PAOLA DA COSTA SOUZA

**Estudo da participação do colágeno V no
câncer de pulmão, especificamente no
carcinoma não de pequenas células**

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
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

reprodução autorizada pelo autor

Souza, Paola da Costa

Estudo da participação do colágeno V no câncer de pulmão especificamente no carcinoma não de pequenas células / Paola da Costa Souza.-- São Paulo, 2011.

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

Programa de Patologia.

Orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Descritores: 1.Colágeno do tipo V 2.Caspase 9 3.Imunoistoquímica 4.Neoplasias pulmonares 5.Sobrevida 6.Prognóstico

USP/FM/DBD-239/11

Permanência

Maria Lúcia Dal Farra

Há sempre um ir e voltar.
E o que mais me entristece na volta
é o olhar em volta
e sentir em tudo a vibração da visão perdida na dia –
contemplação da esperança já finda.

Em cada andar de regresso
há um todo em retrocesso:
tempo e espaço em cada passo
distância na ânsia do que fomos
do que somos.

Eu que fui não sou eu que volto.
Há algo mais em mim que antes não tinha.
Um pouco mais do mundo
trago aqui no fundo –
algo novo, recente, intransigente
que se fez presente
malgrado eu.

Trago no bolso o lenço sujo
da poeira da estrada;
no coração, a certeza de ter nada.

Cerro os meus olhos mas é inútil:
há em mim o medo
de quem teme ver no espelho
a face transformada
a boca enrugada
a alma amassada.
Ah, como é triste voltar:
quisera ficar, sempre ficar.

Sobe aos meus lábios um grito louco de dor
e eu tenho vontade de dizer tudo o que for
mas de achar em mim
um pouco do que eu era quando vim.

Há sempre um ir e voltar.
Mas há de haver um dia
em que todos me hão de levar
e só eu hei de ficar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sentido de todas as coisas.

Agradeço aos meus filhos, Beatriz e João Gabriel, e ao meu marido, Nei, pela paciência, pelos inúmeros dias de ausência e, principalmente, pela compreensão e carinho.

Agradeço aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado e acreditando em mim.

Aos meus queridos irmãos, Caetano e Luciana.

Agradeço de todo o coração à Professora Vera Luiza Capelozzi, minha orientadora, pela oportunidade oferecida de crescimento não somente acadêmico, mas como pessoa, por meio do seu entusiasmo, sua dedicação e honestidade.

Agradeço ao amigo Edwin Roger Parra, grande pesquisador na área de patologia pulmonar, que me ajudou em todos os momentos da pós-graduação, sempre contribuindo de maneira positiva com sugestões e críticas.

Um agradecimento muito especial a Walcy Rosolia Teodoro, professora responsável pelo Laboratório de Matriz Extracelular na Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo companheirismo e imenso auxílio científico e pessoal.

À Ana Paula Veloso, pesquisadora do Laboratório de Matriz Extracelular na Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio na elaboração dos marcadores de imunofluorescência.

À Gimenez, aluna de pós-graduação do Laboratório de Matriz Extracelular na Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela contribuição com a biologia molecular realizada neste estudo.

Ao colega patologista, Alexandre Ab'Saber, pelo auxílio na realização da microscopia confocal.

À Dra. Tereza Takagaki, que muito contribuiu para esta tese, fornecendo informações clínicas imprescindíveis para sua realização.

À amiga Sandra de Moraes Fernezlian, pela confecção dos marcadores imuno-histoquímicos, mas principalmente pela amizade e pelo carinho que me acolheram desde o princípio no Laboratório de Imuno-histoquímica da Disciplina de Patologia.

Às colegas Esmeralda Miristene Eher e Angela Batista dos Santos, profissionais exemplares que, devido ao grande conhecimento e dedicação, além do bom humor, transformam o Laboratório de Imuno-histoquímica da Disciplina de Patologia em um excelente ambiente de trabalho.

Aos colegas Hermogênio Rafael de Oliveira e Douglas Moreira, responsáveis pelo bloário de Divisão de Anatomia Patológica do nosso Hospital, sempre dispostos a orientar com profissionalismo e paciência todos aqueles que necessitam das lâminas e dos blocos de parafina da Divisão.

Aos alunos de Iniciação Científica, Gustavo Noletto, Fabrício Rizardi, Marcelo Atanazio e Osmar Bianchi, por auxiliar nos resultados desta tese.

Ao Prof. Dr. José Carlos da Silva, por me substituir inúmeras vezes no trabalho para confecção desta tese, além de sua presença constante, sempre com palavras de estímulo e questionamentos construtivos.

Agradecer a todas as pessoas que, de algum modo, participaram deste trabalho é uma tarefa muito difícil, pois por menores que tenham sido as contribuições, todas foram fundamentais na realização deste estudo e no desenvolvimento do meu aprendizado.

SUMÁRIO

Lista de Siglas	
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Estatísticas do câncer de pulmão	15
2.2 Classificações do câncer de pulmão	16
2.2.1 Classificação histopatológica do câncer de pulmão	16
2.2.2 Classificação clínica do câncer de pulmão	20
2.2.3 Classificação dos tumores de pulmão segundo o sistema TNM	21
2.3 Tratamento do câncer de pulmão	25
2.4 Carcinogênese pulmonar	26
2.5 O microambiente tumoral	31
2.6 Matriz extracelular	36
2.6.1 Colágeno	37
2.6.2 Colágeno V	40
2.6.2.1 Papel imunogênico do colágeno V	44
2.6.2.2 Colágeno V e o Câncer	50
2.7 Câncer e imunidade	54
3 OBJETIVOS	63
3.1. Objetivos gerais	64
3.2 Objetivos específicos	64
4 MÉTODOS	67
4.1 Casuística	68
4.2 Métodos	69
4.2.1 Levantamento e revisão das lâminas correspondentes	69
4.2.2 Solicitação de cortes a técnica histológica	70
4.2.3 Imunofluorescência dos colágenos I, III e V	71
4.2.3.1 Quantificação da imunofluorescência	72

4.2.4 Realização do método de imuno-histoquímica para as caspases, interleucinas, células imunes e moléculas de adesão	73
4.2.4.1 Método de detecção “in situ” da apoptose“via TUNEL	78
4.2.4.2 Quantificação das marcações imuno-histoquímicas e TUNEL	81
4.2.5 Cultura de fibroblastos	82
4.2.5.1 Imunofluorescência indireta em fibroblastos	83
4.2.6 Biologia molecular	84
4.2.6.1 Extração do RNA total	84
4.2.6.2 Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA por espectrofotometria	85
4.2.6.3 Avaliação da integridade do RNA através da eletroforese em gel de agarose	87
4.2.6.4 Tratamento do RNA total com DNase	88
4.2.6.5 Reação de transcriptase reversa para obtenção de cDNA	89
4.2.6.6 Seleção e desenho dos PRIMERS	90
4.2.6.7 Padronização da PCR em tempo real	92
4.2.7 Reconstrução tridimensional através do microscópio confocal	96
4.2.8 Tabulação das variáveis e análise estatística	98
5 RESULTADOS	100
5.1 Descrição da casuística	101
5.2 Remodelamento do microambiente tumoral por colágeno V e apoptose	103
5.2.1 Tipos histológicos e caracterização da apoptose e colágeno V	103
5.2.2 Quantificação do colágeno V e demais marcadores estudados com exceção dos marcadores de resposta imune	110
5.2.3 Avaliação das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno V pelo método de PCR	112
5.2.4 Análise da sobrevida correlacionando colágenos V e apoptose	113
5.3 Resposta imune inata e adaptativa no microambiente tumoral	115
5.3.1 Tipos histológicos e caracterização das células imunes	115
5.3.2 Quantificação das células Imunofenotipadas	125
5.3.3 Associação entre células imunes e citocinas estudadas no microambiente tumoral e variáveis clínicas	126
5.3.4 Análise da sobrevida correlacionando células imunes e citocinas estudadas no microambiente tumoral dos 65 casos com as variáveis clínicas	127
5.4 Microscopia eletrônica nos tipos histológicos de CNPC de pulmão	130

5.5 Remodelamento do microambiente tumoral nos carcinomas não-pequenas células de pulmão por anormalidades do colágeno do tipo V, apoptose e resposta imune inata e adaptativa	133
5.6 Associação entre o colágeno V e as demais variáveis estudadas	136
6 DISCUSSÃO	140
6.1 Microambiente Tumoral: Análise da apoptose via caspases e TUNEL, marcadores antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-6, angiogênese (expressão de endotelina ,I-CAM e VCAM), colágeno V, I,III, laminina	141
6.2 Microambiente tumoral resposta imune inata e adaptativa	148
6.3 Microambiente Tumoral: remodelamento por anormalidades no colágeno V, apoptose e resposta imune	156
7 CONCLUSÕES	163
8 ANEXOS	165
9 REFERÊNCIAS	171

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
M	Molar
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
µm²	Micrômetro quadrado
ACS	<i>American Cancer Society</i> (Sociedade Americana do Câncer)
AgNORs	Antígeno da região organizadora de nucléolo
ASCL	Associação Internacional para estudo de Câncer de Pulmão
Bad	<i>Bcl-2 Antagonist of cell Death</i>
Bak	<i>Bcl-2 Associated Killer</i>
BAX	<i>Bcl2 Associated x protein</i>
BID	<i>BH3 Interaction Death Domain</i>
Bcl-2	<i>B cell Lymphoma 2</i> , controla a morte celular por via mitochondrial com ação anti-apoptótica
Bcl-6	<i>B cell Lymphoma 6</i> , regula a diferenciação de células B nos centros germinativos e inflamação
bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
CARD	<i>Capase Recruitment Domain</i>
CASPASE	<i>Cysteine asparagil specific proteases</i>
Cd1a	Família da classe I do MHC, sendo um tipo de proteína de membrana CD1 amplamente utilizado como marcador de células dendríticas expressas no início do desenvolvimento
CD3	Linfócitos T, timócitos
CD4	Linfócitos T auxiliares
CD8	Linfócitos T citotóxicos
CD20	Linfócitos B
CD31	PECAM-1 (<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>), molécula de adesão com participação na diapedese
CD34	Marcador de células endoteliais
CD56	Isoforma de molécula de adesão celular neural (N-CAM), sendo um marcador de células NK e subconjunto de Linfócitos T e B
CD68	Marcador de macrófagos e monócitos, principalmente
CD80	Marcador de células dendríticas, linfócitos B ativados e macrófagos
CD86	Marcador de células dendríticas, linfócitos B, monócitos e alguns linfócitos T
CD146	Molécula associada à junção célula-célula e ao citoesqueleto de actina
cDNA	DNA complementar
CEC	Carcinoma de células escamosas
c-erbB-2	Gene que controla o crescimento celular pelo fator de receptor epidérmico humano número 2
CNPC	Carcinomas não de pequenas células
COL V	Colágeno V

DAB	Diamino-benzidina
dATP, dGTP, dCTP e dTTP dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DCs	Células dendríticas
DED	<i>Death effector domain</i>
DEPEC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco modified eagle medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
Ed.	Edição
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Et al.	e outros (colaboradores)
Fas	<i>First apoptotic signal</i>
Fas-L-R	Receptor do Fas ligante
FGF	Fator de crescimento para fibroblasto
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GM-CSF	Fator estimulador de colônias granulócito - macrófago
HC-FMUSP	Hospital da Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina e Eosina
HER-2	Receptor de fator epidérmico do crescimento humano 2
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
Ig	Imunoglobulina
IFN-	Interferon-gama
IL	Interleucina
LSAB	<i>Labeled Streptavidin-Avidin-Biotin</i>
Ki-67	Índice de proliferação celular
MALT	Tecido linfóide secundário associado à mucosa
MEC	Matriz extracelular
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , fator de histocompatibilidade maior
MMP	Metaloprotease
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanesulfônico
NK	<i>Natural killer</i> , assassinas naturais
NORs	Regiões organizadoras do nucléolo
NL	Novolink
OMS	Organização Mundial de Saúde
P53	Proteína supressora p53
PBS	Tampão fosfato de sódio
pH	O logaritmo negativo, para base 10, da concentração de íons livres de hidrogênio em uma solução

PCNA	Antígeno de proliferação nuclear
PCR	Reação em Cadeia de Polimerização em Tempo Real
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PECAM –1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i> ; molécula de adesão com participação na diapedese
r	Risco Relativo
ras	<i>Rat sarcoma virus</i> , protooncogene e proteína ras
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	Ácido ribonucleico ribossômico
S-100	Marcador de células adiposas, células de Schwann, astrócitos, células de Langerans, algumas células epiteliais e melanócitos, normais e neoplásicos
SFB	Soro fetal bovino
SPSS	<i>Statistical package for social science</i>
Status	Condição de óbito ou vivo
TCR	Receptor de célula T
TCR	Classe de linfócitos T com receptor de célula T que expressa cadeias α e β
TCGF	Fator de crescimento da célula T
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-Beta</i> , fator de transformação do crescimento
Th1	Resposta T helper 1
Th2	Resposta T helper 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
T regs	Células T regulatórias CD4 ⁺ CD45RC ^{high}
TUNEL	<i>Tdt mediated dUTP nick end labeling</i>
UICC	<i>International Union Against Cancer</i> – União Internacional contra o Câncer
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular Celular 1
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação clínica (TNM) do câncer de pulmão.....	24
Tabela 2 - Estadiamento do câncer de pulmão.....	24
Tabela 3 - Relação dos anticorpos empregados em imuno-histoquímica.....	77
Tabela 4 - Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA por espectrofotometria no grupo dos tumores e controle.....	86
Tabela 5 - Sequência e descrição dos genes selecionados para o estudo.....	91
Tabela 6 - Características dos 65 pacientes com CNPC de pulmão.....	102
Tabela 7 - Sumário dos resultados morfométricos nos 65 casos de CNPC de pulmão...	111
Tabela 8 - Modelo proporcional de Cox para análise de sobrevida e risco de morte nos 65 casos de CNPC de pulmão estudados de acordo com o colágeno V e apoptose controlados pelo estágio N e tipos histológicos	114
Tabela 9 - Resultados morfométricos encontrados no microambiente tumoral e não tumoral referente às células imunes e citocinas nos 65 casos estudados.....	125
Tabela 10 - Modelo proporcional de Cox para análise de sobrevida e risco de morte nos 65 casos de CNPC de pulmão estudados de acordo com as células imunes e seus produtos controlados por tabagismo, estágio N, tratamento e tipos histológicos....	128
Tabela 11 - Associações entre o colágeno V e as demais variáveis nos 65 casos de CNPC de pulmão.....	138
Tabela 12 - Modelo matemático de sobrevida de Cox associando o colágeno V às variáveis clínicas, histológicas e morfométricas no microambiente tumoral dos 65 casos de CNPC de pulmão.....	140

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama esquemático do mecanismo de metástase do câncer, de acordo com Geraldo (2006).....	34
Figura 2 -(A) Modelo esquemático de parte de uma única cadeia α de colágeno. Cada aminoácido é representado por uma esfera. A cadeia é enrolada em forma de hélice e composta por uma série de sequências de Y-X-Glicina. (B) Modelo esquemático de uma parte de uma molécula de colágeno com as três cadeias alfa cada uma de uma cor diferente arranjadas em tripla hélice segundo (Alberts et al., 2002).....	40
Figuras 3 e 4 - Desenho ilustrativo representando a interação dos colágenos tipos I (amarelo) e tipo V (vermelho) nas fibrilas heterotípicas. A) Visão transversal da fibrila heterotípica, com o domínio globular do colágeno tipo V (vermelho), voltado para o exterior da fibrila. B, C) Visão longitudinal da fibrila heterotípica, com a porção fibrilar (helicoidal) do colágeno tipo V (vermelho) no interior da fibrila e o domínio globular para a região externa.....	42
Figura 5 - Integridade das bandas de colágeno V em algumas amostras de tumores e casos controle.....	87
Figura 6 - Exemplo de representação do teste de eficiência dos <i>primers</i> utilizados neste estudo.....	93
Figura 7- Exemplo de curvas de padronização no PCR.....	95
Figura 8 - PCR dos tumores e controles estudados.....	98
Figura 9 - A, B e C: Pulmão - coloração de hematoxilina e eosina (HE) nos três tipos celulares de CNPC de pulmão. Carcinoma de Células Escamosas (A), Adenocarcinoma (B) e Carcinoma de Grandes Células (C). D, E F: Imunomarcagem em células endoteliais de caspase 9 nos três tipos celulares de CNPC de pulmão. Carcinoma de Células Escamosas (D), Adenocarcinoma (E) e Carcinoma de Grandes Células (F). G, H e I: Imunomarcagem da Laminina nos três tipos celulares de CNPC de pulmão. Carcinoma de Células Escamosas(G), Adenocarcinoma (H) e Carcinoma de Grandes Células (I). J, K e L: Imunofluorescência com Colágeno V nos três tipos celulares de CNPC de pulmão. Carcinoma de Células Escamosas (J), Adenocarcinoma (K) e Carcinoma de Grandes Células (L). As setas grossas representam o colágeno V e as setas finas, as células tumorais. M, N e O: Microscopia Confocal com o Colágeno V nos três tipos celulares de CNPC de pulmão. Carcinoma de Células Escamosas (M), Adenocarcinoma (N) e Carcinoma de Grandes Células (O). As setas grossas (verde) representam o colágeno V e as setas finas (azul), as células tumorais 400X.....	105
Figura 10 - Expressão de RNAm para as cadeias alfa 1 e alfa 2 do colágeno V nos 65 casos de CNPC de pulmão. Expressão diminuída das cadeias alfa 1 e alfa 2 do colágeno V no carcinoma não pequenas células de pulmão em relação ao controle ($p=0,04$ e $p=0,04$, respectivamente).....	112
Figura 11 - Análise gráfica de Kaplan-Meier correlacionando probabilidade de sobrevida <i>versus</i> tempo de seguimento em meses daqueles pacientes com estadiamento N0. O grupo com taxa de colágeno de 9,4% ou mais aparece na curva superior, de melhor sobrevida, e o grupo com taxa inferior a 9,4% aparece na curva inferior, de pior sobrevida.....	115

Figura 12 - A, B, C: Pulmão - Imunomarcção de linfócitos CD3 em Carcinoma de Células Escamosas (A), Adenocarcinoma (B) e Carcinoma de Grandes Células (C). D, E, F: Imunomarcção de linfócitos CD4 em Carcinoma de Células Escamosas (D), Adenocarcinoma (E) e Carcinoma de Grandes Células (F). G, H, I: Imunomarcção de linfócitos CD8 em Carcinoma de Células Escamosas (G), Adenocarcinoma (H) e Carcinoma de Grandes Células (I). J, K, L: Imunomarcção de células dendríticas pelo Cd1a em Carcinoma de Células Escamosas (J), Adenocarcinoma (K) e Carcinoma de Grandes Células (L). M, N, O: Imunomarcção de células dendríticas pelo S-100 em Carcinoma de Células Escamosas (M), Adenocarcinoma (N) e Carcinoma de Grandes Células (O). P, Q, R: Imunomarcção de células dendríticas pelo CD68 em Carcinoma de Células Escamosas (P), Adenocarcinoma (Q) e Carcinoma de Grandes Células (R). S, T, U: Imunomarcção para IL-4 em Carcinoma de Células Escamosas (S), Adenocarcinoma (T) e Carcinoma de Grandes Células (U). V, W, X: Imunomarcção para TGF em Carcinoma de Células Escamosas (V), Adenocarcinoma (W) e Carcinoma de Grandes Células (X) 400X.....	117
Figura 13 - Análise gráfica de Kaplan-Meier correlacionando probabilidade de sobrevida com a densidade de macrófagos no microambiente tumoral.....	129
Figura 14 - A-F: Pulmão (Microscopia eletrônica). Cortes ultrafinos corados por acetato de uranila e citrato de chumbo em 1 caso de adenocacinoma de pulmão. G-K: Carcinoma de grandes células de pulmão.....	131
Figura 15 - A-E: Pulmão (Microscopia eletrônica). Cortes ultrafinos corados por acetato de uranila e citrato de chumbo em um caso de adenocacinoma de pulmão. Representação do estroma tumoral, com destaque as fibras grossas de colágeno I (A, B) e fibras finas do colágeno III (C, D) e fibras de colágeno V (E).....	135
Figura 16 - Microscopia eletrônica e cultura de células. No painel A são mostradas as fibras grossas do colágeno I (setas) e as fibras finas do colágeno III (setas, A). No painel B pode ser apreciada uma visão panorâmica do <i>imunogold</i> para fibras do colágeno V. Em grande aumento, o painel C permite contemplar com detalhe a expressão da proteína do colágeno V na periferia das fibras grossas do colágeno I ou do colágeno III. Note o aumento de espessura e a irregularidade das fibras do colágeno V na cultura de células dos fibroblastos do microambiente.....	136

RESUMO

Souza PC. *Estudo da participação do colágeno V no câncer de pulmão, especificamente no carcinoma não de pequenas células*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

O colágeno V vem emergindo como um potente indutor de morte celular (apoptose) via caspase. Nosso objetivo, neste estudo, foi examinar a interface entre o colágeno dos tipos I, III e V, apoptose tumoral e endotelial, angiogênese e células imunes, assim como o impacto desses fatores no prognóstico de pacientes com carcinomas não de pequenas células (CNPC) de pulmão. As amostras foram obtidas de 65 pacientes com CNPC de pulmão cirurgicamente excisados. Foram utilizados imunofluorescência e histomorfometria para colágenos I, III e V; imuno-histoquímica e histomorfometria para avaliar apoptose endotelial e epitelial pelas caspases 5, 6, 8, 9 e via TUNEL, antiapoptose pela expressão do Bcl-2 e Bcl-6, densidade microvascular utilizando CD34, atividade vascular através da endotelina, VCAM e CD54, além da laminina. As células imunes foram imunomarcadas pelo CD3, CD4, CD8, CD20, CD56, Cd1a, S100, CD68 e as seguintes citocinas foram quantificadas: IL-4, IL-6, IL-8 e TGF- β . O modelo de sobrevida de Cox mostrou que, quando controlados pelo estadiamento patológico linfonodal N, somente o colágeno do tipo V e a apoptose endotelial via caspase-9 foram significativamente associados com a sobrevida. Uma medida de corte ao nível da mediana para o colágeno do tipo V e caspase-9 dividiu os pacientes em dois grupos distintos de prognóstico. Aqueles com colágeno V maior do que 9,40% e apoptose vascular maior que 1,09% apresentaram baixo risco de morte (0,27 e 0,41, respectivamente), comparados com aqueles com colágeno V inferior a 9,40% e apoptose vascular inferior a 1,09%. Foi observada também menor densidade de células imunes e citocinas no microambiente tumoral do que não tumoral. O modelo de sobrevida de Cox, associando todas as variáveis estudadas, mostrou que baixo risco de morte associou-se com tabagismo menor que 41 maços/ano, estadiamento linfonodal N₀, tratamento cirúrgico, ao tipo histológico carcinoma de células escamosas, fração de linfócitos CD4 > 16,2%, macrófagos CD68 > 4,5%, citocina IL-4 > 0,8%, citocina IL-6 > 2,2%, células dendríticas Cd1a > 1,6% e colágeno V > 9,4%. Coletivamente, os dados indicaram que o CNPC de pulmão não desencadeou uma resposta imune efetiva no sítio tumoral. Além disso, baixa síntese no colágeno V e apoptose endotelial pela caspase-9 em CNPC de pulmão estão fortemente associadas à sobrevida, sugerindo que estratégias destinadas a prevenir a baixa síntese de colágeno V, baixos índices de apoptose e resposta imune inata e adaptativa têm impacto no prognóstico dos CNPC de pulmão e podem ser marcadores promissores em novas abordagens na imunoterapia, podendo, assim, ter grande impacto no tratamento do câncer de pulmão.

Descritores: Colágeno do tipo V; Caspase-9; Imuno-histoquímica; Neoplasias pulmonares; Sobrevida; Prognóstico

SUMMARY

Souza PC. *Study of the involvement of collagen V in lung cancer specifically in non-small cell carcinoma*. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2011.

Type V collagen emerging promise as inductor of death response (apoptosis) via caspase. Our aim was to verify the remodeling of the microenvironment by type V collagen, tumoral/vascular apoptosis, angiogenesis, immune response and their impact on prognosis of patients with non-small cell lung carcinomas (NSCLC). Collagen, apoptosis, angiogenesis and immune cells were examined in tumor tissues from 65 patients with surgically excised NSCLC. We used immunofluorescence, immunohistochemistry, morphometry, 3D reconstruction and real-time PCR to evaluate the amount, structure and mRNA chains expression of type V collagen, endothelium and epithelial apoptosis caspases 5, 6, 8, 9 and via TUNEL; anti-apoptotic expression Bcl-2 and Bcl-6; immune cells CD3, CD4, CD8, CD20, CD56 Cd1a, S100 and CD68 and IL-4, IL-6, IL-8 e TGF- β cytokines; microvessel density (CD34) and vascular activity by endotelin, V-CAM and Cd54. Impact of these markers was tested on follow-up until death from recurrent lung cancer. Decreased and abnormal synthesis of collagen V leads to increased angiogenesis by low endothelial death rate, and low immune response. Cox model analysis demonstrated that controlled for N stage, just two variables were significantly associated with survival time: collagen V and endothelium apoptosis caspase 9 +. Once these two variables were accounted for, none of the others related to survival. A cutpoint at the median for collagen V and endothelium apoptosis caspase 9 divided patients into two groups with distinctive prognosis. Those with collagen V > 9.40% and endothelium apoptosis caspase 9 > 1.09% have low risk of death (0.27 and 0.41, respectively) than those with collagen V < 9.40% and endothelium apoptosis caspase 9 + < 1.09%. In addition low levels of immune cells and cytokines in the tumour environment when compared with non-tumour environment. Cox model analysis with all variables showed low risk of death for tabagism < 41 packs/year, N₀ stage, SCC, CD4⁺ > 16.81%, macrophages/monocytes > 4.5%, cytokine IL-4 > 0.8%, cytokines IL-6 > 2.2%, dendritic cells Cd1a > 1.6% and collagen V > 9.4%. Collectively, the data indicated that NSCLC did not trigger a substantive immune cell infiltrate at tumour sites. More over Collagen V and endothelium apoptosis caspase 9 + in resected NSCLC are strongly related to prognosis, suggesting that strategies aimed at preventing the low collagen V synthesis, or local responses to low endothelium apoptosis and immune cell infiltration has impact on NSCLC prognosis and may be a promising marker for new immunotherapeutic approaches and may have a greater impact in lung cancer.

Descriptors: Type V collagen; Caspase 9; Tunel, lung cancer, survival, Morphometry.

1 INTRODUÇÃO

O estigma inerente ao câncer desde a Antiguidade não é por acaso. Todas as estimativas de incidência e, principalmente, mortalidade o colocam no “banco dos réus”. Segundo a *American Cancer Society* (ACS), cerca de metade dos homens e um terço das mulheres do mundo vão desenvolver câncer em algum período de sua vida.

Com este chamariz, existe um grande temor e uma enorme torcida para que novas abordagens terapêuticas e, especialmente, medidas preventivas sempre menos custosas, façam parte de um futuro próximo.

Embora atualmente muito se pesquise e se publique sobre o câncer, sua descrição existe desde a Antiguidade. As primeiras evidências científicas dessa doença foram encontradas em tumores ósseos fossilizados de múmias no Egito, berço da descrição mais antiga que data de 3000 a.C., denominada *Papiro de Edwin Smith*. Este é a cópia de parte de um livro de cirurgia de trauma, que descreve oito casos de tumores ou úlceras de mama. Muito interessante é que já nessa época se relatava o que hoje ainda é em parte verdade: “Não há tratamento para esta doença”.

Mas até então não se designava *câncer* essa doença tão temida. Foi o médico grego Hipócrates (470-370 a.C.), “Pai da Medicina”, o criador dos termos *carcinos* e *carcinoma* para descrever tumores ulcerados ou não. Essas palavras significam, em grego, *caranguejo*, fazendo uma analogia feliz entre o crescimento infiltrativo do câncer, formando projeções como as pernas de um caranguejo. Porém cabe ao romano Celsus (28-50a.C.) a tradução da palavra para o latim: *câncer*.

Na Renascença, durante o século 15, principalmente por meio dos conhecimentos de Galileu e Newton, começou-se a entender melhor o funcionamento do corpo humano.

Giovanni Morgagni (1761) foi o primeiro a introduzir, por meio da autópsia, a correlação clínico-patológica, tentando estabelecer assim a *causa mortis*. Essa prática tão importante e difundida por anos ajudou muito no entendimento não somente da patofisiologia do câncer, como também de outras doenças, possibilitando que fossem estabelecidas medidas preventivas, para que muitas patologias antes temidas, como a tuberculose, fossem controladas.

O cirurgião escocês, John Hunter (1728-1793), foi mais audacioso. Já naquela época, sugeriu que alguns tipos de câncer, principalmente aqueles que não apresentavam infiltração em tecidos vizinhos, poderiam ser “curados”, se ressecados cirurgicamente. Não nos esqueçamos que a anestesia só foi descoberta um século depois e, aí sim, tiveram início as grandes cirurgias oncológicas, como a mastectomia radical.

No século 19, o fundador da patologia celular, Rudolf Virchow, incorporou a microscopia às descrições macroscópicas e correlações clínico-patológicas de Morgagni. Esse método propiciou um melhor entendimento do “dano” causado pelo câncer, além de corroborar e muito para o desenvolvimento da cirurgia oncológica. Com esta contribuição de Virchow, era possível o patologista diagnosticar, com os conhecimentos existentes na época, o tipo de câncer e, principalmente, se o cirurgião havia o ressecado completamente ou não (conceito de margens cirúrgicas livres ou

comprometidas). Hoje, essa prática otimiza muito o tratamento oncológico e faz parte da rotina de patologistas e cirurgiões no mundo inteiro.

O início do século 20 veio com toda sua imponente transformação e desvendou a teoria sobre a carcinogênese. Os cientistas James Watson e Francis Crick, em 1962, acabaram recebendo o prêmio Nobel por terem descoberto a estrutura química do DNA, a base do material genético, abrindo as portas para a biologia molecular. Agora entendendo que o DNA era a base do código genético, responsável por gerir todas as células, e a posterior tradução desse código, cientistas foram capazes de desvendar como os genes trabalham e como podem ser danificados por mutações iniciando e promovendo a carcinogênese.

Os pesquisadores já sabiam que o câncer poderia ser causado por agentes químicos, radiação e vírus, e que, em alguns casos, havia uma relação familiar. Entretanto, com a descoberta do código genético, foi possível entender que o dano do DNA por esses agentes ou a introdução de novas sequências de DNA viral eram responsáveis pela carcinogênese. Tornou-se possível, então, determinar o exato local de dano/lesão de um gene específico.

Em 2011, a Agência de Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde (IARC) identificou a existência de cem carcinógenos químicos, físicos e biológicos. Não nos esqueçamos de que a maioria dessas associações foram reconhecidas muito tempo antes de os cientistas entenderem a fundo a carcinogênese.

Thomas Venner foi o primeiro a advertir os danos do tabaco em 1620. Escreveu “o uso incontrolado do tabaco lesiona o cérebro e olhos além de causar tremedeira das pernas e coração”.

Em 1915, Katsusaburo Yamagiwa e Koichi Ichikawa, da Universidade de Tóquio, induziram câncer em animais de laboratório pela primeira vez através da aplicação de alcatrão à pele de coelho. Mas 150 anos antes o médico John Hill de Londres já havia reconhecido o tabaco como um carcinógeno. Muitos anos se passaram até a atual "redescoberta" do tabaco como um dos carcinógenos químicos mais destrutivos conhecidos pelo homem.

No campo da cirurgia, essa evolução natural no conhecimento da carcinogênese não se traduziu de forma diferente.

Médicos e cirurgiões da Antiguidade já sabiam que o câncer, na maioria dos casos, “voltava” após ser totalmente removido. Estas são as palavras de Celsus, no que se refere ao câncer: “após a excisão, mesmo quando há a formação de uma cicatriz, a doença pode voltar”.

Galeno, considerado a maior autoridade médica por mais de mil anos, acreditava, como Hipócrates, que o câncer não poderia ser curado. Suas ideias e convicções nortearam a conduta terapêutica no câncer por anos.

Embora a medicina tenha florescido em algumas civilizações antigas e progredido deste então, havia poucos avanços inerentes ao tratamento do câncer. De certa forma, a crença na incurabilidade da doença tem persistido, mesmo no século 21. Esse tabu tem servido para alimentar o medo dessa patologia no ser humano. Alguns, ainda hoje, consideram todos os cânceres

incuráveis e postergam a procura a um médico, comprometendo o tratamento adequado e alimentando, assim, a cadeia, pois com a demora o câncer deixa de ser tratável e passa a ser realmente incurável.

A partir do século 19 e início do século 20, grandes avanços foram feitos tanto no campo da cirurgia geral quanto da oncológica. Havia grandes cirurgiões antes da descoberta da anestesia. John Hunter, Astley Cooper e John Warren alcançaram a fama devido à sua capacidade de realizar cirurgias rápidas e precisas. Mas quando a anestesia tornou-se disponível, em 1846, o avanço foi tão importante e rápido que os cem anos seguintes foram designados como "o século dos cirurgiões". Foi nesse período áureo que William Stewart Halsted, professor de cirurgia da Universidade Johns Hopkins, descreveu e propôs a mastectomia radical como tratamento no câncer de mama. Intrigantemente, Halsted não acreditava que o câncer pudesse se disseminar através da corrente sanguínea. Ele preconizava que a remoção adequada do câncer poderia curar a paciente e, se mais tarde este aparecesse novamente em outro lugar, seria um novo processo. A mastectomia radical se tornou a base da cirurgia de câncer de mama por quase um século.

Felizmente, na década de 1970, ensaios clínicos demonstraram que, com cirurgias menos extensas, se obtinham resultados igualmente eficazes para a maioria das mulheres com câncer de mama.

Hoje, a mastectomia radical praticamente não é mais indicada e a "mastectomia radical modificada" é realizada com menos frequência do que antes. A maioria das mulheres com câncer de mama agora se submete à

remoção local do tumor primário por meio da setorectomia ou quadrantectomia, seguida, se necessário, de radioterapia e quimioterapia.

Ao mesmo tempo em que Halsted e Handley realizavam suas cirurgias radicais extensas, Stephen Paget, um cirurgião inglês, levantou a seguinte questão: "O que é que decide em quais órgãos os tumores irão disseminar?". Por meio de suas observações, Paget concluiu que as células cancerosas se propagavam pela corrente sanguínea para todos os órgãos do corpo, mas eram capazes de crescer apenas em alguns órgãos. Em um salto brilhante da lógica, ele traçou uma analogia entre a metástase do câncer e as sementes: "estas são carregadas em todas as direções, mas elas só podem viver e crescer, se caírem em solo fértil". Assim como as células de um tumor primário, que podem se espalhar através da corrente sanguínea, mas podem crescer somente em alguns, e não em todos os órgãos.

Este foi o início do conceito de metástase. Essa hipótese precisa e altamente sofisticada só foi confirmada pelas técnicas modernas de biologia celular e molecular, quase cem anos mais tarde. O conceito de metástase tornou-se um elemento-chave em reconhecer as limitações da cirurgia oncológica, permitindo aos médicos e à ciência desenvolver tratamentos sistêmicos utilizados após a cirurgia para destruir as células que se disseminaram e usar operações menos mutilantes no tratamento de muitos tipos de câncer. Hoje, esses tratamentos sistêmicos também podem ser usados antes da cirurgia (ACS, 2011).

Até então pouca atenção se dava ao câncer de pulmão, que só passou a ter enfoque a partir do século 20, quando se tornou um dos primeiros no *ranking* em termos de incidência e mortalidade (Younes et al., 2008).

Essa estatística justifica a sua importância para a saúde pública, principalmente porque representa uma das principais causas de óbito evitável com medidas preventivas. Portanto, a busca de inovações para melhora da sobrevida e solução das limitações terapêuticas no tratamento do câncer de pulmão constituem uma das prioridades para os programas de Saúde Pública no Brasil.

Devido às altas taxas de prevalência e incidência, o câncer de pulmão determina um custo social e econômico relevante para o país. Dessa forma, é dever do Estado investir na busca de soluções para esse problema, fortalecendo estruturas capazes de encontrar novas alternativas. Inovações tecnológicas desenvolvidas em colaboração entre grupos de regiões distintas no país com problemas e níveis de desenvolvimento científico semelhantes possibilitam uma leitura circunstanciada das questões de interesse comum, além de permitir um importante e racional intercâmbio de experiências, processos e tecnologias, que vão determinar o aumento do conhecimento, estimulando o desenvolvimento de novos métodos e produtos necessários ao bem-estar da população.

Os marcadores prognósticos no câncer fazem parte dessa gama de pesquisas que estão sendo realizadas com relação ao câncer. Um dos maiores problemas com esses marcadores no câncer de pulmão é o tipo de

estudo que geralmente é utilizado, estudos transversais. Nesses, os pacientes são avaliados no momento da cirurgia para a ressecção do tumor primário. Marcadores moleculares deveriam ser realizados no momento da ressecção do tumor primário, durante a recidiva da doença, nas metástases e durante a autópsia. Esses procedimentos sequenciais permitiriam comparar a expressão dos marcadores em diferentes estágios da doença no mesmo paciente. Com esses resultados, seria possível responder muitas perguntas, como: “pacientes com maior sobrevida apresentariam alguma expressão maior ou diferente de um determinado marcador em alguma fase da doença? Qual seria este marcador?”. Em posse de algumas dessas respostas poderíamos fornecer novas perspectivas de tratamento ao paciente com câncer de pulmão.

Por esse motivo, nosso grupo norteou suas pesquisas nos marcadores prognósticos no câncer de pulmão, mais especificamente nos CNPC (carcinomas não de pequenas células) (Bernardi et al., 1995). O objetivo maior dos estudos tem sido identificar características tumorais que ajudem a prever resposta ao tratamento adjuvante, taxa de crescimento tumoral, metástases e sobrevida.

Mesmo diante de tantos avanços no campo da biologia molecular, muitos estudos mostram a morfometria como ferramenta útil na determinação de fatores morfológicos de prognóstico no câncer de pulmão.

Iniciando uma série de artigos nesta linha, Bernardi et al. (1997) publicaram um estudo referente ao carcinoma de células escamosas de pulmão e marcadores prognósticos. Assim, após análise histológica dos

espécimes, apresentaram melhor sobrevida aqueles pacientes com tumores constituídos por células tumorais que exibiam relação núcleo/citoplasma ou volume nuclear altos. Esses resultados sugerem que o inverso poderia selecionar pacientes candidatos a modalidades terapêuticas complementares para evitar a recidiva tumoral. Essa sugestão foi reforçada pelos resultados obtidos e publicados por Carvalho et al. (1997), que utilizaram o mesmo método em biópsias de carcinoma de células escamosas avançado. Nesse estudo, os autores constataram que tumores com relação núcleo/citoplasma e volume nucleares baixos tiveram melhor comportamento em termos de sobrevida dos pacientes, possivelmente pelo melhor efeito radioterápico sobre as células assim caracterizadas.

Outros estudos enfocaram a proliferação celular no CNPC. Há vários métodos de coloração dos núcleos com o intuito de determinar atividade proliferativa celular, incluindo coloração imuno-histoquímica para detecção do antígeno de proliferação nuclear (PCNA) e Ki-67 e coloração histoquímica para regiões nucleolares organizadoras (AgNORs). As regiões organizadoras do nucléolo (NORs) são constituídas por segmentos de DNA que contêm os genes para produção do ácido ribonucleico ribossômico (RNAr) e representam os nucléolos celulares. Utilizando a técnica de impregnação com a prata, essas estruturas são visualizadas à microscopia óptica como pontos escuros (AgNOR). O número e a área de NORs no núcleo estão relacionados à síntese de proteínas e, portanto, os NORs expressam-se mais nos tumores de alto grau. Antonangelo et al. (1997) e Rodrigues et al. (1997) demonstraram que pacientes com carcinomas de

células escamosas com baixa expressão de AgNOR apresentam maior sobrevida quando comparados com pacientes com alta expressão. Demarchi et al. (2000, 2001) e Carvalho et al. (2000) avaliaram o valor prognóstico da densidade de estroma, expressão de PCNA, Ki-67 e p53 em adenocarcinomas ressecados de pulmão. Constataram que alta proporção de estroma e baixa expressão da oncoproteína p53 associaram-se à melhor sobrevida dos pacientes.

Em outros estudos, Pinto et al. (2003) e Minamoto et al. (2003) investigaram a relação entre células e microambiente tumoral em carcinomas de células escamosas em estágio precoce e avançado. No primeiro estudo, foram também incluídas análises de expressão nas metástases eventualmente ressecadas. Determinaram elevada expressão da oncoproteína p53 nas metástases e esta foi significativa estatisticamente. Na doença avançada, o aumento na angiogênese e MMP-9 (metaloproteinase 9) foi mais significativo nos tumores primários em estágio T3. Nessa mesma linha de investigação, comparando tumores primários e metástases, Matheus et al. (2004) estudaram a expressão do antígeno de proliferação Ki-67, em que a forte expressão relacionou-se significativamente à presença de metástases cerebrais. Igualmente significantes foram os índices de expressão da oncoproteína ciclina D4, do oncogene c-erbB-2 e do fator de crescimento celular VEGF em adenocarcinomas e suas correspondentes metástases investigados por Saito et al. (2007) e Parra et al. (2008).

Apesar da experiência de nosso grupo com marcadores prognósticos de câncer de pulmão, ainda não se tem por unanimidade um painel de marcadores biológicos ou moleculares para prever comportamento e estabelecer novos protocolos de tratamento.

Atualmente, com o avanço das técnicas em biologia molecular e embasados cientificamente no fato de que o colágeno V pode estar relacionado com a invasão tumoral, abrindo assim novas perspectivas no tratamento da doença neoplásica estabelecida, propomos o câncer de pulmão como alvo de estudo no projeto apresentado, complementando com ferramentas como imuno-histoquímica, imunofluorescência, reconstrução tridimensional e microscopia eletrônica. Fatores associados, como a reação imunocelular, também deverão ser abordados. Convém realçar que as funções específicas desses mediadores no processo de crescimento e invasão tumoral ainda permanecem desconhecidas, e a relação com os fatores prognósticos e comportamento no câncer de pulmão nunca foi antes estudada. Na revisão da literatura, um recente estudo de Luparello et al. (2005) demonstrou que o colágeno V é capaz de prejudicar a sobrevivência das células do câncer de mama, mais especificamente as células 8701-BC (Breast Cancer), por promover uma apoptose caspase-dependente, fornecendo alguma informação em nível de expressão gênica, no caso, ativando a expressão de certos tipos de caspases. Ou seja, esse fato mostra que o colágeno do tipo V pode ser um eficiente promotor de apoptose (morte celular programada) e, assim, um inibidor de crescimento de certas células cancerígenas, como no câncer de mama, demonstrado por Luparello et al.

(2005), e como queremos demonstrar no presente estudo, no câncer de pulmão, colocando, assim, o colágeno V na lista dos marcadores prognósticos e, conseqüentemente, como um promissor agente terapêutico no controle da carcinogênese.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estatísticas do câncer de pulmão

O câncer de pulmão, juntamente com as doenças cardiovasculares representa uma das maiores causas de morte em vários países, incluindo o Brasil. Como consequência, a identificação de mecanismos moleculares de doença, ao lado de relevantes marcadores de diagnóstico, prognóstico e resposta ao tratamento, representa foco de grande interesse científico, em termos conceituais e de valor prático.

Os dados mundiais publicados pela *American Cancer Society* (2010) referentes ao câncer de pulmão para 2009 são alarmantes. Mesmo com todos os avanços nestas últimas décadas referentes ao diagnóstico e tratamento do câncer de pulmão, estima-se cerca de 160 mil casos de morte por câncer de pulmão, correspondendo a 28% do total das mortes por câncer.

