MARISTELA PERES RANGEL

Relevância clínica da concentração do ácido hialurônico no escarro e em espécimes tumorais de pacientes portadores de carcinomas de pulmão

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Fisiopatologia experimental

Orientador: Profª Dra. Vera Luiza Capelozzi

São Paulo

2012

MARISTELA PERES RANGEL

Relevância clínica da concentração do ácido hialurônico no escarro e em espécimes tumorais de pacientes portadores de carcinomas de pulmão

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Fisiopatologia experimental

Orientador: Profª Dra. Vera Luiza Capelozzi

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rangel, Maristela Peres
Relevância clínica da concentração do ácido hialurônico no escarro e em espécimes tumorais de pacientes portadores de carcinomas de pulmão / Maristela Peres Rangel. -- São Paulo, 2012.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Vera Luiza Capelozzi.

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

USP/FM/DBD-163/12

Dedico este trabalho aos meus pais,

que nunca deixaram de acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Aos meus avós, Argeu e Eugênia e minha tia Marisa, por me acolherem em sua casa e por me tratarem tão bem. Sem esse suporte de vocês esse processo seria muito mais difícil. Muito obrigada por dividirem tudo comigo sem hesitar. E às minhas tias, tios e primos por me agüentarem falando somente desta pesquisa. Admiro a paciência de vocês!

À Profª Vera Capelozzi por ter aberto esta porta para mim num momento em que estava quase desistindo. Quero muito continuar aprendendo a ser generosa, paciente e, principalmente, humilde como você. Obrigada por tudo! Você é um grande exemplo!

Aos amigos do laboratório, Edwin Parra, por toda a ajuda, pelas muitas risadas e por dizer sempre que tudo ia dar certo, Vanessa Karen de Sá, pela ajuda na elaboração deste trabalho e Natália Colombo, pela amizade,

conversas, apoio e inúmeras risadas no laboratório. Agradeço também à Tânia Souza por todo o suporte administrativo e a todos do programa de pós-graduação em Fisiopatologia Experimental.

A todos da Disciplina de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pela oportunidade e contribuição intelectual tão relevante. Agradeço especialmente ao Prof Dr. João Roberto Maciel Martins por toda colaboração na realização deste trabalho e pela paciência comigo. Admiro muito sua competência e excelência no que faz.

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

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

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

As enfermeiras e técnicas de enfermagem do HCB e aos funcionários do SVOC-USP. Foi um prazer imenso conhecer e trabalhar com vocês. Obrigada por toda a disposição em ajudar.

Aos amigos que fiz no HCB. Todos! Vocês são prova de que quem faz os lugares são as pessoas! Natália Campacci e Alice Lopes, obrigada por me receberem na casa de vocês e por se tornarem minhas amigas. Cleyton Zanardo, obrigada pela ajuda (e paciência!) com a estatística.

Aos meus amigos da Presbi e do Mack por me agüentarem repetindo e repetindo sobre este projeto. Pelos momentos de descontração extremamente necessários para eu conseguir continuar e finalizar esse trabalho.

À FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro de toda pesquisa.

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

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa.

Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre”

Paulo Freire

Esta dissertação está de acordo com:

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....02

1.1 *Câncer de pulmão - Incidência e mortalidade*.....02

1.2 *Tipos histológicos* 03

1.3 *Causas principais e fatores de risco*.....04

1.4 *DPOC*.....06

1.5 *Transformações pré-neoplásicas*.....07

1.6 *Prevenção e screening do Câncer de Pulmão*.....08

1.7 *Métodos diagnósticos*.....10

1.8 *Microambiente neoplásico*.....14

1.9 *Glicosaminoglicanos (GAGs)*.....15

1.10 *Ácido Hialurônico*.....16

1.11 *Metabolismo do AH*.....17

1.12 *AH nas patologias*.....19

2. HIPÓTESE.....24

3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS 25

4. MÉTODOS.....26

4.1 *Casuística (Tecidos)* 26

4.2 *Microscopia Óptica*.....27

4.3 *Casuística (escarro)* 27

4.4 *Coleta das amostras de escarro*.....30

4.5 *Coleta das amostras provenientes de cadáveres*.....32

4.6 *Ensaio fluorométrico para dosagem do AH*.....33

4.7 *Organograma da metodologia.....36*
4.8 *Tabulação dos dados e análise estatística.....37*
5. RESULTADOS*.....39*
5.1 *Pacientes selecionados para amostras de tecido: características demográficas.....40*
5.2 *Análise dos níveis de AH nos tecidos.....41*
5.3 *Análise da Sobrevida.....44*
5.4 *Pacientes selecionados para amostras de escarro: características demográficas.....46*
5.5 *Análise dos níveis de AH no escarro.....50*
5.6 *Análise de Curva ROC 56*
6.DISCUSSÃO*.....59*
7. CONCLUSÕES*.....71*
8. ANEXOS*.....72*
9. REFERÊNCIAS*.....93*
APÊNDICE

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: *Características básicas dos glicosaminoglicanos.....15*

Figura 2: *Amostras de cada um dos tipos histológicos (Travis et al.,2011) encontrados nos casos selecionados. A e B – Adenocarcinoma acinar; C e D – Adenocarcinoma Papilífero; E e F – Adenocarcinoma In Situ; G e H – Carcinoma de células escamosas clássico; I e J – Carcinoma de Grandes Células. Imagens à esquerda: aumento de 200X. À direita: 400X.....27*

Figura 3: *Inalador ultrassônico de micropartículas homogêneas (menores do que 4 micrômetros) capazes de atingir as vias respiratórias inferiores do pulmão (alvéolos) utilizado nas coletas de escarro induzido.....29*

Figura 4: *Separação macroscópica do escarro e da saliva sobre placa de Petri com o auxílio de agulha seguida de armazenamento em microtubo eppendorf para congelamento.....30*

Figura 5: *Coleta de amostra de secreção endobrônquica. A: Incisão biacrômia esterno. B: Exposição da traquéia abaixo do cartílago cricóide e início da inserção da espátula. C: Inserção completa da espátula na traquéia. D: Amostra da secreção coletada.....31*

Figura 6: *Placa de ELISA contendo as amostras no dispensador de líquidos automático para a adição de Enhancement.....34*

Figura 7: *Organograma dos métodos de análise do AH em amostras de tecido.....35*

Figura 8: *Organograma dos métodos de análise do AH em amostras de escarro.....35*

Figura 9: *Concentração de AH presente nas amostras tumorais e não tumorais (p<0,001) 41*

Figura 10: *Concentração de AH presente em amostras de adenocarcinomas versus amostras não tumorais (p<0.001) 42*

Figura 11: *Concentração de AH presente em amostras de Carcinoma de Células Escamosas (CEC) versus amostras não tumorais (p=0,002).....43*

Figura 12: *A curva de sobrevivência de Kaplan Meier mostra que os pacientes que apresentaram níveis de AH no tecido menores que 364,36 µg/g apresentaram maior sobrevida do que aqueles no segundo grupo (com valores de AH entre 364,36 µg/g e 899,83 µg/g) e no terceiro grupo (com valores de AH maiores que 899,83 µg/g).(LogRank= 5.81; p=0.05).....43*

Figura 13: *Comparação do AH presente nos três grupos analisados: Controle, DPOC e Câncer (p<0.001). Escala Log10.....50*

Figura 14: *Comparação do AH presente nos grupos Controle e Câncer (p<0.001).Escala Log10.....51*

Figura 15: *Comparação do AH presente nos grupos DPOC e Câncer (p=0.002). Escala Log10.....51*

Figura 16: *Comparação do AH presente nos grupos Controle e DPOC (p=0.02) Escala Log10.....52*

Figura 17: *Diferença nos níveis de AH presente em cada um dos tipos histológicos (p=0.01). Escala Log10.....53*

Figura 18: *Diferença nos níveis de AH presente em cada um dos estádios clínicos (p=0.9). Escala Log10.....54*

Figura 19: *Curva ROC representando a habilidade diagnóstica da dosagem do AH no escarro para diferenciar pacientes com câncer de pessoas saudáveis. Área=0.82.....56*

Figura 20: *Curva ROC representando a habilidade diagnóstica da dosagem do AH no escarro para diferenciar pacientes com câncer de pacientes com DPOC. Área =0.69.....57*

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.(anexo 1) *Dados demográficos dos 46 pacientes selecionados no hospital AC Camargo para a coleta de amostras de tecido.....71*

Tabela 02.(anexo 2) *Re-*classificação *histológica dos 46 casos selecionados para o estudo.....73*

Tabela 03.(anexo 3) *Dados demográficos dos 90 pacientes portadores de carcinomas de pulmão selecionados no ICESP e no HCB para a coleta de escarro.....75*

Tabela 04.(anexo 4) *Dados demográficos dos 25 pacientes portadores de DPOC selecionados no HC-FMUSP para o grupo de alto risco.....78*

Tabela 05.(anexo 5) *Dados demográficos dos 15 pacientes sem histórico de doença pulmonar crônica selecionados no HC-FMUSP para o grupo controle.....79*

Tabela 06.(anexo 6) *Dados demográficos dos 26 casos selecionados no SVOC-USP para coleta de secreção endobrônquica para o grupo controle.....80*

Tabela 07.(anexo 7) *Critérios de inclusão e exclusão para cada um dos grupos selecionados para a coleta de escarro.....81*

Tabela 08. *Características demográficas dos 46 pacientes quanto ao sexo, idade, localização do tumor, estadiamento, tabagismo e sobrevida.....39*

Tabela 09: *Análise descritiva dos valores de AH presente nos tecidos tumorais e não tumorais selecionados (µg/g de tecido seco).....41*

Tabela 10. *Características demográficas dos 90 pacientes selecionados para coleta de escarro quanto ao sexo, idade, localização do tumor, estadiamento, tabagismo e sobrevida.....46*

Tabela 11. *Características demográficas dos 25 pacientes portadores de DPOC quanto à idade, sexo e tabagismo.....47*

Tabela 12. *Características demográficas dos 15 voluntários saudáveis quanto à idade, sexo e tabagismo.....48*

