al. Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. J Intern Med 1997;242:41-8.
[5] Turley EA, Noble PW, Bourguignon LYW. Signaling properties of hyaluronan receptors. J Biol Chem 2002;277:4589-92.

[6] Herrlich P, Morrison H, Sleeman J, et al. CD44 acts both as a growth and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor. Ann NY Acad Sci 2000;910:106-18.
[7] Posey T, Soloway MS, Ekici S, et al. Evaluation of the prognostic potential of hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) for prostate cancer. Cancer Res 2003;63:2638-44.
[8] Pirinen R, Tammi R, Tammi M, 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;95:12-7.
[9] Ropponen K, Tammi M, Parkkinen J, et al. Tumor cell–associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer. Cancer Res 1998;58:342-7.
[10] Hobarth K, Maier U, Marberger M. Topical chemoprophylaxis of superficial bladder cancer with mitomycin C and adjuvant hyaluronidase. Eur Urol 1992;21:206-10.
[11] Rein DT, Roehrig K, Schondorf T, et al. Expression of the hyaluronan receptor RHAMM in endometrial carcinomas suggests a role in tumor progression and metastasis. J Cancer Res Clin Oncol 2003;129:161-4.
[12] Lokeshwar VB, Obek C, Soloway MS, et al. Tumor associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. Cancer Res 1998;58:31-41.
[13] Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, et al. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase in prostate cancer. J Biol Chem 1998;276:11922-32.
[14] Travis W, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. J Thorac Oncol 2011:244-85.
[15] Travis W, Brambilla E, Hermelink-Muller HK, Harris CC, editors. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC Press; 2004.
[16] Harada H, Takahashi M. CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. J Biol Chem 2007;282:5597-607.
[17] Bertrand P, Courel MN, Maingonnat C, et al. Expression of HYAL2 mRNA, hyaluronan, and hyaluronidase in B-cell non-Hodgkin lymphoma. Relationship with tumor aggressiveness. Int J Cancer 2006;113:207-12.
[18] Li R, Todd NW, Qiu Q, et al. Genetic deletions in sputum as diagnostic markers for early detection of stage I non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2007;13:482-7.
[19] Lokeshwar VB, Schroeder GL, Carey RI, et al. Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing. J Biol Chem 2002;277:33654-63.
[20] Markovic-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, et al. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. Structure 2000;8:1025-35.
[21] de Sá VK, Canavez FC, Silva IA, Srougi M, Leite KR. Isoforms of hyaluronidases can be a predictor of a prostate cancer of good prognosis. Urol Oncol 2009;27:377-81.
[22] Chao KL, Muthukumar L, Herzberg O. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. Biochemistry 2007;46:6911-20.

HYALURONIDASE, HYALURONAN SYNTHASE, E-CADHERIN, AND TGF-β MODULATE A DIFFERENT TUMOR-INDUCED INVASIVE PATHWAY IN LUNG ADENOCARCINOMA SUBGROUPS AND SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Vanessa Karen de Sá 1, Lina Carvalho [2], Ana Gomes [2,] Ana Alarcão [2], Maria Reis Silva [2], Patrícia Couceiro[2], Vitor Sousa[2], Fernando Augusto Soares [3,] , Vera Luiza Capelozzi[1].

Department of Pathology, [1]Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil, [2]Universidade de Coimbra, Portugal, and [3] Hospital AC Camargo, São Paulo, Brazil,

Running Title: Hyaluronidases and hyaluronan synthases in NSCLC

This study was supported by the following Brazilian agencies: the National Council for Scientific and Technological Development [CNPq UNIVERSAL 474405/2008-7 UNIVERSAL]; Foundation for the Support of Research of the State of São Paulo [FAPESP: 08/57911-7 and 08/58557-2]; and the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel [Capes: 1294-10-5**].**

Poster presentation at the 2011 Amsterdam European Respiratory Congress

Poster presentation at the 2011 PPS Biennial Meeting, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York City.

Correspondence to:

Prof Vera Luiza Capelozzi, e Vanessa Karen de Sá, Departamento de Patologia

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Av. Dr. Arnaldo 455, sala 1143, ZIP CODE 01296-903, São Paulo, SP, Brazil

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

E-mail: vcapelozzi@lim05.fm.usp.br / vankaren@usp.br

ABSTRACT

Aims: Among the most common features of highly invasive tumors, such as lung adenocarcinomas, is the massive degradation of the extracellular matrix (ECM); and the remarkable qualitative and quantitative modifications of hyaluronic acid (HA), E-cadherin adhesion molecules, and the transformer growth factor β (TGF-β) may favor invasion, cellular motility, and proliferation. We examined Hyal, HAS, E-cadherin, and TGF-β profiles in lung adenocarcinoma (AD) subtypes and squamous cell carcinomas (SQCC) obtained from smokers and nonsmokers. **Methods:** Fifty-six patients, mean age 64 years, who underwent lobectomy for AD (n = 31) and SqCC (n = 25) were included in the study. **Results:** Overexpression of HAS3 and Hyal1 was found in neoplastic epithelial cells of adenocarcinoma and mesenchymal cells of squamous cell carcinomas. Smoking history presented a positive association with HAS1 in tumor epithelial cells, and tumors from patients without lymph node metastasis overexpressed E-cadherin. Predominant acinar and papillary adenocarcinoma was negatively associated with HAS1 in mesenchymal cells; papillary AD was positively associated with HAS3 and Hyal1 in tumor cells. Positive associations were found for TGF- β in tumor cells and HAS2 in mesenchymal cells, E-cadherin in mesenchymal cells and HAS2 in tumor cells, Hyal1 in tumor cells and HAS1 in mesenchymal cells, Hyal3 and HAS1 in mesenchymal cells, Hyal3 in tumor cells and HAS1 in mesenchymal cells, and Hyal3 and HAS1 in tumor cells. Negative correlations were found between TGF-β, HAS3, and Hyal1. **Conclusion:** Hyaluronidase, hyaluronan synthase, E-cadherin, and TGF-β modulate a different tumor-induced invasive pathway in lung AD subgroups and SQCC. An inverse relationship between epithelial and mesenchymal biomarker expression provides a different spectrum of aggressiveness. While an overexpression of HAS1

and HAS3 indicates aggressive subtypes of SQCC and AD, an overexpression of TGF-β and E-cadherin, indicates a protective role of the ECM in avoiding invasion by tumoral cells in both histological types. Therefore, our findings suggest that strategies aimed at preventing high HAS3 and Hyal1 synthesis, or local responses to low TGF-β and E-cadherin, may have a greater impact in lung cancer. Proof of this idea will require further study in a randomized, prospective clinical trial.