Essas estimativas colocam o câncer de pulmão como a principal causa de morte por câncer. Em termos comparativos, mais pessoas morrem de câncer de pulmão do que de mama, próstata e cólon juntos (ACS, 2010).

O câncer de pulmão (tanto o carcinoma de pequenas células como os carcinomas não de pequenas células) é o segundo tipo de câncer mais comum, perdendo, no sexo masculino, somente para o câncer de próstata, e, no sexo feminino, para o câncer de mama (ACS, 2010).

As estimativas eram de que, em 2009, fossem diagnosticados cerca de 220 mil novos casos de câncer de pulmão, correspondendo à estatística mundial de 15% do total de casos novos de câncer (ACS, 2010).

O Brasil não fica atrás nessas estimativas. Segundo os últimos dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, o câncer de pulmão foi responsável por 18.715 mortes em 2006, sendo o tipo de câncer que mais fez vítimas.

Estimativas de novos casos para 2010 eram de 27.630 (17.800 referentes ao sexo masculino e 9.830 ao sexo feminino) (INCA, 2010).

O câncer de pulmão geralmente é detectado em estágios avançados, devido à ausência de sintomatologia nos estágios iniciais da doença. Em decorrência disso, permanece como uma doença altamente letal. A sobrevida média cumulativa total em cinco anos varia entre 13% e 20% em países desenvolvidos, e 12% nos países em desenvolvimento. Ao final do século 20, o câncer de pulmão tornou-se uma das principais causas de morte evitável no mundo (INCA, 2010).

2.2 Classificações do câncer de pulmão

2.2.1 Classificação histopatológica do câncer de pulmão

Quase todos os tipos de câncer de pulmão são carcinomas, sendo outros tipos histológicos responsáveis por menos de 1% dos casos (Travis et al., 2004).

Devido à necessidade de uma linguagem universal entre clínicos, cirurgiões e patologistas, a classificação histopatológica do câncer de

pulmão, assim como as dos demais tipos de câncer, vem sendo uniformizada e atualizada pela Organização Mundial de Saúde.

Essa classificação mais atual, referente ao câncer de pulmão, data de 2004, e leva em consideração as características moleculares e morfológicas desta neoplasia, sendo extremamente importante do ponto de vista clínico, pois representa um dos primeiros marcadores de prognóstico e conduta no paciente com esse tipo de câncer. Nessa classificação, são reconhecidos quatro tipos maiores de câncer de pulmão (Travis et al., 2004):

1. adenocarcinoma;
2. carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermóide);
3. carcinomas neuroendócrinos:
 - ✓ tumor carcinóide típico;
 - ✓ tumor carcinóide atípico;
 - ✓ carcinoma neuroendócrino de grandes células;
 - ✓ carcinoma de pequenas células;
4. carcinoma de grandes células.

Os quatro tipos histológicos principais do câncer de pulmão são responsáveis por mais de 90% dos casos, estando todos relacionados ao tabagismo. No início da epidemia do câncer de pulmão, na década de 1950, havia uma maior incidência de casos de carcinoma de células escamosas seguido pelo carcinoma de pequenas células; entretanto, nos últimos anos, ocorreu um aumento progressivo dos casos de adenocarcinoma, que passou a ser o tipo histológico mais comum (Alberg et al., 2005).

Essa modificação na incidência dos tipos histológicos pode ser explicada principalmente devido à alteração na composição do cigarro e aumento dos casos de câncer de pulmão em mulheres. A redução da quantidade de nicotina contribuiu para a diminuição dos casos de carcinoma de pequenas células, enquanto um aumento dos níveis de nitrato, levando a uma maior produção de nitrosaminas, seja provavelmente o responsável pelo aumento de incidência nos adenocarcinomas (Alberg et al., 2005).

A explicação para uma maior incidência de adenocarcinomas em mulheres não é bem definida. Aspectos relacionados ao tipo de tabagismo, exposições e, principalmente, genética tem sido estudados. Provavelmente a influência hormonal ocupa um papel importante na história da carcinogênese, pois há diferenças significativas entre os sexos relacionadas ao tipo histológico (frequência), sobrevida e resposta ao tratamento (Alberg et al., 2005).

Adenocarcinomas que constituem o tipo histológico mais comum em homens e mulheres com frequência manifestam-se sob forma de massa, com fenótipo resultante da quebra de mecanismos distais de defesa pulmonar. Os aspectos microscópicos característicos incluem formação glandular, geralmente com produção de mucina, podendo exibir padrão papilífero e sólido. Um aspecto morfológico importante é que, com frequência, neste tipo histológico, observa-se uma resposta tecidual desmoplásica adjacente (Younes et al., 2008). Segundo a literatura, o adenocarcinoma atualmente é o tipo histológico que mais se tem estudado,

não só por ser o mais frequente, mas devido à sua heterogeneidade do ponto de vista clínico, radiológico, molecular e patológico (Motoi et al., 2008).

O adenocarcinoma apresenta como principais subtipos: papilífero (37% dos casos), acinar (30%), sólido (25%) e bronquioloalveolar (7%) (Motoi et al., 2008).

Carcinomas de células escamosas exibem, dentre os quatro tipos histológicos maiores, uma relação mais ligada ao tabagismo, seguido pelos carcinomas de pequenas células e adenocarcinomas (Travis et al., 2004).

Carcinomas de células escamosas surgem, em sua maioria, no hilo ou próximo a ele, por quebra de mecanismos de defesa proximais. Em nível microscópico, variam desde neoplasia queratinizante (por isso o nome epidermóide) bem diferenciada a tumores anaplásicos com queratinização focal (Younes et al., 2008).

Carcinoma de pequenas células é o mais maligno dos cânceres pulmonares e, em geral, manifesta-se na forma de tumor central e hilar, como fenótipo resultante da quebra dos mecanismos proximais de defesa pulmonar, como os carcinomas de células escamosas. Os aspectos microscópicos característicos incluem presença de células pequenas com pouco citoplasma, dispondo-se em ninhos ou agregados, sem diferenciação escamosa ou glandular. No nível estrutural, apresentam grânulos neurosecretores e, por isso, geralmente apresentam positividade no estudo imuno-histoquímico para marcadores neuroendócrinos (Younes et al., 2008).

Carcinomas de grandes células provavelmente representam formas pouco diferenciadas de carcinomas de células escamosas ou

adenocarcinomas. Assim como os carcinomas de pequenas células, não possuem arranjo glandular ou escamoso, mas diferem destes quanto às células, que, conforme refere sua nomenclatura, são geralmente grandes, podendo ser gigantes, células claras e até fusiformes (Younes et al., 2008).

2.2.2 Classificação clínica do câncer de pulmão

Quando a primeira ressecção curativa do câncer de pulmão foi relatada em 1933, pouco era conhecido sobre as importantes implicações terapêuticas impostas pelos vários tipos histológicos de neoplasias pulmonares (Kreyberg, 1961; Graham; Singer, 1993). À medida que mais e mais tumores pulmonares foram ressecados, tornou-se claro que pacientes com carcinomas de pequenas células não eram sérios candidatos à cirurgia, uma vez que a doença se disseminava sistemicamente com grande rapidez.

Com a introdução de quimioterapia combinada para carcinoma de pequenas células em 1970, tornou-se óbvio que muitos pacientes com câncer de pulmão poderiam curar-se ou obter importantes remissões clínicas, desde que modalidades terapêuticas fossem adequadamente aplicadas aos pacientes. Portanto, tornou-se incrivelmente importante desenvolver uma classificação para o câncer de pulmão que permitisse reconhecer os diferentes tipos de tumor. Do ponto de vista clínico, a distinção mais importante deve ser feita entre os carcinomas não de pequenas células (CNPC) e os carcinomas de pequenas células.

2.2.3 Classificação dos tumores de pulmão segundo o sistema TNM

O sistema TNM para a classificação dos tumores malignos foi desenvolvido por Pierre Denoix, entre os anos de 1943 e 1952 (*International Union Against Cancer - UICC*, 2009).

A prática de se dividir os casos de câncer em grupos, de acordo com os chamados estádios, surgiu do fato de que as taxas de sobrevida eram maiores para os casos nos quais a doença era localizada do que para aqueles nos quais a doença tinha se estendido além do órgão de origem. Esses grupos eram frequentemente referidos como casos iniciais e casos avançados, inferindo alguma progressão regular com o passar do tempo. Na verdade, o estágio da doença, na ocasião do diagnóstico, pode ser um reflexo não somente da taxa de crescimento e extensão da neoplasia, mas, também, do tipo de tumor e da relação tumor-hospedeiro. O principal propósito a ser conseguido pela concordância internacional na classificação dos casos de câncer pela extensão da doença é fornecer um método que permita comparações entre experiências clínicas sem ambiguidade (UICC, 2009).

Existem muitas bases ou eixos de classificação dos tumores, por exemplo: a localização anatômica e a extensão clínica e patológica da doença, a duração dos sinais ou sintomas, o gênero e a idade do paciente, o tipo e grau histológico. Todas essas bases ou eixos representam variáveis que, sabidamente, têm uma influência na evolução da doença. O sistema TNM trabalha prioritariamente com a classificação por extensão anatômica

da doença, determinada clínica e histopatologicamente (quando possível) (UICC, 2009).

TNM é o sistema mais usado para a classificação de tumores malignos e a descrição de sua extensão anatômica, desenvolvido e publicado pela UICC (2009).

O primeiro passo então é tarefa do médico clínico ou cirurgião fazer uma avaliação do prognóstico e decidir qual o tratamento mais efetivo a ser realizado. Esse julgamento e essa decisão requerem, entre outros fatores, uma avaliação objetiva da extensão anatômica da doença, utilizando-se um estadiamento adequado universal e já estabelecido como o TNM (UICC, 2009).

Para descrever a extensão anatômica da doença, o sistema TNM está baseado na avaliação de três componentes:

T - extensão do tumor primário;

N - ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais;

M - ausência ou presença de metástase à distância.

Existem algumas regras para a classificação TNM nos tumores de pulmão:

- A classificação é aplicável somente para carcinomas de pulmão (CNPC, carcinoma de pequenas células e tumores carcinóides bronco pulmonares). Logo não se aplica a sarcomas e outros tumores raros;

- É necessária confirmação histológica da doença e a divisão dos casos por tipos histológicos.

A Classificação Clínica (TNM) dos tumores de pulmão pode ser observada na Tabela 1.

A Classificação Patológica (TNM) sempre é precedida pela letra “p” minúscula (pTNM) e, no caso do câncer de pulmão, é semelhante à Classificação Clínica (TNM) (Tabela 1).

Logo, as categorias pT, pN e pM correspondem às categorias T, N e M do sistema TNM.

Com relação aos CNPC de pulmão, o estadiamento é importante não somente para avaliar prognóstico da doença, mas também para auxiliar na definição de estratégias terapêuticas adequadas.

Recentemente, a Associação Internacional para estudo de Câncer de Pulmão (IASCL) publicou que, juntamente com o estágio clínico (Tabela 2), estado geral do paciente, idade e sexo (sexo masculino associado à pior sobrevida) são fatores de prognóstico importantes tanto nos CNPC quanto nos carcinoma não pequenas células de pulmão (Edge et al., 2010).

Tabela 1-Classificação clínica (TNM) do Câncer de Pulmão

TNM - Classificação Clínica		
T - Tumor Primário		
TX O tumor primário não pode ser avaliado, ou tumor detectado pela presença de células malignas no escarro ou lavado brônquio, mas não visualizado em diagnóstico por imagem ou broncoscopia		
T0 Não há evidência de tumor primário		
Tis Carcinoma <i>in situ</i>		
T1 Tumor com 3 cm ou menos em sua maior dimensão, circundado por pulmão ou pleura visceral, sem evidência broncoscópica de invasão mais proximal que o brônquio lobar (i.e., sem invasão do brônquio principal) ¹		
T2 Tumor com qualquer das seguintes características de tamanho ou extensão:		
<ul style="list-style-type: none"> • Com mais de 3 cm em sua maior dimensão • Compromete o brônquio principal, com 2 cm ou mais distalmente à carina • Invade a pleura visceral • Associado com atelectasia ou pneumonite obstrutiva que se estende até a região hilar, mas não envolve todo o pulmão 		
T3 Tumor de qualquer tamanho que invade diretamente qualquer uma das seguintes estruturas: parede torácica (inclusive os tumores do sulco superior), diafragma, pleura mediastinal, pericárdio parietal; ou tumor do brônquio principal com menos de 2 cm distalmente à carina 1 mas sem envolvimento da mesma; ou tumor associado com atelectasia ou pneumonite obstrutiva de todo o pulmão		
T4 Tumor de qualquer tamanho que invade qualquer das seguintes estruturas: mediastino, coração, grandes vasos, traquéia, esôfago, corpo vertebral, carina; ou nódulo(s) tumoral(ais) distinto(s) no mesmo lobo; tumor com derrame pleural maligno ²		
Notas: 1. A disseminação superficial, rara, de tumor de qualquer tamanho, com invasão limitada à parede brônquica, que pode se estender proximalmente até o brônquio principal, é também classificada como T1.		
2. A maioria dos derrames pleurais associados com o câncer de pulmão é devida ao tumor. Entretanto, em alguns pacientes, múltiplos exames citopatológicos do líquido pleural são negativos para células malignas, e o líquido não é sanguinolento e nem um exsudato. Quando isso ocorrer e o julgamento clínico evidenciar que o derrame não está relacionado com o tumor, o derrame será excluído como elemento de estadiamento e o paciente deve ser classificado como T1, T2 ou T3.		
II- Linfonodos Regionais		
NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados		
N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais		
N1 Metástase em linfonodos peribrônquicos e/ou hilares homolaterais e nódulos intrapulmonares, incluindo o comprometimento por extensão direta		
N2 Metástase em linfonodo(s) mediastinal(ais) homolateral(ais) e/ou em linfonodo(s) subcarinal(ais)		
N3 Metástase em linfonodo(s) mediastinal(ais) contralateral(ais), hilar(es) contralateral(ais), escaleno(s) homo- ou contralateral(ais), ou em linfonodo(s) supra-clavicular(es)		

Fonte: <http://www1.inca.gov.br/tratamento/tnm/tnm2.pdf>

Tabela 2 - Estadiamento do câncer de pulmão

Grupamento por Estádios			
Carcinoma oculto	TX	N0	M0
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio IA	T1	N0	M0
Estádio IB	T2	N0	M0
Estádio IIA	T1	N1	M0
Estádio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estádio IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Estádio IIIB	Qualquer T	N3	M0
	T4	Qualquer N	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: <http://www1.inca.gov.br/tratamento/tnm/tnm2.pdf>

2.3 Tratamento do câncer de pulmão

Carcinomas não de pequenas células (CNPC) são os mais frequentes dentre os carcinomas de pulmão, correspondendo de 75 a 80% de todos os casos. Nesses pacientes, o estadiamento clínico é fundamental para se estabelecerem as estratégias terapêuticas.

Em geral, recomenda-se o tratamento loco-regional (cirurgia ou radioterapia) para pacientes com doença localizada, que correspondem somente a 20% dos casos. Os pacientes com CNPC de pulmão metastático são submetidos a tratamento quimioterápico. A base do tratamento dos pacientes com carcinoma de pequenas células é a quimioterapia (Younes et.al., 2008).

A maioria dos pacientes com CNPC apresenta a doença em estádios avançados na ocasião do diagnóstico, sendo esse um dos motivos da sua alta taxa de mortalidade. Estima-se que, no momento do diagnóstico de CNPC de pulmão, 20% dos pacientes têm doença localizada, 25% têm extensão da neoplasia para os linfonodos mediastinais e 55% já apresentam metástases à distância.

Nos estádios mais precoces, a ressecção cirúrgica representa a chance real de cura; entretanto, mesmo no estágio clínico IA (T1N0M0), cerca de 30 a 40% dos pacientes morrerão em consequência da progressão da neoplasia, principalmente à custa de recidiva sistêmica.

A administração de terapêutica adjuvante para esses pacientes ainda não mostrou claro benefício na melhora da sobrevida. Por esse motivo, a

identificação de fatores prognósticos vem sendo objeto de estudo de diferentes pesquisadores, com a finalidade de selecionar os pacientes com maior risco de recidiva. Esses pacientes selecionados teriam benefício potencial com terapêuticas adjuvantes, que visam evitar a recidiva da neoplasia e a sua evolução fatal (Younes et al., 2008).

2.4 Carcinogênese pulmonar

Carcinomas de pulmão originam-se ou das células que revestem os alvéolos do parênquima pulmonar ou da mucosa da árvore traqueobrônquica (Edge et al., 2010).

Durante a evolução biológica dos animais, o sistema que mais necessitou se adaptar às novas condições, com o intuito de equilibrar suas funções de filtro e troca, foi o respiratório. As mudanças, principalmente na organização histoanatômica, foram por um lado benéficas, com relação à proteção da árvore traqueobrônquica, porém por outro lado tornou o sistema respiratório extremamente suscetível à carcinogênese, com a quebra dos mecanismos de defesa proximais e distais ao longo dos anos (Younes et al., 2008).

A quebra dos mecanismos de defesa proximais ocorre principalmente por inalação aguda ou crônica de irritantes, dos quais o tabaco é o mais importante, responsável por 90% de todos os tipos de câncer de pulmão. Essa estatística embasa a afirmação de Zander et al. (2008), de que “o

câncer de pulmão é uma doença primeiramente ambiental”. No tabaco, foram identificados mais de quatro mil químicos e, dentre os considerados carcinogênicos, estão as nitrosaminas, aminas aromáticas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e aldeídos (Zander et al., 2008).

Mesmo havendo essa forte relação causa e efeito entre o tabaco e o câncer de pulmão, somente 10 a 20% dos fumantes ativos desenvolvem câncer e, mais intrigante ainda, 15% dos cânceres de pulmão ocorrem em indivíduos que nunca fumaram. Os não fumantes podem ter sido expostos a outros procarcinógenos e carcinógenos ambientais que “justificariam” o aparecimento do câncer, mas como explicar que pessoas que apresentam estímulos ambientais semelhantes possam ter respostas diferentes a carcinógenos? Por que algumas desenvolvem câncer de pulmão frente a um mesmo estímulo e outras não? (Zander et al., 2008).

Isso ocorre porque os indivíduos apresentam suscetibilidade diferente aos fatores de risco para o câncer, em geral, assim como para o câncer de pulmão. Provavelmente, essa diferente suscetibilidade aos fatores de risco se origine do polimorfismo gênico herdado, cujo produto pode afetar a habilidade do indivíduo de reparar o dano do DNA após exposição a algum carcinógeno, ou de metabolizar carcinógenos ou ainda de detoxificar carcinógenos.

Embora esses polimorfismos não sejam causadores de câncer, eles afetam o efeito da exposição ou como o indivíduo responde a essa exposição (Zander et al., 2008).

Os carcinógenos, conforme já relatado, podem danificar o DNA de várias maneiras, dependendo da natureza química a que eles pertencem. A mutação do gene p53 é mais comum em pacientes fumantes com câncer de pulmão do que em pacientes não fumantes. Mais interessante é que o padrão de mutação em fumantes é típico, embora não específico, representado pela transversão de base G para T, causada provavelmente pelo benzopireno, um dos vários carcinógenos do tabaco (Pfeifer et al., 2002).

Como as vias aéreas e, por conseguinte, os pulmões servem de filtro para o organismo, não somente o tabaco entra como “vilão” na etiologia do câncer de pulmão. Desde 1950, há relatos que estabelecem a importante participação de exposições ocupacionais, sendo as mais importantes aos seguintes agentes: asbesto, sílica, radônio, mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e metais pesados (Travis et al., 2004).

A irritação aguda ou crônica produzida pelas substâncias irritantes conduz o epitélio cilíndrico ciliado e mucoso a transformar-se em um epitélio mais resistente à semelhança da epiderme que recobre a pele, denominando-se tal processo de metaplasia escamosa. Embora mais resistente, sobretudo à agressão crônica, a metaplasia escamosa, no entanto, quebra um dos mais importantes mecanismos de defesa no nível proximal da árvore respiratória, anulando a aderência do material particulado ao muco e sua eliminação pelo batimento ciliar e tosse. Em outras palavras, expõe o epitélio respiratório, à medida que retém o material particulado, as partículas com ação carcinogênica. Na próxima divisão celular, se o estímulo

promotor da carcinogênese persistir, o epitélio metaplásico adquire características de imaturidade, dando origem à displasia e finalmente ao carcinoma *in situ*. Essa sequência histopatológica de eventos é responsável principalmente pelo aparecimento de dois tipos histológicos de câncer de pulmão: o carcinoma de células escamosas e o carcinoma de pequenas células. A irritação crônica produzida por partículas como a fibra de asbesto, por exemplo, que por suas dimensões vence com facilidade os mecanismos de defesa proximais, atinge o alvéolo e aloja-se no interior dos macrófagos, onde ativa interminavelmente o mecanismo imunológico da inflamação. A primeira resposta do epitélio agredido faz-se sob forma de uma hiperplasia. Com os surtos repetidos de agressão, na próxima divisão celular, o epitélio agredido, além de hiperplasiar-se, dará origem a estruturas glandulares, compondo o quadro de hiperplasia adenomatosa. Nas divisões celulares subsequentes, origina-se a hiperplasia adenomatosa atípica e, finalmente, o adenocarcinoma. A mesma sequência de eventos histopatológicos ocorre na formação do carcinoma de grandes células pulmonares (Kumar et al., 2010).

A transformação neoplásica

Entendendo-se a quebra dos mecanismos de defesa, proximal ou distal, e a sequência histopatológica de eventos que culminam com o aparecimento do carcinoma *in situ* ou adenocarcinoma, compreende-se melhor as bases moleculares da carcinogênese pulmonar.

O câncer de pulmão é uma doença genética. A lesão genética pode ser adquirida nas células somáticas por agentes ambientais ou herdada na

linhagem germinativa. Os tumores desenvolvem-se como progênie clonal de uma única célula progenitora geneticamente lesada. Quatro classes de genes são alvos de lesão genética:

- Protooncogenes promotores do crescimento (Erb-B2, família Ras, N-myc, L-myc, Ciclina D4);
- Genes supressores tumorais inibidores do crescimento (Rb, p53, p16);
- Genes que regulam a apoptose (p53, bcl-2);
- Genes que regulam o reparo do DNA (hMSH2).

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas. Os atributos de malignidade, como capacidade de infiltração, crescimento excessivo e escape do sistema imunológico, são adquiridos de modo gradativo – um processo denominado progressão tumoral. No nível genético, a progressão resulta do acúmulo de mutações sucessivas (Kumar et al., 2010).

Angiogênese

A angiogênese é o crescimento de novos vasos a partir de uma vascularização pré-existente, e esta ocorre durante o crescimento, diferenciação e reparo de tecidos e aberrantemente durante o crescimento de tumores (Folkman, 1995). As células tumorais, à semelhança das células normais, necessitam de oxigênio para sobreviver. A vascularização dos tumores por vasos sanguíneos derivados do hospedeiro tem uma profunda influência no crescimento dos tumores. Naqueles que exibem crescimento rápido, a taxa de crescimento excede, algumas vezes, a velocidade de

vascularização, com consequente aparecimento de áreas de necrose isquêmica. A vascularização dos tumores é efetuada pela liberação de fatores angiogênicos associados ao tumor, derivados de células tumorais ou de células inflamatórias, como os macrófagos que penetram nos tumores. Os dois fatores angiogênicos tumorais mais importantes são o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF). Além dos fatores angiogênicos, as células tumorais ou as células do hospedeiro também produzem fatores antiangiogênicos, que incluem a angiostatina, a endostatina e a vasculostatina. O crescimento dos tumores é controlado pelo equilíbrio entre fatores angiogênicos e antiangiogênicos. Estes últimos têm sido estudados terapeuticamente para retardar o crescimento tumoral (Kumar et al., 2010).

2.5 O microambiente tumoral

A busca incessante em marcadores prognósticos e terapêutica alvo propiciou uma corrida de grandes grupos de pesquisa na tentativa de encontrar quais seriam estes possíveis agentes. As pesquisas então se remeteram às células e ao meio em que elas vivem. É nesse contexto que se insere o microambiente tumoral e sua importância. Esse microambiente é formado basicamente pelas próprias células tumorais epiteliais e estromais, pelas as células imunes, como as células *natural killer*, células dendríticas, linfócitos T e B, macrófagos e pelas citocinas produzidas por essas células.

Esses componentes celulares estão imersos no estroma composto por vasos, matriz extracelular e seus constituintes, como proteoglicanas, colágenos, glicoproteínas e outras células, como células adiposas e fibroblastos (Franco et al., 2010).

Esse interesse científico está relacionado com as células tumorais e sua biologia molecular, a imunidade no câncer e possíveis alvos de imunoterapia e não menos importante à matriz extracelular, principalmente, proteínas como o colágeno e metaloproteinases, que podem promover a degradação dessa matriz propiciando invasão das células tumorais nos tecidos, estimulando a angiogênese para sobrevivência desse tumor, e, conseqüentemente, influenciando no processo de metástases (Franco et al., 2010).

A carcinogênese, como já citado, é somente o evento inicial do curso para a malignidade no câncer de pulmão. Após o desenvolvimento do câncer, segue-se uma série de eventos sucessivos, que inclui invasão, metástase e crescimento das metástases. Semelhante à carcinogênese, cada evento está associado com alterações genéticas específicas, que por sua vez resultam em um desequilíbrio entre fatores reguladores positivos e negativos. Antes das metástases acontecerem, uma célula ou grupo de células devem se desprender do tumor primário, penetrar no tecido adjacente, sobreviver e crescer no tecido do hospedeiro. Esse acontecimento requer uma série complexa de eventos que inclui a entrada das células tumorais nos vasos, adesão ao sítio metastático, invasão no parênquima do órgão em questão, angiogênese e proliferação em sítio

distante (Figura 1). O carcinoma de células escamosas é o único subtipo histológico conhecido a progredir através de estágio *in situ* para carcinoma invasivo. Esse fato requer interação com a membrana basal subepitelial e envolve três passos: 1- aderência à membrana subepitelial; 2- criação de um defeito na membrana basal e 3- translocação das células tumorais através da membrana basal. A aderência das células tumorais envolve ligação entre as proteínas de superfície da célula tumoral e as glicoproteínas, tais como laminina, colágeno IV e fibronectina. Essa ligação sofre influências de várias moléculas de adesão, incluindo as integrinas, que representam uma família de glicoproteínas transmembranosas funcionantes como receptores de adesão. As células tumorais formam uma fenda na membrana basal pela produção de enzimas hidrolíticas ou estimulando as células do hospedeiro a produzir proteinases. Exemplos de enzimas proteolíticas incluem as metaloproteinases, tais como as collagenases IV, proteases séricas, como a uroquinase, e cisteína proteases, como as catepsinas B e L. Inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP)-1 e 2 são conhecidos reguladores collagenases-negativos. A translocação através de fendas na membrana basal é direcionada por substâncias quimiotáticas contidas nas células do hospedeiro ou fatores de motilidade produzidos pelas células tumorais. Na circulação, as células do tumor são vulneráveis à destruição pelo sistema imune; logo, para sobreviverem, elas tendem a se agregar entre elas e com as plaquetas na corrente sanguínea (Kumar et al., 2010).

Para sair do vaso sanguíneo, as células tumorais se aderem ao endotélio e sofrem o processo de transmigração para posterior formação de

colônias secundárias de células tumorais, que são as metástases. Para que essas colônias metastáticas sobrevivam é necessário que haja a formação de novos vasos sanguíneos para que elas possam se nutrir, proliferar (angiogênese). Esse processo de angiogênese também é dependente de citocinas produzidas tanto pelas células tumorais quanto pelas células imunes e pelos próprios produtos de degradação da matriz extracelular (Van den Heuvel et al., 2009).

MEC: Matriz extracelular; MB: Membrana basal; MMP: Metaloproteinases.

Figura 1. Diagrama esquemático do mecanismo de metástase do câncer, de acordo com Geraldo (2006)

Portanto, de maneira geral, a angiogênese ocorre em conjunto com a progressão das células neoplásicas, precedendo as metástases à distância.

Sabe-se que o endotélio tem importante papel na regulação da homeostase vascular e perivascular, mantendo uma superfície não trombótica e regulando a permeabilidade e o tônus vasomotor. Situadas na interface entre sangue e tecido, as células endoteliais estão constantemente expostas a vários agentes e modulam respostas com propriedades pró-inflamatórias e pró-coagulantes (Haque et al., 2002). Essas células expressam na membrana proteínas com funções definidas como o CD31 ou PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*; molécula de adesão com participação na diapedese) (Meller, 2003) e o CD146 (molécula associada à junção célula-célula e ao citoesqueleto de actina) (Makin et al., 2003). Uma vez ativadas, as células endoteliais passam a expressar moléculas de adesão (VCAM-1; molécula da adesão celular vascular I e E-selectina), que permitem sua interação com linfócitos, facilitando a sua migração para os tecidos e ainda desempenhando importante papel co-estimulatório na ativação das células T (Mojcik et al., 1997). Além disso, as células endoteliais ativadas produzem endotelina-1, peptídeo com ação não apenas vasoconstritora, mas também desmoplásica (Kazuhide, 1994). Supõe-se, portanto, que tanto as moléculas de adesão VCAM-1 e E selectina, bem como a endotelina-1 podem influenciar a invasão vascular neoplásica. Além da disfunção e ativação do endotélio, a apoptose de células endoteliais parece ser de grande importância na atividade vascular (Kurilizin-Moscal et al., 2005), uma vez que resulta em perda da função de barreira, causando edema e exposição da matriz subendotelial, facilitando a trombose, a reparação tecidual anômala e, supostamente, a invasão vascular. Ademais,

a morte programada de células endoteliais parece influenciar na resistência a apoptose de fibroblastos e miofibroblastos, o que contribuiria para a desmoplasia do estroma tumoral e maior resistência à invasão da matriz extracelular (Kurilizin-Moscal et al., 2005).

2.6 Matriz extracelular

A matriz extracelular está presente não somente no microambiente tumoral, mas em todos os tecidos, sendo um meio intercelular altamente organizado que desempenha importantes funções celulares, como adesão, diferenciação, proliferação e expressão gênica, além de modular o comportamento celular (Teodoro et al., 2003, 2004).

Portanto, as células do tecido conjuntivo estão distribuídas no seio de uma matriz que elas mesmas produzem, formada por fibras (colágenas e elásticas) e microfibrilas imersas em um material amorfo, um gel hidratado e poroso (proteoglicanos), além de glicoproteínas estruturais (laminina, fibronectina, etc.) e moléculas que funcionam como conectoras celulares transmembrana (Franco et al., 2010).

A matriz pode mostrar variações morfológicas e funcionais, dependendo da maior ou menor concentração dos seus componentes, vindo a formar as diversas variedades de tecido conjuntivo (fibroso, elástico, cartilaginoso, ósseo). A matriz também se condensa logo abaixo dos revestimentos epiteliais, endoteliais e mesoteliais para formar uma estrutura

característica especializada, que é a membrana basal. Esta última é formada pelos colágenos IV e laminina (Franco et al., 2010).

2.6.1 Colágeno

O termo *colágeno* é um neologismo francês que data do século 19 e significa “constituente do tecido conectivo que produz cola”. A adaptação inglesa para esse termo foi primeiramente usada em 1865. Atualmente, a definição de colágeno é de uma proteína da matriz extracelular que exibe um ou mais domínios que apresentam conformação em tripla hélice (Van de Rest et al., 1991).

O colágeno constitui uma classe especial de glicoproteínas da matriz extracelular representando a família mais abundante de proteínas extracelulares do organismo, constituindo um quarto do peso seco e um quarto das proteínas totais do corpo humano (Franco et al., 2010).

Essas moléculas são muito resistentes aos agentes químicos, mas são solúveis em água salgada fervente e, *in vivo*, os colágenos são degradados pelas collagenases (Franco et al., 2010).

Proteínas fibrosas, os colágenos são sintetizados principalmente por fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e miofibroblastos (Chanut-Delalande et al., 2004). O colágeno fibrilar é sintetizado do pró-colágeno, uma molécula precursora derivada do pré-colágeno transcrito dos genes do colágeno. Após a hidroxilação dos resíduos da prolina e lisina, três cadeias

de pró-colágenos alinham-se em fase para formar a tripla hélice. O pró-colágeno é secretado da célula e clivado por proteases para formar a unidade básica das fibrilas (Hay, 1991). A formação da fibrila colágena está associada à oxidação de resíduos específicos de lisina e hidroxilisina pela enzima extracelular lisil oxidase. Isso resulta em ligação cruzada entre as cadeias de moléculas adjacentes, estabilizando o arranjo característico do colágeno. A ligação cruzada é o principal contribuinte à resistência tênsil do colágeno (Kumar et al., 2010).

Atualmente já foram descritos 27 isotipos distintos de colágenos codificados por 41 genes distribuídos em pelo menos 14 cromossomos diferentes. Desses isotipos, 18 são bem caracterizados em sua estrutura molecular, enquanto os mais recentes são identificados apenas por clonagem genética e sequenciamento. Os vários tipos de colágeno são designados por algarismos romanos (Franco et al., 2010). De 80% a 90% do colágeno do corpo humano são dos tipos I, II e III (Chanut-Delalande et al., 2004).

Existem alguns requisitos básicos para uma molécula ser considerada colágeno. O primeiro é apresentar uma sequência Y-X-Glicina repetida nas cadeias α , em que Y geralmente corresponde a uma hidroxiprolina, e X, à prolina. O segundo é ter uma extensão de cerca de mil resíduos de aminoácidos e, por último, exibir conformação em tripla hélice (Figura 2) (Hay, 1991). O colágeno tipo II se limita ao tecido cartilaginoso, enquanto os demais podem aparecer em qualquer tecido, mas em pequenas quantidades. Os tipos I, II, III, V e XI são colágenos fibrilares, pois formam

fibras com periodicidade, que aparecem estriadas ao serem observadas por microscopia eletrônica de transmissão. Eles existem misturados no tecido conjuntivo e, como tal, estão presentes em quase todos os órgãos. Os tipos IX e, XII e XV aparecem associados a outras fibras, são considerados colágenos associados a fibrilas e se distinguem dos colágenos fibrilares por terem cadeias laterais de proteoglicanos nas suas moléculas.

A morfologia indeterminada dos colágenos VIII, IX e X, bem como sua escassa quantidade nos tecidos, suscitou uma categoria especial para eles: colágenos mínimos. Outros colágenos não são fibrilares, como o tipo IV, mas filamentosos, e formam redes, constituindo-se em elementos fundamentais para a formação de membranas basais. Finalmente, certos colágenos aparecem como cadeias pequenas (VIII) ou longas (X, VII), que funcionam como filamentos de ancoragem matriz/célula e matriz/matriz (Franco et al., 2010).

O colágeno I é o mais abundante e é o predominante nas áreas de tecido fibroso denso, como na derme cutânea, tendões, córnea e ossos. Sua molécula contém duas cadeias $\alpha 1$ (I) e uma cadeia $\alpha 2$ [(2I)] (Knomi et al., 1984).

Figura 2. (A) Modelo esquemático de parte de uma única cadeia α de colágeno. Cada aminoácido é representado por uma esfera. A cadeia é enrolada em forma de hélice e composta por uma série de sequências de Y-X-Glicina. (B) Modelo esquemático de uma parte de uma molécula de colágeno com as três cadeias α , cada uma de uma cor diferente, arranjadas em tripla hélice segundo Alberts et al., 2002

O colágeno III é formado por três cadeias idênticas α III, sendo mais abundante no tecido conjuntivo frouxo, areolar. Encontra-se predominantemente no local onde há fibras reticulínicas, mas não de forma exclusiva (Franco et al., 2010).

2.6.2 Colágeno V

O colágeno tipo V (COL V), juntamente com os tipos I, II, III e XI, pertence à família dos colágenos que formam fibrilas (Gelse et al., 2003). O COL V foi primeiramente isolado da placenta em 1973 por Burgenson et al.

Este é quantitativamente o menor componente dos tecidos ricos em fibras heterotípicas, tais como derme, tendões, ligamentos, ossos e vasos sanguíneos. Representa cerca de 1 a 3% do total de fibras de colágeno; na córnea, porém, sua concentração no corpo humano é entre 1 e 5%.

No pulmão, o colágeno V também é encontrado em pequenas quantidades, cerca de 1,5% sendo o colágeno I o mais abundante, correspondendo a 69%, e o III, a 21% (Van Kuppevelt et al., 1995). Os principais locais onde podemos encontrar o colágeno V no pulmão são: interstício broncovascular, interstício septal, membrana basal capilar e ao redor das células musculares lisas da parede vascular (Mayne et al., 1993).

O Colágeno V se copolimeriza com os tipos I e III para formar fibrilas heterotípicas (I/III/V). Dessa forma, a porção tripla hélice helicoidal da molécula de COL V encontra-se oculta no interior dessas fibrilas e, por outro lado, o domínio globular amino terminal se projeta para a superfície (Birk, 1990; Lisenmayer et al., 1993) (Figuras 3 e 4). Esse domínio regula o crescimento fibrilar, impedindo fisicamente que novos monômeros se acrescentem à fibrila. Devido a essa característica, o colágeno tipo V tem função importante na organização, no crescimento e dimensionamento do diâmetro das fibrilas heterotípicas (Adachi; Hayashi, 1986; Andrikopoulos et al., 1995; Gelse et al., 2003; Chanut-Delalande et al., 2004) (Figura 3).

Figura 3. Desenho ilustrativo representando a interação dos colágenos tipos I (amarelo) e tipo V (vermelho) nas fibrilas heterotípicas. A) Visão transversal da fibrila heterotípica, com o domínio glubular do colágeno tipo V (vermelho), voltado para o exterior da fibrila. B, C) Visão longitudinal da fibrila heterotípica, com a porção fibrilar (helicoidal) do colágeno tipo V (vermelho) no interior da fibrila e o domínio globular para a região externa

Figura 4. Desenho esquemático da interação dos colágenos tipos I e V nas fibrilas heterotípicas. A) Visão transversal mostrando fibrilas heterotípicas finas (à esquerda) e grossas (à direita). B) Visão longitudinal da fibrila heterotípica, mostrando que domínio globular do colágeno tipo V, voltado para a região externa, impede fisicamente a agregação de novas moléculas de colágeno às fibrilas heterotípicas. O colágeno tipo V tem função na regulação do diâmetro das fibrilas heterotípicas, pois quando se encontra em maior proporção, as fibrilas são mais finas; e em menor proporção, estas são mais grossas (A)

Existem várias isoformas de colágeno tipo V, que diferem pela composição de suas cadeias. A forma mais abundante e amplamente distribuída é a heterotrímera, composta por duas cadeias $\alpha 1$ do tipo V e uma cadeia $\alpha 2$ do tipo V [$\alpha 1(V)_2 \alpha 2(V)$], sendo encontrada em vários tecidos, como pele, pulmão, rim, entre outros. Já a forma heterotrímera, composta por três cadeias diferentes [$\alpha 1(V) \alpha 2(V) \alpha 3(V)$], é encontrada principalmente em placenta, e a forma homotrímera [$\alpha 1(V)_3$], em tecido embriônico (Miller; Rhodes, 1982; Niyibizi et al., 1984; Mayne; Burgeson, 1993).

Fibrilas muito finas de colágeno V (5 a 10 nm de diâmetro) têm sido descritas na região próxima à membrana basal, estendendo-se até a matriz intersticial adjacente (Gay et al., 1981; Fitch et al., 1984; Modesti et al., 1984; Birk, 1986). Além disso, este envolve as células musculares dos vasos sanguíneos (Mayne; Burgeson, 1993). O colágeno tipo V é uma proteína preservada entre diferentes espécies de animais, conservando os telopeptídios NH₂ e COOH terminais, os quais tornam a molécula mais imunogênica (Niyibizi et al., 1984).

Recentemente, foi demonstrado que o colágeno V pode ser um antígeno *self potencial* (Mares et al., 2000; Haque et al., 2002). Como citado acima, este colágeno interage com o tipo I, de forma que epítomos do colágeno V estão ocultos entre as fibrilas heterotípicas. Uma vez expostos, esses epítomos poderiam funcionar como um antígeno desconhecido e ativar o sistema imune.

Outro possível papel do colágeno V seria a indução de apoptose, participando na regulação da expressão de genes apoptóticos e de resposta

ao estresse em linhagem de células neoplásicas no câncer de mama (Pucci-Minafra et al., 2000; Luparello et al., 2003; Luparello et al., 2005). Também é importante salientar que mutações nos genes do colágeno tipo V: COL5A1 e COL5A2 podem gerar anormalidades estruturais da córnea, tornando-as mais finas e frágeis (Segev et al., 2006).

2.6.2.1 Papel imunogênico do colágeno V

Os aspectos imunogênicos da molécula de colágeno são, de maneira geral, invariáveis entre todas as suas isoformas fibrilares. Cada um dos domínios da molécula (helicoidais e telopeptídeos globulares) apresenta imunogenicidade espécie-específica, sendo capaz de desencadear uma resposta imune independente, justificando, de certa maneira, o fato de moléculas de procolágeno (forma precursora) e de colágeno denaturado (possui mais sequências de aminoácidos expostas além dos domínios encontrados na molécula tradicional) apresentarem uma resposta mais difusa por parte do sistema imune.

Mares et al., em 2000, trabalhando com modelo de transplante de pulmão em murinos, mostraram que o colágeno tipo V é alvo da resposta imune para aloantígenos. Verificaram que o tecido conjuntivo peribronquiolar, interstício alveolar e membrana basal dos capilares, nos quais o colágeno tipo V está localizado, são os sítios de lesão patológica em resposta aos aloantígenos no modelo estudado. Nessa mesma linha de

pesquisa, Haque et al., em 2002, encontraram células T específicas para o colágeno tipo V, que surgiram durante os episódios de rejeição do transplante de pulmão, e verificaram que essas células estavam envolvidas na patogênese da rejeição. Os autores sugeriram que, uma vez que o colágeno tipo V é uma molécula altamente conservada entre indivíduos e espécies, este seria um alvo na resposta de rejeição no pulmão. Demonstraram ainda que respostas para um “auto”-antígeno, bem como aloimunidade, estão envolvidas na patogênese da rejeição do enxerto de pulmão. De acordo com os autores, o colágeno tipo V pode tornar-se um neoantígeno durante as respostas de rejeição, visto que este colágeno apresenta-se em menor proporção no pulmão e encontra-se oculto no interior do colágeno tipo I, nas fibrilas heterotípicas das regiões perivasculares e peribronquiolares. Durante o processo de rejeição e inflamação, o tecido sofre ação das metaloproteinases (MMP), como a MMP-2 e MMP-3, e essas enzimas são capazes de clivar e expor o COL V, tornando-o imunogênico; deste modo, os diferentes peptídeos dessa macromolécula poderiam induzir alorreatividade, desempenhando papel importante na rejeição do enxerto e remodelamento pulmonar (Haque et al., 2002).

Mais recentemente, Yoshida et al. (2006) estudaram a importância de células T específicas para COL V na aloimunidade e autoimunidade para colágeno tipo V, usando um modelo de transplante de pulmão entre ratos isogênicos. Nesse modelo, ocorre uma lesão perivascular e peribronquiolar, devido à isquemia de perfusão resultante do procedimento cirúrgico; porém,

esse processo inflamatório começa a se resolver aos três dias de pós-operatório e aos sete dias o isoenxerto está normal e se mantém até 16 meses de pós-transplante. Esses autores transferiram adotivamente células T específicas para colágeno tipo V para animais com isoenxerto de pulmão recente e bem cicatrizado e observaram rejeição (grau 2) do transplante de pulmão recente e rejeição ainda mais acentuada (grau 3) nos animais com 30 dias de pós-operatório. Além disso, observaram altos níveis de IL-17 e IL-23, citocinas recentemente relacionadas com doenças autoimunes. Com este experimento, sugeriram que em decorrência da lesão tecidual e consequente desorganização da matriz extracelular, ocorre exposição de epítomos de colágeno tipo V, os quais se tornam importantes tanto na autoimunidade, como na aloimunidade.