Tabela 13. *Características demográficas dos 26 casos selecionados no SVOC-USP para formação de um segundo grupo controle.....48*

Tabela 14. *Análise descritiva dos valores de AH presente no escarro dos grupos selecionados (ng/mg de proteína).....49*

Tabela 15.(anexo 10) *Valores de ponto de corte com suas respectivas proporções de sensibilidade e especificidade referente à curva ROC entre amostras saudáveis e amostras de pacientes com câncer.....88*

Tabela 16. Matriz de Confusão considerando a classificação da quantidade de AH no escarro dicotomizada em relação a presença ou ausência de câncer.(Grupos Voluntários Saudáveis e Câncer).....56

Tabela 17.(anexo 11) *Valores de ponto de corte com suas respectivas proporções de sensibilidade e especificidade referente à curva ROC entre amostras de pacientes com DPOC e amostras de pacientes com câncer.....90*

Tabela 18: *Matriz de Confusão considerando a classificação da quantidade de AH no escarro dicotomizada em relação à presença ou ausência de câncer. (Grupos DPOC e Câncer).....57*

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÌMBOLOS

AH - Ácido Hialurônico

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

ed. - edição

ELISA – Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay

et al. - e outros

EUA – Estados Unidos da América

Fig. - Figura

GAGs - Glicosaminoglicanos

HAS - Ácido Hialurônico Sintase

HCB – Hospital de Câncer de Barretos

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

HYAL – Hialuronidase

ICESP – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

INCA – Instituto Nacional de Câncer

MEC - Matriz Extracelular

µg/g – Microgramas por grama

ng/mg – Nanogramas por miligramas

NSCLC - Carcinoma de Pulmão Não Pequenas Células

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

RHAMM - Receptor de Ácido Hialurônico Mediador de Motilidade

SVOC – Serviço de Verificação de Óbitos da Capital

USP – Universidade de São Paulo

RESUMO

Rangel MP. *Relevância clínica da concentração do ácido hialurônico no escarro e espécimes tumorais de pacientes portadores de carcinomas de pulmão* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Introdução. O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano não sulfatado presente na matriz extracelular. Vários estudos têm demonstrado que uma produção ou degradação aberrante dessa molécula tem influência no comportamento do câncer de mama, próstata, bexiga e pulmão. Desta forma, a dosagem do ácido hialurônico em tecidos e fluidos corporais como sangue, urina e escarro tem despertado grande interesse como rastreador de indivíduos de alto risco e marcador diagnóstico e/ou prognóstico da doença estabelecida. **Objetivos**. Verificar se há diferenças nos níveis de ácido hialurônico entre espécimes tumorais e não tumorais de câncer de pulmão, bem como seu impacto na sobrevida dos pacientes; verificar se diferenças encontradas nos tecidos estão também presentes no escarro; verificar se a dosagem do ácido hialurônico no escarro permite rastrear pacientes com câncer de pulmão entre pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e voluntários saudáveis. **Resultados**. Houve uma elevação significativa nos níveis de ácido hialurônico nos espécimes tumorais em relação aos espécimes não tumorais, mesmo quando histologicamente categorizados. Não houve associação entre as concentrações do ácido hialurônico com características clínicas dos pacientes, porém houve impacto na sobrevida dos pacientes: pacientes com tumores contendo ácido hialurônico > 364,36 µg/g apresentaram menor sobrevida global

que pacientes cujos tumores evidenciaram ácido hialurônico < 364,36 ug/g. Demonstramos que pacientes com câncer de pulmão apresentam elevações altamente significativas da produção de ácido hialurônico no escarro independente das características clínicas dos pacientes, porém dependente do tipo histológico. Valores de ácido hialurônico >11,13ng/mg no escarro tem sensibilidade de 87% para rastreamento de pacientes com câncer de pulmão e voluntários saudáveis. Nesse grupo valores > 31,44ng/mg tem especificidade de 100% e sensibilidade de 51%. Houve exclusão com sensibilidade de 33% e especificidade de 100% de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica em relação aos pacientes com câncer de pulmão para valores > 48,36ng/mg. **Conclusão**. Diferentes níveis de ácido hialurônico forma observados nos tumores e tecidos normais com impacto na sobrevida dos pacientes, tornando a dosagem do ácido hialurônico como promissor marcador prognóstico no câncer de pulmão. Diferenças observadas nos tecidos foram também constatadas no escarro, despontando a dosagem do ácido hialurônico como promissora no rastreamento de indivíduos com risco para câncer de pulmão.

Descritores. Câncer do pulmão, ácido hialurônico, escarro, matriz extracelular, rastreamento, diagnóstico, sobrevida, prognóstico.

ABSTRACT

Rangel MP. *Clinical relevance of the hyaluronan levels in the sputum and tumoral tissues of lung cancer patients.* [dissertation]. “São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

Introduction. Hyaluronan is an extracellular matrix non-sulfated glycosaminoglycan. Some have reported that its abnormal production and degradation can influence the behaviour of different types of tumours like breast, prostate, bladder and lung cancer. Therefore, hyaluronan quantitative analysis in tissues and body fluids like blood, urine and sputum has shown promise on the high risk patients screening and as diagnostic/prognostic marker of some diseases. **Objectives**. Verify if there are differences in the levels of hyaluronan in tumoral and non-tumoral lung cancer specimens, as well as its impact on the patients survival; verify if sputum samples present the same differences; verify the role of hyaluronan quantitative analysis in the screening of lung cancer patients between patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy volunteers. **Results**. Lung cancer tumoral specimens showed higher levels of hyaluronan when compared to non-tumoral specimens even when the specimens were histologically categorized. There was no correlation between hyaluronan levels and the patients clinical features, however, an impact in the patients survival was observed: patients with tumoral hyaluronan levels > 364,36 µg/g had a lower survival rate than patients with < 364,36 ug/g. We have shown that lung cancer patients show an elevated production of hyaluronan in the sputum. This characteristic was independent of the clinical features but dependent of the histologic type. The hyaluronan quantitative analysis for the

screening of lung cancer patients between healthy volunteers showed a sensitivity of 87% for hyaluronan levels >11,13ng/mg in the sputum. In this group levels > 31,44ng/mg showed 100% specificity and 51% sensibility. On a second group (lung cancer patients *vs* chronic obstructive pulmonary disease patients) levels of sputum hyaluronan > 48,36ng/mg showed 100% specificity to exclude chronic obstructive pulmonary disease patients from lung cancer patients. The sensibility for this cut-off point was 33%. **Conclusion**. Hyaluronan quantitative analysis in the tissues is a promising lung cancer prognostic marker considering the differences between hyaluronan levels on tumoral and non-tumoral tissues. Not only this, but, the differences observed in the tissues were observed in the sputum as well. Hence, the hyaluronan quantitative analysis is a promising strategy in the screening of high risk individuals that might develop lung cancer.

Key words. Lung Cancer, hyaluronan, sputum, extracellular matrix, screening, diagnosis, survival, prognostic.

Introdução

1.1 Câncer de pulmão - Incidência e mortalidade

Ao contrário de outras neoplasias, o câncer de pulmão é o maior causador de mortes no mundo. Nos EUA, é a causa mais freqüente de morte por neoplasia em homens e já ultrapassou os índices de morte por câncer de mama em mulheres (Schrump et al., 2005).

A incidência de câncer de pulmão era rara no início do século XX até que, a partir de 1930 começou a aumentar significativamente, inicialmente nos homens, e em meados do século já era a maior causa de morte por câncer entre homens nos EUA. A incidência também aumentou gradativamente entre as mulheres chegando a ser a maior causa de morte por câncer a partir de 1960. As diferenças entre homens e mulheres na epidemiologia da doença ocorrem principalmente pela diferença no hábito tabagista entre os sexos (Alberg e Samet, 2003)

A mais recente estimativa mundial apontou uma incidência de 1,61 milhões de casos novos de câncer de pulmão para o ano de 2008, representando 12,7% de todos os novos casos de câncer. No Brasil, no ano de 2012, estimam-se 17.210 casos novos de câncer de pulmão em homens e 10.110 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 18 casos novos a cada 100 mil homens e 10 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2011). De todos os casos diagnosticados, 90% acometem pessoas acima dos 55 anos e a mediana de idade diagnóstica é de 71 anos (Howlader et al., 2011).

Em relação à mortalidade, no período entre 2004 e 2008 o câncer de pulmão foi responsável por 75.2 óbitos/100.000 homens e 52.3 óbitos/100.000 mulheres nos EUA. No Brasil, no mesmo período, a doença levou a óbito 15.4 homens/100.000 e 9.6 mulheres/100.000 (Howlader et al., 2011; INCA, 2011).

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

1.2 Tipos histológicos

O câncer de pulmão se apresenta sob diversas formas histológicas entre eles os carcinomas de pequenas células e os carcinomas não pequenas células (NSCLC) sendo este último o principal tipo. Esse tipo de neoplasia pulmonar é caracterizada por achados clínicos bem heterogêneos, mas que se assemelham segundo suas origens celulares e moleculares (Brundage et al., 2002). A classificação como NSCLC abrange os adenocarcinomas, os carcinomas escamosos e os carcinomas de grandes células. Esses tipos de carcinomas são classificados juntos, pois seu diagnóstico, estadiamento, prognóstico e tratamento são similares (NCI, 2007).

Os carcinomas de pulmão podem se originar a partir dos brônquios maiores formando os chamados tumores centrais ou a partir dos brônquios menores, bronquíolos ou alvéolos formando os tumores periféricos. Os

carcinomas de células escamosas e os carcinomas de pequenas células surgem predominantemente de maneira central enquanto que os outros tipos histológicos, adenocarcinomas e carcinomas de grandes células, têm origem e localização periférica. A partir de dados obtidos em séries publicadas sobre Incidência de Câncer em 5 Continentes, carcinomas de pequenas células compreendem 20% dos casos e carcinomas indiferenciados/carcinomas de grandes células em torno de 9%. Para outros tipos histológicos, a proporção difere entre os sexos: carcinomas de células escamosas compreendem 44% dos cânceres em homens, e 25% nas mulheres, enquanto adenocarcinomas compreendem 28% dos casos em homens e 42% em mulheres (Travis et al., 2004).