Key Words: Lung cancer, E-cadherin, TGF-β, HAS1, HAS2 e HAS3, Hyal1 e Hyal3, immunohistochemistry, prognosis, and morphometry,

INTRODUCTION

Adenocarcinoma (ADC) and squamous cell carcinoma (SQCC) are the 2 most common histological carcinoma subtypes in most countries, accounting for ~90% of all lung cancers (1). Considering that ADC is a heterogeneous group of tumors with a highly variable prognosis, a new classification of lung ADC based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system was proposed. Such a new classification provides advantages for personalized therapy to patients, better patient selection, and stratification for clinical trials and molecular studies. ADC histology is a strong predictor of response to pemetrexed therapy in advanced stage patients (2), whereas SQCC is important because of potential life-threatening hemorrhage in patients with SQCC who receive bevacizumab therapy (3). Despite advances in personalized therapy in the last years, the death rate by lung cancer has remained almost unchanged, and the main cause of death is invasion and metastasis (4). There is great interest in ways to identify which tumors are likely to invade, metastasize, and shorten the patient's life, to optimize therapeutic efforts for each individual patient (5). Considering that lung cancer is the phenotypic consequence of the interactions between epithelial and mesenchymal factors (such as extracellular matrix) for growth, invasion, and metastasis, ongoing studies are currently validating other biomarkers. In this context, remarkable qualitative and quantitative modifications of the epithelium-mesenchymal components, such as hyaluronic acid (HA), E-cadherin adhesion molecules, and the transformer growth factor β (TGF-β) may favor invasion, cellular motility, and proliferation. Hyaluronan (HA), a large unsulfated glycosaminoglycan, is expressed by many cell types and contributes to cellular functions. The biosynthesis and turnover of HA is abnormal in many types of diseases and inflammatory processes. Elevated levels of HA in serum and tissues is an

important marker for a variety of pathological conditions (6). Migration of tumor cells in a cellular matrix rich in HA occurs after it is degraded into fragments of 2-25 disaccharides and is mediated by specific cell surface receptors, CD44, and RHAMM (receptor for hyaluronan mediates motility) (7). Hyaluronan synthase (HAS) consists of a group of isozymes responsible for synthesis of HA with different chains. There are 3 types of HASs termed HAS1, HAS2, and HAS3 (8). HAS mRNA levels often correspond to the rate of hyaluronan synthesis, and are known to influence the content of HA in transplanted tumors (9). Therefore, upregulation of HAS expression is a likely contributor to HA accumulation in tissues, and promotes tumor growth (10) and metastasis in experimental animals, especially when coexpressed with hyaluronidase (11). Different types of (HAase) hyaluronidases, Hyal1, Hyal2, and Hyal3 can degrade the long chains of alternative units of N-acetyl-glusamine and hyaluronan in different sizes. For example, Hyal1 is responsible for degrading HA into small fragments of 20-25 disaccharides, needed to activate the MAP-kinase pathway (12). The major transcript of Hyal3 is enzymatically inactive and appears to have only a supportive role in Hyal1 expression (13). Increased HAase expression has also been reported in colon (14) and prostate cancer, (15) as well as in breast tumor metastases (16). Notably, the growth of murine lung carcinoma and melanoma cells is influenced by Hyal1(17). In lung fibroblasts, HA synthesis and degradation appear to be controlled by transforming growth factor 1 (TGF-β1) (18). Transforming growth factor beta (TGF-β) has profound growth-suppressive effects on normal epithelial cells, but supports metastasis formation in many tumor types. As opposed to the function of HAase, TGF-β is a potent stimulator of extracellular matrix (ECM) protein (19). The key molecule that maintains epithelial cell-cell adhesion and integrity is E-cadherin. E-cadherin, the prototype member of the classical cadherin family, is a Ca2-dependent transmembrane receptor that mediates cell-cell adhesion at the adherent junctions via homophilic binding (20). In most, if not

all cancers of epithelial origin, E-cadherin mediated cell–cell adhesion is lost concomitantly with progression towards tumor malignancy (21).

In light of these previous data suggesting different clinical behavior among Adenocarcinomas subtypes, as well as an interaction between epithelial and mesenchymal factors, the aim of the present study was to evaluate [1] whether Hyal and HAS are over-deposited in epithelial and mesenchymal cells of ADC and SQCC; [2] the relationship among Hyal, HAS, E-cadherin, and TGF-β; [3] whether these biomarkers are associated with the new classification of adenocarcinoma; [4] and to verify the impacts of smoking history and staging of the patients. It was hypothesized that in ADC and SQCC, tumors with different behavior, hyaluronidase, hyaluronan synthase, E-cadherin, and TGF-β should modulate different tumor-induced invasive pathway. It was found that SqCC expressed Hyal 3 by mesenchymal cells, whereas acinar predominant ADC strongly expressed HAS 3 by epithelial cells. Both histologic types and smoking history were associated with tumor epithelial expression of HAS1 and HAS3, whereas E-cadherin was more frequent in the samples without lymph node metastasis. An inverse relationship between epithelial and mesenchymal biomarker expression provided a different spectrum of aggressiveness. While an overexpression of HAS1 and HAS3 provides aggressiveness to SQCC and ADC, an overexpression of TGF-β and E-cadherin, provides a protective role to the ECM, by helping it to avoid invasion by tumor cells in both histological types.

MATERIALS AND METHODS

This research was approved by the Institutional Ethical and Scientific Committees N° 0171/09.

Patients

Lung specimens from 56 patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) were selected from a tumor bank of the Coimbra University Hospital. Twelve specimens of normal lung tissue were obtained from same bank.

All specimens were classified at clinical stage $T_{1-3}N_{0-2}M_0$ and were considered to have tumors potentially curable by surgical resection. After the surgical resection, all these patients were followed for at least 2 years. Clinical staging was determined by routine chest x-ray, bronchoscopy, computed tomography of the thorax and upper abdomen, abdominal ultrasound, and bone scans. Mediastinoscopy and lymph node biopsy were additionally performed on patients whose lymph nodes had a short-axis diameter of > 1 cm. Other details about these patients are summarized in Table 1.

Tumor tissues used in this study were examined and verified for histologic diagnosis by 2 research staff (VKS and VLC) who classified the tumors as squamous cell, adenocarcinoma, or large cell carcinoma types according to the new guidelines for classification of non-small cell carcinomas proposed by Travis et al (22). Given the sub-analysis on 56 heterogeneous samples consisting of different histologic types and stages as well as different treatments.

Immunohistochemistry evaluation

For immunohistochemistry, the avidin-biotin-peroxidase-complex and streptavidin-biotin enzyme complex immunostaining methods were used with antibodies against: Hyal1 (dilution, 1:50), Hyal3 (dilution 1:50), HAS1 (dilution 1:50), HAS3 (dilution 1:50), E-cadherine (dilution 1:100), TGF-β (dilution 1:100), (mouse monoclonal antibodies from DAKO, Carpinteria, CA, USA. Immunohistochemical reactions were performed in accordance with the manufacturer's directions. Diaminobenzidine was used as the color substrate, and Meyer's hematoxylin was

used for counterstaining. Brownish cytoplasmic staining was considered to be evidence of antigen expression.

Histomorphometry

The quantification of the markers, after immunohistochemistry reaction was done using the Automated Cellular Imaging System (ACIS; DAKO, Carpinteria, CA, USA) III instrument. Briefly, the components of ACIS III consists of an automated digital microscope and a computer with a 26 image capture and image processing system. Each immunohistochemically stained slide was scanned and the images were reviewed on the computer screen. The ACIS III is able to detect count and classify cell types based on levels of hue, saturation and brightness. The signal is then converted to number density measurement. To analyse the expression of proteins was used the computer program “membranes and cytoplasm”, resident in the system. This program measures intensity of staining of cytoplasm and cell membrane and provides a result in continuous variables ranging from 0 to 256. This is attributed to the threshold, i.e., indicates to the software immunoreactivity with cells and cells without immunoreactivity. The areas to be analyzed on each slide were selected manually using the selection tools of the ACIS III. For statistical analyses we used the average of two regions (stroma and tumor) of each case (23).