Além desses achados, Yasufuku et al., em 2001, mostraram que a indução de tolerância oral ao colágeno tipo V, nos recipientes de enxerto de pulmão, administrados anteriormente ao transplante, diminuía as respostas de rejeição. A análise imunológica, radiológica e histológica dos animais receptores de enxerto tratados oralmente com colágeno tipo V, em relação ao controle, demonstrou diminuição de células polimorfonucleares e linfócitos no fluido bronquioalveolar, menos infiltrados nos enxertos, preservação da anatomia do enxerto e redução da rejeição patológica. A administração oral de colágeno tipo V induziu aumento na produção de TGF- β , citocina com ação imunossupressora.

Esses autores, por fim, mostraram que os receptores de enxerto, tolerados oralmente com COL V, exibiam diminuição das respostas de

hipersensibilidade tardia para os aloantígenos do doador, o qual era neutralizado por TGF- β . Posteriormente, foram identificadas células T regulatórias (T regs) (CD4⁺CD45RC^{high}), as quais mediam tolerância para colágeno tipo V, em transplante de pulmão, no modelo experimental em ratos, que não expressam Smad7 e, deste modo, são permissivas à sinalização mediada por TGF- β (Mizobuchi et al., 2003). Os autores sugerem que, como o Smad7 é uma molécula protéica intracelular potente inibidora da sinalização para a produção de TGF- β , ele possa ser a chave na determinação de células que podem contribuir para a inflamação ou ativação da supressão imune, através de células T regs, com função regulatória.

Recentemente, células T específicas para colágeno tipo V, que produziam IL-10 (citocina imunossupressora), foram detectadas no sangue periférico de pacientes, após o transplante de pulmão. Ainda, foi detectada menor proporção de células do subtipo Th1 (produtoras de IL-2 e INF- γ), específicas para colágeno tipo V, as quais mediam inflamação e rejeição do transplante (Bharat, 2006). As células T, produtoras de IL-10, específicas para COL V, suprimiam a proliferação e expansão das células Th1, de um modo dependente de IL-10. Porém o desenvolvimento dessas células, produtoras de IL-10, foi dependente da presença de células T regs (CD4⁺CD25). Por outro lado, durante a rejeição crônica do transplante de pulmão foi encontrado um significativo declínio de células T, produtoras de IL-10, com concomitante expansão das células Th1 específicas para colágeno tipo V (Bharat, 2006). Isso demonstra a importância de células T

regs (CD4⁺CD25) constitutivas na modulação da autoimunidade celular para COL V, após transplante de pulmão em humanos.

Logo, por essas propriedades do colágeno V, principalmente pelo seu papel imunogênico, no final do século passado surgiram duas linhas de pesquisa independentes relacionando a antigenicidade do colágeno V com a origem de certas doenças autoimunes.

Trabalhos do grupo liderado por Wilkes (2003) demonstraram que o colágeno tipo V é o antígeno responsável pela rejeição em transplantes halogênicos de pulmão em modelo animal. De acordo com eles, o processo inflamatório gerado durante o processo de rejeição no pulmão promoveu a exposição de epitopos previamente “escondidos” de colágeno tipo V, originando uma doença tipo enxerto *versus* hospedeiro.

No Brasil, o laboratório de matriz extracelular da Disciplina de Reumatologia da Universidade de São Paulo (USP) desenvolveu recentemente um interessante modelo experimental de Esclerodermia Sistêmica (ES), induzido em coelhas saudáveis, Nova Zelândia, através da imunização com colágeno tipo V humano (COL V) com adjuvante de Freund.

Os animais imunizados desenvolveram alterações histológicas progressivamente piores, caracterizadas por lesões nas células endoteliais e fibrose na camada íntima do vaso, em todos os órgãos normalmente acometidos nesta doença, como pulmão, esôfago, coração, rim, pele, cartilagem e sinóvia (Yoshinari et al., 2002; Teodoro et al., 2003; Teodoro et al., 2004; Bezerra et al., 2006).

Duas características notáveis foram identificadas nesse modelo. Primeiro, o remodelamento cutâneo foi muito precoce, sendo observado após sete dias da primeira imunização com COL V. A segunda característica foi o surgimento tardio de anticorpos nos animais imunizados, incluindo a presença de anticorpos antinucleares (FAN), anticorpos para proteínas do complexo de Golgi, identificados pelo *imunoblot* e presença de anticorpos anticolágeno dos tipos I, III e IV (Yoshinari et al., 2005).

Adicionalmente, estudos histológicos e imuno-histoquímicos realizados em pulmões e tecidos da pele de animais imunizados e pacientes com ES revelaram grandes similaridades (Souza et al., 2005). Essas semelhanças também foram reproduzidas com a cultura de fibroblastos de pele e pulmão de animais e pacientes com ES, pelo método de *explant* (Souza et al., 2005).

Tanto em animais como em pacientes com ES, além do aumento da síntese de colágenos, foi identificada a presença de COL V estruturalmente anômala, depositada em vários tecidos. Normalmente, essa fibra apresenta discreta marcação por imunofluorescência, formando longas e finas fibras. Esse padrão morfológico habitual de COL V esteve muito diferente, tanto nos tecidos quanto nas culturas de animais imunizados e de pacientes com esclerodermia. Essa molécula esteve expressa anormalmente, formando fibras mais curtas e espessas com distribuição heterogênea. Essa alteração no fenótipo do COL V, observada no modelo experimental e em pacientes com ES, é uma descoberta original e de grande relevância, na medida em que essa molécula participa do processo de fibrilogênese, ajudando a

manter a integridade da matriz extracelular e regulando o diâmetro das fibras de colágeno (Bezerra et al., 2006).

2.6.2.2 Colágeno V e o Câncer

Naturalmente, a maioria das células do nosso corpo morre e é substituída por outras mais jovens, oriundas do próprio tecido. Esse tipo de morte natural e fisiológica chama-se apoptose. O mecanismo da apoptose, a formação de novas células, bem como praticamente todas as funções do nosso organismo, são controlados a partir de genes que nada mais são do que segmentos de DNA com funções específicas. A apoptose é induzida por uma cascata de eventos moleculares, que podem ser iniciados de modos distintos através das vias intrínseca ou mitocondrial e via extrínseca, culminando na ativação de caspases (Kumar et al., 2010).

As caspases são proteases de cisteína ("c"), ou seja, têm um centro ativo de cisteína. São sintetizadas sob a forma de precursores, zimogênios que precisam ser clivados ao nível de resíduos contíguos de ácido aspártico para adquirirem atividade proteolítica e, por isso, recebem esse nome: C (cisteína) + asp (ácido aspártico) + ase (enzima) (Franco et al., 2010).

Existem 14 tipos diferentes de caspase, e pelo menos sete delas participam da apoptose. São elas: 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10. As demais (1, 4, 5, 11, 12, 13, e, 14) estão primariamente envolvidas na ativação de pró-citocinas que atuam na inflamação. As caspases não ativadas são, elas

próprias, substratos para outras caspases. A análise da estrutura das caspases sugere que elas têm preferência por outras caspases, conforme uma ordem hierárquica (Kumar et al., 2010).

O processo de apoptose pode ser dividido em uma fase de ativação, que é realizada pelas caspases iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10), na qual as caspases se tornam cataliticamente ativas, e uma fase de execução, realizada pelas caspases executoras (caspases 6, 3 e 7), na qual essas enzimas atuam provocando a morte celular (Kumar et al., 2010).

Estes dois tipos de caspases atuam nas vias mitocondrial e extrínseca da apoptose.

A via mitocondrial é a mais frequentemente acionada nas células que morrem por apoptose. É comum a ativação indireta da via mitocondrial quando receptores da via extrínseca, como os receptores Faz-L-R e os TRAIL-R1 e TRAIL-R2, são acionados. Os fatores que ativam a via mitocondrial são numerosos. Agentes como a radiação ionizante ou ultravioleta que degradam a organização do DNA ou que induzem defeitos na execução do ciclo proliferativo ou mobilização indevida da célula de seu lugar na matriz extracelular ou remoção de nutrientes ou de hormônios que garantem a troficidade das células-alvo podem promover a transcrição de genes que levam a apoptose.

A proteína 53(p53) é referida como supressora de neoplasias malignas. Uma das funções mais importantes da p53 é de atuar como fator de transcrição que leva à ativação de genes de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Bad, BID, Puma, Noxa), que promovem a

apoptose. A família de genes Bcl-2 controla a morte celular por via mitocondrial, promovendo-a ou bloqueando-a. Muitos estudos mostram que, nas neoplasias malignas, frequentemente a proteína Bcl-2 está expressa em altos níveis e tem ação antiapoptótica. Além do Bcl-2, merecem destaque as proteínas a ele relacionadas, designadas como Bax (*Bcl-2 associated protein*) e Bak, sendo que Bax tem elevada capacidade de induzir apoptose (Franco et al., 2010).

Os genes supressores de tumor que controlam a apoptose como o p53 frequentemente estão mutados em 50% a 80% e 80% a 100% dos carcinomas não de pequenas células e carcinoma de pequenas células, respectivamente. Imunoistoquimicamente se demonstra intensa expressão do gene antiapoptótico Bcl-2 em 90% dos tumores, em contraste com uma baixa frequência da expressão do gene pró-apoptótico Bax (Strauss et al., 1995).

Alterações podem ocorrer em alguns genes, tornando-os anômalos (oncogenes) e, em vez de levar as células à apoptose, tornam-nas imortalizadas, suscetíveis a transformações, tornando-as estranhas ao organismo e capazes de entrar em processo de multiplicação contínua e formar o câncer que, se não controlado, leva à morte por infiltração de tecidos normais adjacentes ao tumor (crescimento local) e propagação à distância (metástases).

Os tumores podem ser resistentes à morte celular programada, como consequência da inativação do p53 ou de outras alterações e pela proteção

de suas células tumorais contra a apoptose através do Bcl2 (Kumar et al., 2010).

A via extrínseca é constituída pela ação de linfócitos T citotóxicos e, principalmente, pela superfamília de receptores de fator de necrose tumoral (TNF). Os linfócitos injetam diretamente através da membrana de células alvo granzima B, que ativará diretamente caspases efetoras, levando à morte celular. As células T citotóxicas representam a melhor defesa contra vírus que crescem intracelularmente, fora do alcance de anticorpos (Franco et al., 2010).

Com o exposto acima, referente à capacidade imunogênica do colágeno V e à atuação das caspases na apoptose, fica mais fácil entender os primeiros estudos correlacionando o colágeno V e o câncer.

Luparello et al. foram os primeiros a relacionar o colágeno V com o câncer (Minafra et al, 1992). Dentre suas pesquisas, destaca-se o artigo correlacionando o colágeno V e a inibição da motilidade e invasão das células do câncer de mama, mais especificamente as células 8701-BC (*Breast Cancer*) (Luparello et al., 1994).

Recentemente os mesmos autores publicaram um artigo referindo que o colágeno V pode desencadear apoptose via caspase (Luparello et al., 2005). Logo, esse colágeno fornece alguma informação ao nível de expressão gênica, ativando a expressão de certos tipos de caspases, especialmente 5, 6, 8 e 9, estas duas últimas importantes como iniciadoras do processo apoptótico.

Em 1996, foi publicado um artigo na revista *Cancer Research* também correlacionado a presença de autoimunidade a antígenos de colágenos, no câncer de pulmão (Fernandez-Madrid et al., 1996). Este artigo traz a intrigante questão do por que altos níveis de anticorpos anticolágeno do tipo V estão associados com o carcinoma pulmonar de pequenas células, sendo que os colágenos tipos I, III e IV são os maiores constituintes da matriz extracelular. Deve haver algo de especial no colágeno do tipo V que anticorpos para esta macromolécula parecem se tornar distintos dos anticorpos das outras fibras de colágeno (Fernandez-Madrid et al., 1996).

Pelo fato de o colágeno V poder ser um eficiente promotor de apoptose e, assim, um inibidor de crescimento de certas células cancerígenas, como no câncer de mama, este é um promissor agente terapêutico no controle da carcinogênese.

2.7 Câncer e imunidade

Por suas propriedades imunogênicas, o colágeno V é capaz de interferir com a reatividade imune específica inativando clones específicos de células T como já foi citado (Yoshida et al., 2006).

A imunidade no câncer tem sido intensamente estudada como possível alvo prognóstico e na imunoterapia. Muito há para se descobrir, mas algumas afirmações já podem ser feitas (Van den Heuvel et al., 2009).

Primeiramente, células tumorais possuem antígenos de baixo poder imunogênico; portanto, pouca resposta imune. A resposta imune que é desencadeada pelo câncer pode ser tanto a imunidade inata quanto a adaptativa (adquirida), e estas se manifestam desde o início da formação da neoplasia (Van den Heuvel et al., 2009).

Sabe-se também que a fase inicial da resposta imune é capaz de destruir células tumorais e inibir o desenvolvimento da neoplasia; por isso é possível que alguns tumores não se manifestem, sendo eliminados logo em sua origem. O mesmo também ocorre com células tumorais presentes na circulação (Van den Heuvel et al., 2009).

Grande parte das células circulantes é destruída por mecanismos imunitários ou não imunitários, sendo uma das razões para explicar por que a maioria das células neoplásicas circulantes não desenvolvem metástases (Van den Heuvel et al., 2009).

É importante salientar que a mesma resposta imune que muitas vezes destrói as células neoplásicas contribui para selecionar clones mais resistentes e mais agressivos. Além disso, quimiocinas e citocinas liberadas na inflamação decorrente de mecanismos inatos e adaptativos podem favorecer o crescimento do tumor (Geraldo, 2006).

O sistema imunitário do hospedeiro age, além dos mecanismos inatos, por meio da resposta humoral e celular para eliminar as células tumorais.

A resposta imune inata inclui mecanismos já existentes no organismo que se instalam rapidamente e respondem de modo inespecífico.

As células NK (*Natural Killer*) são as mais importantes na imunidade inata. Elas são linfócitos CD56 positivos e CD3 negativo sendo o primeiro componente da resposta inata (Becknell; Caligiuri, 2008).

As NK destroem as células tumorais por meio de múltiplos mecanismos, incluindo apoptose e lise direta de antígenos sem a prévia sensibilização e sem a participação de moléculas de histocompatibilidade (Becknell; Caligiuri, 2008).

As células NK também exibem o importante papel na ligação entre a imunidade inata e adquirida através da produção de citocinas, função esta também exercida pelas células dendríticas que, assim como os macrófagos, são eficientes apresentadoras de antígenos. Assim, se a célula NK produzir interferon (IFN) γ numa situação, a resposta pelos linfócitos T CD4+ será preferencialmente do tipo Th1: haverá ativação de macrófagos com micróbios em suas vesículas via CD40-CD40 ligante e IFN- γ , e síntese de substâncias microbidas e secreção de citocinas pró-inflamatórias por esses macrófagos ativados. Por outro lado, se a célula NK/T responder com a liberação de interleucina-4 (IL-4), será favorecida a resposta Th2: temos, então, a produção de IL-4, que estimula a síntese de IgE; e IL-5, que ativa os eosinófilos. A IgE tem a capacidade de revestir mastócitos e causar sua sensibilização, levando à degranulação dessas células e resposta alérgica explosiva numa próxima exposição ao antígeno (Abbas et al., 2000).

A células dendríticas, representantes também da imunidade inata, têm como função capturar antígenos. Ao capturar esses antígenos elas migram e drenam para órgãos linfóides e, após processo de maturação, apresentam

esses antígenos para células T, responsáveis pela imunidade adquirida (Geraldo, 2006).

Os macrófagos, participantes da imunidade inata, têm função de lisar células tumorais pela produção de radicais livres de oxigênio e citotoxicidade celular dependentes de anticorpos (Palucka et al., 1999).

O principal mecanismo de imunidade tumoral é a destruição de células tumorais por Linfócitos T CD8; portanto, através da imunidade celular (Fukuyama et al., 2007).

Os linfócitos CD8 reconhecem e destroem células potencialmente malignas que expressam peptídeos derivados de proteínas celulares mutadas ou proteínas virais oncogênicas através de associação com moléculas MHC I (Fukuyama et al., 2007).

A imunidade humoral é aquela mediada por anticorpos (AC) produzidos por linfócitos B previamente sensibilizados mediante a transformação em plasmócitos. Os anticorpos destroem células tumorais de duas maneiras, por meio da ativação do sistema complemento ou através da citotoxicidade dependente de anticorpos mediada por células (macrófago e células NK) (Fukuyama et al., 2007).

Quanto às citocinas inflamatórias produzidas na resposta imune, elas podem ser de dois tipos: aquelas produzidas por linfócitos Th-2 e são: IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, responsáveis pela indução da imunidade humoral, e as produzidas por linfócitos Th-1, que são: IL-2, IL-12, TNF- α e INF- γ (Fukuyama et al., 2007).

Estudos recentes indicaram a presença de citocinas tipo Th-2 no microambiente tumoral, sugerindo que estas podem ter um papel na supressão da imunidade celular contra o câncer.

Há pouca evidência de imunidade humoral efetiva contra o câncer (Fukuyama et al., 2007). No caso do câncer de pulmão, o sistema imune tem uma estruturação específica para lidar com um contexto peculiar de exposição ao meio externo, devido à função pulmonar (Berne et.al., 2004).

Outra característica do câncer de pulmão reside no fato de que ele é extremamente agressivo e as terapias atuais muitas vezes não são tão eficazes. Assim, é importante a compreensão do funcionamento do sistema imune pulmonar e de suas alterações no câncer de pulmão, visando possibilitar, posteriormente, a manipulação desse sistema como terapia para estágios avançados dessa neoplasia.

Ao pulmão, cabe a função primordial de troca de gases, captando oxigênio e expelindo gás carbônico. Além disso, em virtude da constante exposição desse órgão ao ambiente externo, tornou-se imprescindível o desenvolvimento de um sistema de defesa capaz de lidar com essa exposição e com a constante agressão por agentes externos. Como exemplos desses agentes, há as substâncias naturais inertes, vírus e bactérias patogênicas, poluentes industriais, tabaco, entre outros. As partículas inaladas são depositadas no decorrer do trato respiratório de acordo com seu tamanho – as partículas maiores geralmente se depositam em porções superiores do trato, enquanto partículas menores tendem a ficar

depositadas nas vias aéreas mais distais ou nos alvéolos –, sendo também influenciadas pela distância percorrida, a densidade e a umidade relativa.

Com a evolução das espécies, surgiram sistemas únicos para processamento e eliminação dessas partículas. Dentre esses sistemas, temos um sistema imune mucoso que abrange respostas imunológicas inatas e adaptativas executadas por linfócitos, macrófagos e células dendríticas, e um sistema de depuração mucociliar localizado na região traqueobrônquica, que transporta partículas líquidas em direção à boca através de células epiteliais ciliadas (Berne et al., 2004).

À semelhança de outras superfícies mucosas (como as que recobrem o trato gastrointestinal e o sistema urinário), o trato respiratório também apresenta um tecido linfóide secundário associado à mucosa (MALT). Este é constituído por nódulos linfóides, linfonodos, agregados linfóides e uma rede submucosa difusa de linfócitos e células dendríticas, sendo todos altamente especializados na defesa do pulmão. Outra característica singular do pulmão é sua capacidade de limitar a resposta inflamatória, o que é fundamental para que não seja prejudicada a troca gasosa. No MALT do pulmão há um único sistema de anticorpos representado pela IgA. Na submucosa, a IgA é secretada por plasmócitos em forma de dímero ligado por uma cadeia-J. Esse complexo migra em direção às células epiteliais, onde se liga ao poli-Ig, um receptor protéico de membrana. Assim ocorre a pinocitose do dímero e sua entrada na célula epitelial, com posterior secreção para o lúmen da via aérea. Durante essa exocitose, há clivagem do poli-Ig, sendo que sua parte secretória permanece associada ao complexo IgA. Devido à ligação da parte

secretória do poli-Ig com o complexo IgA, este complexo fica protegido da proteólise no lúmen e também não interage com o complemento da forma clássica, limitando sua função pró-inflamatória. Contudo, ainda é possível que a IgA ative o complemento pela via alternativa. Além disso, esse complexo secretado no lúmen do trato respiratório é capaz de se ligar a vírus e particulados com grande eficiência, possibilitando posterior eliminação dessas substâncias por meio do sistema de depuração mucociliar. Outra particularidade do MALT reside no fato de que ele é capaz de processar um antígeno sem levar à sensibilização sistêmica, ao contrário do que ocorre em linfonodos verdadeiros, que possuem drenagem linfática aferente e eferente. Embora exista a possibilidade de comunicação com o MALT de outros órgãos, a sensibilização imunológica pode ser restrita apenas a esses órgãos mucosos (Berne et al., 2004).

O MALT pulmonar é constituído por algumas células imunológicas principais: macrófagos alveolares, células dendríticas (DCs), linfócitos $\text{TCR}\gamma\delta$ e células *natural killer* (NK).

Os linfócitos $\text{TCR}\gamma\delta$ correspondem a uma classe de linfócitos T com receptor de célula T (TCR) expressando cadeias γ e δ , ao invés das cadeias α e β expressas pelos outros linfócitos T. Essas células $\text{TCR}\gamma\delta$ constituem o conjunto de células T solitárias intraepiteliais que permeiam o MALT. São capazes de reconhecer antígenos nativos sem a presença de moléculas MHC, eliminando células epiteliais lesadas antes do estabelecimento de uma resposta inflamatória antígeno-específica mediada por células T (Berne et al., 2004).

As DCs são encontradas por todo o trato respiratório e também no parênquima pulmonar, comumente associadas ao epitélio (Berne et al., 2004). Geralmente, quando em contato com antígenos, as DCs presentes nos tecidos periféricos amadurecem rapidamente e migram para órgãos linfóides secundários, onde exercerão seu papel, expressando altos níveis de moléculas MHC, moléculas co-estimuladoras (como CD80 e CD86) e CD83 (marcador característico de DC ativa) (Zhou et al., 1992).

Os macrófagos alveolares ficam localizados preferencialmente no alvéolo adjacente ao epitélio. São células fagocíticas eficientes e rápidas e matam as partículas endocitadas por meio da produção de radicais livres de oxigênio, derivados de halógenos e enzimas, antes que ocorra inflamação ou invasão e lesão tecidual. O macrófago também pode inibir a atividade da célula T pela secreção de IL-10, TGF- β , óxido nítrico e prostaglandina E₂. Essa atividade supressora do macrófago pode ser inibida por GM-CSF (fator estimulador de colônias granulócito-macrófago) e fator de necrose tumoral (TNF)- α (Berne et al., 2004). Os macrófagos ainda têm a capacidade de produção de fatores indutores de angiogênese, apresentam função importante no remodelamento de matriz extracelular e podem modificar a expressão gênica de células tumorais. Devido a esses últimos atributos do macrófago, quando esta célula não responde a um tumor de maneira eficaz, pode contribuir para invasão e crescimento tumoral (Kataki et al., 2002).

A imunidade inata tende a ser a primeira resposta do pulmão frente a um agente invasor e tem grande dependência dos mecanismos expostos anteriormente. Todavia, em algumas ocasiões é necessária a participação

da resposta imune adaptativa para defesa do organismo. Nesta resposta, além da influência das células já citadas, temos a participação de linfócitos T e linfócitos B (síntese de anticorpos) após a resposta inflamatória inicial (que também conta com a participação de outras células fagocíticas, como leucócitos polimorfonucleares). Existe ainda outro tipo de resposta, quando o agente desencadeador da imunidade persiste e é de difícil fagocitose, a resposta granulomatosa. O granuloma se desenvolve a partir de uma resposta Th1, sendo composto por macrófagos que tentaram fagocitar o agente invasor e células T CD4+ que migram para o local posteriormente. Através do granuloma, o agente invasor pode ser isolado e contido. Porém, o local onde houve a resposta granulomatosa acaba sendo lesado e futuramente haverá deposição de colágeno e formação de cicatriz, tornando essa região não-funcional (Berne et al., 2004).

Apesar dessa estruturação do sistema imunológico do pulmão para a manutenção da homeostase frente à exposição a fatores lesivos externos, pode ocorrer falha nessa defesa e o estabelecimento da neoplasia pulmonar.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:**3.1 Objetivos Gerais**

- Validar a importância do colágeno V no carcinoma não de pequenas células (CNPC) de pulmão.
- Analisar as características histológicas do colágeno V nos pacientes com CNPC de pulmão, observando sua contribuição na compreensão dos mecanismos patológicos e apoio diagnóstico neste tipo de câncer.

3.2. Objetivos Específicos

- Evidenciar se há relação entre o colágeno V, angiogênese, apoptose vascular e resposta imune no CNPC de pulmão.
- Analisar, no CNPC de pulmão, a relação entre os colágenos do tipo I, III e V.
- Verificar o impacto destes marcadores de angiogênese, apoptose, resposta imune, mas principalmente colágeno V na sobrevida e no prognóstico dos pacientes com CNPC de pulmão.

Para alcançar estes objetivos foram realizados os seguintes procedimentos:

- Avaliação da distribuição do colágeno dos tipos I, III e V pulmonares na região tumoral e no microambiente não tumoral por meio da cultura de fibroblastos pulmonares destas áreas pelo método de imunofluorescência indireta.
- Avaliação da apoptose pela expressão das caspases (5, 6, 8 e 9) e via TUNEL mediante marcação imuno-histoquímica.
- Avaliação dos marcadores antiapoptóticos Bcl6, e Bcl2.
- Avaliação da expressão de mRNA para as cadeias do colágeno V por meio da técnica de PCR, para a caracterização das isoformas deste colágeno.
- Reconstrução tridimensional do colágeno tipo V pelo microscópio confocal.
- Avaliação da resposta imune celular por meio da expressão de interleucinas 4, 6, 8 e TGF- β , células imunes (CD20, CD4, CD8, CD3, S-100, CD68, CD56).
- Avaliação da expressão de marcadores vasculares, como CD34 e de atividade endotelial VCAM-1, CD54 e antiendotelina e Laminina.
- Avaliação das características das células tumorais e sua relação com as células imunes e o estroma tumoral por meio da microscopia eletrônica.

Levantamos a hipótese de que, no câncer de pulmão, especificamente no CNPC, o colágeno do tipo V, por suas propriedades imunogênicas, pode interferir com a imunidade celular e a apoptose, despontando como um promissor agente de controle do crescimento tumoral.

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

Todos os pacientes selecionados para este estudo fizeram acompanhamento ambulatorial ou estiveram internados no Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas de São Paulo da FMUSP. Estes pacientes foram submetidos à ressecção cirúrgica com esvaziamento linfonodal, no período de 2000 até o final de 2004. Foi criado um banco de dados com diversas informações sobre cada paciente, 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 todos os casos que não apresentaram metástases linfonodais, ou seja, estadiados clinicamente como (N0).

As amostras pulmonares obtidas durante as ressecções pulmonares de pacientes foram utilizadas como método de diagnóstico, sendo selecionadas as com diagnóstico de carcinoma não de pequenas células (CNPC), e/ou tratamento cirúrgico. Essas ressecções foram realizadas sob anestesia geral, no centro cirúrgico do Hospital das Clínicas da FMUSP. O procedimento foi efetuado por um cirurgião torácico experiente na área, com exérese de fragmentos pulmonares de duas áreas diferentes do parênquima pulmonar afetado. Após o ato cirúrgico, o paciente permaneceu com um dreno de tórax por aproximadamente dois dias. Durante esse período, ele recebeu analgesia para alívio da dor com cloridrato de tramadol. Os fragmentos obtidos foram divididos da seguinte forma: fragmentos para

estudo histopatológico foram imersos em formol a 10% por 24 horas e embebidos em parafina; fragmentos para estudo das células tumorais e estromais foram colocados em meios de cultura previamente preparados para este fim, e fragmentos para estudo do RNA foram congelados em tubos de Ependorf.

A presente investigação foi aprovada pela Comissão de Ética para análise de Projetos e Pesquisa sob o número de protocolo 0842/07 (Anexo 1).

4.2 Métodos

Trata-se de um estudo retrospectivo de corte transversal. Foram selecionados 65 casos de CNPC de pulmão para prosseguir o estudo.

4.2.1 Levantamento e revisão das lâminas correspondentes

Blocos e lâminas foram obtidos do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP para posterior análise e revisão. As lâminas procedentes das biópsias coradas por Hematoxilina-Eosina (HE) foram analisadas ao microscópio óptico e revistas por três patologistas, separadamente: o próprio pesquisador e dois patologistas experientes na área de patologia pulmonar (Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi

e Dr. Alexandre Ab'Saber), conhecedores dos critérios preconizados pela Organização Mundial da Saúde da classificação histológica dos CNPC de pulmão (Travis et al., 2004), baseado no subtipo histológico predominante identificado na maioria das áreas analisadas.

A análise foi procedida de maneira cega, ou seja, nenhum dos três patologistas conhecia o diagnóstico dado previamente. Em casos de discordância, realizava-se uma análise conjunta, na qual participavam os três revisores, até que se chegasse a um diagnóstico de consenso.

4.2.2 Solicitação de cortes à técnica histológica

Após a reclassificação feita pelos patologistas, foram selecionados os blocos que apresentavam representatividade do tumor designadas no presente estudo como microambiente tumoral e blocos que exibiam área não tumoral, distante do tumor, designada neste estudo como microambiente não tumoral.

É importante salientar que, como em alguns casos a biópsia foi realizada somente para fim de diagnóstico, nestes nem sempre foi possível a obtenção de áreas representativas de microambiente não tumoral. Lâminas em branco e silanizadas foram solicitadas destes blocos à técnica histológica para posterior realização das técnicas de imunofluorescência, imuno-histoquímica, e detecção *in situ* da apoptose via TUNEL.

4.2.3 Realização da imunofluorescência para os colágenos I, III e V nos cortes histológicos

Parte das lâminas recortadas e silanizadas oriundas dos 65 casos seguiram para o Laboratório de Matriz Extracelular para identificação do colágeno dos tipos I, III e V através da imunofluorescência. As reações seguiram o protocolo do referido Laboratório. Foram seccionados fragmentos de tecido pulmonar tanto com tumor quanto de área não tumoral, com 2 a 3µm, previamente imersos em parafina, em lâminas com aminosilane (Sigma Chemical Co.). Posteriormente, foram imersas em xilol e desidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Para a exposição dos sítios imunogênicos, foi realizado o tratamento enzimático dos órgãos com pepsina bovina (10000 UTD) (Sigma Chemical Co.) em tampão ácido (pH = 2.2) (2 mg/ml) por 30 minutos a 37°C, e incubação posterior com leite a 5% em tampão fosfato pH = 7,0. As lâminas foram incubadas por uma noite, a 4°C, com anticolágeno tipos I e V policlonais obtidos em coelhos, diluídos em tampão salino fosfato (PBS), nas concentrações de 1:100 e 1:2000 e anticolágeno tipo III monoclonal (Oncogen), na concentração de 1:100. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS com tween20 a 0,05% várias vezes e incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo e coelho conjugados com fluoresceína (Sigma Chemical Co.), diluído na proporção de 1:50, em solução de PBS contendo azul de Evans 0,005% por 90 minutos. Novamente, as lâminas foram lavadas por várias vezes com PBS com Tween20 a 0,05% e montadas com solução de

glicerina tamponada. A reação foi visualizada em microscópio de fluorescência marca Nikon.

4.2.3.1 Quantificação da imunofluorescência

A análise quantitativa da imunomarcção do colágeno tipo V dos casos de CNPC foi realizada mediante a utilização de um analisador de imagem acoplado a um microscópio de fluorescência. O sistema utilizado consiste em uma câmera JVC TK-C1380 acoplada a um microscópio Leica, a partir do qual as imagens foram visualizadas no monitor. Através de um sistema digital inserido num computador (Pentium3 300 Mhz), as imagens foram processadas pelo *software Image Pro-Plus*.

Para a contagem das fibras de colágeno V foram selecionados dez campos de interstício nas áreas tumorais e não tumorais do mesmo caso sob um aumento de 400x.

O cálculo da área das fibras de colágeno tipo V imunomarcadas, em micrômetros quadrados, foi dado através do reconhecimento das frequências de luz correspondentes às fibras verdes fluorescentes. O mesmo padrão de frequências foi utilizado para todas as lâminas, evitando qualquer tipo de viés.

Na mesma amostra, para cada campo de interstício tumoral e não tumoral, também foi medido o total de área sólida, em micrômetros quadrados, correspondente ao tecido pulmonar presente, excluindo-se os espaços aéreos. A seleção das áreas sólidas foi feita através do mouse. O

resultado da área de fibras de colágeno V dividida pela área sólida intersticial total foi expresso em fração de área destas fibras.

4.2.4 Técnica Imuno-histoquímica empregada para detecção dos antígenos para avaliação da apoptose (caspases 5, 6, 8 e 9), citocinas como interleucinas (IL-4, IL-6 e IL-8), células imunes (CD3, CD4, CD8, CD20, S-100, Cd1a, CD68, CD56), marcador vascular (CD34), moléculas de adesão (V-CAM, I-CAM e antiendotelina), Laminina R, Bcl-2 e Bcl-6

Para imunomarcção dos fenótipos específicos na resposta inflamatória e da expressão de citocinas, além da avaliação da apoptose celular e expressão de moléculas de adesão e Laminina, foi utilizada metodologia padronizada pelo Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP. Observa-se na Tabela 3 os anticorpos utilizados e suas referências (marca, clone, espécie, titulação, recuperação antigênica, kit de amplificação utilizado e padrão de marcação). Para tanto, as etapas que compõem o método são descritas a seguir:

1. Os cortes histológicos de 3µm de espessura foram obtidos de material embebido em parafina e colhido em lâminas previamente silanizadas com solução de “3-aminopropyltiethoxy-silane” (Sigma, código A-3648).

2. Os cortes foram submetidos à desparafinização em banho de 20 minutos em xilol aquecido a 95°C, seguido de três banhos de xilol à temperatura ambiente.

3. Posteriormente, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70%) por cinco minutos cada.

4. Procedeu-se à lavagem em água corrente e em água destilada e deionizada por cinco minutos cada.

5. 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°C por 35 minutos.

6. A cuba com as lâminas foi retirada e permaneceu mais 20 minutos em temperatura ambiente para esfriar.

7. Realizou-se a lavagem em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,2-7,4 (PBS) por três vezes, três minutos cada.

8. Foi realizado o bloqueio das peroxidases endógenas, lavando-se as lâminas em peróxido de hidrogênio 10V (3%), sete vezes por cinco minutos.

9. Posteriormente as lâminas foram lavadas três vezes em água corrente, três vezes em água destilada e mais três vezes em PBS, cada lavagem durando três minutos.

10. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado colocando-se as lâminas em leite desnatado 2% diluído em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente.

11. As lâminas foram, em seguida, escurridas e secas ao redor do corte.

12. Os anticorpos primários foram pingados nas lâminas já preparadas. As diluições destes anticorpos foram feitas em soro albumina bovina (BSA), Sigma, e estão referidas na Tabela 3.

13. As lâminas foram cobertas com 100µl dessas soluções e permaneceram incubadas em câmara úmida em geladeira durante 18 horas.

14. As lâminas então foram lavadas em PBS três vezes por três minutos.

15. Foram então incubadas com o anticorpo secundário LSAB-HRP (*Large Streptavidin-Avidin-Biotin – System Peroxidase*; k-0690; Dako A/S, Copenhagen, Denmark), comercializado já pronto para uso, conforme a seguinte sequência de utilização: primeiramente foi incubado o anticorpo secundário por uma hora a 37°C, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com estreptoavidina-biotinilada peroxidase por 45 minutos a 37°C.

16. Foram realizados três banhos por três minutos em PBS.

17. A revelação da imuno-histoquímica foi realizada com o emprego do cromógeno (3-3'-diaminobenzamida – DAB 100mg em 70ml de PBS + 3ml de água oxigenada; Sigma Diagnostics, St. Louis, EUA) por cinco minutos.

18. Posteriormente foram lavadas em água corrente por mais cinco minutos;

19. Em seguida, os cortes foram contracorados em hematoxilina de Harris (Sigma Diagnostics, St. Louis, EUA) por 30 segundos.

20. Novamente foram lavadas em água corrente por cinco minutos e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 95%, 100%), três vezes em cada.

21. Finalmente, os cortes foram diafanizados em xilol (três vezes) e montados com lamínula e Entelan, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24 horas.

Controles positivos foram incluídos em cada reação utilizando alguns dos próprios casos selecionados para este estudo e, para controles negativos, foram omitidos os anticorpos primários.

Tabela 3- Relação dos anticorpos empregados em imuno-histoquímica

Anticorpo	Marca/Clone	Espécies	Diluição	Recuperação antigênica	Kit utilizado
Caspase 5	SantaCruz/...	Cabra	1:100	Citrato	LSAB
Caspase 6	Millipore/ Casp 6 c-terminus	Camundongo	1:50	Citrato	N.L.
Caspase 8	Santa Cruz/...	Cabra	1:100	Citrato	LSAB
Caspase 9	Chemicon/ 2-23	Camundongo	1:6000	Citrato	N.L.
CD3	Dako/ F7. 2.38	Camundongo	1:1500	Citrato	N.L.
CD4	Dako/ OPD4	Camundongo	1:1000	Citrato	N.L.
CD8	Dako C8/144B	Camundongo	1:400	Citrato	N.L.
CD20	Dako/ L26	Camundongo	1:2000	Citrato	N.L.
CD68	Dako /KP1	Camundongo	1:5000	Citrato	N.L.
S-100	Dako/...	Camundongo	1:1000	Citrato	N.L.
CD56	Thermo Scientific/56C04	Camundongo	1:1000	Citrato	N.L.
CD1a	Dako/010	Camundongo	1:80	Citrato	N.L.
IL-4	Santa Cruz/...	Coelho	1:50	Protein. K 30 mim.	N.L.
IL-6	Millipore/B-E8	Camundongo	1:50	Tris-cit/PV	N.L.
IL-8	Millipore/...	Coelho	1:200	Citrato	N.L.
TGF-β	Santa Cruz/...	Coelho	1:1500	Citrato	N.L.
CD34	Novocastra/ QBEnd/10	Camundongo	1:500	Citrato	N.L.
CD54(I-CAM)	Novocastra/23G12	Camundongo	1:100	Citrato	N.L.
V-Cam	Santa Cruz/...	Coelho	1:150	Citrato	N.L.
Endotelina	Chemicon/...	Coelho	1:4000	Citrato	LSAB
Bcl-6	Novocastra/ LN22	Camundongo	1:100	Citrato	N.L.
Bcl-2	Dako/124	Camundongo	1:50	Citrato	N.L.
Laminina-R	Santa Cruz/MLu5	Camundongo	1:100	Protein. K 30 mim.	N.L.

Citoplas: Citoplasma; NL: Novolink

4.2.4.1 Técnica da detecção *in situ* da apoptose via TUNEL

Para avaliar a apoptose em células endoteliais e epiteliais nas áreas tumorais e não tumorais também foi realizado o método do TUNEL (*Tdt mediated dUTP nick end labeling*).

O princípio desse método se baseia na clivagem do DNA genômico durante a apoptose, quebrando-o em dois segmentos, um com alto e outro com baixo peso molecular do DNA (mono e oligonucleossomos respectivamente). Esses fragmentos livres podem ser identificados por marcador livre 3'-OH terminal com nucleotídeos modificados através de uma reação enzimática. A reação do TUNEL preferencialmente marca segmentos de DNA clivados durante a apoptose. Esse procedimento permite discriminar a apoptose da necrose e das clivagens primárias de DNA induzidas por drogas citostáticas ou por irradiação. O TUNEL pode sofrer interferências, apresentando resultados falso-negativos ou falso-positivos. Os falso-negativos ocorrem, pois o DNA clivado pode ser isento ou incompleto em algumas formas de apoptose. Isso acontece, pois certos componentes da matriz extracelular podem prevenir o acesso do TdT aos segmentos de DNA. Os falso-positivos acontecem, pois a fragmentação extensiva do DNA pode advir em estados tardios de necrose.

As fitas de DNA também podem ser proeminentes em populações de células com alto grau de proliferação ou atividade metabólica. Nesses casos, é possível obter um resultado falso-positivo. Para confirmar o processo apoptótico de morte celular, a morfologia dessas respectivas células deve

ser examinada com muito cuidado. As mudanças morfológicas durante a apoptose têm uma característica padrão, tornando a avaliação da morfologia celular um parâmetro importante nas situações em que há algumas ambiguidades na interpretação dos resultados (www.roche-applied-science.com).

A reação do TUNEL realizada foi padronizada pelo Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP, com a rotina descrita a seguir:

1. Os cortes histológicos de 3 a 5 µm de espessura foram obtidos de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente silanizadas com solução de “3-aminopropyltiethoxy-silane” (Sigma, código A-3648).
2. Posteriormente foram desparafinizados em três banhos de xilol de cinco minutos cada (1 a 60 °C, e dois à temperatura ambiente).
3. Os cortes histológicos foram reidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 90%, 80%, 70%).
4. Incubados em Proteinase K (Gibco) 20mg/ml por 15-30 minutos à temperatura ambiente.
5. Os cortes foram lavados com dois banhos de três minutos em PBS.
6. Em sequência incubados em H₂O₂ 0,3% em metanol por 30 minutos à temperatura ambiente.
7. Novamente lavados com dois banhos em PBS.
8. Após a secagem da área em torno da amostra, foram pipetados 50 µl da mistura de reação TUNEL (5 µl da Solução de Enzima (tubo 1 blue),

+45 µl da Solução de Marcador (tubo 2-violeta), que marcou as fitas de DNA por TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase), o qual catalisa polimerização de nucleotídeos marcados de extremidades livres 3'-OH de uma maneira independente (reação de TUNEL), por amostra.

9. As amostras foram encubadas sob parafilme em câmara úmida a 37°C por 60 minutos.

10. Procederam-se então lavagens com seis banhos em PBS e foram secadas as áreas em torno da amostra.

11. Foram pipetados 50 µl do Conversor de Peroxidase (tubo 3-amarelo, no qual a fluoresceína incorporada e detectada por um anticorpo Fab anti-fluoresceína obtidos em cabras, conjugado com soro de cavalo através da peroxidase (POD), por amostra.

12. Novamente as amostras foram encubadas sob parafilme em câmara úmida a 37°C agora por 30 minutos.

13. Igualmente lavadas com três banhos em PBS por três minutos cada.

14. Depois foram pipetados 50 µl de DAB (0,2% + H₂O₂ 0,05% em PBS) para revelar a reação que foi deixada por 10 minutos à temperatura ambiente.

15. Foram então lavados novamente com três banhos em PBS por três minutos cada.

16. Os cortes foram contracoloradas com Azul de Evans.

17. Posteriormente estes cortes foram lavados em água destilada.

18. Foi realizada a desidratação por Butanol.

19. Finalmente, os cortes foram diafanizados em xilol (três vezes) e montados com lamínula e glicerol 1%, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24 horas.

Para controles negativos o Tdt foi eliminado da mistura da reação.

4.2.4.2 Quantificação das marcações imuno-histoquímicas e detecção *in situ* da apoptose via TUNEL

A coloração castanha evidenciou a expressão dos antígenos estudados (Tabela 3) com exceção da detecção *in situ* da apoptose via TUNEL, onde no núcleo com fragmentação de DNA corou-se de marrom (marcação positiva). O núcleo sem a fragmentação de DNA corou-se em azul (marcação negativa).

Para determinar os índices de expressão desses antígenos depois da imuno-histoquímica, foi usada a técnica do *point-counting*, utilizando retículo contendo 100 pontos e cinquenta retas, segundo proposto em 1988 por Gundersen et al. Ao aumento de 400x, foram examinados dez campos microscópicos não-coincidentes, aleatórios, nas áreas do tumor e no microambiente não tumoral, totalizando mil pontos por lâmina, cobrindo uma área de $62.500\mu\text{m}^2$ em cada caso.