1.3 Causas principais e fatores de risco

O câncer de pulmão inicia seu desenvolvimento a partir da exposição a fatores ambientais carcinogênicos que causam as primeiras mutações nas células. Dentre os mais diversos fatores, o tabaco é considerado o principal fator carcinogênico quando se trata de câncer de pulmão. Oitenta por cento dos homens e 75% das mulheres que morrem em decorrência dessa neoplasia têm sua doença associada ao fumo. Na maioria das populações, os casos de câncer do pulmão tabaco-relacionados representam 80% ou mais dos casos desse câncer e quando comparados com os não fumantes, os tabagistas têm cerca de 20 a 30 vezes mais risco de desenvolver câncer do pulmão (INCA, 2011). Além do tabaco, ainda podemos destacar outros fatores que contribuem

para o aumento na incidência do câncer de pulmão, tais como exposição a fibras de asbestos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos derivados da poluição atmosférica, radônio, cromo, níquel entre outros agentes irritantes.

A exposição aos fatores ambientais tem grande influência na incidência do câncer de pulmão, entretanto o risco de desenvolver a doença também está relacionado com a susceptibilidade do indivíduo a esses agentes ambientais. Essa susceptibilidade é que determina a extensão das lesões genéticas causadas pela exposição aos agentes ambientais e o tempo decorrido desde a exposição até a ocorrência das lesões (Alberg e Samet, 2003). No caso do câncer de pulmão, já se sabe que no momento que a doença já esta clinicamente detectável, já ocorreram uma série de 10 a 20 lesões genéticas. Essas lesões podem ocorrer tanto em proto-oncogenes recessivos (3p14/21/24-25; 5q; 9p; 11p13/15; Rb gene; p53 gene) quanto em genes dominantes (*Myc, ERBB* and *Ras* families and Her2/neu gene) (Minna, 1993).

A obstrução das vias aéreas e/ou o enfisema são outros fatores de risco associados ao aparecimento do câncer de pulmão. A esses acometimentos pulmonares, desde a bronquiolite crônica obstrutiva até o enfisema pulmonar, dá-se o nome de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Pelo fato de muitos pacientes desenvolverem mais de uma dessas características morfológicas ao mesmo tempo a nomenclatura é generalizada e qualquer um desses acometimentos é chamado de DPOC.

1.4 DPOC

O que ocorre na DPOC é um espessamento, inflamação, diminuição da elasticidade e destruição das paredes alveolares causando dificuldades para a realização das trocas gasosas. Em muitos casos também há alta produção de muco causando a obstrução das vias aéreas dificultando ainda mais o influxo de ar.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a DPOC é a quarta doença que mais causa mortes em todo o mundo e o câncer de pulmão ocupa o sétimo lugar nesse ranking (WHO, 2008). Assim como para o câncer de pulmão, o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da DPOC também é a exposição a agentes ambientais carcinogênicos, principalmente o tabaco. Apesar disso, já foi comprovado que ter DPOC é um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão independentemente do hábito tabagista (Sekine, Y et al., 2011).

A incidência anual de câncer de pulmão proveniente de pacientes com DPOC fica entre 0.8% e 1.2%. Um estudo de revisão recente compilou trabalhos que mostram que 1% dos pacientes portadores de DPOC desenvolve o câncer de pulmão enquanto que apenas 0.2% das pessoas com função pulmonar normal desenvolvem a doença (Sekine, Y et al., 2011) e já se sabe que vias de sinalização ativadas na DPOC têm relação com a carcinogênese (Adcock et al., 2011).

1.5 Transformações pré-neoplásicas

De forma geral, assim como as outras neoplasias, com a ação dos fatores de risco, o desenvolvimento do câncer de pulmão é resultado de um acúmulo de modificações genéticas e epigenéticas e geralmente essas neoplasias ocorrem após uma série de modificações patológicas da mucosa respiratória conhecidas como pré-neoplásicas ou lesões pré-malignas (Wistuba e Gazdar, 2006). A lesão genética presente nas neoplasias pode ser herdada pela linhagem germinativa ou adquirida pelas células somáticas por agentes ambientais (Cotran et al., 1999).

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

pode se transformar num carcinoma bronquioalveolar que se caracteriza pelo crescimento de células neoplásicas ao redor das estruturas alveolares preexistentes podendo acarretar, posteriormente, num adenocarcimona invasivo (Colby et al., 1998; Wistuba et al., 2002). O desafio dos pesquisadores atualmente tem sido a procura por alguma molécula ou marcador capaz de detectar essas lesões pré-neoplásicas para a detecção da doença antes que ela se desenvolva ou enquanto ainda está em estadios iniciais. Atualmente, os testes disponíveis para tal finalidade, apesar de já terem avançado consideravelmente, ainda podem ser melhorados para maior conforto do paciente.

1.6 Prevenção e screening do Câncer de Pulmão

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

Mesmo com as ações preventivas, é importante que existam métodos capazes de detectar a doença uma vez que ela se desenvolva. Os métodos de “screening” (rastreamento, reconhecimento, varredura) são realizados para a

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

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

Apesar de efetivos esses métodos ainda não são considerados ideais, pois só têm capacidade de detectar o câncer de pulmão em estadios mais avançados. Atualmente, a ânsia dos pesquisadores da área é pela descoberta de algum marcador molecular seja no sangue, no escarro ou nos lavados brônquicos para a detecção precoce do câncer de pulmão, mas até o momento nenhum grupo de pesquisa teve sucesso nessa busca.

1.7 Métodos diagnósticos

Uma vez detectado, os oncologistas dispõem de uma série de ferramentas para o diagnóstico e estadiamento precisos do câncer de pulmão. Para selecionar qual destas ferramentas usar em cada caso, é recomendado que os oncologistas consultem os pneumologistas, radiologistas e cirurgiões torácicos para a definição da conduta (Collins et al., 2007).

No caso de tumores aparentemente em estadios iniciais, recomenda-se a realização da toracotomia para a confirmação da presença do tumor, estadiamento e possível retirada do mesmo. Nos casos de estadios mais avançados é recomendada a realização do teste menos invasivo possível para o paciente. Entretanto, a grande maioria dos testes disponíveis ainda hoje para a confirmação do câncer de pulmão requer alguma intervenção cirúrgica.

Dentre as técnicas e exames mais utilizados para a detecção do câncer de pulmão podemos destacar a toracocentese, a biópsia de linfonodos, a broncoscopia, a biópsia por agulha transcutânea e a citologia do escarro.

Toracocentese

A toracocentese é o método de aspiração de líquido pleural, através de uma agulha ou cateter, introduzido através da pele e parede torácica. É indicado em casos de derrame pleural, para realização de citologia do líquido, com sensibilidade entre 40 a 70%, principalmente para adenocarcinoma (por ter mais esfoliação das células pleurais) (Fernandez A et al., 2002).

Broncoscopia

Trata-se de um exame endoscópico que consiste na introdução de aparelho fino e flexível através da via aérea. A broncoscopia além de ter a capacidade de visualização da lesão, independente da sua localização (traquéia ou brônquios) também permite ao médico a coleta de material em forma de lavado broncoalveolar, escovado brônquico e biópsias brônquicas e transbrônquicas. Na maioria dos casos é utilizado o broncofibroscópio e o aparelho mais rígido é utilizado somente em casos específicos. Tem alta acurácia nos tumores centrais, de 55 a 80%. É considerada a técnica definitiva para o diagnóstico (Collins et al., 2007; Fernandez A et al., 2002).

Biópsia por agulha transcutânea

Procedimento realizado com anestesia local e auxílio da tomografia computadorizada. O médico radiologista alcança a lesão com o auxílio de uma agulha e assim consegue obter uma amostra da lesão para análise citológica. Neste tipo de intervenção há um risco de 20-35% de ocorrer pneumotórax. O

pneumotórax é uma complicação freqüente do procedimento, sendo a principal causa de aumento da morbidade e aumento em número de dias de internação hospitalar. Diversos fatores aumentam o risco de pneumotórax, sendo o principal deles a DPOC grave (Fernandez et al., 2002).

Mediastinoscopia

A mediastinoscopia facilita o estadiamento patológico dos linfonodos mediastinais. Através de uma incisão cervical, é possível biopsiar os linfonodos paratraqueais altos e baixos, pré-traqueais e, em alguns casos, os hilares e carinais. A mediastinoscopia tem rendimento diagnóstico que varia de 89 a 100% (Fernandez et al., 2002).

Citologia do escarro

Com a maior utilização da broncoscopia a realização da citologia do escarro tem diminuído consideravelmente. Ela é útil quando a broncoscopia não é indicada. O rendimento da técnica depende da localização, tamanho do tumor e tipo histológico sendo que os melhores resultados são obtidos quando os tumores são grandes e centrais. Desse modo, a técnica tem melhores resultados nos casos de carcinomas escamosos, os quais usualmente têm esse tipo de localização.

Para a realização da técnica pode ser coletado o escarro produzido por expectoração espontânea ou utilizar-se de técnicas capazes de induzir a sua produção. A técnica mais largamente utilizada é a indução do escarro através de

inalação de solução salina hipertônica, utilizada desde o início dos anos 80, inicialmente para o diagnóstico de infecção por *Pneumocystis carinii* em enfermos com Síndrome de Imunodeficência Adquirida (Martins et al., 2004).

A técnica consiste na nebulização com uma solução salina hipertônica (3-5%), através de um nebulizador ultra-sônico de micropartículas menores que 4µm. Trata-se de um procedimento não invasivo, rápido, de baixo custo e fácil realização. A desvantagem da técnica é a demanda de tempo para a realização da coleta, a necessidade de aguardar um intervalo de pelo menos 30 minutos entre uma coleta e outra no caso de insucesso na primeira tentativa, além de necessitar da presença de médicos ou enfermeiros durante a indução para o gerenciamento de possíveis intercorrências (Chanez et al., 2002).