Statistical analysis

Data are expressed as the mean (± standard error of the mean) with 95% confidence intervals. Statistical analysis was performed by analysis of variance, followed by appropriate *post hoc* tests, including Bonferroni for multiple comparisons by the one-way analysis of variance (ANOVA) test and Student’s t-test for 2 variables between groups. The Pearson test was used for verification of association between the different biomarkers and the clinical data

base of the patients. The statistical program used was SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A p value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

ADC and SQCC, are respectively represented as stained by H&E (Figure 1 A, B, C, and D) and immunohistochemistry for HYAL 1, 3 (Figure 2 and 3), HAS 1, 2, 3 (Figure 4, 5, and 6), E-Cadherin (Figure 7), and TGF-β (Figure 8). Squamous cell carcinoma was characterized by keratinization, pearl formation, and intercellular bridges (Figure 1 A) and expressed Hyal3 by stromal cells. Adenocarcinoma *in situ* (AIS) exhibited growth restricted to neoplastic cells along pre-existing alveolar structures (lepidic growth), lacking stromal, vascular, or pleural invasion (Figure 1B), and presented a weak expression of the immunomarkers. Acinar predominant adenocarcinoma revealed a majority component of round to oval-shaped glands with a central luminal space surrounded by tumor cells containing mucin. Some cases showed rounded aggregates of tumor cells with peripheral nuclear polarization with central cytoplasm without a clear lumen or a cribriform arrangement (Figure 1C), and strongly expressed HAS3. Papillary predominant adenocarcinoma showed a major component consisting of a growth of glandular cells along central fibrovascular cores (Figure 1D). Solid predominant adenocarcinoma exhibited a major component of polygonal tumor cells forming sheets which lack the recognizable patterns of adenocarcinoma, with mucin detected by histochemistry. Papillary and solid adenocarcinomas also presented a weak expression of the immunomarkers.

Table 2 summarizes the morphometric results for the tumor and control. Tumor and control specimens expressing HAS1, 2, and 3 and Hyal1 and 3 were compared (Table 2).

Clearly, HAS1, 2 and 3, and HYAL1 and 3 were significantly more expressed by tumor cells than by mesenchymal cells. As shown in Table 2, the E-cadherin index was significantly increased in the tumor epithelial cells compared to mesenchymal cells ($p = 0.0001$). TGF-B occurred to a higher extent in the tumor epithelial cells and mesenchymal cells ($p = 0.0001$). The HAS 1, 2, and 3 were highly expressed by tumor epithelial cells as compared to mesenchymal cells ($p<0.01$).

Equally significant were the increased expressions of HYAL1 and 3 by tumor cells compared to nontumor cells and controls ($p<0.01$).

A large population of neoplastic epithelial and stroma cells had detectable Hyal 1 (Figure 2 A-B), Hyal 3 (Figure 3 A-D), HAS 1 (Figure 4 A-B), HAS 2 (Figure 5A-B), HAS 3 (Figure 6 A-B), E-cadherin (Figure 7 A-D), and TGF-β (Figure 8 A-B), in lungs from tumoral areas. The statistical analysis showed an increased expression of HAS 3 and Hyal 1 in neoplastic epithelial cells of adenocarcinoma ($p = 0.01$) and the stroma of squamous cells carcinomas ($p = 0.002$), respectively, when compared with other biomarkers in the different histological groups, Figure 3.

Table 3 summarizes the associations between clinical and morphological variables with statistical significance. Multivariate analysis including the different biomarkers analyzed and clinical data was performed. Smoking history presented a positive association with HAS1 in tumor cells ($R = 0.38$; $p = 0.01$), HAS3 in mesenchymal cells ($R = 0.40$, $p = 0.05$) and Hyal1 in mesenchymal cells ($R = 0.40$, $p = 0.05$). Acinar ADC was negatively associated with HAS1 in mesenchymal cells ($R = -0.35$, $p = 0.02$) and papillary ADC ($R = -0.49$, $p = 0.05$), whereas papillary ADC was positively related to HAS3 ($R = 0.27$, $p = 0.04$), and Hyal1 ($R = 0.53$, $p = 0.04$) in tumor cells. Considering pathological N stage, E-cadherin was more frequently expressed by lung samples from patients without lymph node metastasis ($R = 0.33$, $p = 0.01$).

The following positive associations were found between the biomarkers studied: TGF-β in tumor cells and HAS2 in mesenchymal cells (R = 0.40, p= 0.03), E-cadherin in mesenchymal cells and HAS2 in tumor cells (R = 0.47, p = 0.11), Hyal3 and HAS1 in mesenchymal cells (R = 0.58 p = 0.02), Hyal in tumor cells, and HAS1 in mesenchymal cells (R: 0.44, p = 0.01), Hyal3 and HAS1 in tumor cells (R: 0.35, p = 0.01). A negative correlation was found between TGF-β, HAS3, and Hyal1, where the expression of TGF-β was lower in the presence of the HAS3 in mesenchymal cells of lung tumors (R = -0.54, p = 0.004), and Hyal1 in tumors cells (R = -0.40, p = 0.03). No association was found between the protein markers and known markers of "aggressiveness" such as tumor size, grade or relapse rates**.**

DISCUSSION

In the present study it was hypothesized that in ADC subtypes and SqCC, tumors with different behavior, Hyal, HAS, E-cadherin, and TGF-β should modulate different tumor-induced invasive pathway. Generally, while an over expression of HAS1 and HAS3 provides aggressiveness to SQCC and ADC, an over expression of TGF-β and E-cadherin, provided a protective role to the ECM, by helping it to avoid invasion by tumor cells in both histological types.

Specifically, it was found that HAS1, 2, 3, and HYAL1, 3 were significantly over expressed by tumor cells than by mesenchymal cells. In fact, the heterogeneity of hyaluronidase expression has been identified in tumors and shows promise as an indicator of disease progression. In a previous study, our group demonstrated that the expression profile of alternatively spliced mRNA forms of HYAL was associated with histology and outcome,

suggesting that strategies aimed at modulating their levels may be effective for lung cancer treatment (27).

We also detected an over expression of HAS 3 and Hyal 1 by neoplastic epithelial cells of adenocarcinoma and the stroma of squamous cells carcinomas when compared with other biomarkers in the different histological groups. Thus, we document for the first time a pathway whereby HAS3 and Hyal 1 over expression respectively by neoplastic epithelial and mesenchymal cells may favor different pathway for invasion respectively in ADC and SQCC. HAS3 is the most active HAS, responsible for synthesis of low molecular weight HA (2×10^6 Da), which contributes to autonomically pericellular matrix formation and interaction with HA receptors, activating cellular signaling cascades, and leading to changes in tumor behavior. HAS3 is known to contribute to the malignant phenotype in many malignancies (28). Tumor metastasis is a complex series of events in which cells migrate beyond tissue compartments and spread to distant organ sites. Hyaluronan has an important role in regulating tumor growth and metastasis through its cell surface CD44 receptor, a major glycosaminoglycan component of the ECM, because it mediates cellular adhesion to ECM, which is a prerequisite for tumor cell migration (29). Tumor cell invasion involves the active movement of cells across the ECM (29). Adhesion to ECM, a critical initial step in the metastatic process, has been found to be hyaluronan-dependent in several tumors (30). Interestingly, we found that predominant acinar and papillary AD was negatively associated with HAS1 expression in mesenchymal cells, whereas a positive relationship was found between papillary AD, HAS3, and Hyal1 expression in epithelial tumor cells. These findings suggest that an overexpression of HAS1 and 3 by epithelial tumor cells provides aggressiveness to acinar and papillary AD, but a negative expression of HAS1 by mesenchymal cells provides a protective role to ECM by helping it to avoid invasion by tumoral cells in both histological subtypes. Our findings may be supported by