Para corrigir os dados, tendo em vista as diferenças dos tecidos das biópsias estudadas, fator que não foi controlado durante a feitura das mesmas, não foram considerados os pontos que não incidiam em área sólida.

Os valores foram expressos em porcentagem de pontos positivos do total de pontos em áreas sólidas, segundo a fórmula:

$$P_{\text{PONTOS}} = (P_i \times 100) / P_{\text{PARÊNQUIMA}}$$

P_{PONTOS} é a porcentagem corrigida de pontos marcados, P_i é o número de pontos que incidem sobre a positividade do marcador imuno-histoquímico e $P_{\text{PARÊNQUIMA}}$ é o total de pontos que incidem sobre área sólida. A P_{PONTOS} de cada antígeno em cada caso foi calculada a partir da soma dos resultados P_i e $P_{\text{PARÊNQUIMA}}$ de todos os campos analisados para cada paciente. Para todos os procedimentos morfométricos, uma estimativa do erro (CE) foi computada pela relação:

$$CE = \frac{SE}{mean}$$

Onde SE representa o erro padrão da média. Considerando o número de pontos contados, CE ficará abaixo de 10% em todas as medições morfométricas.

Foi realizada a quantificação da expressão dos marcadores já citados (Tabela 3) no microambiente tumoral e não tumoral (número de células positivas e número total de células contadas no campo analisado, ou seja, células positivas e negativas).

4.2.5 Cultura de fibroblastos

A cultura primária dos fibroblastos foi desenvolvida pelo método de *explant*, logo após a coleta dos fragmentos pulmonares obtidos do ato cirúrgico. As amostras foram seccionadas em pequenos fragmentos e transferidas para uma garrafa plástica de 25cm² contendo uma película de

meio DMEM suplementado com 20% de SFB (soro fetal bovino), 1% de L-glutamina e 1% de penicilina + streptomicina até que ocorresse a aderência, quando foi acrescentado mais meio e deixado até confluência, em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Após confluência das células nas garrafas de 25cm² as mesmas foram expandidas para garrafas de 75cm² e tratadas como descrito acima. Alguns fragmentos foram colocados em lamínulas de vidro redondas, deixados em placas de 24 wells, para a identificação do colágeno por imunofluorescência, e sofreram o mesmo tratamento descrito acima.

4.2.5.1 Imunofluorescência indireta em fibroblastos

Após confluência das células em lamínulas, estas foram lavadas duas vezes em tampão fosfato (PBS) pH 7,2 e fixadas com paraformaldeído a 4% por uma hora a 4°C. Parte das lamínulas foi incubada com ácido acético 0,15M por um minuto, em seguida, lavada com PBS e então fixada. A seguir, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com leite desnatado (Molico) 5% em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo anticolágeno dos tipos I e V policlonais produzidos em coelho (1:100) e anticolágeno do tipo III monoclonal (Oncogene) (1:100), durante uma noite, a 4°C. As lamínulas foram então lavadas em PBS com Tween₂₀ 0,05% e incubadas por 90 minutos com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com

fluoresceína (1:50). Após sucessivas lavagens em PBS com Tween₂₀, as lamínulas foram montadas em glicerina tamponada e analisadas em microscópio de fluorescência (NIKON).

As lâminas obtidas mediante esse procedimento foram analisadas segundo as características de expressão, distribuição e síntese do colágeno dos tipos I, III e V por parte dos fibroblastos.

4.2.6 Biologia molecular

4.2.6.1 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído do tecido pulmonar proveniente dos pacientes com carcinomas não pequenas células (CNPC) de pulmão criopreservados pelo método de (Chomczynski, Sacchi, 1987), usando o reagente Trizol (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O processo de extração de RNA consistiu de quatro fases:

➤ **Separação do RNA:** foi adicionado a uma garrafa de cultura de células de 75 cm³ 1 ml de Trizol. Em seguida, o homogenato foi transferido para um microtubo, sendo homogeneizado por inversão. Incubaram-se as amostras por 5 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se a adição de 200µl de clorofórmio. As amostras foram então rapidamente agitadas e mantidas à temperatura ambiente por três minutos, e logo após, submetidas

à centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um tubo novo, evitando-se a interfase.

➤ **Precipitação do RNA:** foi adicionado ao sobrenadante 500µl de álcool isopropílico e, em seguida, homogeneizado por inversão e mantido no freezer a -20°C por um período de 12 horas.

➤ **Lavagem do RNA:** Após esse período, as amostras foram centrifugadas (10 minutos/12000rpm/4°C), descartando-se o sobrenadante, ressuspendido o precipitado em 1ml de etanol (85%) e submetido a nova centrifugação (5 minutos/2.500 rpm/ 4°C).

➤ **Dissolução do RNA:** novamente desprezou-se o sobrenadante, preservando o precipitado, deixando os tubos abertos e invertidos sobre papel absorvente. O RNA foi então dissolvido em 20µl de H₂O deionizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPEC) (Merck, Alemanha), que constitui um forte inibidor de ribonuclease, sendo essa quantidade suficiente para diluir o precipitado de RNA.

4.2.6.2 Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA por espectrofotometria

A avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA foram feitas a partir de 1µl da amostra de RNA dissolvido em 199µl de H₂O miliQ, sendo utilizado como referência 1µl de H₂O DEPEC diluído em 199µL de H₂O miliQ. A leitura no espectrofotômetro “Gene Quant pro” (Amersham

Bioscience, Cambridge, Suécia) foi determinada através da leitura da absorbância, em comprimento de onda de 260nm e 280nm. A relação entre as leituras obtidas (260/280) deveria estar entre 1,7 e 2,0 para obtenção de RNA com alto grau de pureza (Tabela 4).

Tabela 4 - Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA por espectrofotometria no grupo dos tumores e controle

Tumor	Relação 260/280	Concentração µg/µl
1	1,82	2,56
2	1,82	2,72
3	1,70	1,57
4	2,00	1,51
5	1,75	1,57
6	2,00	1,57
7	1,80	1,51
8	1,70	2,73
Controle	Relação 260/280	Concentração µg/µl
1	2,27	1,36
2	1,97	1,60
3	1,99	3,14
4	1,76	0,96
5	2,17	1,91
6	2,13	1,55

4.2.6.3 Avaliação da integridade do RNA através de eletroforese em gel de agarose

A qualidade do RNA extraído foi controlada por eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo MOPS 1x e 5,1% de formaldeído, verificando, assim, a integridade das bandas de RNA ribossômico 18S e 28S, que indicam e confirmam a presença de RNA. As amostras de RNA foram preparadas com 5µl de tampão de aplicação para RNA, 1µl de brometo de etídio e 1µl do RNA extraído, enquanto que o gel foi feito com 0,25g de agarose diluída em 21,75ml de H₂O miliQ, 2,5ml de MOPS 10x e 1,5ml de formaldeído a 37%. A corrida eletroforética em gel de agarose foi realizada em tampão MOPS 1x e voltagem de 60 volts à temperatura ambiente.

Figura 5. Integridade das bandas de colágeno V em algumas amostras de tumores e casos controle

O processo de extração de RNA foi árduo e repetido nas amostras que não apresentaram integridade das bandas de RNA até lograr uma extração com resultados adequados para os passos seguintes do processo.

4.2.6.4 Tratamento do RNA total com DNase

A partir de 10µg de RNA total, seu volume final foi acertado para 50µl com TE (10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 8,0) (Gibco BRL, Grand Island, EUA), sendo então adicionados: 1µl de MgCl₂ 1M (Invitrogen Life Technologies); 1µl de DTT (0,1M) (Invitrogen); 1µl de DNase/RNase Free (10U/µl) (Roche, Mannheim, Alemanha); 2µl RNasin (40U/µl) (Promega, Madison, EUA) para inibir o RNA, e 45µl de TE. Incubaram-se as amostras a 37°C por 10 minutos, adicionou-se em seguida 2µl da proteinase K (2mg/ml), novamente as amostras foram encubadas a 37°C por 30 minutos. Foram adicionados 2,5µl de EDTA (0,5M), 12,5µl de acetato de sódio (3M pH 5,4), 2,5µl de SDS (10%), 7,5µl de H₂O MiliQ e 100µl H₂O DEPEC. Para retirar DNA e outras proteínas remanescentes foram acrescentados 114µl de fenol (pH 5,0) e 114µl de clorofórmio, agitando-se essa mistura por 15 segundos. As amostras foram então submetidas à centrifugação de 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C, recuperando-se o sobrenadante, o qual foi transferido para um novo microtubo, onde se acrescentou 250µl de álcool isopropílico e o mesmo volume de NaCl (250mM) com a finalidade de precipitar o RNA. Esse material foi armazenado à temperatura de -20°C por aproximadamente

18 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C por 15 minutos, desprezando-se o sobrenadante e adicionando-se 1ml de etanol (75%) para lavagem do *pellet*, sendo, então, centrifugadas novamente a 12.000 rpm a 4°C por 15 minutos. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante deixando-se os tubos invertidos sobre papel absorvente, ressuspensando-se a solução com 20µl de H₂O DEPC.

O RNA total foi tratado com DNase/RNase Free com a finalidade de evitar-se contaminação com qualquer tipo de DNA remanescente. Após esse tratamento, a integridade e qualidade do RNA foram determinadas da mesma forma que para a extração de RNA total, controladas por eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com brometo de etídio e para concentração de absorbância realizada por espectrofotometria.

4.2.6.5 Reação de transcriptase reversa (rt) para obtenção do cDNA

Foram coletados volumes que correspondem a 4µg de RNA tratado com DNase/RNase Free e acrescentado H₂O contendo solução inibidora DEPC para um volume final de 10µl. A essa solução foram adicionados 2µL de hexâmeros iniciadores na concentração de 0,5µg/µl (Amersham biosciences, Piscataway, NJ). A mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos, para romper qualquer estrutura secundária que pudesse ter sido formada, e colocada imediatamente no gelo por 2 minutos após incubação inicial. Foram adicionados 4µl do tampão 5X *First Strand Buffer* (Invitrogen, Brasil), 2µl de

desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP e dTTP - dNTPs) à concentração de 2,5mM (Gibco, BRL) e 1µl de ditionitrito (DTT) à concentração de 0,1M (Invitrogen, Brasil), que agem na desnaturação da cadeia molde. Foi realizada nova incubação a 55°C por 10 minutos. Logo após, foi adicionado 1µl da enzima *Superscript III Reverse Transcriptase* 200U/µl (Invitrogen, Brasil) seguida por aquecimento a 55°C por uma hora. Após uma hora de tratamento com a referida enzima, a temperatura foi elevada para 70°C por 15 minutos para inativação da enzima. A síntese da primeira fita de cDNA obtida foi estocada a -20°C até a amplificação por meio da Reação em Cadeia da Polimerização (PCR) em tempo real.

A análise da concentração do cDNA obtido também foi realizada através de espectrofotometria, sendo a relação ideal de 1,7 até 2,0. A análise da qualidade e integridade foi feita por eletroforese em gel de agarose a 2%.

4.2.6.6 Seleção e desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (PRIMERS)

Foram selecionadas as três cadeias gênicas de interesse (específicas para humanos) para este estudo, sendo eles: o colágeno V (COL V), com suas três cadeias αI, αII e αIII, e um gene constitutivo (gene cuja expressão não apresente variação, sendo utilizado para avaliação da qualidade da

reação como normalizador interno), o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O desenho dos *primers* pode ser visualizado na Tabela 5.

Tabela 5 – Sequência e descrição dos genes selecionados para o estudo

Sequência gênica	Tamanho do produto de cDNA	Código de acesso
Colágeno V α1		
(primer right) 5'TCACCTCAAACACCTCCTC 3'	178 pb	AY633663
(primer left) 5'GTGGCACAGAATTGCTCTCA 3'		
Colágeno V α2		
(primer right) 5'TTGATGGTGGTGCTCATTGT 3'	204 pb	S83371
(primer left) 5'GGAAATGTGGGCAAGACTGT 3'		
GAPDH		
(primer right) 5'GTGAGT TTCCCG TTCAGCTC3'	202 pb	AB231852
(primer left) 5' AGGTCA TCCACG ACC ACTTC3'		

Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir da sequência de RNAm dos genes a serem estudados. As sequências dos genes foram adquiridas pelo site www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide. Para a montagem do mapa gênico da sequência de genes escolhida foi utilizado o *software* localizado no endereço eletrônico www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgbeat. Uma vez tendo o mapa do gene de interesse pode-se conhecer a localização numérica exata dos íntrons e éxons, havendo assim um planejamento da melhor localização para se desenhar o *primer* (próximo da região 3') e *primers* entre íntrons com tamanho maior de 1000 pb (pares de base). Para evitar a amplificação de genes que possuem homologia de outras sequências gênicas, foi utilizado o *software* BLAST, em que se

analisou toda a sequência gênica dos genes selecionados, sendo somente utilizadas aquelas com alta similaridade ao gene de interesse.

As sequências de oligonucleotídeos (*primers*) para amplificação dos genes selecionados foram obtidas a partir do *software* *Primer3*. Para a análise da qualidade dos *primers* foi utilizado o *software* OLIGOTECH, com a finalidade de se evitar a possibilidade da formação de estruturas secundárias entre as próprias fitas de oligonucleotídeos.

4.2.6.7 Padronização da reação em cadeia da polimerização (PCR) em tempo real (teste de eficiência de amplificação dos *primers* e determinação da quantidade de cDNA molde)

A reação de RT-PCR em tempo real foi realizada em um termociclador Rotor Gene RG-3000 (Corbett Research, 2004). A obtenção e a análise dos dados foram realizadas pelo *software* Rotor Gene 6.0, criado pela *Corbett Research*. Entretanto, antes de iniciar os experimentos de quantificação, foi realizada uma padronização do método para análise da expressão do colágeno v e GAPDH, envolvendo o teste de eficiência de amplificação dos *primers* e a determinação da quantidade de cDNA molde.

Para determinar a eficiência de amplificação dos *primers* foram realizadas curvas de amplificação utilizando quantidades conhecidas de cDNA em cada reação. A partir da leitura feita na etapa de Transcriptase Reversa (RT) para obtenção de cDNA, foram realizadas diluições seriadas

de 1000 ng/μl, 500 ng/μl, 250 ng/μl e 125 ng/μl. Ao final da reação foi verificada a relação entre a quantidade inicial de amostra e o número de ciclos obtidos em uma determinada fluorescência (Ct). Espera-se que, a cada ciclo, dobre a quantidade de produto formado (2 Ct). Tendo definido o nível de fluorescência e coletado o número de ciclos necessários para amplificar quantidades diferentes de cDNA inicial é possível correlacionar estes dois fatores. A inclinação da reta (slope) obtida determina a eficiência de amplificação da reação. O ideal é que a reação apresente 100% de eficiência (duplicação dos produtos de PCR a cada ciclo) ou com variações de 10%. Por meio dessas análises foi possível determinar a melhor quantidade de amostra para os *primers* desenhados (Figura 6).

Figura 6. Exemplo de representação do teste de eficiência dos *primers* utilizados neste estudo

Assim, a técnica de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se para um volume final de 20 µl, 5µl de cDNA a 125ng de cada amostra, 0,6µl de cada *primer* à concentração de 10mM, 4,95µl de H₂O ultrapura, 3µl de 10X PCR Buffer (Invitrogen, Brasil), 1,2µl de MgCl₂ à concentração de 50mM (Invitrogen, Brasil), 2,4µl de dNTP's à concentração de 2,5mM, 1,5µl de DMSO (DynaL Biotech ASA, Oslo, Norway), 0,45µl de taq platinum DNA polimerase (5U/µl) (Invitrogen, Brasil) e 0,3µl de SYBR Green.

As condições determinadas para a reação foram: 40 ciclos, 10 minutos a 95°C (aquecimento inicial), 15 segundos a 95°C (desnaturação), 60 segundos a 56°C (anelamento) e 60 segundos a 72°C (extensão); estas condições foram determinadas para os quatro *primers* desenhados.

Esta PCR avalia o acúmulo do produto na fase logarítmica da reação de amplificação, que está diretamente relacionado à quantidade de molde existente no início da reação, sendo atualmente considerado um método bastante preciso e reprodutível para a quantificação da expressão gênica (Figura 7).

Utilizamos o sistema de detecção por SYBR Green, que se baseia no uso de uma molécula fluorescente, denominada SYBR Green I, que, quando intercalada à dupla fita do DNA, passa a ser detectável (Figura 8).

Figura 7. Exemplo de curvas de padronização no PCR

Figura 8. PCR dos tumores e controles estudados

4.2.7 Reconstrução tridimensional pelo microscópio de confocal

Os blocos foram submetidos a cortes histológicos de 20 μm de espessura com o uso de um micrótomo e montados sobre lâminas de microscopia previamente tratadas com 3-aminopropilttriethoxy silano (Sigma Diagnostics, St. Louis, EUA), sem a realização de coloração. Em seguida, foram imersos em xilol quente por 20 minutos, submetidos a três banhos de xilol frio e hidratados com sucessivas lavagens com álcool etílico em concentrações decrescentes (100%-75%), água destilada e PBS.

Para a exposição e recuperação dos sítios antigênicos o material foi digerido com 2 μg de pepsina de porco (10000U/ml) (Sigma Diagnostics, St. Louis, EUA), dissolvida em 500 μl de ácido acético 1Mm e incubadas por 30 minutos a 37°C. Os cortes tratados foram lavados por três vezes, dez minutos cada, com PBS e incubados conjuntamente com os anticorpos de coelho anticolágeno dos tipos I e V humanos (produzidos pelo Laboratório de Investigação Médica 17 do HC-FMUSP), diluição de 1:200 e 1:2000 em PBS, respectivamente, para obtenção de dupla marcação em uma mesma lâmina. Do mesmo modo, os anticorpos de coelho anticolágeno tipo I (produzido pelo Laboratório de Investigação Médica 17 do HC-FMUSP), diluição 1:200 em PBS, e anticolágeno III monoclonal (Oncogene), diluição 1:100 em PBS, foram incubados conjuntamente para dupla marcação. A incubação levou uma noite.

Após este período, os cortes foram lavados em PBS com Tween₂₀ 0,05%. Os cortes com dupla marcação para colágeno I e V foram incubados por uma hora e 30 minutos com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fluoresceína (Dako A/S, Copenhagen, Denmark), diluição 1:50 em PBS, para o colágeno do tipo V e anti-IgG de camundongo conjugado com rodamina (Dako A/S, Copenhagen, Denmark), diluição 1:50 em PBS, para o colágeno I. Os cortes com dupla marcação para colágeno I e III foram incubados por uma hora e 30 minutos com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fluoresceína (Dako A/S, Copenhagen, Dinamarca), diluição 1:50 em PBS, para o colágeno do tipo I e anti-IgG de camundongo conjugado com rodamina (Dako A/S, Copenhagen, Dinamarca), diluição 1:50 em PBS, para o colágeno III. Posteriormente, as lâminas foram montadas com solução de glicerina tamponada.

A reconstrução tridimensional das marcações do colágeno V foi realizada com o auxílio do microscópio confocal, que avalia a estrutura espacial deste colágeno nas amostras obtidas. As seções foram examinadas sob o microscópio a laser LSCM (LSM 410; Carl Zeiss; Jena, Germany) usando um aumento de 400x. As imagens foram obtidas do microscópio a laser e armazenadas em computador (LSM Image Browser Software, versão. 2,50.0929; Carl Zeiss Meditech, Jena, Alemanha) em formato de TIFF. Séries de 45 a 50 seções ópticas foram obtidas a uma distância de 0,5µm de espessura. Imagens tridimensionais do colágeno V foram reconstruídas mediante este método.

4.2.8 Tabulação das variáveis e análise estatística

A planilha completa estruturada no programa *Excell* contendo dados clínicos, morfológicos e morfométricos dos 65 pacientes foi transferida para o programa SPSS versão 15 (Inc., Chicago, IL). Finalizamos então a análise descritiva das variáveis categóricas através de suas frequências de distribuição. Para variáveis categóricas utilizamos a soma ou número total, para as variáveis numéricas utilizamos média, mediana (idade, 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 1, e que foram a óbito, categorizados como 0. Cada variável clínica e morfológica foi analisada na curva de sobrevida como fator dependente. 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 $p = 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Descrição da casuística

Na Tabela 6 podem ser observadas as características demográficas dos 65 pacientes referentes a sexo, idade, localização do tumor e estadiamento patológico TNM (UICC, 2009).

Dos 65 casos analisados, 39 pacientes eram do sexo masculino e 26, do feminino, todos portadores de Carcinomas Não de Pequenas Células (CNPC) primário de pulmão. A mediana de idade dos pacientes estudados foi de 62 anos (variação 34 a 82 anos). Quanto ao estadiamento patológico final, 20 pacientes estavam no estágio I, 33 no estágio II, 12 no estágio III. Individualmente, quanto ao estágio T, 16 pacientes eram T1; 44 estágio T2; cinco estágio T3. Do total de 65 pacientes, 26 apresentaram metástases para linfonodos peribrônquicos ipsilaterais, linfonodos subcarinais e mediastinais (17 N1 e nove N2, respectivamente).

Quanto aos hábitos de vida, quarenta e um pacientes eram fumantes.

Com relação ao tratamento, 65 pacientes foram submetidos à cirurgia, dos quais 30 também receberam quimioterapia; cinco, radioterapia e quatro, quimioterapia e radioterapia.

No que se refere ao tipo histológico, após a reclassificação realizada pelo pesquisador e os dois patologistas com experiência em patologia pulmonar conforme anteriormente mencionados (Métodos, p.69-70), 20 foram diagnosticados como carcinomas de células escamosas, 38 como adenocarcinomas e 7, como carcinomas de grandes células.

A mediana de sobrevida foi de 23 meses (variação de 1 a 151 meses). Até o final deste estudo, 44 pacientes foram a óbito.

Tabela 6 - Características dos 65 pacientes com CNPC de pulmão

Total de pacientes	65
Idade (anos)	62 (34-82) ^a
Sexo	39 homens, 26 mulheres
Estadiamento patológico	
I	20
II	33
III	12
Estádio T	
1	16
2	44
3	5
Estádio N	
0	39
1	17
2	9
Tabagismo (maços-ano)	41 (0-120) ^a
Tratamento	
Cirurgia	65
Cirurgia + quimioterapia	30
Cirurgia + radioterapia	5
Cirurgia + quimioterapia + radioterapia	4
Tipo histológico	
Carcinoma de células escamosas	20
Adenocarcinoma	38
Carcinoma de grandes células	7
Seguimento (meses)	23 (1-151) ^a
Pacientes censurados para análise da sobrevida até a última data do seguimento	21

^a Valores representam a mediana (mínimo-máximo)

5.2 Remodelamento do microambiente tumoral pelo colágeno V e apoptose

5.2.1 Tipos histológicos e caracterização da apoptose e colágeno V

Carcinoma de células escamosas exibindo áreas de queratinização, adenocarcinoma, evidenciando projeções papilíferas, e carcinoma de grandes células, com predomínio de núcleos grandes, estão respectivamente representados na Figura 9, sob coloração com hematoxilina & eosina (HE) (A, B, C), imuno-histoquímica para caspase 9 (D, E, F), imuno-histoquímica para laminina (G, H, I), colágeno V observado sob imunofluorescência (J, K, L), e microscopia confocal (M, N, O). Carcinoma de células escamosas (A) exibiu expressão de caspase-9 (D) no endotélio vascular tumoral, e birrefringência esverdeada para as fibras do colágeno V quando observado sob imunofluorescência (J), exibindo um padrão fibrilar denso e irregular individualmente ao redor de células neoplásicas, em seus agrupamentos membranáceos, ou ao redor de vasos neoformados no microambiente tumoral, coincidente com o fenótipo exibido sob HE (A). O adenocarcinoma (B) exibiu expressão de caspase-9 no endotélio vascular tumoral semelhante (E), porém sob microscopia fluorescente chama atenção uma desorganização no microambiente tumoral e uma difusa birrefringência esverdeada das fibras do colágeno V (K). As fibras do colágeno V estavam organizadas em fina e proeminente textura proliferada, semelhante ao

complexo arranjo papilífero visto sob HE. Para o carcinoma de grandes células (C), houve igualmente proeminente expressão de caspase-9 nas células endoteliais vasculares do tumor (F), e birrefringência esverdeada das fibras do colágeno V, quando observadas ao microscópio de fluorescência, formando uma textura irregular com fibras finas, individualizando grandes grupos de células malignas (L). Sob reconstrução tridimensional, o CNPC exibiu desorganização morfológica do colágeno fibrilar, que apresentou diferentes espessuras de acordo com o tipo histológico. Nesses diferentes tipos histológicos, o colágeno V caracterizou-se por um aumento na espessura e desorganização das fibras. No carcinoma de células escamosas, essas características foram mais proeminentes no estroma tumoral (M). Um padrão semelhante foi observado no carcinoma de grandes células, onde o aumento na espessura e desorganização das fibras novamente foi mais proeminente no estroma tumoral (O). Porém, sob a microscopia confocal, foi possível observar um aumento na espessura e uma marcante desorganização morfológica das fibras do colágeno V no adenocarcinoma (N).

Figura 9 (A, B, C). Pulmão-coloração de hematoxilina e eosina (HE) nos três tipos celulares de CNPC de pulmão. Carcinoma de Células Escamosas (A), Adenocarcinoma (B) e Carcinoma de Grandes Células (C) 400X

Figura 9 (D, E, F). Pulmão-imunomarcação em células endoteliais de caspase 9 nos três tipos celulares de CNPC de pulmão. Carcinoma de Células Escamosas (D), Adenocarcinoma (E) e Carcinoma de Grandes Células (F) 400X

Figura 9 (G, H, I). Pulmão-Imunomarcacão da Laminina nos três tipos celulares de CNPC de pulmão. Carcinoma de Células Escamosas (G), Adenocarcinoma (H) e Carcinoma de Grandes Células (I) 400X

Figura 9 (J, K, L). Pulmão-Imunofluorescência com Colágeno V nos três tipos celulares de CNPC de pulmão. Carcinoma de Células Escamosas (D), Adenocarcinoma (E) e Carcinoma de Grandes Células (F) 400X. As setas grossas representam o colágeno V e as setas finas as células tumorais

Figura 9 (M, N, O). Pulmão-Microscopia Confocal com o Colágeno V nos três tipos celulares de CNPC de pulmão. Carcinoma de Células Escamosas (M), Adenocarcinoma (N) e Carcinoma de Grandes Células (O). As setas grossas (verde) representam o colágeno V e as setas finas (azul) as células tumorais

5.2.2 Quantificação do Colágeno V e demais marcadores estudados com exceção dos marcadores de resposta imune

Na Tabela 7 estão sumarizados os resultados morfométricos, com exceção daqueles relacionados à resposta imune, que serão exibidos na Tabela 9, encontrados no microambiente tumoral e não tumoral dos 65 casos de CNPC de pulmão estudados. O índice de apoptose no endotélio vascular pela expressão de caspase-9 foi de 2,7% no microambiente tumoral e 2,3% no normal ($p = 0,2$). A expressão de caspase 6 pelo endotélio tumoral e normal foi semelhante (5,0% VS 5,1%, $p > 0,05$). Houve significativa expressão de caspase-8 pelo epitélio tumoral em relação ao epitélio normal (7,5% vs 5,6%, $p = 0,01$). Já a caspase 5 teve maior expressão no epitélio normal em relação ao tumoral (0,5% VS 0,1%, $p = 0,01$). A expressão da caspase-5 pelo endotélio tumoral e normal foi nula e muito baixa, respectivamente (0,0% vs 0,03). Apoptose via TUNEL ocorreu em 7,2% das células epiteliais no microambiente tumoral e em 10,2% no normal ($p = 0,01$). A expressão de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 esteve presente em 17,2% das células epiteliais neoplásicas e 2,9% das células epiteliais normais ($p = 0,0001$). Já a expressão de Bcl-6, foi de 2,9% nas células tumorais e 0,8% nas células epiteliais normais ($p = 0,0001$). A densidade de microvasos foi de 41,9% no microambiente normal e 10,6% no microambiente tumoral ($p = 0,01$). Não houve diferença estatística entre a expressão de VCAM pelo endotélio dos vasos no tumor e no microambiente não-tumoral (2,6% vs 1,4%, $p = 0,6$). Houve significativa diferença entre a expressão de ICAM pelas células tumorais e células epiteliais normais (8,0%

VS 4,0%, $p = 0,0001$). Com relação à endotelina, houve diferença significativa entre a expressão pelos vasos no estroma tumoral e não tumoral (6,4% VS 3,9%, $p = 0,006$). A área ocupada pelo colágeno V foi maior do que a área ocupada pelo colágeno I e III, tanto no microambiente tumoral quanto não tumoral ($p < 0,05$). Para o colágeno V, no microambiente tumoral e não tumoral, a área ocupada foi respectivamente de 10,8% e 17,3% ($p < 0,01$). Para o colágeno III, a área foi de 8,5% no estroma tumoral e 18,4% no não tumoral ($p = 0,001$). Para o colágeno I, a área ocupada foi de 3,4% no tumor e 6,4% no microambiente não tumoral ($p = 0,5$). A expressão de laminina foi maior no microambiente não-tumoral em relação ao microambiente tumoral (47,7% vs 21,9%, $p = 0,0001$).

Tabela 7 - Sumário dos resultados morfométricos nos 65 casos de CNPC de pulmão

Marcador quantificado	Média		Mínimo-Máximo	
	Microambiente		Microambiente	
	Tumoral	Não Tumoral	Tumoral	Não Tumoral
Endotélio Caspase-9+ (% de pontos)	2,7	2,3	0,0 – 12,0	0,0 – 17,0
Endotélio Caspase 5+ (% de pontos)	0,0	0,03	0,0 – 0,0	0,0 – 0,6
Endotélio Caspase 6+ (% de pontos)	5,0	5,1	0,0 – 16,4	0,0 – 18,2
Endotélio Caspase 8+ (% de pontos)	2,9	5,2	0,0 – 15,3	0,0 – 18,1
Epitélio Caspase-9+ (% de pontos)	2,9	2,8	0,0 – 27,1	0,0 – 12,8
Epitélio Caspase-5+ (% de pontos)	0,1	0,5	0,0 – 1,1	0,0 – 6,5
Epitélio Caspase-6+ (% de pontos)	6,2	5,4	0,0 – 32,7	0,0 – 16,3
Epitélio Caspase-8+ (% de pontos)	7,5	5,6	0,9 – 17,8	1,0 – 16,2
Epitélio TUNEL + (% de pontos)	7,2	10,2	0,0 – 26,9	0,0 – 29,2
Epitélio Bcl-2	17,2	2,9	0,8 – 53,7	0,0 – 11,1
Epitélio Bcl-6	2,87	0,81	0,2 – 5,9	0,0 – 2,5
Microvasos (no. por área)CD34	10,6	41,9	0,0 – 35,5	6,6 – 93,1
VCAM	2,6	1,4	0,0 – 25,2	0,0 – 16,3
ICAM	8,3	4,0	1,2 – 16,3	1,0 – 8,5
Endotelina	6,4	3,9	2,6 – 21,9	0,0 – 22,6
Colágeno I [log (área)]	3,4	6,4	0,2 – 9,2	0,2 – 25,5
Colágeno III [log (área)]	8,5	18,4	0,01 – 31,8	1,2 – 47,3
Colágeno V [log (área)]	10,8	17,3	0,02 – 39,4	0,2 – 35,8
Laminina	21,9	47,7	0,0 – 68,5	23,5 – 80,3

5.2.3 Avaliação das cadeias α_1 e α_2 do Colágeno V pelo método de PCR

A menor expressão do colágeno V no microambiente tumoral em relação ao não tumoral com a técnica de imunofluorescência foi corroborada com o método de PCR quantitativa. A expressão gênica através do mRNA para as cadeias α_1 (colágeno α_1) e α_2 (colágeno α_2) foi menor no estroma tumoral quando comparada ao microambiente não tumoral, sugerindo baixa taxa de síntese deste tipo de colágeno. Houve menor expressão gênica para as cadeias α_1 (colágeno α_1) no microambiente tumoral ($0,41 \pm 0,25$) em relação no microambiente normal ($2,27 \pm 1,4$) e esta foi significativa ($p = 0,04$) (Figura 10).

Figura 10. Expressão de RNAm para as cadeias α_1 e α_2 do colágeno V nos 65 casos de CNPC de pulmão. Expressão diminuída das cadeias α_1 e α_2 do colágeno V no carcinoma não de pequenas células de pulmão em relação ao controle ($p = 0,04$ e $p = 0,04$, respectivamente)

5.2.4 Análise da sobrevida correlacionando Colágeno V e apoptose

Os resultados da análise pelo modelo de Cox podem ser contemplados na Tabela 8. Somente três variáveis estiveram significativamente associadas à sobrevida: estadiamento N, colágeno V e apoptose do endotélio vascular tumoral caspase-9+. Uma vez que essas variáveis foram introduzidas ao modelo, nenhuma das demais foi significativamente associada à sobrevida. Por exemplo, a construção do modelo matemático apenas com a variável estadiamento N esteve significativamente associada à sobrevida, na ausência das variáveis colágeno V e apoptose do endotélio vascular tumoral caspase 9+ ($p = 0,001$); todavia, quando as variáveis colágeno V e apoptose do endotélio vascular tumoral caspase 9+ foram introduzidas como covariáveis, a relação com a sobrevida foi muito mais robusta. A análise multivariada mostrou baixo risco de morte para pacientes com tumores contendo altas taxas de colágeno V no estroma ($OR = 0,27$) e altas taxas de apoptose do endotélio vascular caspase-9+ ($OR = 0,41$).

Tabela 8 - Modelo proporcional de Cox para análise de sobrevida e risco de morte nos 65 casos de CNPC de pulmão estudados de acordo com o colágeno V e apoptose controlados pelo estágio N e tipos histológicos

	Coeficiente	Erro Padrão	Wald	Valor de p	Risco ()	95% IC para Risco β	
						Inferior	Superior
Estádio N2			22,09	0,000			
Estádio N0	-2,57	0,60	18,03	0,000	0,07	0,02	0,25
Estádio N1	-0,24	0,55	0,20	0,65	0,78	0,26	2,30
Carcinoma de grandes células			1,28	0,53			
Carcinoma de células escamosas	0,57	0,68	0,72	0,39	1,78	0,47	6,70
Adenocarcinoma	0,62	0,56	1,24	0,26	1,86	0,62	5,52
Colágeno V	-1,32	0,53	6,28	0,01	0,27	0,09	0,75
Apoptose endotélio tumoral caspase-9+	-0,90	0,47	3,64	0,05	0,41	0,16	1,04
Apoptose epitélio tumoral TUNEL+	0,01	0,41	0,09	0,77	0,88	0,39	1,98

O valor de p é dado para análise de sobrevida pelo modelo de regressão de risco proporcional de Cox. Os valores estatisticamente significativos estão marcados em vermelho.
(Índice de probabilidade do modelo= 188,40 ; Qui-quadrado = 26,58, p=0,002)

A plotagem dos pontos obtidos na regressão para probabilidade de sobrevida *versus* tempo de seguimento em meses para pacientes com CNPC mostrou que o grupo de pacientes com tumores contendo taxa de colágeno V maior que 9,4% tiveram melhor sobrevida quando comparados ao grupo com taxa inferior a 9,4% (Figura 11).

Figura 11. Plotagem de pontos obtidos pela análise multivariada de Cox para probabilidade de sobrevida versus tempo de seguimento em meses daqueles pacientes com estadiamento N0. O grupo com taxa de colágeno de 9,4% ou mais aparece na curva superior, de melhor sobrevida, e o grupo com taxa inferior a 9,4% aparece na curva inferior, de pior sobrevida

5.3 Resposta imune inata e adaptativa no microambiente tumoral

5.3.1 Tipos Histológicos e caracterização das células imunes

Carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células são respectivamente ilustrados na Figura 12 sob coloração com imuno-histoquímica respectivamente para linfócitos CD3 (A-C), CD4 (D-F), CD8 (G-I), células dendríticas Cd1a (J-L) e S100 (M-O), macrófagos CD68 (P-R), e citocinas IL-4 (S-U) e TGF- β (V-Y). Pequenos agregados de

linfócitos CD3 estiveram presentes no microambiente tumoral do carcinoma de células escamosas (A), adenocarcinoma (B) e carcinoma de grandes células (C), linfócitos CD4 estiveram distribuídos na periferia do microambiente tumoral formando densos agregados no carcinoma de células escamosas (D) comparado ao adenocarcinoma (E) e carcinoma de grandes células (F). Esparsos linfócitos CD8 (G-I) e CD20, assim como linfócitos *natural killer* CD56, estiveram presentes no microambiente tumoral envolvendo grupos ou células individuais dos três tipos histológicos. Em contraste, a distribuição das células dendríticas Cd1a e S100 no microambiente tumoral foi mais frequente no adenocarcinoma (K; N), enquanto *clusters* de macrófagos CD68 foram abundantes individualizando células malignas no carcinoma de grandes células (R). A citocina IL-4 foi fortemente expressa pelas células neoplásicas do carcinoma de células escamosas (S) e carcinoma de grandes células (U), enquanto que TGF- foi moderadamente expresso pelas células neoplásicas dos três tipos histológicos (V-X).

Figura 12 (A, B, C). Pulmão - Imunomarcação de linfócitos CD3 em Carcinoma de Células Escamosas (A), Adenocarcinoma (B) e Carcinoma de Grandes Células (C) 400X

Figura 12 (D, E, F). Pulmão - Imunomarcacão de linfócitos CD4 em Carcinoma de Células Escamosas (D), Adenocarcinoma (E) e Carcinoma de Grandes Células (F) 400X

Figura 12 (G, H, I). Pulmão - Imunomarcação de linfócitos CD8 em Carcinoma de Células Escamosas (G), Adenocarcinoma (H) e Carcinoma de Grandes Células (I) 400X

Figura 12 (J, K, L). Pulmão - Imunomarcação de células dendríticas pelo Cd1a em Carcinoma de Células Escamosas (J), Adenocarcinoma (K) e Carcinoma de Grandes Células (L) 400X

Figura 12 (M, N, O). Pulmão - Imunomarcacão de células dendríticas pelo S-100 em Carcinoma de Células Escamosas (M), Adenocarcinoma (N) e Carcinoma de Grandes Células (O) 400X

Figura 12 (P, Q, R). Pulmão - Imunomarcação de células dendríticas pelo CD68 em Carcinoma de Células Escamosas (P), Adenocarcinoma (Q) e Carcinoma de Grandes Células (R) 400X

Figura 12 (S, T, U). Pulmão - Imunomarcção para IL-4 em Carcinoma de Células Escamosas (S), Adenocarcinoma (T) e Carcinoma de Grandes Células (U) 400X

Figura 12 (V, W, X). Pulmão - Imunomarcação para TGF em Carcinoma de Células Escamosas (V), Adenocarcinoma (W) e Carcinoma de Grandes Células (X) 400X

5.3.2 Quantificação das células imunofenotipadas

A Tabela 9 resume os resultados morfométricos encontrados no microambiente tumoral e não tumoral referente às células imunes e citocinas (resposta inflamatória) nos casos estudados.

Tabela 9 - Resultados morfométricos encontrados no microambiente tumoral e não tumoral referente às células imunes e citocinas nos 65 casos estudados

Marcador quantificado	Microambiente Tumoral	Microambiente não Tumoral
Linfócitos CD3 (% de pontos)	6.58 ± 0.96*	2.20 ± 0.22
Linfócitos CD4 (% de pontos)	16.15 ± 3.80	9.01 ± 0.45
Linfócitos CD8 (% de pontos)	1.80 ± 0.19	1.62 ± 0.18
Linfócitos CD20 (% de pontos)	0.80 ± 0.21 *	0.13 ± 0.03
Células dendríticas CD1a (% de pontos)	1.51 ± 0.45 *	0.22 ± 0.08
Células dendríticas S100 (% de pontos)	1.05 ± 0.18*	0.15 ± 0.04
Macrófagos/Monócitos CD68 (% de pontos)	4.52 ± 0.63	3.43 ± 0.75
Linfócitos Natural Killer CD56 (% de pontos)	2.12 ± 1.38	0.29 ± 0.13
Citocina IL-4 (% de pontos)	0.88 ± 0.23	2.04 ± 0.91#
Citocina IL-6 (% de pontos)	2.20 ± 0.41	1.50 ± 0.66
Citocina IL-8 (% de pontos)	0.58 ± 0.14	3.35 ± 0.84#
Citocina TGF- β (% de pontos)	2.32 ± 0.30	12.74 ± 1,24#

^a As unidades de “% de pontos” indicam o número de pontos que recaem sobre o elemento de interesse dividido pelo total de número de pontos que recaem sobre o tumor ou parênquima adjacente. Em morfometria, isso é chamado de fração de área e é frequentemente simbolizado como Pp. Pp corresponde à fração de volume ou Vv (Weibel ER. *Morphometry: stereological theory and practical methods*. In: Gil J, editor. *Models of lung disease-microscopy and structural methods*. New York: Marcel Dekker; 1990. p. 199-247).

Todos os valores foram quantificados em 10 campos aleatórios, não coincidentes no microambiente tumoral e não tumoral. Os valores são as médias ± SEM dos 65 casos. Teste T pareado foi utilizado para explorar diferenças entre o microambiente tumoral e não tumoral. * Marcadores que apresentaram diferença significativa nos microambientes tumoral e não tumoral; # diferente no microambiente tumoral ($p < 0,05$).

A porcentagem de linfócitos CD3 no microambiente tumoral foi maior do que no microambiente não tumoral ($p < 0,01$). Já referente aos linfócitos CD4, a porcentagem foi similar nos dois microambientes estudados ($p = 0,17$) e com os linfócitos CD8 ($p = 0,4$) também não houve diferença.

A porcentagem de linfócitos CD20 no microambiente tumoral foi maior do que no microambiente não tumoral ($p < 0,01$). O mesmo foi observado com as células dendríticas utilizando os marcadores Cd1a ($p = 0,01$) e S100 ($p < 0,01$).

A porcentagem de macrófagos/monócitos foi semelhante nos microambientes tumoral e não tumoral ($p = 0,2$). A porcentagem de linfócitos *natural killer* CD56 foi maior no microambiente tumoral do que no não tumoral, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,1$). A expressão das citocinas IL-4 e IL-8 foram significativamente mais altas no microambiente não tumoral do que tumoral ($p=0,01$ e $p=0,02$ respectivamente). Já a citocina IL-6 apresentou maior expressão no microambiente tumoral do que no não tumoral ($p = 0,04$). Igualmente significativa foi a expressão de TGF- no microambiente não tumoral em relação ao tumoral ($p < 0,01$).

5.3.3 Associação entre células imunes e citocinas estudadas no microambiente tumoral e variáveis clínicas

Ao relacionarmos as células imunes e seus produtos, citocinas, estudados no microambiente tumoral, o tabagismo esteve diretamente relacionado aos linfócitos CD3 ($R^2 = 0,36$; $p = 0,02$) e linfócitos T citotóxicos CD8 ($R^2 = 0,32$; $p = 0,03$).

Pacientes com CNPC de pulmão tratados com cirurgia e quimioterapia apresentaram associação direta com estágio N ($R^2 = 0,40$; $p = 0,001$) e, indiretamente, com Linfócitos T helper CD4 ($R^2 = 0,27$; $p = 0,03$). Adenocarcinomas apresentaram associação positiva com macrófagos/monócitos ($R^2 = 0,49$; $p = 0,002$).