Marcadores biológicos

Marcadores biológicos diagnósticos são substâncias que podem ser medidas quantitativamente por métodos bioquímicos, imunológicos e moleculares nos fluidos ou nos tecidos corporais, associados a neoplasias e possivelmente com o órgão de origem (Schwartz MK, 1993; Bagashawe et al., 1995). Nas últimas décadas várias proteínas e pequenos peptídeos têm sido identificados como produtos de secreção de diferentes neoplasias sólidas, podendo ser utilizados como marcadores tumorais diagnósticos, porém, até o presente momento, os marcadores biológicos diagnósticos para o câncer de pulmão não se mostraram úteis como recurso diagnóstico, devido a sua baixa sensibilidade e especificidade

(Takagaki TY, 1992). A grande invasibilidade dos exames diagnósticos para o câncer de pulmão ainda é um dos maiores desafios da prática clínica oncológica.

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

1.8 Microambiente neoplásico

Outro fator importante que influencia no processo de desenvolvimento das neoplasias é a interação das células tumorais com o ambiente tridimensional que as circunda: a matriz extracelular (MEC). Apesar de durante muito tempo a MEC ter sido considerada somente como um emaranhado protéico cuja função seria preencher os espaços onde não houvesse tecido e como suporte estrutural, hoje já se sabe que ela apresenta características de fundamental

importância para um bom funcionamento dos tecidos (Raghow R, 1994). Nos casos neoplásicos, a MEC possui informações importantes para a migração, diferenciação, ligação e organização das células neoplásicas e, durante o desenvolvimento neoplásico, seus componentes protéicos continuam a ser produzidos pelas células normais, pelas células do estroma e pelas células neoplásicas também (Theocharis et al., 2010)

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

1.9 Glicosaminoglicanos

São polissacarídeos longos e lineares, que consistem de unidades dissacarídeas que se repetem com seqüências que variam na composição básica do dissacarídeo, ligação, acetilação e N- e O- sulfatação. Existem duas principais classes de GAGs: 1) GAG não sulfatado: ácido hialurônico (AH) e 2) GAGs sulfatados: condroitim sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato, heparam sulfato e heparina (Figura 01).

Nome	Açúcares	Sulfatação	Proteoglicanos
Ácido Hialurônico	Ácido glucurônico e glucosamina	-	-
Condroitin sulfato	Ácido glucurônico e galactosamina	+	+
Dermatan sulfato	Ácido idurônico, ácido glucurônico e galactosamina	+	+
Keratan sulfato	Galactose e glucosamina	+	+
Heparan sulfato	Ácido glucurônico/idurônico e glucosamina	+	+
Heparina	Ácido glucurônico/idurônico e glucosamina	+	+

Figura 1: Características básicas dos glicosaminoglicanos

Os GAGs são envolvidos em uma variedade de processos biológicos, incluindo interações células-matriz e ativação de quimiocinas, enzimas e fatores de crescimento (Taylor e Gallo, 2006). Esses processos são mediados através da capacidade de interagirem com numerosas proteínas, incluindo proteases, citocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento (Handel et al., 2005). Com exceção do AH, os GAGs são encontrados sob forma de proteoglicanos. Dentre os principais GAGs presentes na MEC, o que aparece em maior quantidade nos tecidos pulmonares é o AH (Pelosi et al., 2007).

1.10 Ácido Hialurônico

O AH é um polímero linear longo de dissacarídeos repetidos, constituído por unidades alternadas de ácido β-D-glucurônico e N-acetilglucosamina (Raghow R, 1994).

Esse polissacarídeo linear tem como importante característica o fato de não ser sulfatado. Por ser extremamente hidratado, esse GAG possui um importante papel como estabilizador de matriz extracelular, lubrificação articular, homeostasia aquosa, regulação da distribuição das proteínas plasmáticas, barreira contra disseminação de infecções e macromoléculas, bem como a regulação da atividade celular pela interação com proteínas receptoras da superfície celular (Fraser et al., 1997). A interação do AH com proteínas de matriz e com receptores na superfície celular regula muitos aspectos do comportamento das células, tais como a migração, a adesão célula-célula e a diferenciação celular (Knudson e Knudson, 2004; Knudson et al., 2003).

1.11. Metabolismo do AH

O AH está presente em praticamente todos os tecidos do corpo humano principalmente nos tecidos cartilaginosos onde têm um papel importante na hidratação da matriz extracelular. O metabolismo dessa molécula ocorre de maneira complexa e em alguns tipos de células como os condrócitos, por exemplo, as enzimas de síntese e de degradação podem trabalhar ao mesmo tempo. Depois da descoberta da enzima de síntese do AH, a *ácido hialurônico sintase* (HAS), primeiramente descrita na bactéria *Streptococcus pyogenes,* muitos progressos foram realizados para a compreensão do metabolismo desta molécula (McDonald e Camenisch, 2003)

Atualmente já são conhecidas três enzimas na família da HAS chamadas de HAS1, HAS2 e HAS3 com uma homologia de aminoácidos de 55-71%. Essas enzimas são proteínas integrais transmembrana com áreas hidrofóbicas e um grande loop citoplasmático. Diferentemente das outras glicosiltransferases, as HAS se localizam na membrana plasmática. Acredita-se que a síntese do HA aconteça através de um mecanismo de alongamento de cadeia. Neste processo o AH vai sendo sintetizado a partir da adição de subunidades no interior do citoplasma e conforme a cadeia aumenta, a molécula vai sendo transportada para o espaço extracelular através de um poro na própria enzima de síntese. O AH pode ser sintetizado em diferentes tamanhos e já se sabe que as moléculas maiores, ocupam espaço extracelular atraindo moléculas de água, deixando os tecidos hidratados, mas além dessa característica as grandes moléculas de AH apresentam diversas outras propriedades estruturais e de sinalização intracelular. Os fragmentos menores da molécula são conhecidos por terem propriedades angiogênicas, imuno estimulantes e pró-inflamatórias (Stern et al., 2006).

A síntese e degradação do AH ocorre de maneira balanceada de modo que a concentração da molécula permaneça constante no tecido. Na maioria dos tecidos a síntese e degradação do AH ocorre localmente e a meia vida do AH varia entre 12 horas até 2-3 dias.

A degradação do AH ocorre sob a ação das *hialuronidases* (HYAL), levando à formação de oligossacarídeos, clivados a partir do terminal não

redutor da molécula, por ação da β-glucuronidase e β-N-acetilhexosaminidase, resultando em ácido D-glucurônico e N-acetil-D glucosamina, respectivamente. Essas enzimas (HYAL1, HYAL2 e HYAL3) têm a capacidade de degradar o AH em diferentes tamanhos e através de três vias de degradação distintas. A primeira ocorre no nível celular na qual o AH se liga aos seus receptores de membrana, CD44 ou RHAMM, é internalizado e degradado pelas HYAL dentro da célula. A segunda via de degradação ocorre no nível tecidual na qual o AH é drenado pelos vasos sanguíneos e linfáticos e encaminhado para degradação no fígado, rins e baço. A terceira via conhecida é a degradação através de radicais livres que provocam a quebra das cadeias de AH em condições de estresse oxidativo. Nesse caso, acredita-se que a ação dos radicais livres e das HYAL seja balanceada (Stern et al., 2006)

O balanço entre a síntese e a degradação do AH é um fator crucial para um tecido saudável uma vez que o aumento ou diminuição excessiva nos níveis dessa molécula pode alterar a dinâmica da matriz extracelular estimulando ou deixando de estimular vias de sinalização intracelulares que afetam diretamente o metabolismo dos tecidos.

1.12 AH nas patologias

Esse desbalanceamento no “turnover” do AH já foi observado em diversas patologias e em diferentes tecidos. Vários estudos mostram que uma

produção ou degradação aberrante dessa molécula tem influência no comportamento maligno das células no caso das neoplasias, por exemplo.

Níveis elevados de AH e de moléculas envolvidas no seu metabolismo (HAS e HYALs) já foram observados em cânceres de mama, próstata, bexiga, ovário, pulmão, entre outros (Bernet et al., 2011; Jossefsson et al., 2011; Kramer et al., 2011; Antilla et al., 2000; Pirinen et al., 2001, respectivamente). A relação desta molécula com a progressão e desenvolvimento da doença vem sendo amplamente estudada, pois em função da sua ampla gama de propriedades acredita-se que este componente da MEC possa ser um bom marcador para testes diagnósticos e/ou prognósticos. Há também indícios de que a presença de AH em níveis elevados tenha relação com a diminuição da expressão da E-caderina e um aumento na translocação da β-catenina, duas moléculas envolvidas no processo de transformação epitélio mesenquimal, mecanismo crucial no desenvolvimento e progressão das neoplasias, além de apresentar um aumento no potencial metastático dos tumores (Bharadwaj et al., 2007; Koyama et al., 2007).

No câncer de próstata o aumento do AH apresenta relação com o crescimento tumoral, com um mau prognóstico (Jossefsson et al., 2011) e tem capacidade de estimular a ativação de vias de sinalização envolvidas na desestruturação da MEC como a ERRB2, por exemplo (Misra et al., 2006). O mesmo ocorre nos casos de câncer de mama onde a elevação da expressão de HAS2 e HYAL1 estão correlacionadas com um aumento da capacidade de invasão tumoral, angiogênese e progressão do tumor in vitro (Bernet et al.,

2011; Tan et al., 2011) sugerindo que as relações entre o AH e as moléculas responsáveis pelo seu metabolismo podem ter influência no desenvolvimento dos tumores de mama.