the recent validation of the new classification of lung AD proposed by IASLC/ATS/ERS in a North American series (31) and in a series of Australian patients (32). According to both series, the new subtypes of AD in situ, minimally invasive AD and lepidic-predominant AD, had 5-year survival rates approaching 100%, whereas micropapillary-predominant and solid with mucin-predominant AD were associated with particularly poor survival, and papillary-predominant and acinar-predominant had an intermediate prognosis. As previously mentioned by Golshani and colleagues[14] upregulation of HAS expression is a likely contributor to HA accumulation in tissues, thus promoting tumor growth and metastasis in experimental carcinogenesis. Our findings indicate that tumor HAS3 and Hyal1 over expression in human AD subtypes and SQCC constitute an important driving force for invasion of neoplastic cells. Thus, HAS3 and Hyal1 expression may form the basis for an important tumor-induced invasive pathway.

As expected, E-cadherin index was significantly over expressed by tumor cells than by mesenchymal cells, whereas TGF-B occurred to a higher extent in both tumor and mesenchymal cells. These findings are supported by previous works that showed E-cadherin adhesion molecules and the transformer growth factor β favoring invasion, cellular motility, and proliferation (18, 21). More interestingly was the clear positive or negative relationship between growth-factors in tumor cells (TGF-β) and ECM regulators (HAS1, 2, 3, Hyal 1 and E-cadherin). One explanation for these findings may be supported by the fact that HAS2 has the capacity of to activate latent TGF-β suggesting an autocrine and a paracrine pathway in which collagen deposition and further invasion may be enhanced (33). Another explanation is that the activation of latent TFG-β also provides an additional pathway for tumor-induced immune suppression (34). In addition, recent studies by Sun et al (35) demonstrate that hyaluronan fragments have the capacity to upregulate TFG-β by a CD44-dependent pathway. Concerning E-cadherin, some studies report that TGF-β affects the complex of cell adhesion mediated by E-cadherin-catenin in

tumor cells. However, in a study using a culture of pancreatic cells conducted to evaluate the induction of the complex E-cadherin-catenin by the addition of TGF-β in the culture medium, it was demonstrated that the treatment of pancreatic tumor cells with TGF-β resulted in reduced cell adhesion due to dissociation of E-cadherin-catenin from the cytoskeleton (36) Sayo et al (37) demonstrated in cultured human keratinocytes that TGF-β can also regulate the expression of HAS by suppressing HAS3. These results give support to our findings of HAS3 and Hyal1 overexpression in the absence of TGF-β, thus suggesting that a decrease in TGF-β expression could also contribute to a more invasive phenotype because HAS3 and Hyal1 are up-regulated in this situation. As previously mentioned, HAS3 synthesizes the low molecular weight HA, and interestingly, Hyal1 is the enzyme responsible for its degradation.

Other interesting relationship we found, such as co-expression of ECM regulators (HAS1 and Hyal 1,3) by both tumoral and epithelial cells may be an evidence to link known factors of adverse outcome to the biomarker. In fact, the simultaneous expression of these 2 enzymes could confer a better prognosis, because of the ability of HAS1 to synthesize a long chain of HA, while Hyal3 cleaves it into larger fragments larger, helping to preserve the ECM structure. Concerning Hyal3 immunoreactivity found in mesenchymal cells of SqCC, there are no studies evaluating the expression of this enzyme in lung tumors. However, Lokeshwar et al (38) showed that this protein was expressed in high grade tumors and metastatic lymph nodes. The expression of this protein in the tumor mesenchymal cells may contribute to the degradation of HA, favoring cellular growth, migration, and consequently tumor invasion.

Our findings have also an impact in some clinic-pathologic factors. For example, smoking history and lymph node metastasis presented a positive association with ECM regulators by tumor cells (HAS1 and E-cadherin, respectively). These findings are corroborated by Caslino-Matsuda and colleagues who reported that oxidative stress caused by tobacco

(cigarette smoke) *in vivo* or *in vitro* induces activation of the MAPK pathway by increasing the interaction between HA and CD44 receptors (39) interestingly, and as expected, patients with smoking histories presented a negative correlation with predominant acinar ADC. Regarding staging, E-cadherin was expressed in most cases with no lymph node metastases. In fact, Wang and colleagues studied the expression of Twist and E-cadherin in primary and metastatic lung cancer. These authors showed that expression of E-cadherin was higher in primary tumors than in metastases (40).

Conclusion

ECM regulators and growth-factors modulate a tumor-induced invasive pathway in lung AD and SQCC subgroups, and different spectra of aggressiveness were found between SQCC and AD subtypes. An inverse relationship between epithelial and mesenchymal biomarker expression provides a different spectrum of aggressiveness. While overexpression of ECM regulators by epithelial cells provide aggressiveness to SQCC and ADC, overexpression of growth factors and ECM regulators by mesenchymal cells provide a protective role to the ECM avoiding invasion by tumor cells in both histological types. Therefore, our findings suggest that strategies aimed at preventing high ECM regulators synthesis, or local responses to low growth factors TGF- β may have a great impact on lung cancer. To finalize this conclusion will require greater study in a randomized and prospective trial.

References

1. Curado MP, Edwards B, Shin HR, et al. (2007) Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX. Lyon: IARC Scientific Publications.

2. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, et al. (2008) Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol; 26:3543-51.

3. Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, et al. (2004) Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. J. Clin. Oncol.; 22:2184-91.

4. Schrump D, Altorki N, Henschke C, Carter D, Turrisi A, Gutierrez M. (2005) Non-small cell lung cancer. In: De Vita V, Hellman S, Rosenberg S, editors. Cancer: principles and practice of oncology. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 753-54.

5. Pao W, Kris MG, Iafrate AJ, et al. (2009) Integration of molecular profiling into the lung cancer clinic. Clin Cancer Res; 15:5317-22.

6. Pinto CA, Carvalho PEO, Antonangelo L, et al. (2003) Morphometric evaluation of tumor matrix metalloproteinase 9 predicts survival after surgical resection of adenocarcinoma of the lung. Clin Cancer Res; 9(8): 3098-3104.

7. B. Gerdin and R. Hallgren. (1997) Dynamic role of hyaluronan in connective tissue activation and inflammation. *J. Intern. Med.* 242, pp. 49–55.

8. Nedvetzki S, Gonen E, Assayag N, Reich R, Williams RORHAMM ET AL. (2004) A receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: a different interpretation of redundancy. Proc Natl Acad Sci U S A. 28;101(52):18081-6.

9. K.S. Girish, K. Kemparaju. (2007); The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview.80 1921-1943.

10. Jacobson A, Rahmanian M, Rubin K, Heldin P. (2002) Expression of hyaluronan synthase 2 or hyaluronidase 1 differentially affect the growth rate of transplantable colon carcinoma cell tumors. *Int J Cancer*, 102: 212–9.