5.3.4 Análise da sobrevida correlacionando células imunes e citocinas estudadas no microambiente tumoral dos 65 casos com as variáveis clínicas

Diversas combinações entre as variáveis clínicas e morfológicas foram feitas com o intuito de se obter um modelo matemático com impacto na sobrevida dos pacientes. Os resultados da melhor combinação pelo modelo de Cox aparecem na Tabela 10. As seguintes variáveis mostraram impacto na sobrevida dos pacientes: tabagismo, estágio patológico N, cirurgia, tipos histológicos, linfócitos T auxiliares CD4, macrófagos/monócitos CD68, todas no microambiente tumoral. Controlados pelo estágio N e tipos histológicos, a análise multivariada mostrou baixo risco de morte para pacientes tratados com cirurgia e quimioterapia, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células ($OR = 0,13$ e $0,06$, respectivamente), porcentagem de linfócitos CD4 $> 16\%$ e densidade de macrófagos/monócitos CD68 $> 4,5\%$. Risco de morte foi encontrado para tabagismo > 41 ($OR = 11,45$), e estágio patológico N1 ($OR = 7,73$). Individualmente, linfócitos CD8 $> 1,8\%$, citocinas IL-4 $> 0,8\%$ e TGF- $>$

2,3% não foram significantes para predizer risco de morte, mas a presença destes foi importante para refinar, aumentando e dando significância ao modelo ($p = 0,04$). Uma vez retiradas essas variáveis do modelo, as outras perdem a significância.

Tabela 10 - Modelo proporcional de Cox para análise de sobrevida e risco de morte nos 65 casos de CNPC de pulmão estudados de acordo com as células imunes e seus produtos controlados por tabagismo, estágio N, tratamento e tipos histológicos

[-2 Log de probabilidade = 68,78; Qui-quadrado = 17,91; $p = 0,04$]

Variável analisada	Coeficiente β	Erro padrão	Coeficiente Wald	Valor de p	Risco β	95,0% IC para risco(β)	
						Baixo	Alto
Tabagismo > 41 maços/ano	2,43	0,88	7,71	0,005	11,45	2,05	63,96
Estádio linfonodal N2			4,68	0,09			
Estádio linfonodal N1	2,04	1,08	3,58	0,05	7,73	0,93	64,24
Estádio linfonodal N0	-0,13	1,21	0,01	0,91	0,87	0,08	9,32
Cirurgia + quimioterapia	-1,76	0,98	3,20	0,07	0,17	0,02	1,18
Carcinoma de Grandes Células			4,06	0,13			
Adenocarcinoma	-1,98	1,19	2,76	0,09	0,13	0,01	1,42
Carcinoma de Células Escamosas	-2,67	1,35	3,92	0,04	0,06	0,005	0,97
Linfócitos T citotóxicos CD8 > 1,8%	1,37	1,02	1,80	0,18	3,95	0,53	29,49
Linfócitos T auxiliares CD4 > 16,1%	-1,33	1,07	1,56	0,02	0,26	0,03	2,13
Macrófagos/monócitos CD68 > 4,5%	-0,61	0,77	0,62	0,03	0,54	0,12	2,47
Citocina IL-4 tumor > 0,8%	0,28	1,07	0,06	0,79	1,32	0,16	10,85
Citocina TGF- β	0,81	0,86	0,88	0,34	2,25	0,41	12,26

O valor de p é dado para análise de sobrevida pelo modelo de regressão de risco proporcional de Cox. Os valores estatisticamente significantes estão marcados em vermelho. CD8, CD4, Macrófagos, Interleucina IL-4 e Citocina TGF- β foram analisadas como variáveis categóricas e IC; intervalo de confiança.

A análise de Kaplan-Meier dicotomizou, de acordo com a porcentagem de macrófagos em relação a sobrevida, os pacientes em dois grupos. Pacientes com porcentagem de macrófagos $> 4,5$ apresentaram maior sobrevida do que aqueles com macrófagos $< 4,5$ %.

A análise dicotomizou os pacientes em dois grupos, correlacionando a sobrevida em meses e porcentagem de macrófagos no microambiente tumoral. Pacientes com densidade de macrófagos $> 4,5\%$ (curva superior em verde) apresentaram maior sobrevida (menor risco de morte) do que aqueles com macrófagos $< 4,5\%$ (curva inferior em azul)

Figura 13. Análise gráfica de Kaplan-Meier correlacionando probabilidade de sobrevida com a densidade de macrófagos no microambiente tumoral

5.4 Microscopia eletrônica nos tipos histológicos de CNPC de pulmão

Adenocarcinoma é ilustrado na Figura 14 (A-F) e carcinoma de grandes células na Figura 14 (G-K) com coloração pelo acetato de uranila e citrato de chumbo. Adenocarcinoma apresentou-se sob forma de ácino irregular (A), com células malignas exibindo núcleos hipercromáticos, nucléolos proeminentes (B) e citoplasma abundante com microvilos (A) e riqueza em organelas (C, D). Invasão vascular pelas células tumorais pode ser contemplada no painel (D). Pequenos agregados de linfócitos (E) e macrófagos (F) foram encontrados no microambiente tumoral do adenocarcinoma. Os carcinomas de grandes células foram caracterizados por grandes células tumorais com citoplasma abundante frequentemente multinucleadas com núcleos grandes, cromatina vesiculosa e nucléolos proeminentes (G-I). Não foram observados arranjos glandulares ou escamosos e as células neoplásicas mostraram-se coesas (G-I); algumas células neoplásicas eram alongadas com cromatina nuclear em distribuição periférica (J). O microambiente no carcinoma de grandes células era mais amorfo do que fibrilar (K).

Figura 14 (A, B, C). Pulmão-imunomarcação de membrana pelo I-CAM em carcinoma de células escamosas (A), adenocarcinoma (B) e carcinoma de grandes células (C) 400X

Figura 14 (D, E, F). Pulmão-imunomarcação nuclear pelo Bcl-6 em carcinoma de células escamosas (D), adenocarcinoma (E) e carcinoma de grandes células (F) 400X

Figura 14 (G, H, I). Pulmão-Imunomarcção nuclear pelo Bcl-2 em Carcinoma de Células Escamosas(D), Adenocarcinoma (E) e Carcinoma de Grandes Células (F). Nestes dois últimos há marcação em células inflamatórias no estroma tumoral 400X

5.5 Remodelamento do microambiente tumoral nos carcinomas não pequenas células de pulmão por anormalidades do colágeno do tipo V, apoptose e resposta imune inata e adaptativa

Nos painéis A e E da Figura 15 é mostrada a matriz fibrilar encontrada principalmente no adenocarcinoma. Note o desarranjo fibrilar das fibras grossas (A-B) contrastando com as fibras finas (C-E) no microambiente tumoral do adenocarcinoma.

A Figura 16 nos permite contemplar as fibras do colágeno I, III e V na microscopia eletrônica de transmissão e após *imunogold* para caracterização das fibras do colágeno V. As fibras do colágeno I são grossas, as fibras do colágeno III são finas, e as fibras do colágeno V formam um retículo extremamente fino entre as fibras grossas e finas do colágeno I e III. O painel D contém uma figura ilustrativa da cultura de fibroblastos do microambiente tumoral imunocorada para o colágeno V e visualizada sob imunofluorescência, em que se visualiza o aumento de espessura e a irregularidade das fibras do colágeno V com formação de placa.

Figura 15 (A, B, C, D, E). Pulmão (Microscopia eletrônica). Cortes ultrafinos corados por acetato de uranila e citrato de chumbo em um caso de adenocarcinoma de pulmão. Representação do estroma tumoral, com destaque as fibras grossas de colágeno I (A, B), fibras finas do colágeno III (C, D) e fibras de colágeno V (E).

Figura 16. Microscopia eletrônica e cultura de células. No painel A são mostradas as fibras grossas do colágeno I (setas) e as fibras finas do colágeno III (setas, A). No painel B pode ser apreciada uma visão panorâmica do *imunogold* para fibras do colágeno V. Em grande aumento, o painel C permite contemplar com detalhe a expressão da proteína do colágeno V na periferia das fibras grossas do colágeno I ou do colágeno III. Note o aumento de espessura e a irregularidade das fibras do colágeno V na cultura de células dos fibroblastos do microambiente

5.6 Associação entre o colágeno V e as demais variáveis estudadas

Foram testadas as associações entre a variável Colágeno V e as demais variáveis (apoptose via caspases 5, 6, 8, 9, e TUNEL; antiapoptose via Bcl-2 , Bcl-6; expressões de endotelina, CD54, V-CAM e laminina; presença de linfócitos CD3, CD4, CD8, CD56, macrófagos CD68, células dendríticas CD1a e S100; e colágeno I e III; no microambiente tumoral. Na Tabela 11 podem ser observadas as associações que resultaram significantes do ponto de vista estatístico. Em apenas 33,3% dos tumores houve associação entre maior fração de colágeno V e menor fração de vasos ou angiogênese ($p = 0,02$). A menor expressão de proteína antiapoptótica associou-se com a maior fração de colágeno V em somente 30,8% dos tumores ($p = 0,05$). Maiores frações de apoptose tumoral via caspase-8 e colágeno V estiveram associados em apenas 20% dos tumores ($p = 0,05$). A maior fração de linfócitos citotóxicos CD8 peritumorais coincidiu com a maior fração de colágeno V somente em 19,3% dos tumores ($p = 0,04$). Em 10,9% dos tumores houve associação entre as maiores frações de IL-4 e colágeno V ($p = 0,03$). Para a maior fração de citocina IL-8 e colágeno V, houve significância estatística em apenas 9,5% dos tumores ($p = 0,05$). Houve significativa associação entre a maior expressão da citocina TGF- e colágeno V em 18,5% dos tumores ($p = 0,01$).

Tabela 11 - Associações entre o Colágeno V e as demais variáveis nos 65 casos de CNPC de pulmão

		Colágeno V			Signif.
		< 9,4%	> 9,4%	Total	
Vasos no Microambiente tumoral (CD34)	< 10,7%	9	18	27	0,02
		16,7%	33,3%	50,0%	
	> 10,7%	17	10	27	
		31,5%	18,5%	50,0%	
		26	28	54	
		48,1%	51,9%	100%	
		Colágeno V			Signif.
		< 9,4%	> 9,4%	Total	
Anti-Apoptose Bcl-2 (%)	< 17,2%	12	20	32	0,05
		18,5%	30,8%	49,2%	
	> 17,2%	20	13	33	
		30,8%	20,0%	50,8%	
		32	33	65	
		49,2%	50,8%	100%	
		Colágeno V			Signif.
		< 9,4%	> 9,4%	Total	
Apoptose Caspase-8	< 7,5%	12	20	32	0,05
		18,5%	30,8%	49,2%	
	> 7,5%	20	13	33	
		30,8%	20,0%	50,8%	
		32	33	65	
		49,2%	50,8%	100%	
		Colágeno V			Signif.
		< 9,4%	> 9,4%	Total	
Linfócitos CD8	< 1,8%	10	18	28	0,04
		17,5%	31,6%	49,1%	
	> 1,8%	18	11	29	
		31,6%	19,3%	50,9%	
		28	29	57	
		49,1%	50,9%	100%	
		Colágeno V			Signif.
		< 9,4%	> 9,4%	Total	
Citocina IL-4	< 0,8%	17	25	42	0,03
		26,6%	39,1%	65,6%	
	> 0,8%	15	7	22	
		23,4%	10,9%	34,4%	
		32	32	64	
		50,0%	50,0%	100%	

continua

Tabela 11 - Associações entre o Colágeno V e as demais variáveis nos 65 casos de CNPC de pulmão
continuação

		Colágeno V			Signif.
		< 9,4%	> 9,4%	Total	
Citocina TGF-β	< 2,3 %	11	21	32	0,01
		16,9%	32,3%	49,2%	
	> 2,3%	21	12	33	
		32,3%	18,5%	50,8%	
	32	33	65		
	49,2%	50,8%	100%		
		Colágeno V			Signif.
		< 9,4%	> 9,4%	Total	
Citocina IL-8	< 0,6%	18	27	45	0,05
		28,6%	42,9%	71,4%	
	> 0,6%	12	6	18	
		19,0%	9,5%	28,6%	
	30	33	63		
	47,6%	52,4%	100%		
		Colágeno V			Signif.
		<9,4%	>9,4%	Total	
Citocina TGF-β	<2,3 %	11	21	32	0,01
		16,9%	32,3%	49,2%	
	>2,3%	21	12	33	
		32,3%	18,5%	50,8%	
	32	33	65		
	49,2%	50,8%	100%		
		Colágeno V			Signif.
		<9,4%	>9,4%	Total	
Citocina IL-8	<0,6%	18	27	45	0,05
		28,6%	42,9%	71,4%	
	>0,6%	12	6	18	
		19,0%	9,5%	28,6%	
	30	33	63		
	47,6%	52,4%	100%		

Signif: Significância

Diversos modelos matemáticos de sobrevida foram testados utilizando-se as variáveis clínicas (idade, sexo, tabagismo, estadiamento e tratamento), histológicas (classificação dos tumores) e morfométricas (colágeno V, I, III, expressão de laminina – membrana basal –, apoptose caspases 5, 6, 8, 9, apoptose TUNEL, antiapoptose Bcl-2 e Bcl-6, células imunes e citocinas). Na Tabela 12 podem ser visualizadas as variáveis selecionadas pelo modelo matemático de Cox que melhor se associaram à sobrevida. Assim, baixo risco de morte associou-se com tabagismo menor que 41 maços/ano, estadiamento linfonodal N0, tratamento cirúrgico, ao tipo histológico carcinoma de células escamosas, fração de linfócitos CD4 > 16,2%, macrófagos CD68 > 4,5%, citocina IL-4 > 0,8%, citocina IL-6 > 2,2%, células dendríticas Cd1a > 1,6% e colágeno V > 9,4%.

Tabela 12 - Modelo matemático de sobrevida de Cox associando o Colágeno V as variáveis clínicas, histológicas e morfométricas no microambiente tumoral dos 65 casos de CNPC de pulmão

[-2 Log de probabilidade:37,27;Qui-quadrado:41,71;(p=0,0001)]

	β	Erro padrão	Wald	Signif	β
Tabagismo > 41 maços/ano	-6,08	2,41	6,34	0,01	0,00
Estádio N0			6,70	0,03	
Estádio N1	4,69	1,93	5,85	0,01	109,24
Estádio N2	-0,36	2,02	0,03	0,85	0,69
Cirurgia			10,91	0,01	
Cirurgia + quimioterapia	-10,43	3,74	7,76	0,00	0,00
Cirurgia + radioterapia	-2,42	2,20	1,21	0,27	0,08
Cirurgia + radioterapia + quimioterapia	-20,08	1339,85	0,00	0,98	0,00
Carcinoma de Células Escamosas			6,27	0,04	
Adenocarcinoma	5,60	2,41	5,38	0,02	270,45
Carcinoma de Grandes Células	-3,14	2,37	1,74	0,18	0,04
Linfócitos T auxiliar CD4<16,20%	1,97	1,80	1,20	0,27	7,19
Macrófagos/monócitos CD68 <4,5%	-6,81	2,66	6,55	0,01	0,00
Citocina IL-4 <0,8%	6,26	2,47	6,42	0,01	526,34
Citocina IL-6 <2,2%	-7,29	3,08	5,60	0,01	0,00
Células dendríticas CD1a <1,6%	3,66	1,97	3,45	0,06	38,96
Colágeno V < 9,4%	5,72	2,95	3,75	0,05	307,25

6 DISCUSSÃO

6.1 Microambiente tumoral: análise da apoptose via caspases e TUNEL, marcadores antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-6, angiogênese (expressão de endotelina, I-CAM e VCAM), colágeno V, I, III, laminina

O mecanismo da apoptose, a formação de novas células, bem como praticamente todas as funções do nosso organismo, são controlados a partir de genes que nada mais são que segmentos de DNA com funções específicas. A apoptose é induzida por uma cascata de eventos moleculares que podem ser iniciados de modos distintos, culminando na ativação de caspases (Kumar et al., 2010). O processo de apoptose pode ser dividido em uma fase de ativação, na qual as caspases se tornam cataliticamente ativas, e uma fase de execução, na qual essas enzimas atuam provocando a morte celular (Kumar et al., 2010).

Caspases são essenciais na apoptose celular, um dos principais tipos de morte celular programada durante o desenvolvimento e em outras fases da vida adulta. Algumas caspases também são necessárias no sistema imune, para a maturação das citocinas. Falhas na apoptose são uma das principais causas para o desenvolvimento de tumores e doenças autoimunes. Caspases são reguladas num nível pós-traducional, assegurando que possam ser rapidamente ativadas. Elas são inicialmente sintetizadas como pró-caspases inativas, que consistem num pró-domínio, numa pequena subunidade e numa grande subunidade. Caspases iniciadoras possuem um prodomínio mais longo que as efectoras, cujo prodomínio é bem curto. O prodomínio das caspases iniciadoras contém

domínios como o domínio CARD (exemplo caspases-2 e -9) ou o domínio efetor de morte (DED) (caspases-8 e -10) que habilita as caspases a interagirem com outras moléculas que regulam sua ativação. Essas moléculas respondem a estímulos gerando o acúmulo das caspases iniciadoras, que permite a elas se autoativarem para que possam prosseguir e ativar as caspases efetoras. A caspase-5 é uma caspase inflamatória, da mesma forma que a caspase 1, caspase 4 e caspase 11, exercendo papel no sistema imunológico (Martinon et al., 2007) enquanto a caspase-6 e a caspase-7 são executoras da apoptose celular. A cascata das caspases pode ser ativada pela granzima B liberada por linfócitos T citotóxicos que ativam caspases-3 e -7; receptores de morte (como o ligante FAS, o TRAIL e o TNF) que podem ativar caspases-8 e -10; e o apoptossomo, regulado pelo citocromo c e a família Bcl-2, que ativa a caspase-9. Uma vez que a cascata é ativada, uma resposta retroalimentadora positiva garante que a célula inevitavelmente caia em apoptose: por exemplo a caspase-9 ativada pelo apoptossomo cliva e ativa a caspase-3, esta por sua vez além de clivar suas proteínas-alvo irá também clivar mais caspase-9, que ativará mais caspase-3.

No presente estudo, a expressão das caspases 5, 6, 8 e 9 no microambiente tumoral e não tumoral foi muito semelhante. Especificamente, obtivemos índice de apoptose no endotélio vascular pela expressão de caspase-9 tão baixo quanto o observado no microambiente não tumoral. Igualmente foi a expressão de caspase-6 pelo endotélio tumoral e não tumoral. Todavia, houve significativa expressão de caspase-8 pelo epitélio

tumoral em relação ao epitélio não tumoral. Já a caspase-5 teve maior expressão no epitélio não tumoral em relação ao tumoral. Com relação ao endotélio tumoral e não tumoral, a expressão da caspase-5 foi nula e muito baixa, respectivamente. Apoptose via TUNEL ocorreu em 7,2% das células epiteliais no microambiente tumoral e em 10,2% no normal. Houve maior expressão de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 pelas células epiteliais neoplásicas em relação às células epiteliais normais.

De maneira geral, a angiogênese ocorre em conjunto com a progressão das células neoplásicas, precedendo as metástases à distância. Sabe-se que o endotélio tem importante papel na regulação da homeostase vascular e perivascular, mantendo uma superfície não trombótica e regulando a permeabilidade e o tônus vasomotor. Situadas na interface entre sangue e tecido, as células endoteliais estão constantemente expostas a vários agentes e modulam respostas com propriedades pró-inflamatórias e pró-coagulantes (Mantovani et al., 2008). Essas células expressam proteínas com funções definidas, na membrana, como o CD31 ou PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*; molécula de adesão com participação na diapedese) (Meller, 2003) e o CD146 (molécula associada à junção célula-célula e ao citoesqueleto de actina) (Makin et al., 2004). Uma vez ativadas, as células endoteliais passam a expressar moléculas de adesão (VCAM-1 – molécula da adesão celular vascular I e E-selectina), que permitem sua interação com linfócitos, facilitando a sua migração para os tecidos e ainda desempenhando importante papel coestimulatório na ativação das células T (Mojcik et al., 1997). Além disso, as células

endoteliais ativadas produzem endotelina-1, peptídeo com ação não apenas vasoconstritora, mas também desmoplásica (Kazuhide et al., 1994). Supõe-se, portanto, que tanto as moléculas de adesão VCAM-1 e E selectina, bem como a endotelina-1 podem influenciar a invasão vascular neoplásica. Além da disfunção e ativação do endotélio, a apoptose de células endoteliais parece ser de grande importância na atividade vascular (Kurilizin-Moscal et al., 2005), uma vez que resulta em perda da função de barreira, causando edema e exposição da matriz subendotelial, facilitando a trombose, a reparação tecidual anômala e supostamente a invasão vascular. Além disso, a morte programada de células endoteliais parece influenciar na resistência a apoptose de fibroblastos e miofibroblastos, o que contribuiria para a desmoplasia do estroma tumoral e maior resistência à invasão da matriz extracelular (Kurilizin-Moscal et al., 2005).

No presente estudo, avaliamos a angiogênese nos CNPC através da densidade e atividade de microvasos, utilizando o CD34 como marcador de endotélio vascular e VCAM e endotelina como marcadores de atividade endotelial. Houve diferença significativa entre a densidade de vasos no microambiente tumoral e não tumoral. Não houve diferença estatística entre a expressão de VCAM pelo endotélio dos vasos no tumor e no microambiente não tumoral. Por outro lado, houve diferença significativa para a expressão de endotelina nos vasos do estroma tumoral e não tumoral.

A interação entre as células tumorais e o microambiente neoplásico, representado pela matriz extracelular (MEC), influencia suas propriedades invasivas e metastáticas. Após a transformação neoplásica, as proteínas da MEC são secretadas localmente pelas próprias células neoplásicas ou por células da própria matriz, o fibroblasto, organizando-se em uma rede nos espaços que circundam as células neoplásicas. A MEC ocupa um volume significativo no tecido e não representa uma massa inerte que somente proporciona suporte estrutural (Raghow et al., 1994), visto que possui informações que orientam a migração, ligação, diferenciação e organização das células neoplásicas, modulando assim uma série de processos. Três grupos de macromoléculas se associam fisicamente para formar e regular a MEC: 1) proteínas estruturais fibrosas (sistema colágeno/elástica); 2) glicoproteínas adesivas e integrinas; 3) glicosaminoglicanos e proteoglicanos. Essas macromoléculas se organizam em duas porções do tecido: a matriz intersticial e a membrana basal (Kumar et al., 2010). Dentre as proteínas estruturais fibrosas, as fibras do colágeno são os principais constituintes da MEC. Apesar de sua grande diversidade no tecido conjuntivo, as principais são as dos tipos I e III, que são fibrilares ou intersticiais, e as dos tipos IV e V, que são fibrilares ou amorfas. O colágeno I é a principal proteína estrutural do microambiente tumoral sendo produzida em grande quantidade nos adenocarcinomas. A síntese de colágeno é intensificada por diversos fatores, incluindo fatores de crescimento [fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento para fibroblasto (FGF), TGF- β] e citocinas [interleucinas 1 e 4 (IL-1, IL-4) que são

secretados por células linfomononucleares e fibroblastos. Associadas às fibras do colágeno, encontram-se as fibras elásticas, que podem ser sintetizadas por miofibroblastos, participando do remodelamento da MEC durante a carcinogênese sob forma de fibroelastose. Glicoproteínas adesivas e integrinas são proteínas estruturalmente diversas, cuja principal propriedade é a capacidade de se ligar a outros componentes da MEC por um lado, e a proteínas específicas integrantes da membrana celular pelo outro. As principais proteínas adesivas são a fibronectina e a laminina (Kumar et al., 2010). A fibronectina é uma proteína adesiva, produzida por fibroblastos, monócitos, células endoteliais e outras células. Sua principal função consiste em se ligar a diversos componentes da MEC, incluindo colágeno, fibrina e proteoglicanos, bem como às células neoplásicas. Acredita-se que a fibronectina esteja diretamente envolvida nos processos de fixação, disseminação e migração celular. É importante também para potencializar a sensibilidade de certas células aos efeitos proliferativos dos fatores de crescimento (Snyder et al., 1990). A laminina é a glicoproteína mais abundante nas membranas basais e atravessa a lâmina basal, ligando-se, por um lado, a receptores específicos sobre a superfície das células e, por outro lado, a componentes da MEC, como o colágeno IV e o heparan sulfato. Além disso, acredita-se que a laminina atue como mediador da ligação da célula a substratos do tecido conjuntivo (Snyder et al., 1990). As integrinas constituem a principal família de receptores de superfície celular responsável pela fixação da célula à MEC. Em virtude de seu papel na adesão, constituem componentes chaves no extravasamento de leucócitos,

na agregação plaquetária, no processo de desenvolvimento e na cicatrização de feridas. Algumas células exibem adesão para sua proliferação e a falta de fixação a elementos da MEC, através de integrinas, induz apoptose (Kumar et al., 2010).

O colágeno V tem função importante na formação de fibras heterotípicas, no controle da fibrogênese e na regulação do tamanho das fibras de colágeno. É essencial não somente para regular os diâmetros das fibras de colágeno como também para manter a integridade do tecido conectivo, exibindo funções diferentes, dependendo de sua distribuição e das isoformas moleculares (Mayne et al., 1993; Walchii et al., 1994; Nishiyama et al., 2003). As moléculas desse colágeno contribuem para ligar os colágenos à membrana basal, sendo importantes para a adesão celular e para processos de reparo da matriz extracelular (Haralson et al., 1984; Aumailley et al., 1986; Birk et al., 1988; Linsenmayer et al., 1990; Walchii et al., 1994; Adachi et al., 1997; Nishiyama et al., 2003). Esta molécula mantém as extremidades terminais do NH₂ e COOH, tornando-a mais imunogênica (Nishiyama et al., 2003). Pesquisas atuais comprovam que o colágeno V é capaz de prejudicar a sobrevivência de tumores por promover uma apoptose das células neoplásicas através da ativação de certos tipos de caspases (especialmente 5, 6, 8 e 9) (Luparello et al., 2005).

6.2 Microambiente Tumoral: resposta imune inata e adaptativa

Outro fator importante no processo neoplásico é o sistema imunológico que envolve uma atividade de extrema complexidade, que depende da imunidade inata (que nasce com o indivíduo) e da imunidade adquirida. Esta última compreende a imunidade humoral, baseada na formação de anticorpos e na imunidade celular, baseada na atuação dos linfócitos e outras células especializadas, como os macrófagos, por exemplo. As células deste sistema de defesa precisam de um sistema de comunicação umas com as outras, com os objetivos de ativar, estimular, amplificar e organizar a defesa do organismo; estas mensagens de comunicação entre as células são enviadas por determinadas substâncias chamadas citocinas. As citocinas funcionam, portanto, como verdadeiros mensageiros entre as células (Mantovani et al., 2008). As citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos, algumas contendo moléculas de açúcar ligadas (glicoproteínas). Podem ser classificadas segundo suas ações ou propriedades, tais como ações pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, ou por seu papel como fatores de crescimento ou efeitos hematopoiéticos, etc. As citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e I N-g) promovem a ativação do processo inflamatório, auxiliando na eliminação de patógenos e na resolução do processo inflamatório. A elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias leva à ativação dos macrófagos, células NK, células T e células B, proliferação de células T e células B; proliferação e secreção de imunoglobulinas e identificação de mecanismos efetivos para

fagocitose. No nível sistêmico, as citocinas demonstraram induzir febre e aumentar a síntese de proteínas da fase aguda. Localmente, promovem o recrutamento de células inflamatórias para os sítios da inflamação. Algumas citocinas – a saber, as quimiocinas – são responsáveis pelo recrutamento, ativação e retenção dos leucócitos nos sítios de inflamações locais. Muitas dessas citocinas constituem, portanto, um grupo de proteínas diferentes, com origens diversas, a maioria em células T, com atuação em células-alvo e efeitos específicos sobre cada alvo. Essas substâncias já foram implicadas como tendo efeitos cardinais sobre processos malignos (Apte et al., 2002). As citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) reduzem a resposta inflamatória por meio da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão da ativação de monócitos. As citocinas exercem seus efeitos dependendo do local de ação. Por exemplo, a IL-8 tem uma ação pró-inflamatória em sítios de inflamação locais, ao passo que, em alta concentração e no compartimento intravascular, exerce uma ação anti-inflamatória (Cavaillon, 2005). Muitas destas citocinas como a IL6 mutada estão sendo implicadas no crescimento tumoral nos casos de Sarcoma de Kaposi nos indivíduos infectados pelos vírus HIV. Outras, como a IL8 e a IL12, por seu papel angiogênico e estimulador da produção de IFN- γ pelos linfócitos T auxiliares – tipo 1 (TH1) e pelas células NK (Yang et al., 2004), podem ser importantes na propagação tumoral. Citocinas como a IL2, originalmente chamada Fator de Crescimento da Célula T (TCGF), são as principais responsáveis pela progressão dos linfócitos T da fase G1 para a fase S do ciclo celular, e têm sido usadas para tratar tumores humanos. A IL-

2 age sobre os linfócitos B como estímulo para formação de anticorpos (Albertini et al., 1990). Da mesma forma citocinas como a IL-3, conhecida como fator estimulador de multilinhagens de colônias (multi CSF), e a IL-4 promovem a expansão de células mediante a ativação de moléculas de adesão, tendo importante atuação nas respostas imunes tumorais (Hart et al., 1989; Fearon et al., 1990; Gansbacher et al., 1990). As citocinas podem também ser classificadas pela fonte de produção do linfócito T helper, se produzidas pelos linfócitos T helper 1 (Th-1) ou T helper 2 (Th-2). Os linfócitos Th-1 liberam citocinas que ativam macrófagos, células NK, neutrófilos, linfócitos citotóxicos, ampliando assim a resposta imunológica celular (IFN- γ , IL-1, TNF- α , IL-2), e tendo um grande valor na resposta contra neoplasias. Por outro lado, as citocinas Th-2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TGF- β) ampliam a resposta humoral por meio da ativação das células B. As citocinas Th-1 são principalmente pró-inflamatórias, enquanto as citocinas Th-2 são principalmente anti-inflamatórias (Hart et al., 1989; Aarvak et al., 1999; Schmitz et al., 2005). O equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias é essencial para manter a homeostase no sistema e seu desequilíbrio (Th1 *versus* Th2) está envolvido na patogênese de muitas doenças humanas, como alergia e doenças autoimunes, doenças infecciosas e septicemia e na resposta contra doenças neoplásicas.

Existem ainda muitas citocinas cujos papéis são pouco conhecidos, que atuam promovendo e ativando respostas celulares muitas das quais podem atuar ou desencadear o crescimento e a propagação tumoral. Evidências recentes indicam que desequilíbrios nestas citocinas ocorrem na

aterosclerose, obesidade de tipo visceral, síndrome metabólica, distúrbios do sono e em resposta a crescimento tumoral (Abbas et al., 2000).

No presente estudo, apesar da significância estatística encontramos quantidades muito semelhantes de células imunes entre o microambiente tumoral e não tumoral, indicando pouca quantidade de tais células em ambientes modificados pela presença de células neoplásicas. Houve alterações na densidade e distribuição de macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, linfócitos CD56 *natural killer*, citocinas IL-4, IL-6 e IL-8, assim como TGF- no microambiente tumoral, quando comparado ao microambiente não tumoral. Para verificarmos a relevância desses achados na evolução dos pacientes, as quantificações das células imunes foram associadas a dados clínicos e sobrevida. Encontramos aumento de densidade de linfócitos CD3, CD20, células dendríticas CD1a e S100, citocinas IL-4, IL-6, e IL-8 no microambiente tumoral. Tabagismo esteve inversamente associado a linfócitos CD4, e diretamente associado a macrófagos CD68 e linfócitos CD20. As mesmas associações foram anteriormente demonstradas no trabalho de Green et al. (2009). Nosso estudo também demonstrou uma associação entre o tipo histológico, carcinoma de células escamosas, e maior porcentagem de linfócitos CD8, enquanto adenocarcinomas tiveram maior fração de células dendríticas CD1a e macrófagos CD68. Maior fração de macrófagos CD68 também foi constatada nos carcinomas de grandes células. Esses achados encontram suporte no trabalho de Baleeiro et al. (2008), que associaram esse fenômeno à usual localização periférica de adenocarcinomas e carcinomas

de células grandes, justamente onde existe maior quantidade de macrófagos (Gordon et al., 2002). Muito interessante foi a associação encontrada entre tumores no estágio N2 e a baixa fração de linfócitos *natural killer* CD56, e a associação de tumores no estágio T2 com a fração de linfócitos CD4 e CD8. Essas associações ganham suporte no trabalho de Meta et al. (1995), ao descreverem as características fenotípicas, funcionais e moleculares de linfócito em cultura, derivados de linfonodos que drenam CNPC avançados. Os autores demonstraram que mesmo estando presentes no início da cultura, linfócitos B e NK CD56 desaparecem com o crescimento das culturas. Para isso, a população *in vitro* de linfócitos expandidos era virtualmente representada por células T. Dentro dessas células T, havia uma proporção variada de linfócitos CD4 e CD8. De fato, constatamos, em nosso trabalho, que tumores em estágio T2 exibiam maior fração de linfócitos CD4 e CD8, provavelmente, porém não em número suficiente para destruir os tumores. Em adição, a maioria desses linfócitos tem como alvo antígenos internos fazendo com que a resposta citotóxica e a produção de anticorpos sejam mais difíceis e, por conseguinte, a apresentação do antígeno interfira na função celular (Anselmo et al., 2005).

Em nosso estudo, as células NK, que têm sido implicadas na resistência contra células malignas e virais infectadas, distribuíram-se esparsamente no microambiente tumoral. Achados semelhantes foram descritos em estudos prévios em carcinomas de células escamosas (Villegas et al., 2002) e adenocarcinomas (Takanami et al., 2001) de pulmão, assim como em casos de câncer do cólon e gástrico (Coca et al., 1997; Ishigami et

al., 2000). Em conjunto, tais achados sugerem que a infiltração do microambiente tumoral por células CK 56 poderá limitar a progressão tumoral e também reforçar seu significado para a imunidade no câncer de pulmão. Como bem apontado por Wu et al. (2003), as células NK podem contribuir diretamente com a imunidade no câncer através da liberação de citocinas e quimiocinas, desta forma induzindo resposta inflamatória, modulando monócitos e células dendríticas, maturando e diferenciando granulócitos, e influenciando subsequentemente a resposta imune adaptativa.

No presente trabalho, foi encontrada maior fração de células dendríticas Cd1a do que S100 no microambiente tumoral. Células dendríticas desempenham um papel importante na imunidade tumoral por capturarem e processarem antígenos tumorais e realizar sua subsequente apresentação, recrutamento e ativação de linfócitos (de Visser et al., 2006). Todavia, o sistema de células dendríticas é muito heterogêneo, e diferentes marcadores são expressos em diferentes tipos e estágios de células dendríticas (Al-Shiblim et al., 2009). Cd1a é expresso na maior parte das vezes por células dendríticas imaturas (Coventry et al., 2003). Em nosso estudo, células dendríticas tiveram impacto no prognóstico, como já previamente relatado em diversos estudos (Gong et al., 2000; Coventry et al., 2003; Sandel et al., 2005; Baleeiro et al., 2008; Al-Shiblim et al., 2009). Nossos achados sugerem que os focos de células dendríticas no microambiente tumoral implicam uma interface direta com os linfócitos infiltrativos do tumor para gerar uma resposta imune antitumoral. Em adição

à sua função como chave na apresentação dos antígenos, as células dendríticas podem por si contribuir com a destruição das células neoplásicas por citotoxicidade ou produção de citocinas (Chaw et al., 2006, 2008). Esse fato ganha suporte na detecção, em nosso estudo, de citocinas IL-4, IL-6 e IL-8, especificamente a citocina IL-4 que tem implicações na diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos (Sallusto et al., 1994; Neves et al., 2005). Encontramos, ainda, que a citocina IL-4 apresentou associação positiva com linfócitos CD4 e macrófagos CD68, este último também positivamente associado à IL-8. Usualmente, a infiltração do tumor por células dendríticas apresenta um déficit de maturação, conduzindo a um acúmulo de células imaturas no microambiente (Bell et al., 1999). Por outro lado, no microambiente não tumoral, encontramos uma síntese simultânea da citocina TGF- β , que poderia também estar impedindo a maturação das células dendríticas, como já previamente demonstrado em outros tumores (Iwamoto et al., 2003). Coincidentemente, encontramos no microambiente tumoral infiltração por linfócitos B, que podem produzir anticorpos neutralizadores contra TGF- β , como é demonstrado nos trabalhos de Barbuto e colaboradores (1995), assim bloqueando as atividades biológicas dessa citocina no microambiente tumoral. Em resumo, demonstramos um aumento em número de células dendríticas imaturas e na fração de macrófagos no microambiente peritumoral, um aumento em IL-4 e diminuição em TGF- β nos tumores, sugerindo um microambiente local desprovido de resposta imune efetiva contra o câncer. O predomínio de células dendríticas imaturas dentro dos tumores poderia afetar não somente

a indução da resposta imune na drenagem para os linfonodos, como também a frequência e o *status* de ativação de linfócitos que infiltram o tumor, assim afetando significativamente a interação entre tumor e células imunes.

Com relação aos macrófagos, encontramos uma frequência semelhante entre os microambientes tumoral e não tumoral. Macrófagos exercem um papel importante no infiltrado de células imunes, estando presentes em virtualmente todas as neoplasias malignas (Dimitriadou et al., 1997; Bingle et al., 2002). Os macrófagos podem produzir efeito tanto negativo quanto positivo no crescimento dos tumores, na dependência do microambiente, apresentando correlação favorável ou desfavorável com o prognóstico (Dimitriadou et al., 1997; Bingle et al., 2002). Assim, o papel imune dos macrófagos nos CNPC de pulmão tem sido controverso. Welsh et al. (2005) estudaram o significado da presença de macrófagos CD68 no estroma e epitélio e concluíram que os macrófagos estromais podem representar um indicador importante na sobrevida. Em contrapartida, Arenberg et al. (2000) demonstraram em CNPC de pulmão que pacientes com recorrência da doença apresentavam mais macrófagos nos tumores primariamente ressecados. Tataroglu et al. (2004) não conseguiram demonstrar um efeito significativo dos macrófagos no estroma tumoral e a progressão do tumor. Os diferentes resultados obtidos podem ser explicados por dois diferentes caminhos; metodologia diferente e dupla ação dos macrófagos. Primeiramente, como pró-indutores tumorigênicos conduzindo à formação do microambiente tumoral, angiogênese (Kataki et al., 2002) e

expressão de fatores de crescimento (de Visser et al., 2006). Secundariamente, como promotor antitumorigênico mediado por produção de citocinas (Kataki et al., 2002). No presente estudo, apesar de termos encontrado uma proporção semelhante de macrófagos no microambiente tumoral e não tumoral, a fração de macrófagos no microambiente tumoral teve impacto na sobrevida dos pacientes, como veremos na análise a seguir.

6.3 Microambiente tumoral: remodelamento por anormalidades no colágeno V, apoptose e resposta imune

No presente estudo, examinamos as características histomorfométricas e estruturais do remodelamento do microambiente tumoral por apoptose, angiogênese, resposta imunocelular, colágenos I, III, e V, com o propósito de determinar uma interação entre o colágeno V e esses fatores. Os resultados encontrados mostraram uma diminuição na taxa de colágeno V, aumento da angiogênese e alta taxa de crescimento tumoral por baixa taxa de apoptose endotelial e epitelial, além de discreta resposta imune, associados a um maior risco de morte por câncer de pulmão. Adicionalmente, através de reconstrução tridimensional dos tumores ao microscópio confocal, detectamos desorganização estrutural das fibras do colágeno V nos três tipos histológicos de câncer de pulmão, tendo sido mais intensa nos adenocarcinomas. A desestruturação das fibras do colágeno do V, bem como sua menor quantidade, pode ter propiciado maior motilidade

das células neoplásicas e maior capacidade de invasão no estroma tumoral. Essa observação realça dados de literatura, ao mostrar que as características estruturais e moleculares do colágeno V têm sido descritas extensivamente por mais de uma década (Bateman et al., 1996), porém o comportamento biológico deste componente “menor” da matriz extracelular e os efeitos de sua interação com diferentes tipos celulares ainda são pouco compreendidos. De fato, estudos prévios realizados por nosso grupo têm mostrado uma ação inversa do colágeno V na matriz extracelular em relação àquela constatada no presente estudo em câncer de pulmão. Os autores em questão têm observado que, ao serem imunizados com o colágeno V, durante o processo de produção de anticorpos correspondentes, coelhos acabam desenvolvendo aumento na síntese do colágeno V por aumento na proliferação de fibroblastos com consequente desenvolvimento de fibrose na parede dos vasos e interstício pulmonar (Teodoro et al., 2004; Velosa et al., 2007; Callado et al., 2007). Assim, através da revisão da literatura sobre o papel do colágeno V, é difícil definir um único e genérico papel desempenhado por esse tipo de colágeno, porque as respostas celulares por ele suscitadas são múltiplas, e algumas vezes opostas, de acordo com a célula examinada. Desta forma, o colágeno V tem se mostrado como um ótimo substrato para adesão e crescimento de hepatócitos (Takai et al., 2001), células de Schwann (Chernousev et al., 2001), células musculares lisas (Grotendorst et al., 1981), e ainda alguns tipos de células tumorais (Ruggiero et al., 1994), inversamente, um papel antiadesivo e antiproliferativo em neurônios (Chernousev et al., 2001), linhagens celulares

epiteliais e endoteliais (Parekh et al., 1998), e células neoplásicas do câncer de mama (Luparello et al., 2005) também foram descritos. Esses fenômenos corroboram com os resultados do presente estudo em câncer de pulmão, onde a menor quantidade de colágeno V constatada, aliada a suas propriedades antiadesivas, deve ter propiciado invasão do estroma e maior agressividade aos tumores.

Nossos resultados encontram suporte no instigante estudo de Luparello et al. (2005), que demonstrou em nível molecular, que o colágeno do tipo V é capaz de impedir a sobrevivência de células neoplásicas do câncer de mama ao promover morte celular e endotelial por apoptose caspase dependente. Esses autores reportaram hiper-regulação de genes controladores da apoptose via caspase-8 e 9, caspase-1, caspase-5 e 14, assim como aumento correspondente na atividade de alguns produtos enzimáticos (Luparello et al., 2005). De fato, nossos resultados apresentaram evidências em nível protéico (imuno-histoquímica e imunofluorescência) de que uma diminuição no colágeno V pode determinar aumento na angiogênese por insuficiente apoptose endotelial via caspase 9. É necessário que haja estudos posteriores para determinar com precisão a via intracelular através da qual o colágeno V desempenha seus efeitos letais. Todavia, os resultados aqui apresentados permitem levantar alguns comentários importantes sobre o assunto.

No presente estudo, detectamos nos CNPC de pulmão baixa taxa de apoptose caspase induzida nas células endoteliais e diminuição na quantidade de colágeno do tipo V no estroma tumoral. Esse fenômeno

poderia sinalizar uma possível interação entre vasos e colágeno do tipo V. A diminuição das fibras do colágeno V leva a uma diminuição entre as ligações de epítomos presentes neste colágeno ao estroma e ao endotélio, favorecendo a motilidade das células neoplásicas do estroma para o interior dos vasos. Outra interação importante entre os vasos e o colágeno V foi demonstrada nos trabalhos de Sgonc et al. (1994, 1999) em doenças autoimunes. Nessa situação, a apoptose endotelial provocaria lesão da membrana basal vascular, expondo epítomos ocultos do colágeno V, resultando na formação de neoantígenos que irão suscitar uma resposta imune (Teodoro et al., 2004; Bezerra et al., 2006; Parra et al., 2006; Parra et al., 2007; Velosa et al., 2007; Ogido et al., 2008). Interessantes são estudos posteriores, demonstrando que o colágeno V e as células imunes podem exercer um papel no remodelamento ativo de vasos e estroma (Bharat et al., 2006), o qual pode ser revertido pela tolerância nasal com o colágeno V (Garippo et al., 2007; Velosa et al., 2007).