No pulmão, quantidades alteradas de AH tanto para mais quanto para menos já foram correlacionadas com diferentes doenças pulmonares como a enfisema, a DPOC e a bronquite crônica (Turino e Canto, 2003; Dentener et al., 2005). No câncer de pulmão o aumento do AH já foi demonstrado através de técnicas de imunohistoquímica. Em um dos estudos a quantidade de AH presente no estroma tumoral de adenocarcinomas de pulmão teve correlação com uma diminuição na sobrevida dos pacientes (Pirinen et al., 2001). Outro estudo mostrou que o AH aumentado se relacionou com altas concentrações de outro componente da matriz extracelular, o versican (Pirinen et al., 2005). Posteriormente, Ohashi et al. (2007) demonstraram, in vitro, a relação do AH com a quimio-resistência em culturas de NSCLC. Além disso, já foi observado que a produção de AH nas neoplasias pulmonares pode ser induzida por citocinas e fatores de crescimento tais como o fator de crescimento epidérmico e a interleucina 1β e essa produção elevada mostrou relação direta com a desestruturação epitélio/MEC (Chow et al., 2010).

Entretanto, existe uma aparente contrariedade na literatura quanto ao AH associado às neoplasias. Alguns estudos defendem que o AH aumentado na MEC está envolvido na promoção da migração das células tumorais pela suas características hidrofílicas, auxiliando ainda na perda de inibição por contato, comportamento típico dos tecidos normais. Contudo, outros estudos têm

demonstrado que o AH promove o crescimento tumoral e facilita a ocorrência de metástases (Tammi et al., 2002; Delpech et al., 1997; Turley e Noble, 2002; Auvinen et al., 2000). Outros autores revelam que a migração das células tumorais na matriz celular rica em AH ocorre após a sua degradação em fragmentos de 2-25 dissacarideos e é mediada por seus receptores de superfície celular específicos, CD44 e RHAMM (Ichikawa et al.,1999; Herrlich et al.,2000). Sendo assim, o AH na sua forma não degradada pode funcionar como uma barreira contra a vascularização impedindo o crescimento e a progressão do tumor (Stern, 2003) e quando fragmentado ele pode promover a angiogênese.

Apesar de todas as controvérsias, grandes níveis de AH continuam sendo associados a diversas condições patológicas. Para a determinação desses níveis, a dosagem desse ácido era realizada através de técnicas que o separava de outros polissacarídeos seguida da sua quantificação por métodos colorimétricos (método de carbazole). Somente após a descoberta de que o AH pode ligar-se, especificamente, a proteínas presentes na cartilagem, foi possível o desenvolvimento de novas técnicas para sua detecção. Após a primeira técnica desenvolvida (Tengblad, 1981), várias modificações ocorreram e hoje a dosagem do AH pode ser realizada por um método fluorimétrico, “ELISA-like” que apresenta altos índices de especificidade e sensibilidade (Martins et al., 2003). Através desse método, um grupo de estudos conseguiu desenvolver um teste clínico onde a dosagem do AH na urina funciona como um marcador

determinante da presença de câncer residual em bexiga (Passerotti et al., 2006).

Apesar de todo o conhecimento envolvendo o AH e as alguns tipos de neoplasias, pouco se sabe sobre a contribuição dele para o desenvolvimento e progressão dos carcinomas de pulmão e tampouco se ele apresenta algum potencial diagnóstico ou prognóstico relacionado à doença.

2. HIPÓTESE

Ao considerar as evidências que envolvem o AH como componente importante no desenvolvimento e progressão de algumas neoplasias, como o câncer de próstata, bexiga, mama e alguns indícios de que ele possa estar aumentado nos carcinomas de pulmão, esta dissertação de mestrado levanta como hipótese a afirmação de que o AH pode ter um papel relevante nas neoplasias pulmonares como marcador prognóstico e/ou diagnóstico.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Verificar a relação entre a concentração do ácido hialurônico presente na matriz extracelular e no escarro com o desenvolvimento e progressão das neoplasias pulmonares além de verificar seu potencial prognóstico e/ou diagnóstico para a doença.

3.2 Específicos

1) Verificar se há diferença nos níveis de ácido hialurônico presentes em amostras teciduais de câncer de pulmão em relação a amostras normais;

2) Avaliar a relação entre os níveis de AH no tecido com a severidade da doença;

3) Correlacionar os níveis de AH com os dados clínicos dos pacientes;

4) Avaliar a diferença nos níveis de ácido hialurônico presente no escarro entre amostras de pacientes com Câncer de pulmão, pacientes com outras doenças pulmonares e pessoas saudáveis.

5) Avaliar a capacidade do AH como marcador diagnóstico nas neoplasias respiratórias;

6) Correlacionar os níveis de AH no escarro com os dados clínicos dos pacientes

4. MÉTODOS

4.1 Casuística (Tecidos)

Foram incluídos neste estudo espécimes cirúrgicos de tecidos tumorais de 45 pacientes operados por Câncer de Pulmão. Os espécimes de tumor primário pulmonar foram provenientes do Hospital do Câncer AC Camargo, selecionados a partir do banco de tumores contendo 150 espécimes de câncer de pulmão, pertencentes a pacientes em estadios I, II, IIIA e IIIB, tendo sido excluídas as metástases ou estadio IV. Um banco de dados foi criado e continuamente alimentado com diversas informações sobre cada paciente, incluindo o diagnóstico anátomo-patológico estabelecido por ocasião da cirurgia.

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

Na Tabela 01 (Anexo 1) são apresentados os 45 pacientes com NSCLC incluídos no estudo e seus respectivos dados demográficos, incluindo o estadiamento patológico final e tipo histológico inicial (definido no momento da cirurgia).

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

4.2 Microscopia Óptica

As lâminas e laudos correspondentes aos pacientes foram solicitados ao arquivo da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer AC. Camargo para análise e revisão da classificação histológica. As lâminas e laudos de cada paciente selecionado foram revisados por um patologista experiente para que a classificação histológica fosse atualizada, compatível com as amostras e de acordo com a última classificação vigente (Travis et al., 2011) (Fig 2). Os fragmentos teciduais de áreas não tumorais também foram avaliados em lâminas de hematoxilina-eosina para que fosse confirmada a ausência de regiões neoplásicas no espécime.

A atualização da classificação histológica realizada encontra-se descrita no anexo 2 tabela 02.

4.3 Casuística (escarro)

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

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

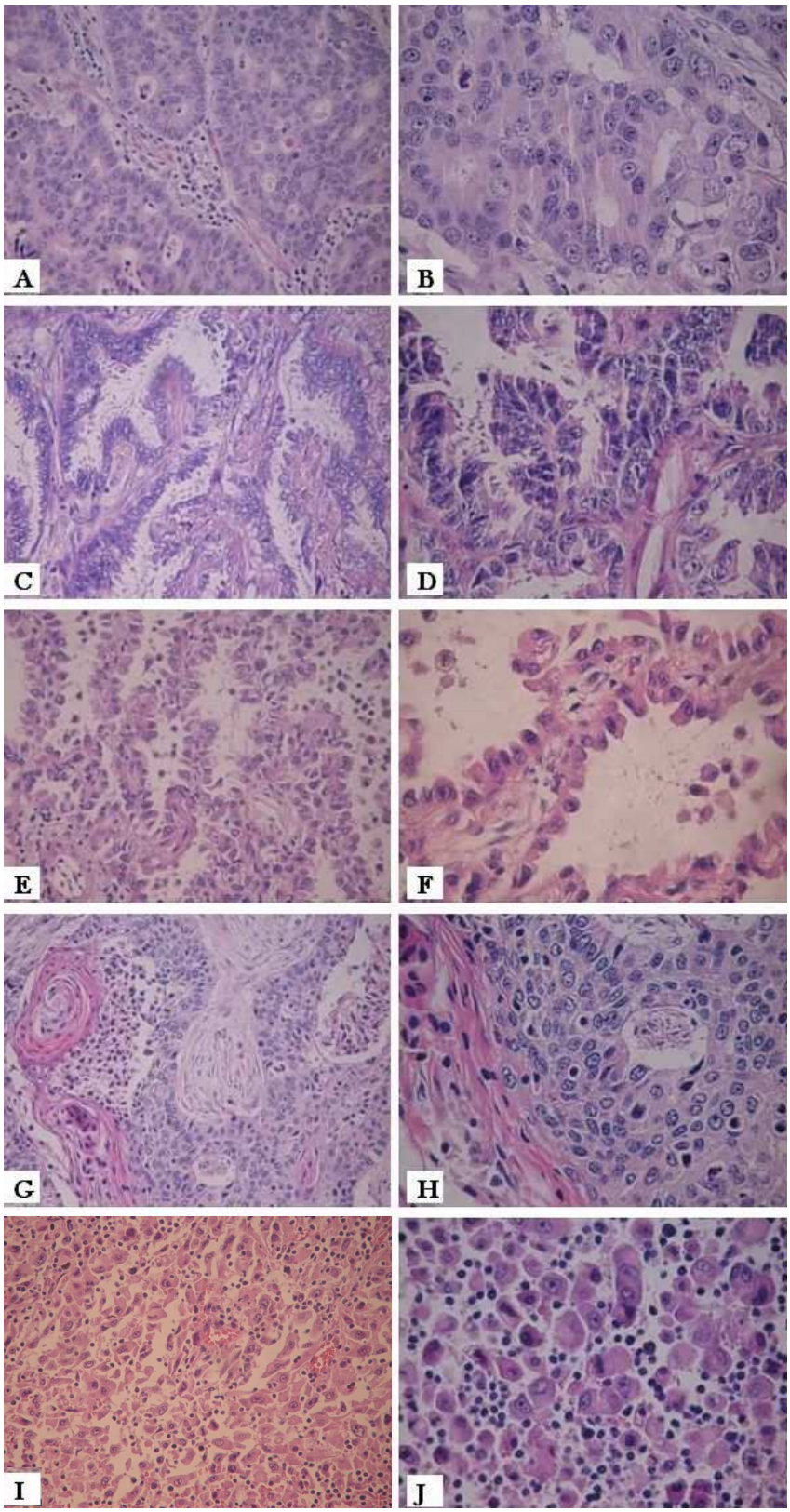

Figura 2: Amostras de cada um dos tipos histológicos encontrados nos casos selecionados e reclassificados segundo Travis (2011). **A e B** – Adenocarcinoma acinar; **C e D** – Adenocarcinoma Papilífero; **E e F** – Adenocarcinoma In Situ; **G e H** – Carcinoma de células escamosas clássico; **I e J** – Carcinoma de Grandes Células. Imagens à esquerda: aumento de 200X. À direita: 400X.