11. Golshani R, Lopez L, Estrella V, Kramer M, Iida N, Lokeshwar VB. (2008) Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44. *Cancer Res*, 68: 483–91.

12. Bharadwaj AG, Kovar JL, Loughman E, Elowsky C, Oakley GG, Simpson MA. (2009) Spontaneous metastasis of prostate cancer is promoted by excess hyaluronan synthesis and processing. *Am J Pathol*, 174: 1027–36.

13. Turley EA, Noble PW, Bourguignon LYW. (2002) Signaling properties of hyaluronan receptors. J Biol Chem;277:4589–92.

14. Hemming R, Martin DC, Slominski E, Nagy JI, Halayko AJ, Pind S, Triggs-Raine B. (2008) Mouse Hyal3 encodes a 45- to 56-kDa glycoprotein whose overexpression increases hyaluronidase 1 activity in cultured cells. *Glycobiology*, 18:280-9.

15. Stern R. (2005) Hyaluronan metabolism: A major paradox in cancer biology. *Pathol Biol (Paris)*, 53:372-82.

16. Lokeshwar VB, Cerwinka WH, Isoyama T, Lokeshwar BL. (2005) HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer: A tumor promoter and suppressor. *Cancer Res*, 65:7782-9.

17. Bertrand P, Girard N, Duval C, d'Anjou J, Chauzy C, Menard JF, Delpech B. (1997) Increased hyaluronidase levels in breast tumor metastases. *Int J Cancer*, 73:327-31.

18. Li, M. Rahmanian, C. Widstrom, G. Lepperdinger, G.I. Frost and P. Heldin. (2000) Irradiation-induced expression of hyaluronan (HA) synthase 2 and hyaluronidase 2 genes in rat lung tissue accompanies active turnover of HA and induction of types I and III collagen gene expression. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Bio*, 23: 411–418.

19. Border WA & Noble NA. (1994) Transforming growth factor in tissue fibrosis. *N Engl J Med*, 331: 1286–1292.

20. Nawrocki-Raby, B. *et al*. (2003).Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. Int. J. Cancer ,105: 790–795

21. Birchmeier, W. & Behrens, J. (1994) Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. Biochim. Biophys. Acta, 1198: 11–26.

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

23. Douglas M. Minot, Benjamin R. Kipp, Renee M. Root, CT(ASCP), Reid G. Meyer, Carol A. Reynolds, Aziza Nassar, Michael R. Henry, and Amy C. Clayton. (2009) Automated Cellular Imaging System III for Assessing HER2 Status in Breast Cancer Specimens. *American* Journal of Clinical Pathology, 132: 133-138.

24. Trends in Lung Cancer Morbidity and Mortality. American Lung Association Epidemiology and Statistics Unit Research and Program Services Division March 2010. Pdf http://www.lungusa.org/finding-cures/for-professionals/epidemiology-and-statistics- rpts.html pdf [Accessed April 2010].

25. Instituto Nacional do Câncer / Ministério da Saúde. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. [acesso em 03/01/2011]. Disponível em: http://www.inca.gov.br.

26. Trends in Lung Cancer Morbidity and Mortality. American Lung Association Epidemiology and Statistics Unit Research and Program Services Division March 2010. pdf http://www.lungusa.org/finding-cures/for-professionals/epidemiology-and-statistics-rpts.html pdf [Accessed aphril 2010).

27. V. K. de Sá, E. Olivieri, E. R. Parra, D. Carraro, F. A. Soares,T. Takagaki , L.Carvalho, V. L. Capelozzi. (2011) Hyaluronidase Splice variants are associated with histology and outcome in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. Hum Pathol.. [Epub ahead of print].

28. S. Adamia, C. A. Maxwell, and L.M. Pilarski, (2005) Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic targets in cancer," Current Drug Targets-Cardiovascular and Haematological Disorders, 5: 3–14.

29. Kohn EC, Liotta LA. (1995) Tumor cell invasion involves the active movement of cells across the extracellular matrix. Cancer Res; 55:1856–1862.

30. Yu Q, Stamenkovic I. (1999) Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. Genes Dev, 13:35–48.

31. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, Park BJ, Rusch VW, Travis WD. (2011) Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. Mod Pathol, 24(5):653-64.

32. Russell PA, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams RA. (2011) Does Lung Adenocarcinoma Subtype Predict Patient Survival? A Clinicopathologic Study Based on the New International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Lung Adenocarcinoma Classification. J Thorac Oncol, Jun 2. [Epub ahead of print].

33. Taipale J, Saharinen J, Keski-Oja. (1998) Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. J. Adv Cancer Res, 75:87–134.

34. Beck C, Schreiber H, Rowley DA. (2001) Role of TGF-β in immune-evasion of cancer. Microsc Res Technol, 52: 387–395.

35. Sun LK, Beck-Schimmer B, Oertli B, Wuthrich RP. (2001) Hyaluronan-induced cyclooxygenase-2 expression promotes thromboxane A_2 production by renal cells Kidney Int, 59:190–196.

36. Vogelmann R, Nguyen-tat MD, Giehl K, Adler G, Wedlich D, Menke A. (2005) TGFβ induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. J Cell Sci, 118:4901-4912.

37. Sayo, T, Sugiyama, Y, Takahashi, Y, et al. (2002) Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes. J Invest Dermatol, 118: 43–48.

38. Lokeshwar VB, Schroeder GL, Carey RI, et al. (2002) Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing. J Biol Chem, 277:33654–63.

39. Casalino-Matsuda SM, Monzon ME, Day AJ, Forteza RM. (2009) Hyaluronan fragments/CD44 mediate oxidative stress-induced MUC5B up-regulation in airway epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol, 40(3):277-85.

40. Wang G, Dong W, Shen H, Mu X, Li Z, Lin X, Liu Y, Du J. (2011) A comparison of Twist and E-cadherin protein expression in primary non-small-cell lung carcinoma and corresponding metastases. Eur J Cardiothorac Surg. Mar 2. [Epub ahead of print].

Legends of figures

Table 1. Patient characteristics

Table 2. Summary of morphometric results [a]

Table 3. Association between immune cells in tumor microenvironment and clinical variables.

Figure 1. **(A)** Squamous cells lung carcinoma, **(B)** Adenocarcinoma *in situ* (AIS), **(C)** Acinar predominant adenocarcinoma and **(D)** Papillary predominant adenocarcinoma are respectively represented in stained by H&E. Magnification 100 μm.

Figura 2. Imunoexpression of Hyal1 by neoplastic cells. **(A)** Adenocarcinoma and **(B)** Acinar predominant adenocarcinoma, **(C)** Squamous cells lung carcinoma and **(D)** Papillary predominant adenocarcinoma . Magnification 100 μm.

Figura 3. Imunoexpression of Hyal3 by neoplastic cells. **(A, B)** Papillary predominant adenocarcinoma,**(C)** Acinar predominant adenocarcinoma, and **(D)** normal parenquima. Magnification 100 μm.

Figura 4. Imunoexpression of HAS1 by neoplastic cells. **(A)** Papillary predominant adenocarcinoma and **(B)** Squamous cells lung carcinoma. Magnification 100 μm.

Figura 5. Imunoexpression of HAS2 by neoplastic cells and control. **(A)** Adenocarcinoma *in situ* (AIS) and **(B)** normal parenquima. Magnification 100 μm.