Nosso estudo também demonstrou baixas porcentagens de células imunes CD3, CD4, CD8, CD20 no microambiente tumoral, e esse fenômeno pode também estar associado às baixas taxas de apoptose caspase induzida e menor imunogenicidade do colágeno V. Pelo que discutimos no parágrafo anterior, podemos contemplar que a baixa taxa de apoptose endotelial preservaria a integridade da membrana basal vascular, dificultando a exposição de epítomos ocultos do colágeno V, para formação de neoantígenos, suscitando ausência ou fraca resposta imune. Por outro lado, é bem conhecido o fato de que o maior evento associado com a

apoptose é a ativação de uma família de proteases cisteínas intracelulares, as caspases, reguladas direta ou indiretamente por produtos de genes controladores e sinalizadores da morte celular, tais como p53 e Bcl-2, muitos deles localizados nas membranas nucleares, mitocondriais externas e retículo endoplasmático, mantenedores portanto da homeostasia eletroquímica das organelas. A cascata de ativação das caspases é responsável por grande parte da proteólise que ocorre durante a apoptose, cujos alvos são fatores envolvidos na reparação, fragmentação e duplicação do DNA, no *splicing* do RNA, na manutenção da integridade do citoesqueleto e na divisão celular (Hofmann et al., 1999). Além dos eventos endógenos, tais como a lesão do DNA genômico, uma variedade de ligantes extracelulares estão envolvidos no gatilho que aciona a morte celular por apoptose entre eles, TNF , Fas ligante, CD3, CD4, e CD8 (Nagata et al., 1999). Tomadas em conjunto, essas considerações podem justificar a ausência de sucesso em induzir a morte por apoptose com agentes que modulam sinais imunocelulares ou inflamatórios, suportando a ideia de que, em alguns casos, o uso de estratégias preventivas da baixa síntese de colágeno do tipo V, ou respostas locais contra a baixa taxa de apoptose celular poderá trazer impacto clínico.

No pulmão normal, pequenas quantidades de colágeno do tipo V estão presentes como fibrilas muito finas na membrana basal dos vasos. Suas moléculas também contribuem para o *link* entre colágeno do estroma e a membrana basal, além de formarem fibras heterotípicas com os colágenos I e III, sendo importante nos processos de adesão celular e reparação da

matriz extracelular (Linsenmayer et al., 1990). Como previamente demonstrado por Mayne et al. (1993), o aumento de interação entre diferentes tipos de fibras do colágeno e consequente formação de fibras heterotípicas influencia fortemente a arquitetura e função da matriz extracelular. Assim, no presente estudo, não foi surpresa constatar que, com a diminuição de fibras do colágeno V, diminuiu também a interação com as fibras do colágeno dos tipos I e III, talvez facilitando ainda mais a motilidade das células tumorais do estroma para o interior dos vasos. Novamente, o colágeno V providenciou mais informações sobre o papel da matriz extracelular no controle da progressão do câncer.

Claramente, o colágeno do tipo V é fundamental não somente para regular o diâmetro das fibras, mas também na integridade do tecido conjuntivo, apresentando funções diferentes dependendo da sua distribuição e isoforma molecular. Nesse sentido, e como foi observado em nosso estudo, houve uma diminuição da quantidade deste colágeno no microambiente tumoral denotando uma possível via de destruição do colágeno V pelas células tumorais parênquima pulmonar. Observou-se expressão diminuída das cadeias alfa 1 e 2 no parênquima tumoral, embora a diferença com relação aos casos controles não tenha atingido significância estatística. É possível que a expressão diminuída das cadeias alfa 1 e 2 do colágeno V esteja interferindo no adequado controle do diâmetro das outras fibras de colágeno no microambiente da matriz extracelular favorecendo a motilidade e invasão das células neoplásicas. Contudo, conclusões

definitivas somente poderão ser realizadas após análise de um número maior de casos.

Nosso estudo apresenta impacto clínico. A fim de estabelecer a relevância de nossos resultados na evolução dos pacientes portadores de CNPC de pulmão, o colágeno V e o fenômeno da apoptose foram avaliados em função da sobrevida dos pacientes, controlados para o estadiamento e tipos histológicos. Claramente, a análise multivariada por Regressão de Cox evidenciou maior risco de morte para pacientes cujos tumores são pobres em fibras do colágeno V, enquanto a alta expressão de caspase exerceu um efeito protetor aos pacientes. Quando introduzimos na análise multivariada variáveis como tabagismo, estadiamento, tipo de tratamento e tipo histológico, menor risco de morte esteve associado à maior fração de linfócitos CD4, menor densidade de macrófagos CD68, maior densidade de células dendríticas CD1a, maior quantidade de citocinas IL4 e IL-6 e maior taxa de colágeno V no microambiente tumoral.

Finalmente, o colágeno V pode representar um forte marcador na identificação de pacientes com risco de morte por CNPC de pulmão.

7 CONCLUSÕES

Concluímos que houve relação do colágeno V com a angiogênese e as células imunes no carcinoma não de pequenas células (CNPC) de pulmão através das seguintes constatações:

- Com a reconstrução tridimensional do colágeno V, observamos uma desorganização estrutural das fibras deste colágeno nos três tipos histológicos (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células), e esta foi mais intensa nos adenocarcinomas.
- A menor expressão dos colágenos I, III e V no microambiente tumoral está associada à desorganização fibrilar, levando à menor desmoplasia estromal, propiciando crescimento, mobilidade das células tumorais e invasão tumoral.
- A expressão do colágeno V e da apoptose via caspase-9 do endotélio vascular esteve fortemente associada ao prognóstico dos pacientes com CNPC de pulmão.
- No CNPC há resposta imune inata e adaptativa, porém esta é anormal e deficiente com baixa expressão das células imunes e citocinas.
- Estratégias terapêuticas para prevenir a baixa síntese de colágeno V e a menor expressão de apoptose vascular pela caspase-9, assim como a resposta imune, poderão ser promissoras no prognóstico e tratamento dos CNPC de pulmão.

8 ANEXOS

Anexo 1 –

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 03/10/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0842/07**, intitulado: **"ESTUDO DA RELAÇÃO DO COLÁGENO TIPO V E CÂNCER DE PULMÃO"** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

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: **PROF^a. DR^a. VERA LUIZA CAPELOZZI**

Pesquisador (a) Executante: **PAOLA DA COSTA SOUZA**

CAPPesq, 05 de Outubro de 2007

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, 255, 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 -sol

ANEXO 2 - Dados demográficos dos 65 pacientes com CNPC

Paciente	Idade	Tabagismo	Sexo	Sobrevida	Status	Tratamento
21-2601-0	55	...	M	151	Vivo	Cir.
23-7102-2	76	..	F	91	Óbito	Cir. + Qt
30-2350-8	58	60	F	87	Óbito	Cirurgia
31-6502-7	56	00	F	118	Vivo	Cir.
32-7135-8	72	00	M	122	Vivo	Cir.
37-0221-9	69	...	M	107	Vivo	Cir.
40-7025-9	74	00	F	98	Vivo	Cir.
44-2691-6	53	94	M	72	Óbito	Cir. + Qt + Rt
45-0200-0	62	...	M	32	Óbito	Cir. + Rt
50-4130-9	58	60	M	50	Óbito	Cir. + Qt
52-0765-7	73	40	F	15	Óbito	...
52-9524-6	55	...	F	44	Óbito	...
55-2154-8	47	...	F	42	Óbito	Cir.
56-6910-3	77	60	M	12	Óbito	Cir.
56-9392-6	63	...	M	17	Óbito	Cir. + Qt
58-7031-3	71	...	M	51	Vivo	Cir. + Qt
58-8721-6	65	...	F	2	Óbito	Cir.
59-1595-3	68	...	F	5	Óbito	Cir. + Qt
59-3657-8	69	20	M	52	Vivo	Cir.
59-6085-1	34	00	M	51	Vivo	Cir. + Qt + Rt
60-0991-3	74	40	M	11	Óbito	Cir.
60-2098-4	82	51	M	23	Óbito	Cir. + Qt
60-4220-1	48	00	M	16	Óbito	Cir. +Qt
61-3883-7	71	30	F	47	Vivo	Cir. + Rt
61-3994-9	56	60	M	15	Óbito	Cir.
61-7620-8	40	00	F	46	Vivo	Cir.+ Qt
62-49531	58	35	M	24	Óbito	Cir. + Qt
63-0200-9	75	...	M	41	Vivo	...
63-0381-1	62	00	M	43	Vivo	Cir. + Qt
63-5595-1	68	50	M	33	Óbito	Qt +Cir. +Cir.
647573-6	61	00	F	24	Óbito	Qt+Cir.+ Qt
65-0752-2	70	50	M	7	Óbito	Cir.
65-1176-7	58	60	M	11	Óbito	Cir. + Qt + Rt
65-1772-2	53	60	M	7	Óbito	Cir. + Qt
65-2810-4	47	30	F	19	Óbito	Cir.
65-3668-9	75	70	F	19	Vivo	Cir.
66-1922-3	51	33	M	22	Óbito	Cir. + Qt
66-7653-7	79	65	M	15	Óbito	...
68-6351-5	68	41	F	29	Óbito	Qt + Cir.

Continua

Anexo 2 - Dados demográficos dos 65 pacientes com CNPC

continuação

Paciente	Idade	Tabagismo	Sexo	Sobrevida	Status	Tratamento
70-5416-5	47	04	F	24	Vivo	Cir.+Qt
70-7051-9	62	50	M	12	Óbito	Cir. + Qt
71-0369-7	58	00	F	3	Óbito	Cir. + Qt
71-0605-0	56	...	M	7	Óbito	Cir. + Qt
71-5138-1	59	120	M	22	Vivo	Cir.
72-4884-9	66	57	M	8	Óbito	Cir. + Qt
72-5094-0	59	120	M	19	Vivo	Cir.
92-10009	43	00	M	138	Óbito	Cir.
69-2397-6	58	100	F	27	Vivo	Cir.
39-1088-1	71	45	M	101	Vivo	Cir.
41-6186-6	45	80	F	95	Vivo	Cir. +Rt
46-3085-8	78	...	F	19	Óbito	Cir. + Rt
51-8820-2	69	30	F	1	Óbito	Qt + Cir.
51-9727-9	59	40	F	60	Óbito	Cir. + Qt + Rt
52-4935-0	56	...	M	18	Óbito	Cir.
52-7784-1	80	20	M	68	Vivo	...
53-8424-9	30	00	F	9	Óbito	Cir.
54-5512-0	62	50	M	16	Óbito	Cir. + Qt
56-1853-3	60	60	M	7	Óbito	Cir.+Qt
56-2756-7	48	...	F	16	Óbito	Cir.
57-4914-0	55	60	M	7	Óbito	...
60-2105-0	63	60	F	50	Vivo	Cir.
60-7032-9	69	100	M	10	Óbito	Qt +Cir.
65-5159-9	73	00	M	34	Óbito	Cir.
68-9410-0	77	...	M	10	Óbito	Cir. + Rt
73-0431-5	39	00	F	20	Óbito	Cir + Qt

F=Feminino; M=Masculino; Cir.=Cirurgia; Qt=Quimioterapia; Rt: Radioterapia.

ANEXO 2 – Dados histopatológicos dos 65 pacientes com CNPC

Paciente	Classificação	Estroma	Necrose	T (Tamanho)	N (Linfonodo)	M (metástases)
21-2601-0	CEC	+++	+++	2	0	0
23-7102-2	Adeno	+++	0	2	0	0
30-2350-8	Adeno	+++	0	2	0	0
31-6502-7	Adeno	++	0	4	0	0
32-7135-8	CEC	+++	+	1	0	0
37-0221-9	CEC	+++	+++	2	0	0
40-7025-9	CGC	+++	+++	2	0	0
44-2691-6	Adeno	++	0	2	1	0
45-0200-0	CEC	+++	+++	2	0	0
50-4130-9	CGC	+++	++	2	0	0
52-0765-7	CEC	+++	+	2	2	0
52-9524-6	CEC	+++	0	2	0	0
55-2154-8	Adeno	+++	++	2	0	0
56-6910-3	Adeno	++	++	4	0	0
56-9392-6	CGC	+++	0	2	1	0
58-7031-3	Adeno	++	++	1	1	0
58-8721-6	Adeno	+++	++	2	1	0
59-1595-3	CEC	++	++	2	1	0
59-3657-8	CGC	+	+++	2	1	0
59-6085-1	CGC	++	0	4	0	0
60-0991-3	Adeno	++	+	2	1	0
60-2098-4	Adeno	+	++	2	0	1
60-4220-1	Adeno	++	+++	4	0	0
61-3883-7	CGC	+	+++	2	0	0
61-3994-9	CGC	++	++	2	1	0
61-7620-8	Adeno	+	+	2	0	1
62-49531	CGC	+++	++	2	1	0
63-0200-9	CGC	++	++	2	0	0
63-0381-1	Adeno	+	+	2	0	0
63-5595-1	Adeno	+++	0	1	0	0
647573-6	Adeno	+++	++	2	0	0
65-0752-2	CGC	+	+++	1	1	0
65-1176-7	Adeno	++	+++	3	0	0
65-1772-2	Adeno	+	0	2	0	0
65-2810-4	CEC	+++	+++	2	0	0
65-3668-9	CEC	+	+	2	0	0
66-1922-3	CEC	++	+	2	2	0
66-7653-7	CEC	++	++	2	1	0
68-6351-5	Adeno	+	+	1	2	0

Continua

ANEXO 2 - Dados histopatológicos dos 65 pacientes com CNPC

continuação

Paciente	Classificação	Estroma	Necrose	T(Tamanho)	N(Linfonodos)	M(Metástase)
70-5416-5	CEC	+	+	4	2	2
70-7051-9	CGC	+	+++	1	0	1
71-0369-7	CGC	+	0	2	1	0
71-0605-0	CGC	+	0	2	2	0
71-5138-1	Adeno	+	0	1	0	0
72-4884-9	CEC	+++	0	2	2	0
72-5094-0	CGC	+	0	1	0	0
92-1000-9	Adeno	+++	+++	2	0	0
69-2397-6	CEC	+++	++	2	1	0
39-1088-1	Adeno	++	+	2	0	0
41-6186-6	CGC	++	++	2	1	0
46-3085-8	CEC	+++	++	2	1	0
51-8820-2	CEC	++	++	2	0	0
51-9727-9	Adeno	+++	+	2	2	0
52-4935-0	Adeno	+	0	2	0	0
52-7784-1	Adeno	+	+	1	0	0
53-8424-9	Adeno	++	0	1	2	0
54-5512-0	CEC	+++	+	2	0	0
56-1853-3	CGC	++	0	2	1	0
56-2756-7	CGC	+++	0	3	0	1
57-4914-0	Adeno	+	0	3	0	1
60-2105-0	CEC	++	++	2	0	0
60-7032-9	CEC	++	+++	4	0	0
65-5159-9	Adeno	++	+	3	0	0
68-9410-0	CEC	+++	++	2	1	0
73-0431-5	Adeno	++	+	3	2	0

Adeno= Adenocarcinoma; CEC= Carcinoma de células escamosas; CGC= Carcinoma de grandes células. Estroma/Necrose: 0= Ausente;+= Leve;++ = Moderada;+++ = Acentuada. TNM: Estadiamento patológico. AJCC, 7ª ed., 2009.

9 REFERÊNCIAS

Aarvak T, Chabaud M, Miossec P, Natvig JB. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. *J Immunol.* 1999;162:1246-51.

Abbas KA, Pober JS. Effectors mechanisms of immune responses. In: Abbas KA, Pober JS, editors. *Cellular and molecular immunology*. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 2000. v.1, p. 553.

Adachi E, Hopkinson I, Hayashi T. Basement-membrane stromal relationships: interactions between collagen fibrils and the lamina densa. *Int Rev Cytol.* 1997;173:73-156.

Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol.* 2005;23:3175-85.

Albertini MR, Sosman JA, Hank JA, et al. The influence of autologous lymphokine-activated killer cell infusions on the toxicity and antitumor effect of repetitive cycles of Interleukin-2. *Cancer.* 1990;66:2457.

Al-Shibli K, Al-Saad S, Donnem T, Persson M, Bremnes RM, Busund L-T. (2009) The prognostic value of intraepithelial and stromal innate immune system cells in non-small cell lung carcinoma. *Histopathology.* 2009;55:301-12.

American Cancer Society (ACS). *Cancer facts and figures*. Atlanta; 2010 [cited 2011]. Available from: <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/CancerFactsFigures/cancer-facts-and-figures-2010>.

American Cancer Society (ACS). *The history of cancer* [cited 2011]. Available from: <http://www.cancer.org/Cancer/CancerBasics/TheHistoryofCancer/index>.

Andrikopoulos K, Liu X, Keene DR, Jaenisch R, Ramirez F. Targeted mutation in the col5a2 gene reveals a regulatory role for type V collagen during matrix assembly. *Nat Genet.* 1995;9(1):31-6.

Anselmo LB, Gross JL, Haddad F, Deheinzelin WD, Silva RA, Couto WJ, Younes RN, Ab'Saber AM, Canzian M, Capelozzi L, Barbuto AM. Dendritic cell distribution in primary lung cancer patients. *Keystone Symposia/Basic Aspects of Tumor Immunology*; 2005.

Antonangelo L, Bernardi FDC, Capelozzi VL, Takagaki T, Younes R, Yagi N, Saldiva PHN. Morphometric evaluation of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) is useful in predicting long-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Chest.* 1997;111:110-4.

Apte RN, Voronov E. Interleukin-1-a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. *Semin Cancer Biol.* 2002;12: 277-90.

Arenberg DA, Keane MP, DiGiovine B, Kunkel SL, Strom SR, Burdick MD, Iannettoni MD, Strieter RM. Macrophage infiltration in human non-small-cell lung cancer: the role of CC chemokines. *Cancer Immunol. Immunother.* 2000;49(2):63-70.

Aumailley M, Timpl R. Attachment of cells to basement membrane collagen type IV. *J Cell Biol.* 1986;103:1569-75.

Baleeiro RB, Anselmo LB, Soares FA, Pinto CAL, Ramos O, Gross JL, Haddad F, Younes RN, Tomiyoshi MY, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. High frequency of immature dendritic cells and altered in situ production of interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha in lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57:1335-45.

Barbuto JAM, Grimes WJ, Hersh EM. Antibodies to tumor necrosis factor: a component of B cell immune responses with a role in tumor/host interaction. *Cancer Immunol Immunother*. 1995;40:31-6.

Bateman JF, Lamandè SR, Ramshaw JAM. Collagen superfamily. In: Comper WD, editor. *Extracellular matrix* volume 2, molecular components and interaction. Amsterdam: Harwood Academic Public; 1996. p.22-67.

Becknell B, Caligiuri MA. Natural killer cells in innate immunity and cancer. *J Immunother*. 2008;31(8):685-92.

Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau, Davoust J, Pallucka KA, Banchereau J. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med*. 1999;190:1417-26.

Bezerra MC, Teodoro WR, de Oliveira CC, Velosa AP, Ogido LT, Gauditano G, Parra ER, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Scleroderma-like remodeling induced by type V collagen. *Arch Dermatol Res*. 2006;298(2):51-7.

Bernardi, FDC, Antonângelo, L, Beyruti, R, Takagaki, T, Saldiva, PHN, Capelozzi, VL. Clinical, pathological and biological markers of prognosis in surgically resected squamous cell carcinoma of the lung. *Modern Pathol*. 1997;10(10):992-1000.

Bharat A, Fields RC, Steward N, Trulock EP, Patterson GA, Mohanakumar T. CD4+25+ regulatory T cells limit Th1-autoimmunity by inducing IL-10 producing T cells following human lung transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6(8):1799-808.

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: Implications for new anticancer therapies. *J Pathol.* 2002;196:254-65.

Birk DE, Fitch JM; Barbiarz JP, Linsenmayer YT. Collagen type I and collagen type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol.* 1988;106:999-1008.

Callado MR, Viana VS, Vendramini MB, Leon EP, Bueno C, Velosa AP, Teodoro WR, Yoshinari NH. Autoantibody profile in the experimental model of scleroderma induced by type V human collagen. *Immunology.* 2007;122(1):38-46.

Carvalho HA, Takagaki TY, Saldiva PHN, Capelozzi V. Stereological estimates of the nuclear/cytoplasmic ratio and star volume on fibroptic biopsies are of prognostic value for survival in a preliminary study of advanced squamous cell carcinoma of the lung. *Histopathology.* 1997;31:420-9.

Carvalho PEO, Antonângelo L, Bernardi FDC, Leão LEV, Rodrigues RO, Capelozzi VL. Useful prognostic panel makers to express the biological tumor status in resected lung adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol.* 2000;30(11):478-86.

Cavaillon J.-M. *Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine, molecular mediators: cytokines.* 2nd ed. Weinheim, Deustch: Wiley-VCH Verlag; 2005, v.8, p. 431-60.

Chan CW, Crafton E, Fan HN, et al. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med.* 2006;12:207-13.

Chan C , Housseau . The iss of death' b dendritic cells to cancer cells. *Cell Death Differ.* 2008;15(1):58-69.

Chanut-Delalande H, Bonod-Bidaud C, Cogne S, Malbouyres M,Ramirez F, Fichard A, Ruggiero F. Development of a functional skin matrix requires deposition of collagen V heterotrimers. *Molec Cell Biol.* 2004;24(13):6049-57.

Chernousev MA, Stahl RC, Carey DJ. Schwann cell type V collagen inhibits axonal outgrowth and promotes Schwann cell migration via distinct adhesive activities of the collagen and noncollagen domains. *J Neurosci.* 2001;21:6125-35.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.

Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer;* 1997;79:2320-8.

Coventry BJ, Morton J. CD1a-positive infiltrating-dendritic cell density and 5-year survival from human breast cancer. *Br J Cancer.* 2003;89:533-8.

Demarchi LMMF, Reios MM, Palomino SAP, Farhat C, Takagaki TY, Beiruti R, Saldiva PHN, Capelozzi VL. Prognostic values of stroma proportion and PCNA, K67 and p53 proteins in patients with resected adenocarcinoma of the lung. *Modern Pathol.* 2000;13(5):511-20.

Demarchi LMMF, Palomino SAP, Farhat C, Takagaki TY, Beyruti R, Capelozzi VL. Correspondence re: prognostic values of stromal proportion

and PCNA, Ki-67 and p53 proteins in patients with resected adenocarcinoma of the lung [letter]. *Modern Pathol.* 2001;14(4):366-7.

de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:24-37.

Dimitriadou V, Koutsilieris M. Mast cell-tumor cell interactions: for or against tumour growth and metastasis? *Anticancer Res.* 1997;17:1541-9.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC cancer staging handbook*. 7th ed. New York: Springer; 2010.

Fernandez-Madrid F, Karvonen RL, Kraut MJ, Czelusniak B, Ager JW. Autoimmunity to collagen in human lung cancer. *Cancer Res.* 1996;56:121-6.

Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, Karasuyama H, Vogelstein B, Frost P. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell.* 1990;60:397-403.

Fitch JM, Gross J, Mayne R, Johnson-Wint B, Linsenmayer TF. Organization of collagen types I and V in the embryonic chicken cornea: monoclonal antibody studies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984;81:2791-5.

Franco M, Montenegro MR, Brito T, Bacchi CE, Almeida PC. *Patologia dos processos gerais*. 5a ed. São Paulo: Ateneu; 2010.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1995;1:27-31.

Fukuyama T, et al. Cytokine production of lung cancer cell lines. *Cancer Sci.* 2007;98:1048-54.

Gansbacher B, Zier K, Daniels B, Cronin K, Bannerji R, Gilboa E. Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *J Exp Med.* 1990;172:1217-24.

Garippo A, Parra ER, Teodoro W, Rivero D, Souza F, Yoshinari N, Capelozzi VL. Nasal tolerance with collagen V protein reverts bronchovascular axis remodeling in experimental bronchiolitis obliterans. *Clinics.* 2007;62(4):499-506.

Gay S, Martinez-Hernandez A, Rhodes RK, Miller EJ. The collagenous exocytoskeleton of smooth muscle cells. *Collagen Relat Res.* 1981;1:377-384.

Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(12):1531-46.

Geraldo BF. Bogliolo patologia. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. 7a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. Cap. 8, p.199.

Gong X, Yan Y, Wu J. Tumor infiltrating dendritic cells in relation to prognosis of lung cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2002;22;135-7.

Gordon SB, Read RC. Macrophage defenses against respiratory tract infections. *Brit Med Bull.* 2002;61:45-61.

Graham EA, Singer JJ. Successful removal of an entire lung for carcinoma of the bronchus. *J.A.M.A.* 1993;101:1371-4.

Green RM, Gally F, Keeney JG, Alper S, Gao B, Han M, Martin RJ, Weinberger AR, Case SR, Minor MN, Chu HW. (2009) Impact of cigarette smoke exposure on innate immunity: a *Caenorhabditis elegans* model. *PLoS One*. 2009;4(8):e6860.

Grotendorst GR, Seppä HE, Kleimanman HK, Martin GR. Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:3669-72.

Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988;96:379-94.

Haralson MA, Mitchel WM, Rhodes RK, Miller EJ. Evidence that the collagen in the culture medium of Chinese hamster lungs cells contains components related at the primary structural level to alpha 1(V) collagen chain. *Arch Biochem Biophys*. 1984;229:509-18.

Hart PH, Vitti DR, Burgess GA, et al. Potential anti-inflammatory effects of interleukin-4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin-1, and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:3803-7.

Haque MA, Myzobuchi T, Yasufuku K, Fujisawa T, Brutkiewicz RR, Zeng Y, Woods K, Smith GN, Cummings OW, Heidler KM, Wilkes DS. Evidence for immune responses to a self antigen in lung transplantation: role of type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. *J Immunol*. 2002;69:1542-9.

Hay ED. Matrix assembly. In: Hay ED, editor. *Cell biology of extracellular matrix*. 20th ed. New York: Plenum; 1991. p. 221-49.

Hofmann K. The modular nature of the apoptotic signaling proteins. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55:1113-8.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. *Incidência de câncer no Brasil: estimativa 2010*. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/versaofinal.pdf>.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. *TNM - classificação dos tumores malignos*. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/tratamento/tnm/tnm2.pdf>.

Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer.* 2000;88:577-83.

Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okusawa M, Mabuchi H, Nohara T, Gon G, Toyoda M, Tanigawa N. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer.* 2003;104:92-7.

Kataki A, Scheid P, Piet M, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression. *J Lab Clin Med.* 2002;140:320-8.

Kazuhide Y: Endothelin and collagen vascular disease: a review with special reference to Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Int Med.* 1994;33(10):579-82.

Konomi H, Toshihiko Hayashi, Kiyoo Nakayasu, Masataka Arima. Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung and skin. Immunohistochemical evidence by anti-collagen antibodies characterized by immunoelectroblotting. *Am J Pathol.* 1984;116:417-26.

Kreyberg L. Main histological types of primary epithelial lung tumours. *Br J Cancer*. 1961;15:206-10.

Kumar R, Abbas A, DeLancey A, Malone R. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2010.

Kurilizin-Moscal A, Klimiuk PA, Sierakowisk S. Soluble adhesion molecules (VCAM-1, E selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin 1. *Clin Rheumatol*. 2005;24:111-6.

Linsenmayer TF, Fitch JM, Birk DE. Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagens: Controlling elements in corneal morphogenesis. *Ann NY Acad Sci*. 1990;580:143-60.

Luparello C, David F, Campisi G, Sirchia R. T47-D cells and type V collagen: A model for study of apoptotic gene expression by breast cancer cells. *Biol Chem*. 2003;381:965975.

Luparello C, Sirchia R. Type V collagen regulates the expression of apoptotic and stress response genes by breast cancer cells. *J Cell Physiol*. 2005;202:411-21.

Makin AJ, Blann AD, Chung NAY, Silverman SH, Lip GYH. Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells: relationship with Von Willebrand factor and tissue factor. *Eur Heart J*. 2004;25:371-6.

Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB*. 2008;6:2591-9.

Mares DC, Heidler KM, Smith GN, Cummings OW, Harris ER, Foreman BH, Wilkes DS. Type V collagen modulates alloantigen-induced pathology and immunology in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 3:62-70.

Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ*. 2007;14(1):10-22.

Mayne R, Burgeson R. Structure and function of collagen types. In: Ulecham R, editor. *Biology of extracellular matrix*. 20th ed. London: Academic Press; 1993. p.1-37.

Meller WA. Leukocit-endothelial-cell interaction in leukocit transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*. 2003;24:327-34.

Meta M, Ponte M, Guastella M, Semino C, Pietra G, Ratto GB, et al. Detection of oligoclonal T-lymphocytes in lymph nodes draining from advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 1995;40(4):235-40.

Miller EJ, Rhodes RK. Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods Enzymol*. 1982;82(Pt A):33-64.

Modesti A, Kalebic T, Scarpa S, Togo S, Grotendorst G, Liotta LA, Triche TJ. Type V collagen in human amnion is a 12 nm fibrillar component of the pericellular interstitium. *Eur J Cell Biol*. 1984;35:246-55.

Mojcik CHF, Shevah EM. Adhesion molecules. A rheumatologic perspective. *Arthritis Rheum*. 1997;40:991-1004.

Nagata S. Apoptosis by cell death factors. *Cell*. 1999;88:355-65.

Neves AR, Ensina LF, Anselmo LB, Leite KR, Buzaid AC, Camara-Lopes LH, Barbuto JAM. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54:61-6.

Niyibizi C, Fietzek PP, Rest VM. Human placenta type V collagens. Evidence for the existence of an $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$, $\alpha 3(V)$. *Col Mol*. 1984;259:14170-4.

Okano Y, Steen VD, Medsger TA. Autoantibody reactive with RNA polymerase III in systemic sclerosis. *Ann Int Med*. 1993;119:1005-13.

Makin AJ, Blann AD, Chung NAY, Silverman SH, Lip GYH. Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells: Relationship with Von Willebrand factor and tissue factor. *Eur Heart J*. 2004;25:371-6.

Matheus RS, Bernardi FD, Gallo CP, Silva AGP, Rodrigues OR, Capelozzi M, Lopes A, Fenezelian S, Saldiva PHN, Capelozzi VL. Nuclear markers (Star Volume, Mitotic Index, AgNOR and Ki-67) of the primary tumor and its metastasis in non-small cell lung carcinomas. *Pathol Res Practice*. 2004;200:13-23.

Minafra S, Luparello C, Pucci-Minafra I, Sobel ME, Garbisa S. Adhesion of 8701-BC breast cancer cells to type V collagen and 67-kD receptor. *J Cell Sci*. 1992;102:323-8.

Minamoto H, Antonângelo L, Silva AGP, Gallo CP, Andrade e Silva FB, Fenezelian S, Rodrigues OR, Jatene F, Saldiva PHN, Capelozzi VL. Different cell and microenvironment profiles in metastatic and non-metastatic non-small cell lung carcinomas. *Histopathology*. 2003;43:427-43.

Mizobuchi T, Yasufuku K, Zheng Y, Haque MA, Heidler KM, Woods K, Smith GN Jr, Cummings OW, Fujisawa T, Blum JS, Wilkes DS. Differential expression of Smad7 transcripts identifies the CD4+CD45RChigh regulatory T cells that mediate type V collagen-induced tolerance to lung allografts. *J Immunol*. 2003;171(3):1140-7.

Motoi N, Skoze J, Riely GJ, Seshan VE, Kris MG, Rusch VW, Gerald WL, Travis WD. Lung adenocarcinoma: modification of the 2004 WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlations between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(6):810-27.

Nishiyama T, McDonough AM, Bruns RR, et al. Type XII and XIV collagens mediate interactions between banded collagen fibers in vitro and may modulate extracellular matrix deformability. *J Biol Commun*. 2003;308(1):152-158.138.

Ogido LT, Teodoro WR, Velosa AP, de Oliveira CC, Parra ER, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Abnormal collagen deposition in synovia after collagen type V immunization in rabbits. *Histol Histopathol*. 2008;23(3):263-9.

Palucka K.,Banchereau,J. Dendritic Cells: A link Between Innate and Adaptative Immunity. *J Clin Immunol*. 1999;19:12-25.

Parekh TV, Wang XW, Makri-Werzen DM, Greenspan DS, Newman MJ. Type V collagen is na epithelial cell cycle inhibitor that is induced by and mimics the effects of transforming growth factor beta1. *Cell Growth Differ*. 1998;9:423-33.

Parra ER, Kairalla RA, de Carvalho CR, Capelozzi VL. Abnormal deposition of collagen/elastic vascular fibres and prognostic significance in idiopathic interstitial pneumonias. *Thorax*. 2007;62(5):428-37.

Parra ER, Teodoro WR, Velosa AP, de Oliveira CC, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Interstitial and vascular type V collagen morphologic disorganization in usual interstitial pneumonia. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(12):1315-25.

Parra ER, Park JY, Rizzardi F, Takagaki T, Saito DMS, Rodrigues OR, Capelozzi VL. Prognostic indice expression of cyclin-d1, c-erbB-2 and VEGF: metastases vs corresponding primary cancers and metastatic vs non-metastatic adenocarcinomas. *Histol Histopathol*. 2008;23(8):987-93..

Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002;21(48):7435-51.

Pinto CA, Carvalho PEO, Antonângel L, Garippo A, Silva AGP, Soares F, Younes R, Beyruti R, Takagaki TY, Saldiva PHN, Vollmer RT, Capelozzi VL. Morphometric evaluation of tumor matrix metalloproteinase 9 predicts survival after surgical resection in adenocarcinoma of the lung. *Clin Cancer Res*. 2003;9:3098-104.

Pucci-Minafra I, Carela C, Cirincione R, Chimenti S, Minafra S, Luparello C. Type V collagen induces apoptosis of 8701-BC breast cancer cells and enhances Mcl-1 expression. *Breast Cancer Res*. 2000;2:E008.

Raghow R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J*. 1994;8:823-31.

Rodrigues OR, Antonângelo L, Franco Filho EC, Capelozzi VL, Saldiva PHN. Prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in mediastinal lymph nodes metastasis and resected non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 1997;27(5):298-304.

Ruggiero F, Champlaud MF, Garrone R, Aumailley M. Interactions between cells and collagen V molecules or single chains involve distinct mechanisms. *Exp Cell Res*. 1994;210:215-23.

Sallusto P, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and down regulated by tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1994;179:1109-18.

Saito DM, Franco MR, Parra ER, Ab'saber AM, Farhat C, Eher E, Soufen MA, Rodrigues R, Capelozzi VL. Cell cycle regulator in primary lung adenocarcinoma and its haematogenous metastases. *Histopathology*. 2007;50:525-7.

Sandel MH, Dadabayev AR, Menon AG, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res*. 2005;11:2576-82.

Schmitz J, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptorrelated protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005;23:479-90.

Segev F, Heon E, Cole WG, Wenstrup RJ, Young F, Slomovic AR, Rootman DS, Whitaker-Menezes D, Chervoneva I, Birk DE. Structural abnormalities of the cornea and lid resulting from collagen V mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(2):565-73.

Sgonc R, Boeck G, Dietrich H, Gruber J, Recheis H, Wick G. Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Genet.* 1994;10(2):41-2.

Sgonc R. The vascular perspective of systemic sclerosis: of chickens, mice and men. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;120(3):169-76.

Snyder LS, Hertz MI, Harmon KR, Bitterman PB. Failure of lung repair following acute lung injury – regulation of the fibroproliferative response. *Chest.* 1990;98:733-8.

Souza RBC, Borges CTL, Capelozzi VL, Carrasco S, Velosa APP, Teodoro WR, Goldenstein-Schainberg C, Yoshinari NH: Abnormal collagen type V deposition in Lung fibroblast is correlated with a worse pulmonary capacity in scleroderma (SSc). *Arthritis Rheum.* 2005;52(9):s177.

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.

Takai KK, Hattori S, Irie S. Type V collagen distribution in liver is reconstructed in coculture system of hepatocytes and stellate cells; the possible functions of type V collagen in liver under normal and pathological conditions. *Cell Struct Funct.* 2001;26:289-302.

Takanami I, Takeuchi K, Giga M. The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;121:1058-63.

Tataroglu C, Kargi A, Özkal S, Esrefoglu N, Akkoçlu A. Association of macrophages, mast cells and eosinophil leukocytes with angiogenesis and tumor stage in non-small cell lung carcinomas (NSCLC). *Lung Cancer*. 2004;43:47-54.

Teodoro WR, Miron BG, Ogido LT, Velosa APP, Abatepaulo F, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Synovial remodelling process induced by type V collagen immunization in rabbits. *Pathol Res Pract*. 2003;199:605-12.

Teodoro WR, Velosa AP, Witzel SS, Garippo AL, Farhat C, Parra ER, Sonohara S, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Architectural remodelling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Patho. Res Pract*. 2004;200(10):681-91.

Uehara C, Jamnik S. Câncer de pulmão. *Medicina* (Ribeirão Preto). 1998;31:266-7.

UICC - International Union Against Cancer. *TNM classification of malignant tumours*. 7th ed. New York: Wiley-Blackwell; 2009.

Van den Heuvel MM, Sjaak AB. Immunotherapy in non-small-cell lung carcinoma: from inflammation to vaccination. *Clin Lung Cancer*. 2009;10:99-105.

Van der Rest, Garrone R. Collagen family proteins. *FASEB J*. 1991;5:2814-33.

Van Kuppevelt TH, Veerkamp JH, Timmermans JAH. Immunoquantification of type I, III, IV and V collagen in small samples of human lung parenchyma. *Int J Biochem Cell Biol*. 1995;27(8):775-85.

Velosa AP, Teodoro WR, de Oliveira CC, Dos Santos Filho A, Moutinho RF, Santos AG, Vendramini MB, Bueno C, Parra ER, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Collagen V nasal tolerance in experimental model of systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res*. 2007;299(4):177-89.

Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, et al. (2002) Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002;35;23-8.

Yang L, Carbone DP. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction *Adv. Cancer Res*. 2004;92:13-27.

Yasufuku M, Heidler M, O'Donnell P, Cummings OW, Foreman BH, Fujisawa T, Wilkes DS. Oral tolerance induction by type V collagen Downregulates lung allograft. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;25(1):26-34.

Younes RN, Katz A, Buzaid AC, editores. *Câncer de pulmão, tratamento multidisciplinar*. 3a ed. São Paulo: Edição e Design; 2008.

Yoshida S, Haque A, Mizobuchi T, Iwata T, Chiyo M, Webb TJ, Baldrige LA, Heidler KM, Cummings OW, Fujisawa T, Blum JS, Brand DD, Wilkes DS. Anti-type V collagen lymphocytes that express IL-17 and IL-23 induce rejection pathology in fresh and well-healed lung transplants. *Am J Transplant*. 2006;6(4):724-35.

Yoshinari NH, Teodoro WR, Ogido LTI, Velosa APP, Prizon CP, Miron B, Bissoli JCC, Cuentas ERP, Capelozzi VL. Modelo experimental de doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC) induzido por colágeno do tipo V. *Rev Bras Reumatol*. 2002;42:295-305.

Yoshinari NH, Callado MR, Velosa APP, Viana VTS, Goldeinstein-Schainberg C, Carrasco S, Bezerra MC, Ogido LT, Oliveira CC, Capelozzi VL, Teodoro WR. Experimental model of scleroderma induced in rabbits. *Arthritis Rheum.* 2005;52(9):s369.

Walchii C, Koch M, Chiquet M. Tissue-specific expression of the fibril-associated collagen XII and XIV. *J Cell Sci.* 1994;107(Pt 2):669-81.

elsh T , Green RH, Richardson D, aller DA, O'B rne , Bradding P. Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:8959-67.

Wilkes DS. The role of autoimmunity in the pathogenesis of lung allograft rejection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2003;51(4):227-30.

Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res.* 2003;90:127-56.

Zander DS, Popper HH, Jagirdar J, Haque AK, Cagle PT, Barrios R. *Molecular pathology of lung disease.* New York: Springer; 2008.

Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Rev Cancer.* 2005;5:263-73.

Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes: a new member of the Ig superfamily. *J Immunol.* 1992;149:735-42.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Médias dos Colágenos I, III e V no microambiente tumoral e não tumoral dos 65 casos de CNPC

Caso	Colágeno I tumoral	Colágeno I não tumoral	Colágeno III tumoral	Colágeno III não tumoral	Colágeno V tumoral	Colágeno V não tumoral
21-2601-0	4,20	4,26	7,05	47,30	0,06	0,20
23-7102-2	0,21	0,20	12,24	18,50	0,02	0,58
30-2350-8	9,20	0,20	9,19	27,08	0,03	0,22
31-6502-7	1,83	...	0,66	...	5,22	...
32-7135-8	1,02	2,37	5,48	21,70	12,77	24,13
37-0221-9	6,27	6,48	0,40	8,53	0,96	1,02
40-7025-9	8,50	4,38	9,27	20,45	4,76	7,95
44-2691-6	0,57	2,23	10,35	24,85	8,93	19,49
45-0200-0	1,11	3,25	4,87	21,77	9,39	20,12
50-4130-9	2,82	...	6,01	...	4,24	...
52-0765-7	0,87	...	17,70	...	19,65	...
52-9524-6	7,88	16,93	3,72	19,17	10,56	26,34
55-2154-8	9,03	10,27	2,84	19,69	21,00	35,18
56-6910-3	9,87	...	21,28	...	32,33	...
56-9392-6	0,91	...	5,23	...	23,78	...
58-7031-3	3,25	2,92	13,01	25,88	0,20	1,80
58-8721-6	1,69	4,58	0,87	32,55	13,32	1,47
59-1595-3	4,58	6,35	16,99	20,80	2,01	10,35
59-3657-8	4,75	7,33	6,38	45,71	1,36	6,25
59-6085-1	0,74	...	17,20	...	18,70	...
60-0991-3	0,32	1,25	9,59	14,76	5,76	10,72
60-2098-4	3,49	...	12,83	...	11,40	...
60-4220-1	1,45	...	3,35	...	39,37	...
61-3883-7	2,26	...	3,88	...	13,32	...
61-3994-9	2,24	3,25	4,00	17,15	14,89	27,22
61-7620-8	1,21	2,57	1,87	2,45	13,18	35,84
62-49531	1,02	2,37	5,48	21,70	0,17	2,03
63-0200-9	3,32	...	9,84	...	12,40	...
63-0381-1	0,60	1,25	9,90	4,68	1,68	1,86
63-5595-1	0,45	...	4,78	...	11,40	...
647573-6	0,77	0,44	0,01	1,31	20,95	25,08
65-0752-2	1,02	...	31,76	...	15,85	...
65-1176-7	0,58	...	17,35	...	17,57	...
65-1772-2	4,59	...	16,65	...	8,15	...
65-2810-4	2,78	3,09	9,74	14,59	15,17	19,40
65-3668-9	4,72	...	12,71	...	11,44	...
66-1922-3	6,61	6,43	3,16	29,34	2,37	11,18
66-7653-7	2,23	2,32	6,29	6,62	11,58	34,72
68-6351-5	0,87	1,27	0,92	5,60	7,04	22,52

Continua

Apêndice 1 - Médias dos Colágenos I, III e V no microambiente tumoral e não tumoral dos 65 casos de CNPC

Continuação

Paciente	Colágeno I tumoral	Colágeno I não tumoral	Colágeno III tumoral	Colágeno III não tumoral	Colágeno V tumoral	Colágeno V não tumoral
70-5416-5	2,21	...	5,78	...	1,44	...
70-7051-9	0,14	4,58	6,98	27,52	10,99	16,82
71-0369-7	1,92	6,48	20,48	26,91	4,97	14,26
71-0605-0	0,43	...	4,29	...	6,40	...
71-5138-1	3,97	8,46	12,23	3,22	23,92	34,07
72-4884-9	3,25	...	9,22	...	28,58	...
72-5094-0	0,45	4,94	2,78	3,45	23,64	34,53
92-10009	0,83	4,21	4,35	18,34	4,92	11,31
69-2397-6	0,87	4,23	7,41	2,21	4,26	13,97
39-1088-1	6,91	3,23	0,44	1,23	11,60	23,85
41-6186-6	7,96	9,23	1,25	5,51	12,89	6,52
46-3085-8	2,33	3,54	0,55	1,47	6,42	21,89
51-8820-2	0,14	1,25	8,83	10,25	2,76	12,03
51-9727-9	2,11	4,78	0,16	0,74	9,25	18,39
52-4935-0	0,57	2,33	2,79	5,27	7,19	23,62
52-7784-1	0,33	2,65	0,15	1,56	7,39	33,94
53-8424-9	0,97	2,21	0,69	17,20	10,02	15,25
54-5512-0	0,82	3,54	0,92	1,88	11,48	34,96
56-1853-3	0,32	3,22	0,41	1,15	19,19	28,97
56-2756-7	2,91	4,58	0,51	1,24	9,38	21,77
57-4914-0	1,58	2,39	0,74	2,32	21,03	27,75
60-2105-0	1,60	4,12	0,58	3,25	14,93	19,03
60-7032-9	3,37	6,73	2,57	5,28	5,37	16,69
65-5159-9	2,17	6,32	2,21	7,78	9,16	12,67
68-9410-0	0,52	1,86	0,98	2,16	5,70	14,87
73-0431-5	1,57	3,47	1,25	2,25	6,63	10,33

Apêndice 2 – Médias das Caspases 5 e 6 no epitélio e endotélio das células tumorais e não tumorais dos 65 casos de CNPC

Paciente	Caspase 5 epitélio tumoral	Caspase 5 endotélio tumoral	Caspase 5 epitélio não tumoral	Caspase 5 endotélio não tumoral	Caspase 6 epitélio tumoral	Caspase 6 endotélio tumoral	Caspase 6 epitélio não tumoral	Caspase 6 endotélio não tumoral
21-2601-0	0,12	0,00	1,46	0,00	9,03	1,20	3,17	0,00
23-7102-2	0,12	0,00	0,80	0,00	7,81	10,15	12,12	18,18
30-2350-8	0,00	0,00	2,13	0,00	0,00	0,00	7,81	1,56
31-6502-7	0,46	0,00	...	...	3,00	8,23	...	...
32-7135-8	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
37-0221-9	0,00	0,00	1,14	0,00	2,10	1,26	0,00	0,00
40-7025-9	0,13	0,00	0,00	0,00	2,87	5,26	6,10	12,19
44-2691-6	0,00	0,00	0,00	0,00	10,48	8,64	16,04	1,37
45-0200-0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,68	6,72	2,38	7,14
50-4130-9	0,00	0,00	...	...	27,39	3,18	...	...
52-0765-7	0,00	0,00	...	...	1,36	3,63	...	...
52-9524-6	0,11	0,00	0,55	0,00	3,68	6,13	5,75	3,83
55-2154-8	0,00	0,00	0,42	0,00	1,07	3,21	4,44	3,33
56-6910-3	0,00	0,00	...	...	2,76	6,90	...	...
56-9392-6	0,11	0,00	...	...	2,58	5,15	...	...
58-7031-3	0,23	0,00	2,33	0,00	2,72	4,08	3,83	6,90
58-8721-6	0,11	0,00	0,36	0,00	1,59	7,14	11,60	12,25
59-1595-3	0,11	0,00	0,00	0,63	8,90	0,68	3,42	1,70
59-3657-8	0,00	0,00	0,00	0,00	1,47	0,98	5,71	7,62
59-6085-1	0,00	0,00	...	...	1,66	4,45	...	...
60-0991-3	0,00	0,00	0,64	0,27	4,02	2,41	1,31	1,25
60-2098-4	00,0	0,00	...	...	0,99	1,74	...	...
60-4220-1	0,00	0,00	...	...	25,82	2,75	...	...
61-3883-7	0,00	0,00	...	...	14,06	16,41	...	...
61-3994-9	0,55	0,00	0,00	0,00	4,61	0,38	0,95	2,86
61-7620-8	0,11	0,00	0,00	0,00	5,34	1,53	3,33	2,22
62-49531	0,11	0,00	0,00	0,00	1,85	3,70	6,38	12,76
63-0200-9	0	0,00	...	...	4,88	11,38	...	...
63-0381-1	0	0,00	0,00	0,00	32,71	1,85	1,45	0,00
63-5595-1	0	0,00	...	...	5,97	7,46	...	...
647573-6	0	0,00	...	...	3,16	7,59	...	...
65-0752-2	0	0,00	...	...	0,64	1,27	...	...
65-1176-7	0	0,00	...	...	10,14	1,45	...	...
65-1772-2	0	0,00	...	...	2,14	3,97	...	...
65-2810-4	0,57	0,00	0,00	0,00	4,31	6,90	1,45	0,00
65-3668-9	0	0,00	...	...	3,01	0,50	...	...
66-1922-3	0	0,00	0,00	0,00	4,44	8,89	0,00	0,00
66-7653-7	0	0,00	0,52	0,00	1,97	0,00	0,00	0,00
68-6351-5	0	0,00	0,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Continua

Apêndice 2 – Médias das Caspases 5 e 6 no epitélio e endotélio das células tumorais e não tumorais dos 65 casos de CNPC

Continuação

Paciente	Caspase 5 epitélio tumoral	Caspase 5 endotélio tumoral	Caspase 5 epitélio não tumoral	Caspase 5 endotélio não tumoral	Caspase 6 epitélio tumoral	Caspase 6 endotélio tumoral	Caspase 6 epitélio não tumoral	Caspase 6 endotélio não tumoral
70-5416-5	0,11	0,00	...	...	4,14	7,59		...
70-7051-9	0,36	0,00	1,65	0,00	1,47	2,94	2,08	6,25
71-0369-7	0,23	0,00	2,38	0,00	3,42	3,42	0,00	0,00
71-0605-0	0,33	0,00	...	...	3,75	5,25	...	...
71-5138-1	0,00	0,00	...	...	9,52	12,70	...	...
72-4884-9	0,33	0,00	...	...	2,88	3,60	...	...
72-5094-0	0,10	0,00	0,00	0,00	2,54	2,03	0,00	0,00
92-10009	0,15	0,00	0,76	0,00	11,20	14,40	0,00	0,00
69-2397-6	0,00	0,00	0,47	0,00	8,69	7,83	0,00	0,00
39-1088-1	0,00	0,00	0,00	0,00	13,18	5,09	0,00	0,00
41-6186-6	0,00	0,00	0,44	0,00	3,03	5,45	0,00	0,00
46-3085-8	0,00	0,00	0,00	0,00	3,57	5,71	0,00	0,00
51-8820-2	1,1	0,00	0,00	0,00	21,29	4,51	7,86	3,74
51-9727-9	0,27	0,00	0,00	0,00	3,95	5,92	2,97	3,96
52-4935-0	0,15	0,00	0,65	0,00	6,37	10,19	0,00	0,00
52-7784-1	0,00	0,00	0,00	0,00	6,98	6,52	0,00	0,00
53-8424-9	0,00	0,00	0,00	0,00	11,46	3,12	2,81	5,63
54-5512-0	0,00	0,00	0,00	0,00	2,70	4,95	0,00	0,00
56-1853-3	0,13	0,00	0,00	0,00	8,63	13,67	0,00	0,00
56-2756-7	0,66	0,00	6,49	0,00	4,76	5,44	0,00	0,00
57-4914-0	0,00	0,00	0,84	0,00	27,27	9,09	0,00	0,00
60-2105-0	0,25	0,00	0,00	0,00	5,75	1,44	0,00	0,00
60-7032-9	0,00	0,00	0,28	0,00	3,42	4,25	0,00	0,00
65-5159-9	0,00	0,00	0,00	0,34	4,83	7,26	8,57	7,14
68-9410-0	0,00	0,00	0,35	0,00	3,59	2,99	6,25	9,72
73-0431-5	0,13	0,00	0,50	0,00	0,00	2,11	0,00	0,00

Apêndice 3 – Médias das Caspases 8 e 9 no epitélio e endotélio das células tumorais e não tumorais dos 65 casos de CNPC

Paciente	Caspase 8 epitélio tumoral	Caspase 8 endotélio tumoral	Caspase 8 epitélio não tumoral	Caspase 8 endotélio não tumoral	Caspase 9 epitélio tumoral	Caspase 9 endotélio tumoral	Caspase 9 epitélio não tumoral	Caspase 9 endotélio não tumoral
21-2601-0	6,89	4,02	1,33	1,01	6,91	0,00	1,07	0,00
23-7102-2	16,85	0,00	2,41	1,72	14,59	2,16	0,00	0,00
30-2350-8	6,82	3,98	6,85	9,59	0,81	3,68	0,74	0,00
31-6502-7	9,93	4,96	...	...	0,01	10,99	...	...
32-7135-8	4,89	0,00	3,84	6,41	1,43	1,91	4,83	5,16
37-0221-9	4,82	1,8	...	...	0,00	0,00	...	...
40-7025-9	2,68	3,35	3,52	0,00	0,00	0,68	1,91	1,27
44-2691-6	12,82	0,00	2,56	3,85	0,00	0,41	2,50	0,63
45-0200-0	0,95	1,90	16,18	4,58	0,00	0,68	0,00	0,29
50-4130-9	7,06	0,60	...	...	0,00	12,26	...	...
52-0765-7	5,8	2,69	...	...	0,00	0,43	...	...
52-9524-6	8,6	1,01	12,35	14,58	5,82	1,94	6,03	0,00
55-2154-8	17,73	0,00	5,51	7,87	0,00	4,66	0,00	0,00
56-6910-3	14,79	1,4	...	...	0,00	1,19	...	...
56-9392-6	6,57	0,00	...	...	0,31	2,48	...	...
58-7031-3	9,02	2,25	15,09	0,94	0,27	0,82	0,00	0,00
58-8721-6	4,77	3,7	9,6	2,25	2,33	7,01	0,00	0,00
59-1595-3	12,8	0,00	6,82	3,41	0,00	0,00	8,06	1,29
59-3657-8	7,33	6,03	6,59	3,58	0,00	6,02	0,00	0,00
59-6085-1	5,26	0,00	...	...	0,00	0,00	...	...
60-0991-3	3,22	1,26	8,64	4,94	0,00	6,91	...	0,00
60-2098-4	7,36	0,86	...	...	2,42	5,40	...	...
60-4220-1	3,29	1,97	...	...	6,32	7,59	...	...
61-3883-7	10,11	3,35		...	2,42	7,27	...	...
61-3994-9	14,9	0,48	4,35	5,8	0,00	3,28	4,69	8,96
61-7620-8	5,97	2,24	6,66	3,85	0,00	0,98	2,16	0,90
62-49531	6,56	5,05	4,65	2,79	4,80	0,48	10,68	0,00
63-0200-9	4,91	4,29	...	...	0,54	10,98	...	...
63-0381-1	2,32	0,77	2,22	2,85	0,00	4,64	5,26	0,13
63-5595-1	12,41	1,38	...	...	1,94	5,82	...	...
647573-6	15,25	2,58	...	...	1,36	4,56	...	...
65-0752-2	6,64	3,78	...	...	0,00	2,16	...	...
65-1176-7	2,08	4,17	...	...	0,29	3,21	...	...
65-1772-2	8,25	3,58	...	...	0,29	3,21	...	...
65-2810-4	5,02	8,89	1,08	2,54	0,00	3,32	0,64	6,99
65-3668-9	7,44	4,96	...	...	0,00	1,91	...	...
66-1922-3	13,65	1,32	1,86	5,08	0,00	0,50	11,41	0,55
66-7653-7	1,25	0,62	2,90	16,29	0,64	0,00	0,32	2,58
68-6351-5	4,65	2,32	2,59	3,39	0,00	7,91	1,05	5,77

Continua

Apêndice 3 – Médias das Caspases 8 e 9 no epitélio e endotélio das células tumorais e não tumorais dos 65 casos de CNPC
Continuação

Paciente	Caspase 8 epitélio tumoral	Caspase 8 endotélio tumoral	Caspase 8 epitélio não tumoral	Caspase 8 endotélio não tumoral	Caspase 9 epitélio tumoral	Caspase 9 endotélio tumoral	Caspase 9 epitélio não tumoral	Caspase 9 endotélio não tumoral
70-5416-5	14,34	2,61	...	...	0,00	6,02	...	...
70-7051-9	2,7	15,24	4,87	2,64	0,00	9,47	8,20	0,93
71-0369-7	5,47	1,49	5,11	4,17	5,77	0,32	3,19	1,30
71-0605-0	11,14	1,11	...	...	0,00	2,20	...	...
71-5138-1	9,01	3,06	...	...	0,00	0,00	...	...
72-4884-9	1,82	2,02	...	...	0,00	0,00	...	...
72-5094-0	15,24	5,68	5,42	1,96	27,09	1,97	8,34	1,30
92-10009	5,23	1,96	3,12	5,66	0,00	6,36	3,75	3,59
69-2397-6	12,14	7,85	4,54	5,15	6,42	0,00	0,00	2,71
39-1088-1	10,21	4,25	8,16	2,24	5,71	0,00	0,00	0,00
41-6186-6	1,25	0,62	8,69	3,62	0,00	0,00	12,84	4,39
46-3085-8	3,41	1,46	2,25	6,23	0,00	0,00	8,33	12,77
51-8820-2	7,92	3,04	1,96	2,25	5,22	0,00	6,90	1,21
51-9727-9	2,87	4,3	7,3	3,12	11,17	0,00	0,00	1,13
52-4935-0	12,41	4,76	3,96	1,09	13,66	0,00	7,27	3,04
52-7784-1	8,09	4,38	9,61	1,92	0,00	0,00	0,00	8,92
53-8424-9	2,24	2,69	7,14	1,19	8,60	0,00	0,00	8,92
54-5512-0	4,4	6,29	4,54	1,15	7,10	0,00	0,00	17,42
56-1853-3	5,05	3,21	4,25	1,06	0,00	0,00	6,72	0,10
56-2756-7	6,13	0,94	8,86	6,52	7,24	7,69	3,90	2,17
57-4914-0	3,41	1,46	5,36	3,25	10,05	0,00	10,34	3,80
60-2105-0	2,83	4,71	3,25	2,23	0,00	0,03	0,00	0,06
60-7032-9	15,52	4,15	5,82	1,65	10,07	0,00	0,00	2,16
65-5159-9	4,2	1,20	2,43	1,21	9,27	0,66	7,46	4,67
68-9410-0	7,62	4,52	2,32	1,09	6,95	0,00	0,00	0,84
73-0431-5	7,92	1,98	1,12	0,00	0,00	0,07	0,00	4,48

Apêndice 4 – Médias do TUNEL no epitélio e endotélio e Laminina no epitélio das células tumorais e não tumorais dos 65 casos de CNPC

Continua

Paciente	TUNEL epitélio tumoral	TUNEL endotélio tumoral	TUNEL epitélio não tumoral	TUNEL endotélio não tumoral	Laminina epitélio tumoral	Laminina epitélio não tumoral
21-2601-0	26,90	0,00	14,68	7,07	50,84	55,07
23-7102-2	16,67	0,00	3,94	2,94	33,00	50,84
30-2350-8	11,87	0,00	6,09	6,52	10,85	48,06
31-6502-7	3,90	0,00	...	...	23,19	...
32-7135-8	17,64	0,00	8,10	3,28	13,86	35,57
37-0221-9	3,28	0,00	3,26	0,00	18,15	39,49
40-7025-9	3,32	0,00	10,14	0,00	50,36	0,00
44-2691-6	0,00	0,00	13,18	8,00	18,01	42,78
45-0200-0	13,09	2,13	9,26	10,12	47,69	30,02
50-4130-9	6,22	0,00	...	...	8,27	...
52-0765-7	13,11	0,00	...	...	9,83	...
52-9524-6	10,46	0,00	8,08	4,00	10,49	46,62
55-2154-8	2,94	0,00	18,07	0,00	27,78	46,28
56-6910-3	8,67	0,00	...	...	23,65	...
56-9392-6	1,16	0,00	...	...	13,85	...
58-7031-3	8,74	0,00	0,00	9,09	17,93	56,76
58-8721-6	4,88	0,00	0,00	16,88	1,60	60,52
59-1595-3	4,74	0,00	19,04	0,00	46,03	60,94
59-3657-8	0,00	0,00	5,68	0,00	21,84	38,55
59-6085-1	8,86	0,00	...	...	26,02	...
60-0991-3	2,27	0,00	15,38	...	30,09	46,60
60-2098-4	5,03	0,00	...	...	33,92	...
60-4220-1	10,37	0,00	...	...	19,30	...
61-3883-7	0,00	0,00	...	...	35,59	...
61-3994-9	10,24	0,00	0,00	0,00	21,86	52,04
61-7620-8	10,32	0,00	0,00	0,00	0,00	33,77
62-49531	15,67	0,00	23,11	0,00	68,49	54,87
63-0200-9	4,28	0,00	...	...	0,00	...
63-0381-1	19,04	0,00	17,65	0,00	14,01	44,91
63-5595-1	15,38	0,00	...	...	23,61	...
647573-6	11,44	0,00	...	...	14,91	...
65-0752-2	13,52	0,00	...	...	34,34	...
65-1176-7	0,00	0,00	...	...	10,12	...
65-1772-2	1,18	0,78	...	...	12,88	...
65-2810-4	5,62	0,00	29,25	0,00	23,12	80,34
65-3668-9	9,65	1,31	...	...	0,00	...
66-1922-3	9,05	2,89	8,36	0,00	33,33	55,39
66-7653-7	5,03	0,00	8,36	0,00	38,29	37,11
68-6351-5	0,27	0,00	17,24	0,00	1,29	54,87

Continua

Apêndice 4 – Médias do TUNEL no epitélio e endotélio e Laminina no epitélio das células tumorais e não tumorais dos 65 casos de CNPC

Continuação

Paciente	TUNEL epitélio tumoral	TUNEL endotélio tumoral	TUNEL epitélio não tumoral	TUNEL endotélio não tumoral	Laminina epitélio tumoral	Laminina epitélio não tumoral
70-5416-5	9,09	0,00	...	...	48,19	
70-7051-9	0,00	0,00	4,35	2,30	31,12	73,68
71-0369-7	2,90	0,00	11,76	2,21	13,55	63,77
71-0605-0	6,38	0,00	...	...	10,20	...
71-5138-1	5,58	0,00	...	...	32,65	...
72-4884-9	8,35	1,25	...	...	3,80	...
72-5094-0	5,88	0,00	9,28	0,00	7,57	51,61
92-10009	9,35	0,00	12,58	0,00	0,00	0,00
69-2397-6	0,00	6,22	0,00	0,00	33,33	0,00
39-1088-1	0,00	0,00	0,00	0,00	15,30	31,70
41-6186-6	0,00	0,00	0,00	0,00	8,86	59,77
46-3085-8	0,00	0,00	4,56	0,00	12,25	0,00
51-8820-2	0,00	0,00	0,00	0,00	37,78	0,00
51-9727-9	0,00	4,13	0,00	0,00	19,61	23,47
52-4935-0	0,00	0,00	0,00	0,00	15,20	57,14
52-7784-1	0,00	0,00	12,28	0,00	5,11	0,00
53-8424-9	0,00	0,00	16,95	0,00	8,34	50,35
54-5512-0	0,00	3,60	0,00	0,00	35,32	45,56
56-1853-3	0,00	0,00	0,00	0,00	39,74	39,74
56-2756-7	0,00	0,00	0,00	0,00	42,78	30,27
57-4914-0	0,00	0,00	0,00	0,00	3,03	44,04
60-2105-0	0,00	0,00	17,39	0,00	55,12	37,41
60-7032-9	0,00	0,00	10,14	0,00	16,44	59,14
65-5159-9	0,00	0,00	0,00	0,00	9,09	26,97
68-9410-0	1,82	10,90	0,00	0,00	11,47	50,82
73-0431-5	0,00	7,42	0,00	0,00	22,69	53,21

Apêndice 5 – Médias dos marcadores de células imunes CD3, CD4, CD8 e CD20 no microambiente tumoral e não tumoral dos 65 casos de CNPC

Paciente	CD3 tumoral	CD3 não tumoral	CD4 tumoral	CD4 Não tumoral	CD8 tumoral	CD8 não tumoral	CD20 tumoral	CD20 não tumoral
21-2601-0	5,45	0,33	80,65	3,41	0,76	1,87	1,03	0,00
23-7102-2	2,41	2,27	2,04	6,15	0,00	2,00	0,22	0,00
30-2350-8	13,42	1,20	11,76	22,22	1,13	1,79	0,65	0,65
31-6502-7	0,00	...	0,00	...	0,00	...	0,00	...
32-7135-8	3,37	2,10	160,91	4,17	0,89	0,91	0,00	0,00
37-0221-9	1,48	2,67	1,54	4,55	1,85	1,48	1,11	0,00
40-7025-9	4,94	1,56	10,53	11,11	0,62	1,12	0,00	0,73
44-2691-6	1,60	2,84	0,00	6,67	0,81	4,46	0,49	0,00
45-0200-0	5,15	4,80	9,62	38,83	2,44	0,78	0,00	0,00
50-4130-9	7,62	...	37,58	...	1,07	...	0,91	...
52-0765-7	0,95	...	12,70	...	0,92	...	0,00	...
52-9524-6	15,52	2,16	19,38	3,77	1,13	2,93	0,00	0,43
55-2154-8	4,64	1,03	32,05	14,28	1,44	0,69	1,25	0,00
56-6910-3	19,93	1,53	45,02	...	7,14	...	0,00	...
56-9392-6	3,52	...	8,84	...	1,30	...	0,28	...
58-7031-3	8,47	5,93	6,47	10,53	1,42	2,94	0,00	0,00
58-8721-6	0,00	2,98	7,66		1,12	1,28	2,29	0,00
59-1595-3	34,27	2,61	2,67		5,43	0,98	0,00	0,00
59-3657-8	8,73	3,58	82,51	113,92	2,25	4,05	0,67	0,00
59-6085-1	4,81	...	4,82	...	1,06	...	0,00	0,00
60-0991-3	4,98	1,85	4,85	13,21	1,20	0,23	1,34	0,00
60-2098-4	0,00	...	11,70	...	1,50	...	0,25	...
60-4220-1	3,80	...	1,76	...	0,83	...	0,00	...
61-3883-7	0,00	...	2,81	...	1,43	...	0,00	...
61-3994-9	1,76	1,58	3,86	1,64	1,03	0,72	0,00	0,00
61-7620-8	11,07	1,97	16,38	4,84	1,27	1,48	3,90	0,00
62-49531	2,49	2,97	4,98	2,67	0,32	1,51	0,00	0,00
63-0200-9	0,00	...	0,00	...	0,00	...	0,00	...
63-0381-1	5,12	3,27	8,37	9,80	1,62	1,12	0,00	0,00
63-5595-1	0,00	...	0,00	...	0,00	...	0,12	...
647573-6	5,06	...	4,73	...	1,31	...	0,00	...
65-0752-2	0,00	...	7,29	...	0,54	...	0,00	...
65-1176-7	11,89	...	5,81	...	1,36	...	1,62	...
65-1772-2	5,54	...	10,88	...	1,63	...	0,00	...
65-2810-4	7,50	2,67	1,30	7,14	2,40	0,34	0,12	0,00
65-3668-9	0,00	...	0,00	...	4,83	...	0,11	...
66-1922-3	14,11	4,75	58,41	8,64	2,17	2,72	0,56	0,00
66-7653-7	1,72	1,47	6,35	14,63	1,02	0,49	0,12	0,47
68-6351-5	6,61		9,84	18,60	1,23	0,76	0,22	0,46

Continua

Apêndice 5 – Médias dos marcadores de células imunes CD3, CD4, CD8 e CD20 no microambiente tumoral e não tumoral dos 65 casos de CNPC

Continuação

Paciente	CD3 tumoral	CD3 não tumoral	CD4 tumoral	CD4 Não tumoral	CD8 tumoral	CD8 não tumoral	CD20 tumoral	CD20 não tumoral
70-5416-5	0,00	...	0,00	...	0,00	...	0,00	...
70-7051-9	9,03	4,55	3,24	5,77	1,63	0,85	0,73	0,00
71-0369-7	0,00		16,16	2,50	2,39	2,53	0,00	0,41
71-0605-0	0,00	...	1,26	...	1,81	...	0,54	...
71-5138-1	0,00	...	35,20	...	2,31	...	0,32	...
72-4884-9	0,00	...	33,05	...	1,01	...	1,32	...
72-5094-0	18,13	0,58	11,88	15,12	0,00	0,42	0,43	0,54
92-10009	5,98	0,80	104,14	0,00	2,81	2,97	4,25	0,54
69-2397-6	28,93	0,84	16,87	5,26	8,23	0,93	8,41	0,00
39-1088-1	0,84	1,89	1,96	1,96	0,62	2,74	0,24	0,00
41-6186-6	2,68	0,00	1,77	19,27	3,30	1,34	1,25	0,00
46-3085-8	0,65	0,57	1,39	0,00	2,23	2,60	0,43	0,00
51-8820-2	3,49	0,82	0,90	40,76	2,17	1,37	0,11	1,00
51-9727-9	1,49	3,93	0,87	3,68	1,32	3,03	0,62	0,00
52-4935-0	2,75	1,19	1,80	0,91	1,16	0,78	1,03	0,00
52-7784-1	4,23	4,80	1,60	0,63	0,60	2,09	0,26	0,00
53-8424-9	0,60	2,85	0,47	1,15	2,65	3,25	0,55	0,37
54-5512-0	3,27		1,32	3,59	3,21	1,30	0,00	0,00
56-1853-3	3,86	2,39	0,00	0,78	0,89	0,74	0,00	0,35
56-2756-7	1,03	2,77	0,54	0,70	0,31	2,15	0,00	0,00
57-4914-0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00
60-2105-0	2,29	0,30	0,00	0,00	0,61	0,42	0,00	0,00
60-7032-9	5,09	5,61	2,73	0,00	3,26	1,98	0,00	1,01
65-5159-9	3,07	0,61	0,38	1,42	1,22	1,52	0,00	0,00
68-9410-0	0,00	0,47	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00
73-0431-5	4,13	0,00	3,23	0,80	2,22	1,44	0,00	0,00

Apêndice 6 – Médias dos marcadores de citocina IL4, IL6, IL8 e TGF no microambiente tumoral e não tumoral dos 65 casos de CNPC

Paciente	IL4 tumoral	IL4 não tumoral	IL6 tumoral	IL6 não tumoral	IL8 tumoral	IL8 não tumoral	TGF- β tumoral	TGF- β não tumoral
21-2601-0	0,42	0,00	2,24	0,00	1,46	0,00	4,37	21,43
23-7102-2	1,55	0,00	1,12	1,25	0,00	0,00	2,08	7,87
30-2350-8	0,00	0,00	1,02	0,00	0,00	0,00	2,41	0,00
31-6502-7	0,00	...	2,15	...	2,12	...	0,86	...
32-7135-8	2,83	0,00	2,1	1,5	0,00	15,12	0,00	11,71
37-0221-9	1,06	27,27	1,47	0,32	0,00	23,14	2,49	14,68
40-7025-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,45	3,51
44-2691-6	0,00	0,00	0,52	1,01	0,52	11,70	0,00	4,44
45-0200-0	0,53	0,00	2,11	0,00	0,00	0,00	0,00	15,24
50-4130-9	11,60	...	1,87	...	0,00	...	0,68	...
52-0765-7	0,00	...	6,25	...	0,00	...	0,00	...
52-9524-6	0,42	0,00	1,24	2,32	1,24	0,00	0,51	9,09
55-2154-8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,53	9,56
56-6910-3	0,00	0,00	0,00	...	0,00	...	2,25	...
56-9392-6	0,00	...	0,00	...	0,00	...	0,00	...
58-7031-3	0,00	12,50	1,25	10,21	0,00	10,21	3,76	4,96
58-8721-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,75	15,13
59-1595-3	0,00	6,67	1,74	5,57	0,00	5,57	7,14	20,69
59-3657-8	4,20	0,00	1,02	0,00	1,02	0,00	6,04	0,00
59-6085-1	0,00	...	0,00	...	0,00	...	4,54	5,22
60-0991-3	0,00	0,00	2,29	6,12	0,00	6,21	11,11	8,45
60-2098-4	0,00	...	3,33	...	3,25	...	1,52	...
60-4220-1	0,00	...	2,65	...	0,00	...	0,00	...
61-3883-7	0,00	...	1,17	...	0,00	...	0,00	...
61-3994-9	0,00	0,00	2,29	0,00	0,00	0,00	0,00	21,20
61-7620-8	0,00	0,00	0,00	3,32	0,00	3,32	3,27	9,68
62-49531	0,00	0,00	1,25	0,00	0,00	0,00	3,64	7,29
63-0200-9	0,75	...	0,00	...	0,00	...	6,01	...
63-0381-1	0,00	0,00	2,28	2,21	2,28	2,21	2,61	9,22
63-5595-1	0,00	...	3,35	...	0,00	...	0,00	...
647573-6	0,00	...	2,59	...	0,00	...	1,40	...
65-0752-2	0,00	...	3,21	...	0,00	...	5,60	...
65-1176-7	0,88	...	2,14	...	2,14	...	0,00	...
65-1772-2	0,00	...	2,65	...	0,00	...	7,29	...
65-2810-4	0,00	0,00	3,45	5,68	0,00	5,68	0,49	0,00
65-3668-9	0,00	...	0,00	...	0,00	...	3,63	...
66-1922-3	0,00	0,00	1,21	12,57	1,12	12,57	0,00	23,40
66-7653-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,56	4,69
68-6351-5	0,47	0,00	0,87	0,00	0,78	0,00	2,47	9,30

Continua

Apêndice 6 – Médias dos marcadores de citocina IL4, IL6, IL8 e TGF no microambiente tumoral e não tumoral dos 65 casos de CNPC

Continuação

Paciente	IL4 tumoral	IL4 não tumoral	IL6 tumoral	IL6 não tumoral	IL8 tumoral	IL8 não tumoral	TGF- β tumoral	TGF- β tumoral
70-5416-5	3,65	...	0,00	...	0,00	...	0,00	...
70-7051-9	0,00	0,00	0,00	1,48	0,00	11,47	0,00	20,18
71-0369-7	3,89	0,00	2,75	0,00	2,21	0,00	5,42	15,22
71-0605-0	0,60	...	1,14	...	0,00	...	2,03	...
71-5138-1	0,00	...	4,88	...	4,58	...	6,53	...
72-4884-9	0,00	...	3,02	...	0,00	...	1,77	...
72-5094-0	1,94	14,28	1,98	0,57	0,00	0,00	6,91	18,67
92-10009	3,67	0,00	4,47	0,28	4,44	0,00	0,00	27,90
69-2397-6	0,00	0,00	6,35	2,25	0,00	3,14	2,18	5,80
39-1088-1	0,00	6,67	0,00	1,05	0,00	0,00	0,73	10,87
41-6186-6	0,53	0,00	2,45	0,00	0,00	0,00	0,00	15,24
46-3085-8	0,00	0,00	1,11	0,00	0,00	0,00	0,99	24,67
51-8820-2	1,45	0,00	9,36	3,14	0,00	15,47	5,75	14,41
51-9727-9	0,47	0,00	7,55	0,00	0,00	0,00	2,30	0,00
52-4935-0	0,00	28,57	2,51	0,00	2,15	11,25	5,21	12,36
52-7784-1	0,00	0,00	2,3	0,14	2,31	0,00	0,00	0,00
53-8424-9	0,00	0,00	1,18	7,88	3,18	0,00	0,00	0,00
54-5512-0	0,00	0,00	2,56	6,55	1,16	0,00	0,85	0,00
56-1853-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,11	25,30
56-2756-7	1,50	0,00	7,56	1,02	0,00	0,00	0,55	0,00
57-4914-0	0,00	0,00	2,69	0,56	0,00	0,00	0,84	0,00
60-2105-0	0,00	0,00	4,22	1,14	0,00	0,00	3,25	0,00
60-7032-9	6,19	0,00	1,16	0,00	0,58	0,00	2,56	0,00
65-5159-9	1,54	0,00	0,00	5,23	0,00	0,00	3,76	0,00
68-9410-0	0,00	0,00	3,25	0,87	0,00	0,00	0,93	18,71
73-0431-5	0,00	0,00	5,51	1,26	0,00	0,00	2,30	0,00

Apêndice 7 – Médias dos marcadores de células dendríticas Cd1a, S-100, CD68 e CD56 no microambiente tumoral e não tumoral dos 65 casos de CNPC

Paciente	Cd1a tumoral	Cd1a não tumoral	S-100 tumoral	S-100 Não tumoral	CD68 tumoral	CD68 não tumoral	CD56 tumoral	CD56 não tumoral
21-2601-0	1,39	0,00	0,73	0,64	1,56	1,30	0,00	0,00
23-7102-2	5,94	0,00	2,69	0,00	1,73	0,00	0,00	0,00
30-2350-8	2,16	0,00	0,92	0,00	3,21	2,09	0,20	0,00
31-6502-7	0,00	...	0,00	...	0,00	...	0,00	...
32-7135-8	0,68	0,85	0,63	0,00	3,24	2,17	0,00	0,00
37-0221-9	0,20	0,00	0,52	0,00	3,44	2,94	0,00	0,00
40-7025-9	0,23	0,00	0,76	0,00	0,00	2,28	0,10	0,00
44-2691-6	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
45-0200-0	0,20	0,00	0,67	0,38	1,80	1,72	0,00	0,00
50-4130-9	3,50	...	1,62	...	0,00	...	0,11	...
52-0765-7	2,06	...	1,45	...	2,55	...	0,00	...
52-9524-6	0,21	0,00	0,96	0,00	3,99	2,45	0,95	0,00
55-2154-8	0,11	0,00	0,80	0,39	2,25	3,72	55,03	1,35
56-6910-3	0,20		1,96	...	0,00	...	0,00	...
56-9392-6	1,19	...	0,57	...	1,44	...	0,60	...
58-7031-3	0,12	0,00	1,96	0,76	3,99	4,09	0,00	0,00
58-8721-6	0,74	0,26	0,00	0,37	10,66	0,95	0,00	0,28
59-1595-3	0,21	0,00	2,05	0,00	0,99	0,00	0,00	
59-3657-8	0,10	0,25	1,02	0,59	8,21	6,67	0,00	0,33
59-6085-1	0,77	...	0,91	...	10,75	...	0,00	...
60-0991-3	0,65	0,61	0,43	0,00	2,68	2,52	0,00	0,00
60-2098-4	2,69	...	0,00	...	1,04	...	0,10	...
60-4220-1	12,90	...	2,02	...	3,81	...	0,00	...
61-3883-7	0,30	...	0,00	...	5,99	...	0,00	...
61-3994-9	0,10	0,73	0,31	0,43	0,88	4,37	0,10	0,00
61-7620-8	21,92	0,42	6,91	1,04	6,49	0,98	0,00	0,88
62-49531	0,00	0,00	0,71	0,39	1,59	0,00	0,00	0,00
63-0200-9	0,00	...	0,00	...	0,00	...	0,00	...
63-0381-1	3,22	1,89	2,57	1,09	0,00	0,00	0,00	0,00
63-5595-1	0,62	...	0,00	...	0,00	...	1,92	...
647573-6	0,43	...	0,00	...	0,00	...	0,00	...
65-0752-2	0,21	...	0,00	...	2,45	...	31,17	...
65-1176-7	0,43	...	1,97	...	11,23	...	0,00	...
65-1772-2	0,20	...	1,67	...	1,79	...	0,00	...
65-2810-4	0,10	0,67	0,82	0,00	2,71	1,63	0,00	0,00
65-3668-9	2,20	...	0,00	...	1,68	...	0,00	...
66-1922-3	0,99	0,00	0,56	0,29	3,07	22,47	0,53	0,00
66-7653-7	0,83	0,00	0,63	0,00	3,81	2,50	0,00	0,00
68-6351-5	3,13	0,00	6,04	0,90	5,98	3,57	0,00	0,00

continua

Apêndice 7 – Médias dos marcadores de células dendríticas Cd1a, S-100, CD68 e CD56 no microambiente tumoral e não tumoral dos 65 casos de CNPC

Continuação

Paciente	Cd1a tumoral	Cd1a não tumoral	S-100 tumoral	S-100 Não tumoral	CD68 tumoral	CD68 não tumoral	CD56 tumoral	CD56 não tumoral
70-5416-5	0,00	...	0,39	...	0,00	...	0,00	...
70-7051-9	0,46	0,00	0,69	0,00	6,59	0,59	0,30	0,00
71-0369-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,79	0,10	0,00
71-0605-0	0,31	...	0,00	...	1,67	...	0,00	...
71-5138-1	0,00	...	0,00	...	0,00	...	0,00	...
72-4884-9	4,18	...	0,00	...	0,00	...	0,00	...
72-5094-0	0,82	0,00	0,00	0,00	0,00	1,38	0,00	0,00
92-10009	0,11	0,00	0,72	0,00	11,61	1,62	0,00	5,26
69-2397-6	0,00	0,60	0,60	0,00	0,00	1,50	0,60	0,00
39-1088-1	0,00	0,10	0,51	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
41-6186-6	1,04	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,46
46-3085-8	1,05	0,37	0,12	0,00	1,08	0,00	0,00	0,00
51-8820-2	2,90	0,00	0,00	0,00	0,00	3,10	0,00	0,00
51-9727-9	0,00	0,00	1,11	0,00	0,00	0,00	0,00	1,02
52-4935-0	0,00	3,09	0,00	0,00	0,00	0,00	3,09	0,00
52-7784-1	1,65	0,10	0,52	0,00	14,49	2,06	0,10	0,00
53-8424-9	0,96	0,20	0,62	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00
54-5512-0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,64	0,00	0,00
56-1853-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
56-2756-7	0,98	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50
57-4914-0	0,00	0,00	0,00	0,00	12,45	0,60	0,00	0,00
60-2105-0	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
60-7032-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35
65-5159-9	0,83	0,00	0,26	0,00	0,00	2,16	0,00	0,00
68-9410-0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
73-0431-5	0,00	0,00	1,03	0,00	0,00	5,86	0,00	0,00

Apêndice 8 – Médias dos marcadores vasculares CD34 e de adesão V-CAM, Endotelina e CD54 no microambiente tumoral e não tumoral dos 65 casos de CNPC

Paciente	CD34 tumoral	CD34 não tumoral	V-CAM tumoral	V-CAM não tumoral	Endotelina tumoral	Endotelina não tumoral	CD54 tumoral	CD54 não tumoral
21-2601-0	5,08	24,17	25,21	2,70	3,20	0,00	5,02	2,47
23-7102-2	22,28	44,70	21,33	3,77	2,70	0,00	16,32	1,32
30-2350-8	14,41	44,44	0,00	0,00	0,00	0,00	15,81	4,20
31-6502-7	5,08	...	0,98	...	1,98	...	12,23	...
32-7135-8	11,67	46,27	2,72	5,23	3,53	3,64	6,58	5,23
37-0221-9	0,00	0,00	2,08	3,33	4,54	6,15	4,20	3,33
40-7025-9	3,01	0,00	2,37	0,00	3,22	0,00	10,23	3,20
44-2691-6	2,05	46,38	3,34	0,00	6,86	1,40	13,25	2,03
45-0200-0	6,34	39,82	2,35	2,03	3,70	0,00	2,33	3,43
50-4130-9	7,21	...	5,80	...	3,57	...	7,88	...
52-0765-7	9,12	...	0,00	...	9,65	...	2,32	...
52-9524-6	18,75	41,16	0,00	0,00	5,43	7,14	5,54	2,70
55-2154-8	0,95	0,00	5,04	1,01	8,95	0,00	9,79	6,23
56-6910-3	4,08	38,59	4,04	...	4,04	...	8,45	...
56-9392-6	6,51	...	1,31	...	9,59	...	5,25	...
58-7031-3	16,98	44,68	1,25	0,00	11,56	0,00	10,87	5,23
58-8721-6	7,64	58,52	0,00	0,00	21,43	6,25	11,25	1,01
59-1595-3	2,36	16,67	0,00	0,00	8,79	10,21	3,25	4,12
59-3657-8	22,76	36,54	21,05	5,68	10,10	12,66	7,74	5,47
59-6085-1	1,69	...	0,00	...	0,93	...	4,44	2,25
60-0991-3	11,81	40,12	0,00	0,00	14,00	0,00	5,57	2,02
60-2098-4	6,99	...	0,00	...	21,05	...	10,47	...
60-4220-1	13,93	...	0,00	...	18,18	...	13,25	...
61-3883-7	0,85	...	8,43	...	13,38	...	8,42	...
61-3994-9	6,20	46,77	0,00	0,00	15,18	4,88	7,15	5,04
61-7620-8	3,76	44,40	0,55	1,02	3,01	6,21	8,77	5,68
62-49531	6,80	28,75	0,00	16,28	4,70	8,70	12,10	3,33
63-0200-9	16,22	...	0,00	...	6,50	...	7,77	...
63-0381-1	20,37	37,39	0,00	1,02	0,00	22,64	12,58	5,21
63-5595-1	3,47	...	5,10	...	3,24	...	11,47	...
647573-6	4,03	...	1,24	...	6,94	...	10,24	...
65-0752-2	3,27	...	0,00	...	9,09	...	8,25	...
65-1176-7	10,44	...	3,25	...	12,73	...	13,25	...
65-1772-2	16,57	...	0,00	...	9,09	...	12,32	...
65-2810-4	2,83	33,92	1,96	1,22	8,57	...	5,25	4,21
65-3668-9	16,41	...	0,00	...	8,61	...	6,23	...
66-1922-3	10,24	52,94	4,58	2,00	7,83	4,35	11,14	4,74
66-7653-7	14,21	37,08	5,70	0,00	1,21	3,84	5,17	3,02
68-6351-5	3,25	34,26	7,45	2,35	6,71	0,00	7,25	4,11

Continua

Apêndice 8 – Médias dos marcadores de vasculares e de adesão CD34, V-CAM, Endotelina e CD54 no microambiente tumoral e não tumoral dos 65 casos de CNPC

Continuação

Paciente	CD34 tumoral	CD34 não tumoral	V-CAM tumoral	V-CAM não tumoral	Endotelina tumoral	Endotelina não tumoral	CD54 tumoral	CD54 não tumoral
70-5416-5	0,00	...	0,00	...	5,43	...	5,00	...
70-7051-9	5,71	37,39	0,00	3,21	5,11	0,00	7,45	2,22
71-0369-7	9,40	0,00	0,98	0,00	5,29	0,00	5,23	2,20
71-0605-0	9,20	...	0,00	...	5,59	...	6,56	...
71-5138-1	0,57	...	2,78	...	5,46	...	9,56	...
72-4884-9	0,56	...	0,00	...	7,60	...	5,02	...
72-5094-0	4,06	67,82	0,00	0,00	0,71	19,80	6,34	3,25
92-10009	14,99	29,26	0,00	0,00	2,14	9,08	12,01	5,68
69-2397-6	35,37	30,70	2,07	0,00	6,15	15,47	5,41	
39-1088-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,23	3,11
41-6186-6	0,00	0,00	0,00	0,00	7,61	0,00	6,25	2,12
46-3085-8	11,00	37,14	0,00	0,00	8,59	2,81	6,61	5,25
51-8820-2	14,54	0,00	0,00	0,00	1,63	0,00	4,47	7,25
51-9727-9	16,84	0,00	1,24	6,02	4,72	9,30	1,24	3,23
52-4935-0	0,00	0,00	0,00	1,13	11,32	0,00	14,20	5,20
52-7784-1	0,00	0,00	2,58	0,00	6,36	0,00	12,85	2,03
53-8424-9	35,43	0,00	1,25	0,00	9,43	7,40	11,55	3,32
54-5512-0	0,00	0,00	2,31	2,55	4,44	0,00	6,31	6,58
56-1853-3	34,50	0,00	5,57	2,51	1,32	0,00	5,87	3,02
56-2756-7	0,00	0,00	6,23	2,75	3,59	0,00	6,23	5,41
57-4914-0	0,00	0,00	2,35	2,11	2,39	3,14	12,55	5,21
60-2105-0	0,00	0,00	4,78	1,14	3,95	0,00	6,78	2,25
60-7032-9	0,00	0,00	0,00	1,47	1,16	0,00	9,85	3,25
65-5159-9	0,00	0,00	2,14	1,23	0,00	6,06	12,41	2,51
68-9410-0	8,98	93,10	1,12	1,17	4,32	3,12	5,32	5,22
73-0431-5	35,50	0,00	0,00	0,00	0,00	4,16	4,25	2,75