Vinte e cinco pacientes foram selecionados para compor um grupo de alto risco de desenvolvimento de câncer de pulmão. Neste grupo foram incluídos pacientes portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) em tratamento no Hospital das Clínicas do Estado de São Paulo (HC-FMUSP). Foram incluídos também neste grupo dois pacientes que foram submetidos a lobectomia e um que foi submetido a segmentectomia e estavam em fase de acompanhamento para a prevenção de recidiva no HCB.

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

E por fim, para complementar o grupo controle foram colhidas 63 amostras de secreção endobrônquica de cadáveres provenientes do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC-USP). Após a coleta foi realizada a revisão dos laudos expedidos pelo patologista a fim de excluir as amostras provenientes de casos com causa mortis relacionada a saúde pulmonar. Em função disso foram excluídas 37 amostras e as 26 remanescentes foram avaliadas.

Os dados demográficos dos indivíduos selecionados para cada um dos grupos acima descritos encontram-se nas tabelas 03, 04, 05 e 06 apresentadas nos anexos 3, 4, 5 e 6, respectivamente.

Os critérios de inclusão e exclusão de cada grupo encontram-se na tabela 07, anexo 7.

4.4 Coleta das amostras de escarro

Os pacientes portadores de carcinomas de pulmão selecionados para a coleta prospectiva de escarro foram, primeiramente, informados dos objetivos e procedimentos do estudo e antes de qualquer procedimento assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com as normas da lei 196/96 (anexos 8 e 9). Após a assinatura do termo, foram submetidos a até 3 inalações com solução salina hipertônica (3%), com duração máxima de 7 minutos cada uma, para a indução do escarro com inalador ultrassônico de micropartículas menores que 4µm capazes de alcançar o espaço alveolar, (Pulmosonic Star Luxo II, Soniclear, Brasil) (Fig 3). Durante o procedimento de indução houve sempre a retaguarda de um médico e corpo de enfermagem para eventuais intercorrências médicas. Todas as coletas foram realizadas nos consultórios do ICESP e do HCB.

Figura 3: *Inalador ultrassônico de micropartículas homogêneas (menores do que 4 micrômetros) capazes de atingir as vias respiratórias inferiores do pulmão (alvéolos) utilizado nas coletas de escarro induzido*

Após cada inalação os pacientes foram orientados a enxaguar a boca, assoar o nariz e o escarro foi então colhido em recipiente estéril próprio e armazenado em isopor contendo gelo picado até a separação. Após a coleta, o escarro foi separado macroscopicamente da saliva sobre placa de Petri com o auxílio de uma agulha e o material foi armazenado em tubos eppendorf a -80℃ até o momento de análise (Fig 4).

Figura 4: *Separação macroscópica do escarro e da saliva sobre placa de Petri com o auxílio de agulha seguida de armazenamento em microtubo eppendorf para congelamento.*

O mesmo procedimento de indução do escarro foi realizado com os 25 pacientes portadores de DPOC e com os 15 voluntários do grupo controle. Em ambos os casos as coletas foram realizadas em consultórios do HC-FMUSP com a retaguarda de médicos e corpo de enfermagem.

4.5 Coleta das amostras provenientes de cadáveres

Para a coleta de amostras provenientes do SVOC-USP foi realizada nos cadáveres uma incisão de rotina do tipo biacrômio esterno pubiana a qual se inicia pelos ombros, mais precisamente em nível do acrômio de cada escápula. Depois se estende pela linha média do manúbrio de esterno até a sínfise púbica. Através da incisão biacrômia a traquéia foi exposta a fim de que fosse possível seccioná-la transversalmente abaixo do cartílago cricóide. A secreção endobrônquica presente no interior da traquéia foi coletada com uma espátula em curva (Fig 5). A amostra foi inserida em microtubos e armazenada em freezer -80ºC até o momento da análise.

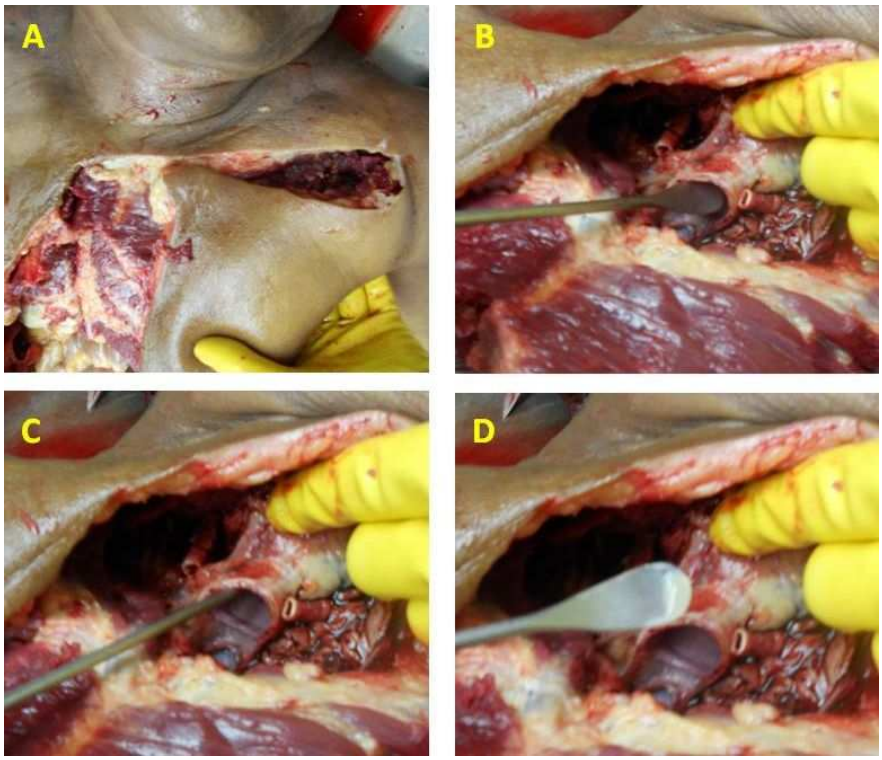

Figura 5: *Coleta de amostra de secreção endobrônquica.* ***A:*** *Incisão biacrômia esterno.* ***B:*** *Exposição da traquéia abaixo do cartílago cricóide e início da inserção da espátula.* ***C:*** *Inserção completa da espátula na traquéia.* ***D:*** *Amostra da secreção coletada.*

4.6 Ensaio fluorométrico para dosagem do AH

a. Extração das cadeias de AH presentes nas amostras de tecido

As 46 amostras de tumores obtidas foram descongeladas, picotadas com bisturi, homogeneizadas e desidratadas em acetona, por 18 h a temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de acetona foi removido por centrifugação, 4000 x g por 15 min e o precipitado seco em estufa, 50℃. O pó seco obtido teve seu peso verificado (peso seco) em balança analítica. Para cada 1mg de pó seco foi adicionado 100 µL da enzima proteolítica maxatase (4 mg/mL em Tris-HCl 0,05 M + NaCl 1M, pH 8) e o material foi incubado por 18 h a 60°C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min e o sobrenadante foi separado em um novo tubo. A inativação da protease foi realizada por aquecimento a 100℃ por 30 min. Após a fervura, o material foi diluído em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,75 + albumina de soro bovino (BSA) 1% na proporção de 1:100 e 1:1000 com incubações em triplicata (Martins, et al., 2003).

b. Extração das cadeias de AH presentes nas amostras de escarro

As amostras de escarro obtidas e armazenadas em freezer -80℃ foram descongeladas e foi adicionado 2mL de uréia 7M diluída em Tris-HCl 0,05 M a fim de que fosse possível a quebra das associações hidrofóbicas presentes em grande quantidade no escarro. Em seguida a concentração de proteínas

presente nas amostras diluídas em uréia foi dosada para a expressão da quantidade de AH encontrada (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, USA).

Após a dosagem de proteínas uma alíquota do material obtido foi diluída na proporção 1:10 com a enzima proteolítica maxatase (4 mg/mL em Tris-HCl 0,05 M + NaCl 1M, pH 8) e o material foi incubado por 18 h a 60°C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min e o sobrenadante foi separado em um novo tubo. A inativação da protease foi realizada por aquecimento a 100℃ por 30 min e a do sagem dos níveis de AH foi realizada conforme descrito a seguir.

c. Dosagem das amostras de tecido e escarro

A dosagem da concentração do AH no material obtido após proteólise (item acima) foi realizada conforme método previamente descrito (Martins et al., 2003). Resumidamente, uma proteína de ligação específica para o AH foi extraída de cartilagem bovina e usada tanto como “coat” em placa de ELISA de 96 poços e também como “sonda” biotinilada. Soluções padrões de AH (0-1000 ng/mL) e as amostras dos pacientes foram diluídas em tampão de trabalho (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,75 + albumina bovina 1%), e colocadas, em triplicatas, em placas de ELISA previamente revestidas com a proteína de ligação, e deixadas em repouso por 8h a 4ºC.

Após lavagem da placa com tampão de lavagem (Tris-HCl 0,05 M pH 7,75), seguiu-se incubação de duas horas com a proteína de ligação marcada

com biotina. Após novo ciclo de lavagens a placa foi incubada 30 min com estreptavidina marcada com európio, diluída 1:10.000 em tampão de trabalho. Após nova lavagem da placa foi adicionado em cada poço 200 µL de uma solução de Enhancement (Wallac Oy, Turku, Suécia), com o auxílio de um dispensador de líquidos automático (Fig 6), e a mesma foi deixada sob agitação por 10 min.

Ao final, a placa foi colocada em um fluorímetro (Victor 2, da Wallac Oy, Turku, Suécia) para a determinação da fluorescência emitida. Um programa de cálculo (Pharmacia, Suécia) interpretou os dados (counts/s) e forneceu os resultados da concentração do AH em ng/mL. Os dados obtidos com a dosagem foram convertidos para que os resultados fossem expressos em µg/g de peso seco no caso dos tecidos e em ng/mg de proteína no caso do escarro.