Figura 6. Imunoexpression of HAS3 by neoplastic cells and control. **(A)** Adenocarcinoma *in situ* (AIS) and **(B)** normal parenquima. Magnification 100 μm.

Figura 7. Imunoexpression of E-cadherine by neoplastic cells. **(A)** Acinar predominant adenocarcinoma, **(B)** Papillary predominant adenocarcinoma, **(C)** Squamous cells lung carcinoma and **(D)** Adenocarcinoma *in situ* (AIS). Magnification 100 μm.

Figura 8. Imunoexpression of TGF-β by neoplastic cells. **(A)** Acinar predominant adenocarcinoma, **(B)** Papillary predominant adenocarcinoma. Magnification 100 μm.

Table 1. Patient characteristics

Total no. of patients	56
Age (yrs)	64 (43-84)[a]
Gender	35 males, 21 females
Overall stage	
I	36
II	16
III	2
IV	2
T stage	
1	17
2	34
3	5
N stage	
0	41
1	12
2	2
Tabagism (pack-years)	37 (0-100)[a]
Treatment	
Surgery	56
Surgery + chemotherapy	7
Surgery + radiotherapy	0
Surgery + chemotherapy + radiotherapy	4
Histologic type	
Squamous cell carcinoma	25
Adenocarcinoma	31
• Acinar	12
• Pappilar	11
• Lepidic	5
• Solid	3

Follow-up (months)	16 (3-30)[a]
Patients censored for survival analysis at last time of follow-up	2

[a] Values represent median (range)

Table 2. Summary of morphometric results [a]

	Continuous Variables (Score)	
	Score Mean	Score Range
Tumoral microenvironment		
HAS 1	42.72	0.00-137.6
HAS 2	30.72	0.01-124.25
HAS 3	53.98	0.00-109.05
Hyal 1	91.75	42.51-136.95
Hyal 3	34.42	0.00-114.45
TGF-β	85.70	32.32-138.20
E-caderina	57.78	5.69-146.11
Non-tumoral microenvironment		
HAS 1	13.92	0.00-75.71
HAS 2	10.45	0.30-38.34
HAS 3	11.70	0.20-56.32
Hyal 1	27.30	0.11-62.27
Hyal 3	12.72	0.02-68.37
TGF-β	57.8	2.65-87.65
E-caderina	64.31	3.2-96.35
Normal tissue		
HAS 1	2.18	0.07-9.15
HAS 2	4.83	0.00-23.24
HAS 3	9.14	0.00-34.56
Hyal 1	3.57	0.20-9.65
Hyal 3	17.49	0.00-76.61

[a] The expression of proteins was measured by the ACIS III computer program "membranes and cytoplasm", resident in the system. This program measures intensity of staining of cytoplasm and cell membrane and provides a result in continuous variables (score) ranging from 0 to 256. This is attributed to the threshold, which indicates to the software cells with and without immunoreactivity. The areas to be analyzed on each slide were selected manually using the selection tools of the ACIS III. For statistical analyses we used the average of two regions (stroma and tumor) of each case. [24]

Table 3. Association between immune cells in tumor microenvironment and clinical variables.

	Smok	T	N	ADC	ADC AC	ADC PAP	E-cad	TGFβ	HAS1	HAS 2	HAS 3	HYAL1	HYAL3
Smok	1	,14	,04	,25	-0,1	-,10	,08	,01*	,37	,08	,01	,37	,08
		,35	,80	,09	0,4	,50	,60	,94	,01	,59	,94	,01**	,59
T	,14	1	-,11	,08	-,05	,21	-,01	,05	,20	-,01	,05	,20	-,01
	,35		,44	,55	,73	,12	,91	,72	,15	,91	,72	,15	,91
N	,04	-,11	1	-,02	-,03	,18	,33	-,02	,12	,33*	-,02	,12	,32
	,8	,44		,86	,82	,20	,01**	,85	,38	,01**	,85	,38	,01**
ADC	,25	,08	-,02	1	-,44	-,48	,04	-,19	,21	,03	-,19	,21	,03
	,09	,55	,86		,00**	,00**	,79	,16	,11	,79	,16	,11	,79
ADC AC	-,12	-,05	-,03	-,43	1	-,17	-,30	-,01	,03	-,29	-,01	,03	-,29
	,42	,73	,81	,00**		,22	,03*	,93	,83	,03*	,93	,83	,03*
ADC PAP	-,10	,21	,18	-,48	-,17	1	,02	,12	-,366**	,02	,12	-,36	,02
	,51	,12	,20	,00**	,22		,90	,38	,00**	,88	,38	,00**	,89
E-cad	,08	-,01	,33	,04	-,29	,02	1	,15	-,00	,14	,30	,02	,14
	,59	,91	,01*	,79	,03*	,89		,27	,96	,30	,02	,83	,30
TGF-β	,01	,05	-,02	-,19	-,01	,12	,15	1	-,11	1	,15	-,00	1
	,94	,72	,85	,16	,93	,38	,27		,42		,27	,96	
HAS1	,38	,20	,12	,21	,03	-,36	-,00	-,11	1	,15	1	-,11	,15
	,01*	,15	,38	,11	,83	,00**	,96	,42		,27		,42	,27
HAS2	-,22	-,02	,11	,00	-,04	-,03	-,14	-,06	,01	-,00	-,11	1	-,00
	,14	,88	,42	,98	,74	,82	,30	,63	,94	,96	,42		,96
HAS3	,25	-,07	-,04	-,34	-,06	,18	,22	,11	,13	-,14	-,06	,01	-,14
	,09	,61	,75	,00**	,68	,18	,10	,40	,34	,30	,63	,93	,30
HYAL1	,26	,04	-,12	,08	-,10	-,12	-,07	,18	-,18	,22	,11	,13	,22
	,07	,73	,40	,53	,47	,38	,63	,17	,18	,10	,39	,34	,10
HYAL3	,19	-,02	,23	,06	,03	-,18	-,00	-,16	,34	-,06	,18	-,18	-,06
	,18	,84	,10	,63	,81		,95	,23	,01**	,62	,17	,18	,62