Apêndice 9 – Médias do Bcl-2 e Bcl-6 nas células tumorais e não tumorais dos 65 casos de CNPC

Paciente	Bcl-2 tumoral	Bcl-2 Não tumoral	Bcl-6 Tumoral	Bcl-6 Não tumoral
21-2601-0	50,01	0,00	5,12	2,17
23-7102-2	30,66	8,16	1,33	0,77
30-2350-8	34,88	0,00	1,02	1,11
31-6502-7	1,38	...	0,75	...
32-7135-8	1,86	0,00	2,70	0,23
37-0221-9	50,56	11,11	1,07	0,33
40-7025-9	0,82	3,25	2,27	0,00
44-2691-6	1,29	4,35	1,24	0,00
45-0200-0	0,96	2,03	0,35	1,03
50-4130-9	5,68	...	3,80	...
52-0765-7	5,20	...	0,22	...
52-9524-6	1,53	4,54	0,41	1,02
55-2154-8	5,04	0,00	3,04	0,11
56-6910-3	3,85	...	2,52	...
56-9392-6	1,31	...	3,21	...
58-7031-3	33,81	0,89	2,52	1,65
58-8721-6	50,21	0,00	0,25	0,00
59-1595-3	18,18	0,00	0,47	0,12
59-3657-8	25,51	2,94	1,05	1,04
59-6085-1	11,12	2,02	2,25	...
60-0991-3	53,67	2,70	5,21	1,10
60-2098-4	10,71	...	5,55	...
60-4220-1	13,33	...	3,28	...
61-3883-7	17,19	...	3,33	...
61-3994-9	1,63	1,47	0,95	1,14
61-7620-8	1,82	5,63	0,55	2,21
62-49531	3,29	3,61	1,25	0,05
63-0200-9	50,36	...	4,78	...
63-0381-1	11,43	0,00	5,67	0,87
63-5595-1	19,19	...	4,52	...
647573-6	0,85	...	5,23	...
65-0752-2	14,58	...	1,57	...
65-1176-7	28,80	...	3,45	...
65-1772-2	3,19	...	5,08	...
65-2810-4	33,18	0,00	3,96	1,02
65-3668-9	45,22	...	4,87	...
66-1922-3	7,78	0,00	3,78	2,21
66-7653-7	1,96	3,80	3,70	1,03
68-6351-5	1,87	2,01	5,05	0,17

Continua

Apêndice 9 – Médias do Bcl-2 e Bcl-6 nas células tumorais e não tumorais dos 65 casos de CNPC

Paciente	Bcl-2 tumoral	Bcl-2 Não tumoral	Bcl-6 Tumoral	Bcl-6 Não tumoral
70-5416-5	2,68	...	4,78	...
70-7051-9	9,01	4,88	2,21	1,22
71-0369-7	15,49	0,00	0,98	2,10
71-0605-0	37,21	...	2,56	...
71-5138-1	32,70	...	2,87	...
72-4884-9	13,25	...	3,50	...
72-5094-0	11,52	0,00	2,29	1,20
92-10009	30,87	0,00	3,56	2,15
69-2397-6	15,28	2,90	2,27	1,07
39-1088-1	1,16	3,25	3,12	1,12
41-6186-6	35,71	8,86	2,22	0,47
46-3085-8	14,74	1,37	3,53	0,11
51-8820-2	24,57	3,52	4,33	1,65
51-9727-9	36,30	0,00	1,44	0,14
52-4935-0	24,71	0,00	3,88	0,75
52-7784-1	26,03	1,45	2,85	1,40
53-8424-9	1,26	8,24	2,52	0,01
54-5512-0	12,33	4,57	3,37	1,44
56-1853-3	15,87	6,55	5,07	1,02
56-2756-7	13,22	5,75	5,43	0,77
57-4914-0	12,59	0,00	2,05	0,04
60-2105-0	14,87	3,13	5,88	1,03
60-7032-9	14,21	5,25	0,96	0,12
65-5159-9	12,41	2,35	3,21	2,51
68-9410-0	21,12	0,00	4,75	0,05
73-0431-5	15,24	2,31	0,58	2,18

Original contribution

Refractory remodeling of the microenvironment by abnormal type V collagen, apoptosis, and immune response in non-small cell lung cancer[☆]

Paola Souza MD^a, Fabrizio Rizzardi^a, Gustavo Noletto^a, Marcelo Atanazio^a, Osmar Bianchi^a, Edwin Roger Parra MD, PhD^a, Walcy Rosolia Teodoro PhD^c, Solange Carrasco^c, Ana Paula Pereira Velosa PhD^c, Sandra Fernezlían^a, Alexandre Muxfeldt Ab'Saber MD, PhD^a, Leila Antonângelo MD, PhD^a, Tereza Takagaki MD, PhD^b, Cláudia Goldenstein Schainberg MD, PhD^c, Natalino Hajime Yoshinari MD, PhD^c, Vera Luiza Capelozzi MD, PhD^{a,*}

^aDepartament of Pathology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 01246-903, Brazil

^bOncology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

^cDiscipline of Rheumatology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

Received 30 May 2009; revised 22 July 2009; accepted 23 July 2009

Keywords:

Collagen V;
Apoptosis;
Caspase 9;
In situ hybridization;
Lung cancer;
Survival;
Morphometry;
Immunohistochemistry;
Immunofluorescence;
Tridimensional reconstruction;
Real-time polymerase chain reaction

Summary Collagen V shows promise as an inducer of the death response via caspases. Remodeling of the microenvironment by collagen V, tumoral/vascular apoptosis, and the immune response were evaluated, based on the prognosis of 65 patients with surgically excised non-small cell lung cancer. Immunofluorescence, immunohistochemistry, morphometry, tridimensional reconstruction, and a real-time polymerase chain reaction were used to evaluate the amount, structure, and molecular chains of collagen V, tumoral and vascular apoptosis, immune cells, and microvessel density. The impact of these markers was tested on follow-up until death from recurrent lung cancer occurred. A decreased and abnormal synthesis of collagen V was found to lead to increased angiogenesis due to a low endothelial death rate and a low immune response. A Cox model analysis, controlled for the lymph node stage, demonstrated that only collagen V and vascular apoptosis variables were significantly associated with survival time. A point at the median for collagen V and vascular apoptosis divided patients into 2 groups, each with a distinctive prognosis. Those with a collagen V higher than 9.40% and vascular apoptosis higher than 1.09% had a low risk of death (0.27 and 0.41, respectively) compared to those with a collagen V lower than 9.40% and vascular apoptosis lower than 1.09%. Collagen V and vascular apoptosis in resected non-small cell lung cancer was strongly related to the prognosis, suggesting that

[☆] This study was supported by the following Brazilian agencies: the National Council for Scientific and Technological Development; the Foundation for the Support of Research of the State of São Paulo; and the Laboratories for Medical Research, Hospital das Clínicas, University of São Paulo Medical School. Silver Sponsorship by Oral Presentation at the 2009 Vienna European Respiratory Congress.

Oral Presentation at the 2009 22nd European Congress of Pathology.

* Corresponding author. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 01296-903, Brazil.

E-mail address: vcapelozzi@lim05.fm.usp.br (V. L. Capelozzi).

strategies aimed at preventing low collagen V synthesis, or local responses to low vascular apoptosis may have a greater impact in lung cancer treatment.
 © 2009 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

The extracellular matrix (ECM) contains a significant number of “informational” molecules whose interaction with scattered cells is of primary importance in the control of cellular proliferation and differentiation in cancer development [1]. One of the commonest features of most highly invasive tumors, such as non-small cell lung cancer (NSCLC), is a massive degradation of the basement membrane [2]; on the other hand, marked qualitative and quantitative modifications of the interstitial collagen component have been described [2-4]. Collagen V is a component of the ECM located in the pulmonary interstitium and capillary basement membranes and is surrounded by vascular smooth cells [5]. It is a highly preserved protein found in many different animal species, maintaining the NH₂ terminal region and is highly immunogenic [6]. Normally, this protein is not found to be exposed in the ECM, as it is hidden among collagen I and III, together comprising heterotypic fibers [7]. Studies by Luparello and Sirchia [8] have shown that collagen V, a minor component of normal breast stroma and accounting for about 1% of total collagens, was overdeposited in the ECM of breast carcinoma, increasing to up to 10% of extractable collagens. Subsequently, *in vitro* breast cancer experiments [9] demonstrated a direct binding of collagen V epitopes to a nonintegrin receptor recognized by an anti-elastin/laminin-binding protein antibody, resulting in a prominent slowing of growth rate and an inhibition of motility and invasion [10]. Interestingly, more recent results on breast cancer provided evidence that collagen V was able to trigger apoptotic promotion via caspases [8].

Despite advances in surgery, chemotherapy, and radiotherapy in the last 2 decades, the death rate from lung cancer has remained little changed, the main cause being metastasis [11]. There is therefore great interest in finding ways to identify which tumors are likely to invade and metastasize, thereby shortening the patient's life, and to optimize therapeutic efforts for each individual patient. In this regard, our group has been studying morphometric and biological markers in resected lung cancer and its correspondent lymphatic and hematogenous metastasis [12-20]. Lung cancer is the phenotypic consequence of the interactions between cellular and microenvironment factors, such as blood supply and ECM, in terms of growth, invasion, and metastasis, and currently much interest is focused on the influence of these factors on programmed cell death, or apoptosis.

In the light of previous data suggesting an interaction between collagen V, growth-restraining, and cell death rate

factors, the aim of the present study was to (1) determine whether collagen V is overdeposited in the ECM of NSCLC; (2) determine the relationship between type I, III, and V collagens; (3) determine whether the collagen is associated with angiogenesis, vascular apoptosis via caspase and the immune response; (4) verify the impact on the survival of the patients. The hypothesis was that in NSCLC, one of most highly invasive tumors, there is an interaction between collagen V, vascular apoptosis and the immune response.

It was found that a decreased and abnormal synthesis of collagen V leads to increased angiogenesis from a low endothelial death rate and a low immune response resulting in high probability of death from lung cancer. Therefore, our findings support the idea that collagen V may be a promising marker for new therapeutic approaches.

2. Methods

2.1. Patients and tumor tissues

The patients of this study comprised 65 patients with completely resected NSCLC. All were clinically staged to be T₁₋₄N₀M₀ and were considered to have tumors potentially curable by surgical resection. Clinical staging comprised 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 more than 1 cm. Other details about these patients are summarized in Table 1.

Tumor tissue used in this study was derived from routine formalin-fixed pathologic samples taken from the resected lung specimens after routine pathologic studies had been completed. Two of us (P. S. and V. L. C.) reviewed and verified the histologic diagnosis to be squamous cell, adenocarcinoma, and large cell carcinoma types, classified according to the WHO tumor classification [21], and we selected a sample of the paraffin-embedded tumor for further observations of the tumor.

2.2. Immunohistochemistry and *in situ* hybridization

To evaluate caspase-9 apoptosis by the endothelial cells, angiogenesis (CD34), and immune cells (CD3, CD4, CD8, CD1a, S100), we used immunostaining using the Novolink Max Polymer (Novocastra Laboratories LTDA), pressure

Table 1 Patient characteristics

Total no. of patients	65
Age (y)	62 (34-82) ^a
Sex	39 males, 26 females
Overall stage	
I	14
II	33
III	12
IV	6
T stage	
1	10
2	44
3	5
4	6
N stage	
0	39
1	17
2	9
Histologic type	
Squamous cell carcinoma	20
Adenocarcinoma	28
Large cell carcinoma	17
Follow-up (mo)	23 (1-151) ^a
Patients censored for survival analysis at last time of follow-up	21

^a Values represent median (range).

cooking antigen retrieval, biotinylated rabbit antimouse immunoglobulin G (Dako, Carpinteria, CA, USA; dilution, 1:400), streptavidin combined in vitro with biotinylated horseradish peroxidase (Dako; dilution, 1:1000), diaminobenzidine tetrahydrochloride, and counterstaining with hematoxylin. The antibodies used were caspase 9 (Chemicon Millipore Corporation, Temecula, CA, USA; dilution, 1:6000), anti-CD34 monoclonal antibody (Novocastra Laboratory; dilution, 1:25), CD3 (Dako; dilution, 1:500), CD4 (Dako Corp, Inc; dilution 1:500), CD8 (Dako; dilution 1:500), CD1a (dilution 1:20), and S100 (Dako; dilution, 1:600). Brownish cytoplasmic staining was considered to be evidence of antigen expression. In situ hybridization was used to identify apoptosis in tumoral and surrounding environment nuclear expression by deoxynucleotidyl transferase (TdT) method of end labeling (TUNEL) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). This method involves the addition of deoxyuridine triphosphate labeled with fluorescein to the ends of the DNA fragments by the catalytic action of TdT. Paraffin wax-embedded sections (3–4 μ m) were layered on to glass slides. The tissue sections were dewaxed with xylene and rehydrated with graded dilutions of ethanol in water. The slides were then washed 4 times with double-distilled water for 2 minutes and immersed in TdT buffer (Boehringer Mannheim). The sections were then covered with TdT (0.3 U/ μ L) and fluorescein-labeled deoxyuridine triphosphate in TdT buffer, and the samples were incubated in a humid atmosphere at 37°C for 60 minutes. For negative controls, TdT was eliminated from the reaction mixture. The

sections were then incubated with an antibody specific for fluorescein conjugated to peroxidase. The staining was observed with a substrate system, in which nuclei with DNA fragmentation stained brown. The reaction was terminated by washing the sections twice in phosphate-buffered saline. The nuclei without DNA fragmentation stained blue as a result of counterstaining with hematoxylin. In addition, we quantified the staining in a tumor and normal microenvironment using the conventional stereological method of point sampling [22]. At $\times 400$ magnification, we used an eyepiece systematic point sampling grid with 100 points and 50 lines to count the fraction of points overlying positively stained structures. We averaged this over 10 microscopic fields to obtain a final result as the percentage of staining structures.

2.3. Immunofluorescence

To characterize type I, III, and V collagen, 3- μ m paraffin-embedded sections were mounted on a methacryloxypropyltri-methoxysilane (Sigma Chemical Co; St Louis, Mo) slides. The sections were dewaxed in xylene and dehydrated in graded ethanol. Antigen retrieval was determined by enzymatic treatment of lungs with bovine pepsin (10 000 units tissue dry) (Sigma Chemical Co) in acetic acid buffer (pH 2.2) (4 mg/mL) for 30 minutes at 37°C and subsequent incubation with milk 5% in phosphate buffer, pH 7.0. The slides were then incubated overnight with mouse polyclonal antihuman type I (1:100) and V (1:2000) and monoclonal antihuman type III collagen (1:100) [23,24]. For negative controls, sections were incubated with fetal bovine serum instead of the primary antibody [23]. The same tissue treatment was carried out for immunofluorescence detection. The sections were incubated with the same primary antibody diluted with phosphate-buffered saline plus bovine serum albumin 1% overnight at 4°C in a humid atmosphere. The sections were then incubated with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat antimouse and antirabbit immunoglobulin (Sigma Chemical Co; dilution 1:50) as a secondary antibody and mounted with an aqueous mounting medium. The different types of collagen fibers (I, III, V) were quantitatively evaluated in tumor and normal microenvironments by image analysis. Briefly, the image analysis system consisted of an Olympus camera, attached to an Olympus microscope, from where the images were sent to a monitor LG by means of a digitizing system (Oculus TCX; Coreco Inc, St Laurent, Quebec, Canada) inserted in a computer (Pentium 1330Mhz). The images were processed using ImaGen Pro-Pus 6.0 software. For each lung specimen, tumor and normal microenvironments were analyzed at a magnification of $\times 200$. The collagen fiber density in each category was measured and expressed as a relation between the quantities of fibers divided by the total area studied. The final results express the amount of different collagenous fibers (in area) per total [25].

2.4. Tridimensional reconstruction

The microenvironment of the tumors was evaluated using confocal microscopy by anti-collagen V fluorescence immunohistochemistry. Tumors were incubated with anti-collagen V (polyclonal antihuman type V collagen antibody (1:50) [26], followed by double staining with fluorescein and rhodamine (rhodamine-conjugated goat antimouse immunoglobulin G receptor; dilution, 1:40; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Images were obtained using a Zeiss LSM-410 laser-scanning confocal microscope. Serial optical sections were performed with Simple 32 C-imaging computer software (LSM Image Browser software, Carl Zeiss). Z-series sections were collected at 0.6 μm with a $\times 60$ Plan Apo lens and a scan zoom of $\times 2$. All images were collected at the same photomultiplier tube settings. Images were processed and reconstructed using NIH Image software, and contrast and color levels were adjusted with Adobe Photoshop 7.0.

2.5. Tumor fibroblast culture

The primary fibroblast culture was developed using the "explant" method [27] straight after the material collection. The tumor specimens were sectioned in small fragments, transferred to a large 25-cm² plastic bottle (Costar, EUA manufacturer), containing a DMEM medium, supplemented with 20% of fetal bovine serum, 1% of L-glutamine, and 1% of penicillin + streptomycin and incubated at 37°C in a 5% carbon dioxide atmosphere, until cell confluence was reached. After 0.2% trypsin treatment, the cells were transferred to 75-cm² bottles and treated as described above. For types I, III, and V collagen immunostaining, some fragments were placed on coverslips, placed on 24-well plaques, and fibroblasts were cultivated until the confluence.

2.6. Real-time polymerase chain reaction

The biomolecular profile of $\alpha 1$ (collagen V) and $\alpha 2$ (collagen V) chains of collagen V was evaluated by real-time polymerase chain reaction (PCR). Tissue specimens (ap-

proximately 100 mg) were pulverized (Bio-Pulverizer, BioSpec Products Inc, Bartlesville, OK, USA) under liquid nitrogen, and total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), according to the Manufacturer's protocol. RNA quality and integrity were verified by the absorbance 260 nm/280 nm ratio ($A_{260/280}$), which varied between 1.78 and 2.0, and through observation of 18S/28S rRNA using agarose gel (1%) electrophoresis, in denaturant conditions with visualization using ethidium bromide (ratio >1.0). Total RNA (4 g) was reverse-transcribed using a hexamer primer (0.5 g/L) (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, St Giles, UK) and Superscript III (Invitrogen Corporation). Real-time RT-PCR was carried out using SYBR-green I (Sigma) in a Rotor-gene system (Corbett Research, Mortlake, Australia). Amplification reactions were carried out using 5- μL (125 ng) cDNA (final volume, 20 μL), 1.25 U Platinum Taq Polymerase (Invitrogen Corporation), 1 $\times$ polymerase buffer (Invitrogen Corporation), 2.0 mmol/L MgCl_2 , 200 $\mu\text{mol/L}$ each dNTP, 0.3 mol/L each primer, 5% dimethyl sulfoxide, and 0.1 μL SYBR Green. Amplification conditions consisted of denaturation at 95°C for 15 seconds followed by 40 cycles of annealing at 56°C for 60 s, and extension at 72°C for 60 seconds. Primer sets were designed based on the coding region closer to the 3' end of the gene using Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3-www.cgi>) $\alpha 1(V)$ chain left GTGGCACAGAATTGCTCTCA, right TCACCCTCAAACACCTCCTC; $\alpha 2(V)$ chain left G G A A A T G T G G G C A A G A C T G T, right TTGATGGTGGTGCTCATTGT. Sequences, present in different exons preferentially separated by long introns, were selected according to sequences deposited at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>. To avoid nonspecific product formation, BLAST analysis (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) was carried out. To minimize self- and cross-dimer hairpin formation, homodimer melting temperatures were verified using the program OligoTech version 1.00, Copyright (1995) (Oligos Etc Inc and Oligo Therapeutics Inc, Invitrogen Corporation). All samples were tested in duplicates and analyzed by the software Rotor-Gene 6 System (Corbett Research, Mortlake, Australia). Results displaying a CT variation of less than 1.5 between them were further used to calculate average values. Data were expressed

Fig. 1 Tumoral specimens obtained from 3 patients, respectively, with squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and large cell carcinoma, stained with HE (A, B, C), immunohistochemistry for caspase 9 (D, E, F), CD8-immune cells (G, H, I), collagen V observed under fluorescent microscopy (J, K, L), and confocal microscopy (M, N, O). In squamous cell carcinomas (A), the caspase expression (D), the CD8 cells (G), and the strong green birefringence of type V collagen fibers were organized in a dense and irregular fibrillar pattern around of individual or grouped malignant cells (J), and coincided with the HE phenotype (A). Adenocarcinomas (B) show endothelial expression of caspase (E), CD8-immune cells (H), and a distortion of the tumoral stroma by a diffuse increase of green birefringence of collagen V (K), organized in a prominent texture of thin fibers involving malignant glands, visualized under HE staining. Endothelial caspase expression (F), CD8 cells (I), and the green birefringence of collagen V fibers showing an irregular texture with the thin fibers in individual large groups of malignant cells are seen in large cell carcinoma (C). By collagen V 3-dimensional reconstruction, NSCLC shows a disorganization of fibrillar collagen with a diverse disarray and thickness. In squamous cell carcinoma, these features are more prominent than in tumoral stroma (M). A similar characterization is observed in large cell carcinoma (O). By contrast, greenish collagen type V shows a marked thickness and dramatic morphological disorganization in adenocarcinomas (N).

as CT values (the cycle number at which logarithmic PCR plots cross a calculated threshold line). Relative expression of genes of interest was normalized to that of GAPDH, and gene expression in each sample was then compared with expression in pool cells. The comparative CT method (CT) was used for quantification of gene expression and relative expression was calculated as 2^{-CT} [28].

2.7. Statistical analysis

Initial analyses were performed using Kaplan-Meier curves, and final multivariate analyses were carried out using the Cox proportional hazard model. In addition, paired-samples *t* test and the general linear model were used to test the relationship between one continuous variable and several others, and the residuals were examined to ensure that they were approximately normally distributed. All analyses were carried out using SPSS statistical software (Inc, Chicago, IL). The threshold for statistical significance was chosen as $P = .05$.

3. Results

Squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and large cell carcinoma are respectively represented in Fig. 1 stained by hematoxylin-eosin (HE) (A, B, C), immunohistochemistry for caspase 9 (D, E, F), CD8 (G, H, I), collagen V observed under fluorescent microscopy (J, K, L), and confocal microscopy (M, N, O). Squamous cell carcinomas (A) show caspase-9 expression (D), CD8-immune cells (G), and a green birefringence of collagen V fibers observed under fluorescent microscopy (J), which are organized in a dense and irregular fibrillar pattern around individual malignant cells, cells in squamous membranaceous differentiation, as well as those around new vessels of the tumoral microenvironment coincident with the HE phenotype (A). By contrast, adenocarcinomas (B) show endothelial caspase expression (E), CD8-immune cells (H), and a distortion of the tumoral microenvironment and a diffuse green birefringence of collagen V fibers observed under fluorescent microscopy (K). Collagen V fibers are organized in a prominent texture of thin fibers consisting of a complex glandular proliferation, the stroma and immune cells visualized under HE staining. For large cell carcinoma (C), equally prominent were endothelial caspase expression (F), the presence of CD8-immune cells (I), and a green birefringence of collagen V fibers, observed under fluorescent microscopy, forming an irregular texture with the thin fibers in individual large groups of malignant cells (L). Collagen V tridimensional reconstruction in NSCLC was characterized by a morphological disorganization of fibrillar collagen with different thickness according to the histologic type. In these different subtypes, collagen V was characterized by an increase in fiber thickness and disorganization. In

squamous cell carcinoma, these features were more prominent in tumoral stroma (M). A similar characterization was observed in large cell carcinoma, where the increase in fiber thickness and disorganization were again more prominent in tumoral stroma (O). By contrast, greenish collagen V showed a marked thickness and a dramatic morphological disorganization in adenocarcinomas (N).

Table 2 summarizes the morphometric results for the tumor and normal microenvironments. The endothelium caspase 9+ apoptosis index was 2.7% in the tumoral microenvironment and 2.3% in the normal microenvironment ($P = .2$). Epithelial TUNEL apoptosis occurred in 7.2% of the tumoral microenvironments and in 10.2% of the normal microenvironment ($P = .01$). The microvessels occupied 41.9% of the total area in the normal microenvironment, whereas 10.6% were inside of the tumoral microenvironment ($P < .01$). The percentage of CD3 lymphocytes in the tumoral microenvironment was 7.7% and 2.5% in the normal microenvironment ($P < .01$). The lymphocyte CD4 percentage in tumoral and normal microenvironments was 21.5% and 13.6% ($P = .2$), respectively. The immune cell CD8 density was equal in tumoral and normal areas (1.7% in each, $P = .5$). Immature dendritic cells CD1a+ represented 1.8% of the total in

Table 2 Summary of morphometric results^a

	Mean	Range
<i>Tumor microenvironment</i>		
Endothelium caspase 9+ (% of points)	2.7	0.0-12.0
TUNEL (% of points)	7.2	0.0-26.9
Microvessels (no. per area)	10.6	0.0-35.5
CD3 (% of points)	7.7	0.9-34.3
CD4 (% of points)	21.5	0.0-160.0
CD8 (% of points)	1.7	0.0-7.2
CD1a (% of points)	1.8	0.0-21.9
S100 (% of points)	1.4	0.0-6.9
Collagen I	3.4	0.2-9.2
Collagen III	8.5	0.01-31.8
Collagen V	10.8	0.02-39.4
<i>Normal microenvironment</i>		
Endothelium caspase 9+ (% of points)	2.3	0.0-17.0
TUNEL (% of points)	10.2	0.0-29.2
Microvessels (no. per area)	41.9	16.6-93.1
CD3 (% of points)	2.5	0.3-5.9
CD4 (% of points)	13.6	0.0-113.9
CD8 (% of points)	1.7	0.2-4.5
CD1a (% of points)	0.2	0.0-2.0
S100 (% of points)	0.2	0.0-1.09
Collagen I	6.4	0.2-25.5
Collagen III	18.4	1.2-47.3
Collagen V	17.3	0.2-35.8

^a The units of “% of points” indicate the number of points overlying the phenomena of interest divided by the total number of points overlying tumor. In morphometry, this is called a point fraction and is often symbolized as *Pp*. *Pp* has been shown to approximate the volume fraction or *Vv* [30].

Fig. 2 A box plot shows the $[\alpha 1$ (collagen V)] and $[\alpha 2$ (collagen V)] mRNA expression gene in a normal and tumoral microenvironment.

tumoral parenchyma and 0.2% in the normal microenvironment ($P = .01$), respectively, whereas the value for the fraction of S100+ cells in tumoral parenchyma and the normal microenvironment was 1.4% and 0.2%, respectively ($P = .03$). The level of collagen V was higher than that of collagen I or III in tumoral and normal microenvironments ($P < .05$). For collagen V in the tumoral microenvironment, the level was 10.8%, whereas it was 17.3% for the normal microenvironment ($P < .01$). For collagen III, the level in tumoral stroma was 8.5% and was 18.4% in the normal microenvironment ($P = .001$). Finally, for collagen I, the level in tumoral areas was 3.4%, whereas it was 6.4% in the normal microenvironment ($P = .5$). In addition, we found that the level of collagen V was related to several factors connected with the phenotype of the tumor and the tissue environment. A multivariate model demonstrated that the level of collagen V related weakly to the pathologic tumor stage ($R = 0.67$; $P = .06$), collagen I ($R = 0.21$; $P = .07$),

collagen III ($R = 0.09$; $P = .06$), to adenocarcinoma histologic subtype ($R = 0.25$; $P = .06$), CD3 ($R = 0.47$; $P = .07$), CD4 ($R = 0.16$; $P = .08$), S100 ($R = 0.35$; $P = .07$), and most strongly with the pathologic N lymph node stage ($R = 0.24$; $P < .01$), endothelium apoptosis caspase-9+ ($R = 0.9$; $P = .05$), microvessel density ($R = 0.24$; $P = .05$), CD8 ($R = 0.65$; $P = .01$), and Cd1a ($R = 0.60$; $P = .02$). In addition, according to a univariate analysis, collagen V was negatively related to the amount of microvessels and positively with endothelium apoptosis caspase 9+. In other words, lower levels of tumor with collagen V were associated with higher fractions of microvessels in the stroma and a low fraction of endothelium apoptosis caspase 9+.

The $[\alpha 1$ (collagen V)] and $[\alpha 2$ (collagen V)] mRNA expression gene levels were lower in the tumor, compared with the normal microenvironment, suggesting a low rate of synthesis of this collagen type. Significantly ($P = .046$), we found a lower expression of $[\alpha 1$ (collagen V)] (0.41 ± 0.25) in tumor when compared with $[\alpha 1$ (collagen V)] (2.27 ± 1.4) in the normal microenvironment (Fig. 2).

3.1. Survival analysis

The results of the Cox model analysis appear in Table 3. Only three variables were significantly associated with survival time: pathologic N stage, collagen V, endothelium apoptosis caspase-9+. Once these three variables were accounted for, none of the others related to survival. For example, we found that individual N stages were significantly related to survival time, in the absence of collagen V and endothelium apoptosis caspase 9+ ($P = .001$); however, when collagen V and endothelium apoptosis caspase 9+ were present as covariates, its relationship to survival was much stronger. Multivariate analyses showed a low risk of death for high-density collagen V (OR = 0.27) and low endothelium apoptosis caspase expression (OR = 0.41). Regression plots of survival probability versus follow-up time in months, for patients with NSCLC, show that the

Table 3 Cox proportional hazard model analysis of survival time (model likelihood ratio, 188.40; $\chi^2 = 26.58$, $P = .002$)

	β coefficient	SE	Wald	Significance	Exp(B)	95% confidence interval for Exp(B)	
						Lower	Upper
N2 stage			22.09	0.00			
N0 stage	-2.57	0.60	18.03	0.00	0.07	0.02	0.25
N1 stage	-0.24	0.55	0.20	0.65	0.78	0.26	2.30
Large cell carcinoma			1.28	0.53			
Squamous cell carcinoma	0.57	0.68	0.72	0.39	1.78	0.47	6.70
Adenocarcinoma	0.62	0.56	1.24	0.26	1.86	0.62	5.52
Collagen V	-1.32	0.53	6.28	0.01	0.27	0.09	0.75
Endothelium apoptosis	-0.90	0.47	3.64	0.05	0.41	0.16	1.04
Microvessel density	0.29	0.42	0.48	0.48	1.33	0.58	3.02
Epithelial apoptosis	0.01	0.41	0.09	0.77	0.88	0.39	1.98

Fig. 3 Cox multivariate analysis plots of survival probability versus follow-up time in months in those patients with pathologic N stage. The group with 9.4% collagen V or more appears as the top curve, and the group with less than 9.4% collagen V appears as the bottom curve.

group with a collagen V higher than 9.4% had a better survival rate compared with the group with lower than 9.4% (Fig. 3).

4. Discussion

The reason that surgical excision fails to cure some patients with localized NSCLC is clearly because occult metastases remain undetected by either the routine imaging or pathologic analyses used. The question of interest is whether additional, more detailed information, gathered from either the tumor tissue or its milieu might help to identify tumors likely to have occult metastases. The process of cancer cell invasion and metastases undoubtedly comprises a series of complex, sequential steps, but among these, the proteolysis of basement membranes and other ECM components, by either tumor cells or endothelial cells, is thought to be important because this breakdown facilitates the migration of tumor cells and penetration of tumors by blood vessels [1,3]. Collagen V has been described extensively for more than a decade [28]; however, the biological role of this “minor” component of the ECM and the effect of its interaction with different cytotypes remains poorly understood. Previous studies from our group demonstrated an inverse and different action of collagen V in the ECM from that observed in lung cancer. Others have shown that rabbits immunized with human collagen V, in an attempt to produce the corresponding antibodies, developed increased type collagen V synthesis by fibroblasts and consequent fibrosis in vessels and lungs [26,29-30]. Reviewing the literature, it appears unlikely that one could define a generic and unique role for collagen V because the

cellular responses evoked by this collagen substrate are multiple and sometimes opposite, dependent on the cell in question. In fact, collagen V has been proven to represent an optimal substrate for the attachment and growth of hepatocytes [31], Schwann cells [32], normal smooth muscle cells [33], and of some tumor cell types [34]. Conversely, an antiadhesive and antiproliferative role played by this collagen species has been described for neurons [32], various epithelial and endothelial cell lines [35], and breast cancer cells [8]. It is therefore not surprising that collagen V provides important information about the substrate for the attachment and growth of tumor cells, and our results here confirm its importance in NSCLC. A decreased amount of collagen V was found and according to tridimensional reconstruction showed a structural disorganization of the fibrils with a different thickness according to the histologic type and was maximal in adenocarcinomas. The structural disorganization and low amount of collagen V may lead to a decrease in binding to stromal receptors, thus increasing the tumor growth rate, motility and invasion. In addition, mRNA expression of the $[\alpha 1$ (collagen V)] chain from the collagen V gene was also decreased, thus changing collagen V synthesis in NSCLC. Taken together, these results suggest that genes that code for $[\alpha 1$ (collagen V)] may play an important role in the progression of NSCLC.

Our results also show that a decrease in collagen V fibers was associated with a decrease in tumoral and microvessel apoptosis, suggesting that a reduction of binding of collagen V to epitopes on endothelial cells reduces the synthesis of collagen V by these cells, along with fibroblasts, myofibroblasts, and also by desmoplastic stroma in tumors [36-38]. This demonstrates that the increase of collagen V is able to impair the survival of cancer cells by promoting caspase-dependent apoptosis as previously demonstrated by Luparello and Sirchia [8]. They also reported up-regulation of apoptotic initiators caspase 8 and 9, and of the apoptosis-involved caspase 1 and the related caspase 5 and 14, as well as a similar increase of the activity of some of the enzyme products [8]. Our results provide information, at the proteomic and molecular level, showing that a decreased amount of collagen V may lead to increased angiogenesis by an insufficient caspase 9-induced endothelial apoptosis. Apart from endogenous events, such as genomic DNA damage, a variety of extracellular ligands have been described that trigger apoptotic cell death (eg, tumor necrosis factor α , Fas ligand, CD4, CD8, Collagen V) or even to exert a negative control (eg, insulin-like growth factor 1 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) [39]. In this study, we found low levels of CD3, CD4, CD8, CD1a, and S100 immune cells in the tumoral microenvironment, again possibly associated with the low rate of apoptosis induced by caspase 9 and discrete immunogenicity of the decreased collagen V. To establish the relevance of these findings to the clinical setting, collagen V and apoptosis phenomenon were evaluated in terms of survival, controlled for staging and histologic

types. Clearly, multivariate analyses revealed a low risk of death for high collagen V synthesis and high endothelium apoptosis caspase expression.

It was also found that collagen V was associated with other collagen types. For example, a decrease in the density of fibers of collagen V in tumoral stroma was associated with a decrease in collagens I and III. The findings are opposing because collagen I and III are both collagen components, which are usually up-regulated in any type of lung remodeling. In the normal lung, small amounts of collagen V are expressed as very thin fibrils in the basement membranes for binding with stromal collagen, this being important for cell adhesion and the matrix repair process [5]. In the current work, the decreased amount of fibers of collagens I, III, and V found in tumors was associated with low desmoplasia, probably due to a low co-polymerization among the fibers, thus resulting in a heterotypic assembly incapable of controlling fibril structure, collagen fibrillogenesis, and tumoral growth [5,25,26,28,29,40,41]. From the literature, data can be found showing an inverse correlation of the extent of the desmoplastic stroma reaction with the progression of carcinomas, which looks similar to the decrease of collagen V found in our study [2-4]. Another question that could be resolved is the relationship between low collagen V synthesis, poor desmoplastic stroma, and increased blood vessel density, which leads to reduced hypoxia and increased nutrient flow. Thus, a decreased tumor expression of collagen V may be more of a primary event while a decreased apoptosis may be more of a secondary event. Regardless of the mechanism, staining of the tumor for collagen V and apoptosis provides important information in NSCLC.

We conclude that collagen V fiber density and the apoptosis index in tumors offers the potential to control growth rate, motility, and invasion, suggesting that strategies aimed at preventing the low collagen V synthesis, or local responses to low cell apoptosis, may have a useful impact in lung cancer treatment. To realize this will require a larger-scale study in a randomized and prospective trial.

References

- [1] Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer (Phila)* 1993;71:1368-83.
- [2] Pinto CA, Carvalho PEO, Antonangelo L, et al. Morphometric evaluation of tumor matrix metalloproteinase 9 predicts survival after surgical resection of adenocarcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* 2003;9:3098-104.
- [3] Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 1983;49:636-49.
- [4] Demarchi LM, Reis MM, Palomino SAP, et al. Prognostic values of stroma proportion and PCNA, Ki-67 and p53 proteins in patients with resected adenocarcinoma of the lung. *Mod Pathol* 2000;13:511-20.
- [5] Mayne R, Burgeson R. Structure and function of collagen types. In: Ulecham R, editor. *Biology of Extracellular Matrix*, 20th ed. London: Academic Press; 1993. p. 1-37.
- [6] Mares DC, Heidler KM, Smith GN, et al. Collagen V modulates alloantigen-induced pathology and immunology in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:62-70.
- [7] Linsenmayer TF, Fitch JM, Birk DE. Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagens. Controlling elements in corneal morphogenesis? *Ann N Y Acad Sci* 1990;580:143-60.
- [8] Luparello C, Sirchia R. Type V collagen regulates the expression of apoptotic and stress response genes by breast cancer cells. *J Cell Physiol* 2005;202:411-21.
- [9] Minafra S, Morello V, Glorioso F, et al. A new line (8701-BC) from primary ductal infiltrating carcinoma of human breast. *Br J Cancer* 1989;60:185-92.
- [10] Minafra S, Luparello C, Pucci-Minafra I, Sobel ME, Garbisa S. Adhesion of 8701-BC breast cancer cells to type V collagen and 67-kD receptor. *J Cell Sci* 1992;102:323-8.
- [11] Schrupp 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. 753-4.
- [12] Bernardi FD, Capelozzi VL, Takagaki T, Younes R, Saldiva PH. Usefulness of morphometric evaluation of histopathological slides is useful in predicting long-term outcome of patients with squamous cell carcinoma of the lung. A preliminary report. *Chest* 1995;107:614-20.
- [13] Bernardi FDC, Antonangelo L, Beyruti R, Takagaki T, Saldiva PHN, Capelozzi VL. Clinical, pathological and biological markers of prognosis in surgically resected squamous cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol* 1997;10:992-1000.
- [14] Carvalho HA, Takagaki TY, Saldiva PHN, Capelozzi V. Stereological estimates of the nuclear/cytoplasmic ratio and star volume on fiberoptic biopsies are of prognostic value for survival in a preliminary study of advanced squamous cell carcinoma of the lung. *Histopathology* 1997;31:420-9.
- [15] Antonangelo L, Bernardi FDC, Capelozzi VL, et al. Morphometric evaluation of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) is useful in predicting long-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Chest* 1997;111:110-4.
- [16] Rodrigues OR, Antonangelo L, Franco Filho EC, Capelozzi VL, Saldiva PHN. Prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in mediastinal lymph nodes metastasis and resected non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1997;27:298-304.
- [17] Minamoto H, Antonangelo L, Silva AGP, et al. Different cell and microenvironment profiles in metastatic and non-metastatic non-small cell lung carcinomas. *Histopathology* 2003;43:427-43.
- [18] Matheus RS, Bernardi FD, Gallo CP, et al. Nuclear markers (star volume, mitotic index, AgNOR and Ki-67) of the primary tumor and its metastasis in non-small cell lung carcinomas. *Pathol Res Pract* 2004;200:13-23.
- [19] Saito DM, Franco MR, Parra ER, et al. Cell cycle regulator in primary lung adenocarcinoma and its haematogenous metastases. *Histopathology* 2007;50:525-7.
- [20] Parra ER, Park J, Rizzardi F, et al. Prognostic indice expression of cyclin-d1, c-erbB-2 and VEGF: metastases vs corresponding primary cancers and metastatic vs non-metastatic adenocarcinomas. *Histol Histopathol* 2008;23:987-93.
- [21] 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. p. 26-50.
- [22] Weibel ER. Morphometry: stereological theory and practical methods. In: Gil J, editor. *Models of lung disease—microscopy and structural methods*. New York: Marcel Dekker; 1990. p. 199-247.
- [23] Miller EJ, Rhodes RK. Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods Enzymol* 1982;82(Pt A):33-64.
- [24] Lane D, Harlow E. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1988. p. 56-81.
- [25] Parra ER, Kairalla RA, de Carvalho CR, Capelozzi VL. Abnormal deposition of collagen/elastic vascular fibres and prognostic

- significance in idiopathic interstitial pneumonias. *Thorax* 2007;62:428-37.
- [26] Teodoro WR, Velosa AP, Witzel SS, et al. Architectural remodelling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract* 2004;200:681-91.
- [27] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(Delta Delta C (T))} Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- [28] Bateman JF, Lamandè SR, Ramshaw JAM. Collagen superfamily. In: Comper WD, editor. *Extracellular matrix volume 2, molecular components and interaction*. Amsterdam: Harwood Acad. Public; 1996. p. 22-67.
- [29] Velosa AP, Teodoro WR, de Oliveira CC, et al. Collagen V nasal tolerance in experimental model of systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 2007;299:177-89.
- [30] Callado MR, Viana VS, Vendramini MB, et al. Autoantibody profile in the experimental model of scleroderma induced by type V human collagen. *Immunology* 2007;122:38-46.
- [31] Takai KK, Hattori S, Irie S. Type V collagen distribution in liver is reconstructed in coculture system of hepatocytes and stellate cells; the possible functions of type V collagen in liver under normal and pathological conditions. *Cell Struct Funct* 2001;26:289-302.
- [32] Chernousev MA, Stahl RC, Carey DJ. Schwann cell type V collagen inhibits axonal outgrowth and promotes Schwann cell migration via distinct adhesive activities of the collagen and noncollagen domains. *J Neurosci* 2001;21:6125-35.
- [33] Grotendorst GR, Seppä HE, Kleimanman HK, Martin GR. Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3669-72.
- [34] Ruggiero F, Champlaud MF, Garrone R, Aumailley M. Interactions between cells and collagen V molecules or single chains involve distinct mechanisms. *Exp Cell Res* 1994;210:215-23.
- [35] Parekh TV, Wang XW, Makri-Werzen DM, Greenspan DS, Newman MJ. Type V collagen is an epithelial cell cycle inhibitor that is induced by and mimics the effects of transforming growth factor β 1. *Cell Growth Differ* 1998;9:423-33.
- [36] Konomi H, Toshihiko H, Kiyoo N, Masataka A. Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung and skin. immunohistochemical evidence by anti-collagen antibodies characterized by immunoelectroblotting. *Am J Pathol* 1984;116:417-26.
- [37] Reiser KM, Last JA. Type V collagen. Quantitation in normal lungs and in lungs of rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Biol Chem* 1983;258:269-75.
- [38] Para ER, Teodoro WR, Velosa AP, de Oliveira CC, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Interstitial and vascular type V collagen morphologic disorganization in usual interstitial pneumonia. *J Histochem Cytochem* 2006;54:1315-25.
- [39] Sgonc R. The vascular perspective of systemic sclerosis: of chickens, mice and men. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;120:169-76.
- [40] Bezerra MC, Teodoro WR, de Oliveira CC, et al. Scleroderma-like remodeling induced by type V collagen. *Arch Dermatol Res* 2006;298:51-7.
- [41] Ogido LT, Teodoro WR, Velosa AP, et al. Abnormal collagen deposition in synovia after collagen type V immunization in rabbits. *Histol Histopathol* 2008;23:263-9.