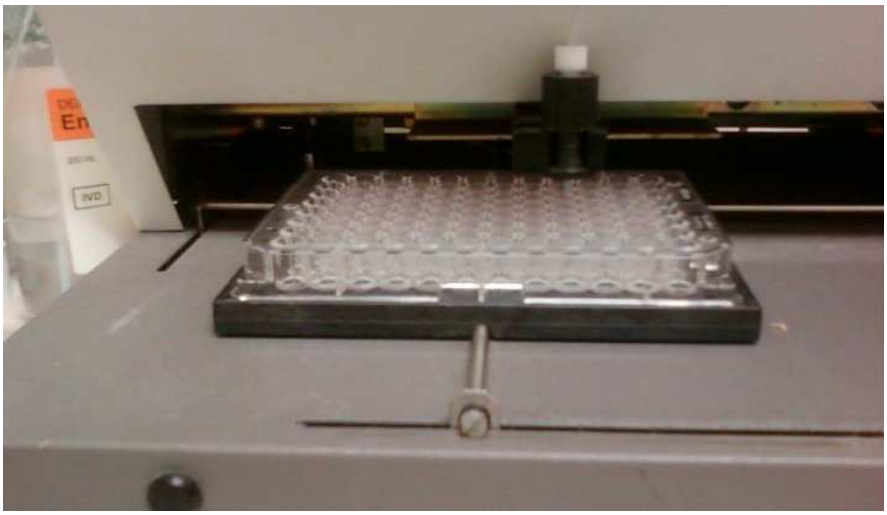

Figura 6: *Placa de ELISA contendo as amostras no dispensador de líquidos automático para a adição de Enhancement.*

4.7 Organograma da metodologia

A fim de facilitar a compreensão da metodologia utilizada no presente trabalho foram desenhados os organogramas abaixo. (Figs 7 e 8)

4.7.1 Análise nos tecidos

Figura 7: *Organograma dos métodos de análise do AH em amostras de tecido*

4.7.2 Análise no escarro

Figura 8: *Organograma dos métodos de análise do AH em amostras de escarro*

4.8 Tabulação dos dados e análise estatística

Foram organizadas no programa Excel quatro planilhas contendo todos os dados clínicos e os valores de concentração de ácido hialurônico (uma planilha para cada um dos grupos estudados – amostras de tecido, amostras de escarro câncer, escarro DPOC e escarro controle). Tais tabelas foram transferidas para o programa SPSS versão 18 (Inc., Chicago, IL). Os dados foram tabulados considerando as estatísticas descritivas (média, desvio padrão, mínimo, máximo e quartis) para os dados quantitativos e tabelas de freqüência para os qualitativos. Quando necessário as variáveis foram analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação do padrão de normalidade.

Constatando a distribuição não normal dos valores de AH foi utilizado o teste de Wilcoxon para verificar as diferenças entre os grupos normal e tumoral (tecido) por se tratar de grupos dependentes. Nos grupos de escarro foi utilizado o teste de Kruskal Wallis por se tratar de mais de 2 grupos independentes, e na comparação entre dois grupos independentes, foi utilizado o teste de Mann Whitney.

A seguir, estimamos a sobrevida global considerando o estimador não paramétrico de Kaplan-Meier. A sobrevida foi definida como o tempo entre o diagnóstico histológico do tumor e o óbito (este sendo o evento de interesse) ou o último registro do paciente em prontuário para os que permaneceram vivos.

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

Em todo estudo, foi considerado a significância de 0,05. Nos casos das comparações simultâneas feitas pelo método não paramétrico, a confiança foi corrigida pelo método de Bonferroni quando necessário.

5. Resultados

O mais abundante componente da matriz extracelular pulmonar é o ácido hialurônico. Já se sabe que tal molécula tem importantes funções na divisão celular, diferenciação e apoptose e, sendo assim, tem significativa influência no bom funcionamento e desenvolvimento tecidual. Quando se trata de sua relação com patologias como o câncer, muitos estudos têm mostrado que este composto exerce funções relacionadas ao crescimento tumoral, ocorrência de metástases entre outros eventos.

Levando em conta essas informações, foi avaliada neste estudo a concentração de AH presente em espécimes tumorais e em amostras de escarro de pacientes com câncer de pulmão.

Um ensaio ELISA-like foi utilizado para determinar a quantidade de AH presente nas amostras e no caso dos tecidos foram utilizadas amostras pareadas, isto é, cada indivíduo foi controle de si próprio uma vez que obtivemos amostras tumorais e amostras não tumorais provenientes da borda da peça retirada por ressecção cirúrgica.

5.1 Pacientes selecionados para amostras de tecido: características demográficas

Na Tabela 08 estão descritas as características demográficas dos 46 pacientes quanto ao sexo, idade, localização do tumor, estadiamento, tabagismo e sobrevida.

Tabela 08. *Características demográficas dos 46 pacientes quanto ao sexo, idade, localização do tumor, estadiamento, tabagismo e sobrevida.*

Total de pacientes	46
Idade (anos)	65 (44-84)[a]
Sexo	29 homens, 17 mulheres
Estádio T 1 2 3 4 Não consta	 9 22 5 2 8
Estádio N 0 1 2 3 Não consta	 25 4 8 1 8
Tipo histológico Carcinoma de células escamosas Adenocarcinoma Carcinoma de grandes células	 13 27 6
Tabagismo Sim Não Não consta	 25 15 06
Seguimento (meses)	27 (7-88)[a]
Pacientes censurados para análise da sobrevida até a última data do seguimento	32

Foram avaliados 46 pacientes, dos quais 29 homens e 17 mulheres, todos portadores de carcinomas não-pequenas células primários de pulmão. A mediana de idade dos pacientes estudados foi de 65 anos (variação 44 a 84 anos). Quanto ao estadiamento, 9 pacientes eram T1, 22 estádio T2, 5 estádio T3, 2 estádio T4 e 8 pacientes não tinham esta informação em seus prontuários. Quanto ao comprometimento de linfonodos, 25 pacientes eram estádio N0, 4 estadio N1, 8 estadio N2, 1 estadio N3 e 8 pacientes não tinham essa informação no prontuário. Nenhum caso selecionado apresentava metástase. Em relação ao tabagismo consta que 25 pacientes eram tabagistas, 15 não eram fumantes e 6 não tinham esta informação no prontuário. Quanto ao tipo histológico, de acordo com a nova classificação (Travis et al., 2011), 13 eram carcinomas de células escamosas, 27 adenocarcinomas e 6 carcinomas de grandes células. A mediana de sobrevida foi de 27 meses (variação, 7 a 88 meses). Até o momento do último registro em prontuário consultado, 14 pacientes faleceram e 32 estavam vivos.

5.2 Análise dos níveis de AH nos tecidos

Primeiramente foi realizada a análise descritiva dos dados obtidos a partir da dosagem do AH nas amostras de tecido e os resultados dessa análise estão descritos na tabela 09.

Tabela 09. *Análise descritiva dos valores de AH presente nos tecidos tumorais e não tumorais selecionados (µg/g de tecido seco).*

Grupo	Nº casos	Média	Mediana	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Controle	46	255,1206	155,3900	281,5748	24,01	1786,82
Câncer	46	869,0432	713,1650	701,3936	55,75	3387,79

Foi observado, nas análises feitas neste estudo, que existe um padrão de concentração de AH diferente entre amostras tumorais e não-tumorais. A concentração de AH (µg/g) foi significativamente maior nos espécimes tumorais do que nos não-tumorais (713,16 µg/g vs, 155,39 µg/g tecido seco, p<0.001) (Fig 9).

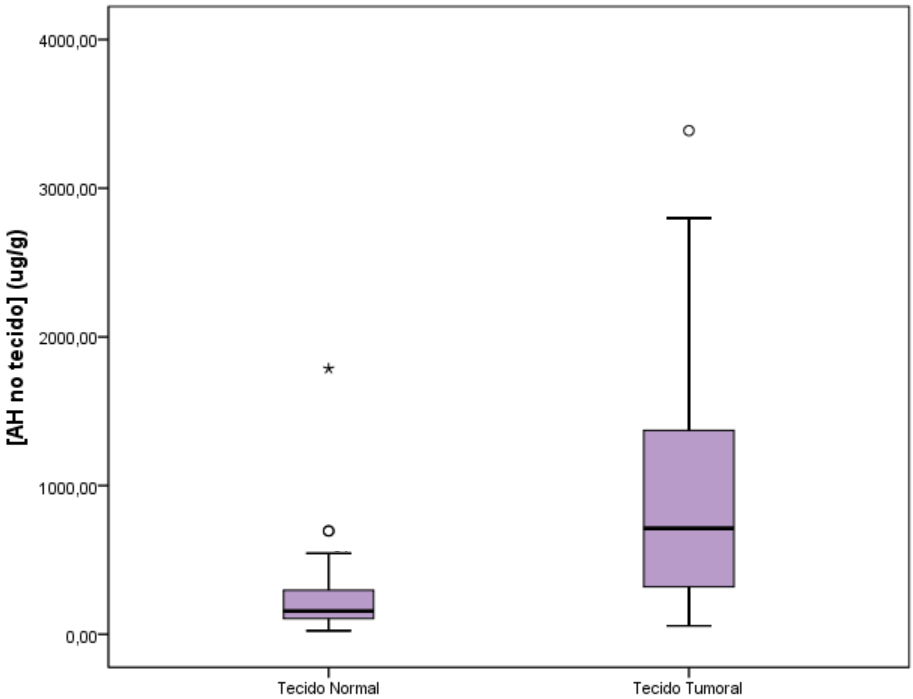

Figura 9: *Concentração de AH presente nas amostras tumorais e não tumorais (p<0.001)*

Ao separar as amostras de acordo com o tipo histológico foi observada uma significância estatística entre adenocarcinomas e carcinoma de células escamosas versus amostras não-tumorais correspondentes a cada um dos grupos (p=0.0006 e p=0.005, respectivamente) (Figs 10 e 11). Os 6 casos de carcinomas de grandes células não apresentaram diferença estatística entre as amostras tumorais e não tumorais.