Figure 1

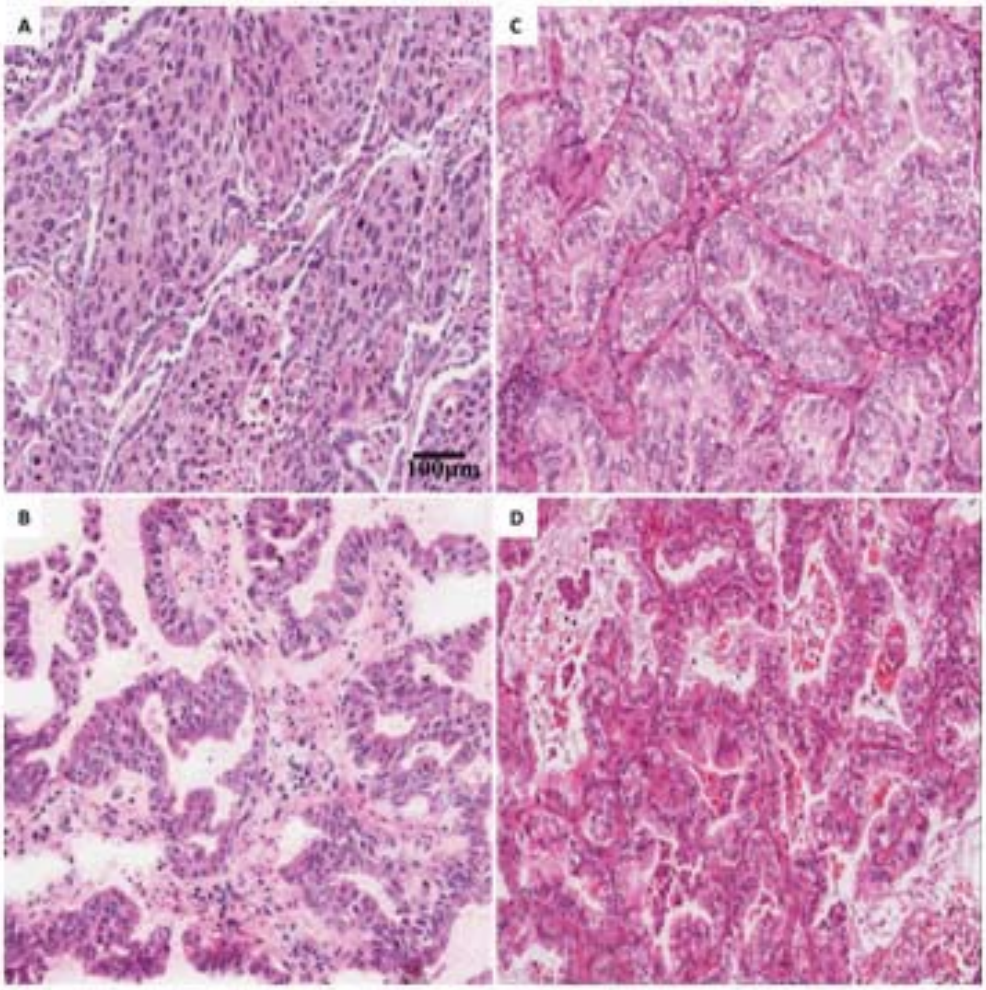


Figure 2

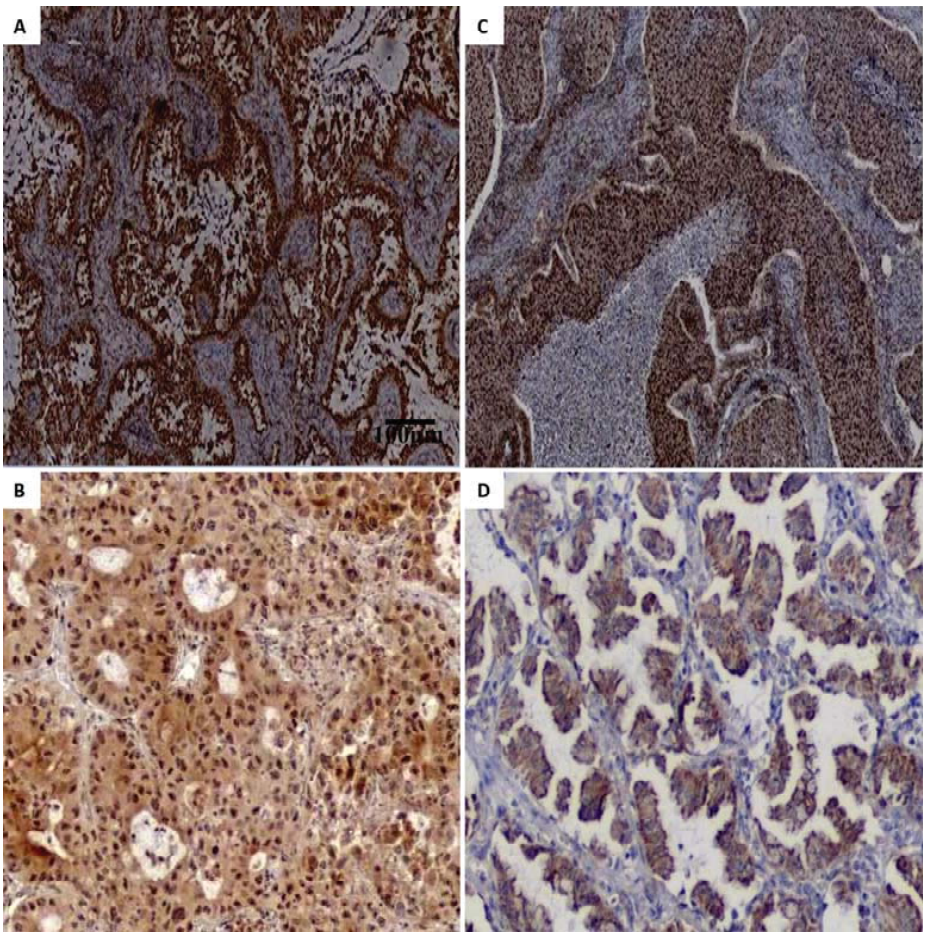


Figure 3

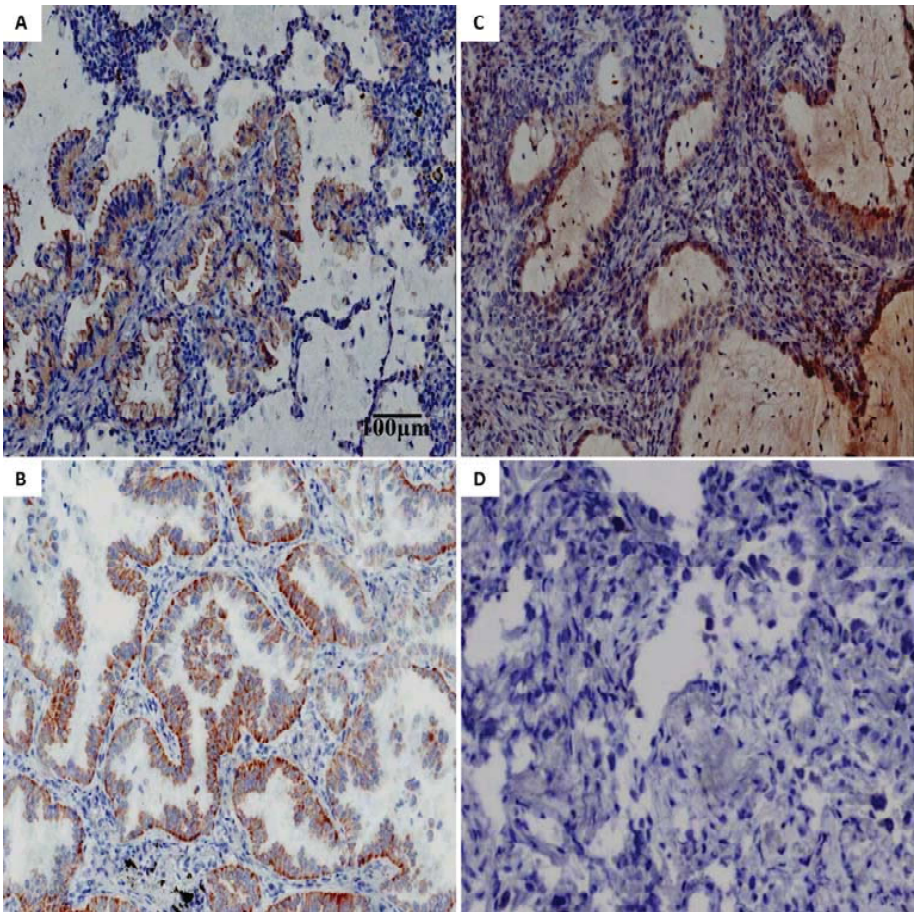


Figure 4

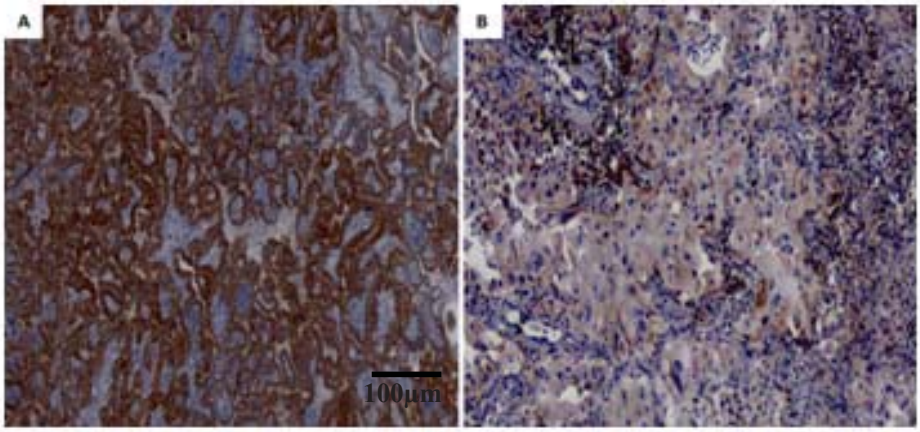


Figure 5

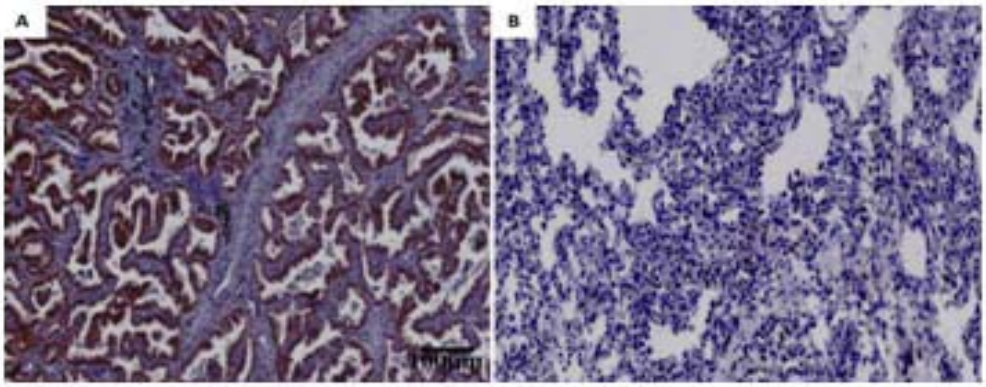


Figure 6

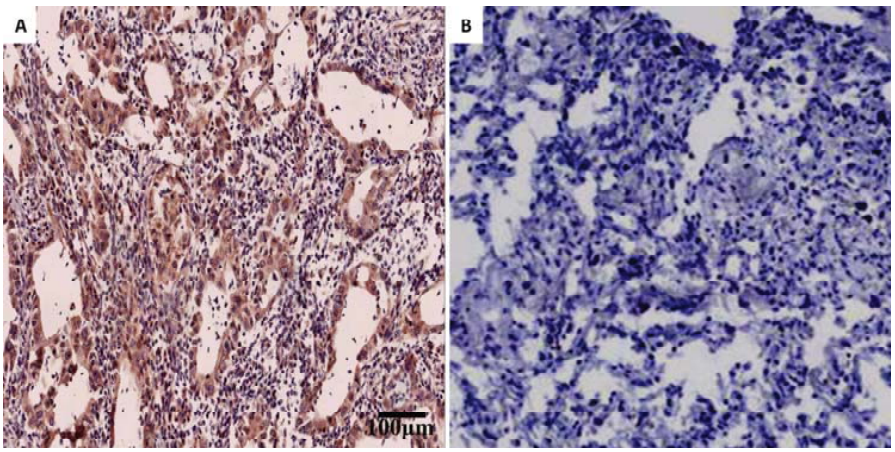


Figure 7

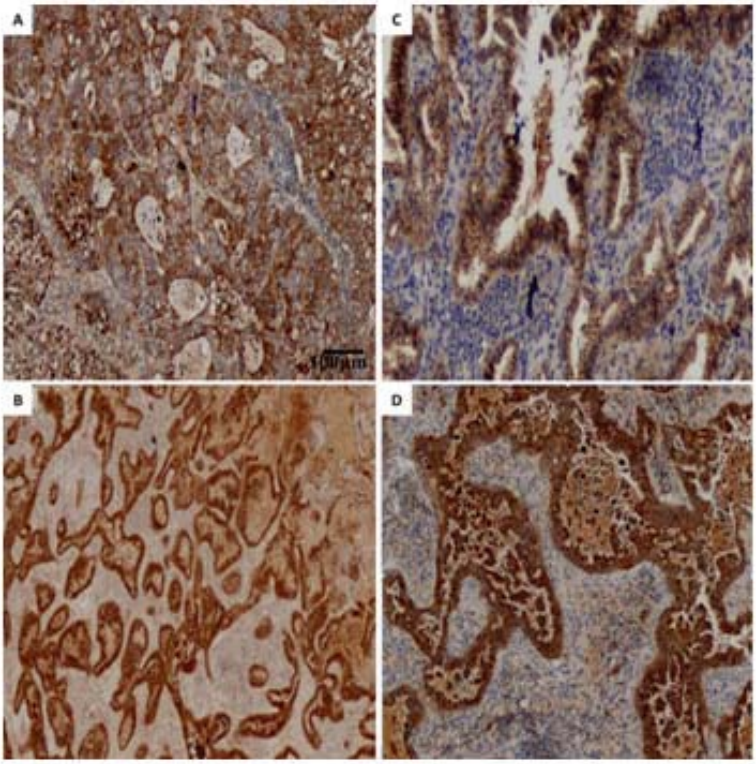
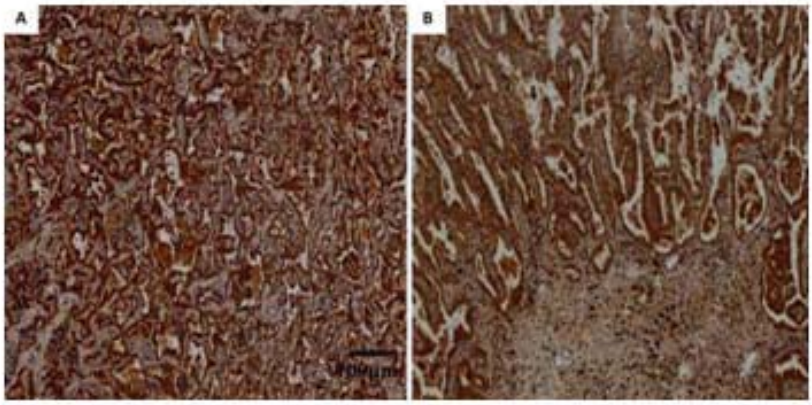



Figure 8