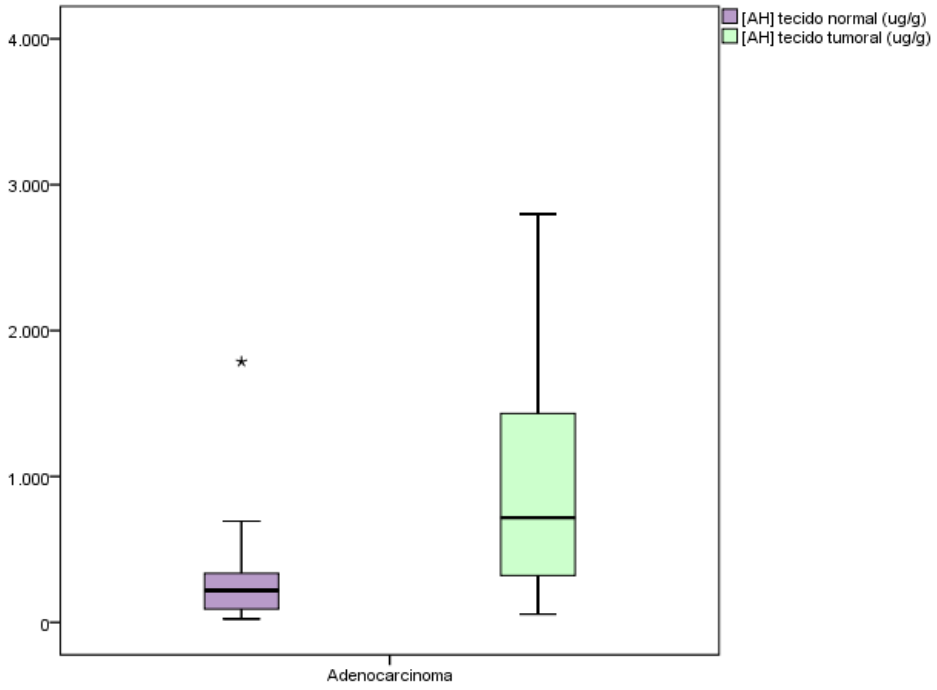

Figura 10: *Concentração de AH presente em amostras de adenocarcinomas versus amostras não tumorais (p=0.0006)*

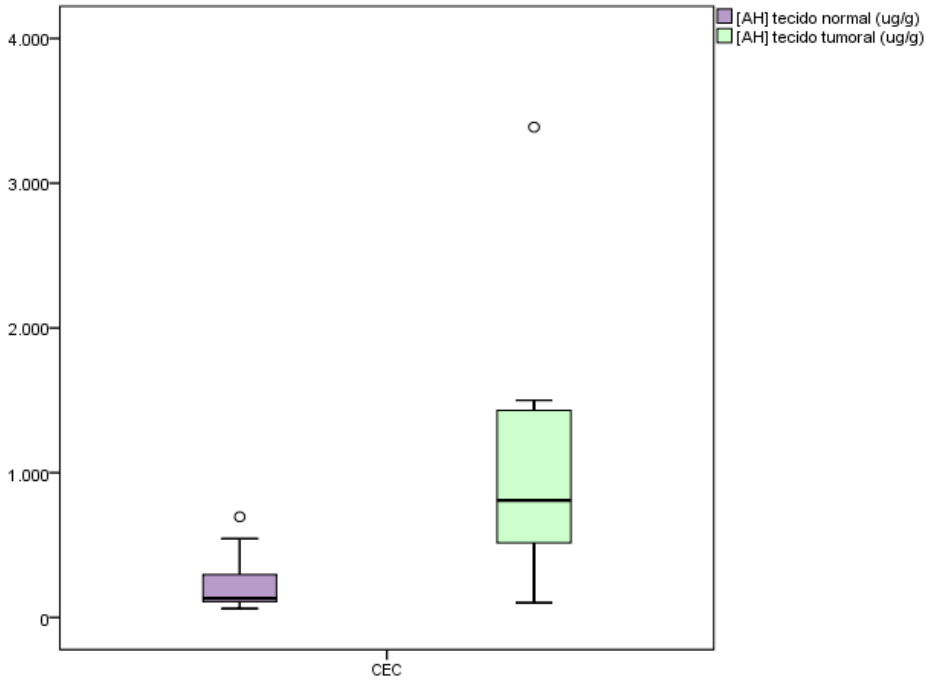

Figura 11: *Concentração de AH presente em amostras de Carcinoma de Células Escamosas (CEC) versus amostras não tumorais (p=0.002).*

5.3 Análise da Sobrevida

As dosagens de AH no tecido pulmonar foram relacionadas com o tempo de sobrevida dos pacientes desde a data da cirurgia até o dia do último registro documentada em prontuário no dia da revisão de dados. A mediana de sobrevida foi de 27 meses, 32 pacientes estavam vivos e 14 morreram de

causas relacionadas ao câncer de pulmão. Os valores obtidos para o AH foram estratificados em tercis. Os pontos de corte estabelecidos pelos tercis resultaram numa diferença significativa na curva de Kaplan Meier. A taxa de sobrevida de 5 anos nos pacientes com AH ≤ 364,36 foi de 74,2 meses versus 46,3 e 46,4 meses nos outros dois grupos com níveis de AH mais elevados (LogRank= 5.81; p=0.05; Fig. 12).

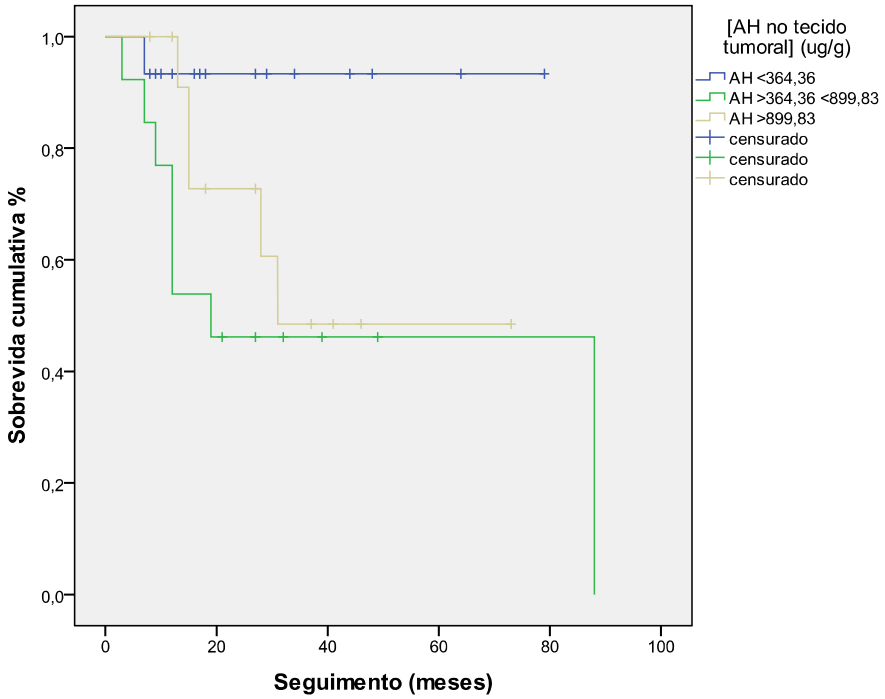

Figura 12: *A curva de sobrevivência de Kaplan Meier mostra que os pacientes que apresentaram níveis de AH no tecido menores que 364,36 µg/g apresentaram maior sobrevida do que aqueles no segundo grupo (com valores de AH entre 364,36 µg/g e 899,83 µg/g) e no terceiro grupo (com valores de AH maiores que 899,83 µg/g). (LogRank=5.81; p=0.05)*

5.4 Pacientes selecionados para amostras de escarro: características demográficas

Noventa pacientes foram selecionados para a coleta prospectiva de escarro no ICESP e no HCB dos quais 59 homens e 31 mulheres, todos portadores de carcinomas primários de pulmão. A mediana de idade dos pacientes estudados foi de 61 anos (variação 37 a 89 anos). Quanto ao estadiamento, 3 pacientes eram T1, 19 estadio T2, 17 estadio T3, 31 estadio T4. Quanto ao comprometimento de linfonodos, 14 pacientes eram estádio N0, 5 estadio N1, 24 estadio N2 e 28 estadio N3. Vinte e oito dos casos selecionados não apresentava metástase (M0) e 42 eram estádio M1. Em relação ao estadiamento clínico, 2 pacientes eram estádio IIA, 3 eram IIB, 6 eram estadio IIIA, 17 eram IIIB e 32 eram estadio IV. Vinte pacientes não apresentavam informações de estadiamento nos prontuários. Em relação ao tabagismo consta que 35 pacientes eram tabagistas, 13 não eram fumantes, 36 eram ex-fumantes e 6 não tinham esta informação no prontuário. Foram considerados como ex-fumantes os pacientes que abandonaram o hábito tabagista a mais de 1 ano. Quanto ao tipo histológico, 32 eram carcinomas de células escamosas, 37 adenocarcinomas, 2 carcinomas de grandes células, 5 carcinomas de pequenas células e 14 não tinham essa informação. Até o presente momento, 15 pacientes faleceram e 75 estão vivos. Na tabela 10 estão descritas suas características demográficas.

Tabela 10. *Características demográficas dos 90 pacientes selecionados para coleta de escarro quanto ao sexo, idade, localização do tumor, estadiamento, tabagismo e sobrevida.*

Total de pacientes	90
Idade (anos)	61 (37-89)[a]
Sexo	59 homens, 31 mulheres
Estádio T	
1	3
2	19
3	17
4	31
Não consta	20
Estádio N	
0	14
1	5
2	24
3	28
Não consta	19
Estádio M	
0	28
1	42
Não consta	20
Estadiamento clínico	
IIA	3
IIB	2
IIIA	6
IIIB	17
IV	42
Não consta	20
Tipo histológico	
Carcinoma de células escamosas	32
Adenocarcinoma	37
Carcinoma de grandes células	2
Carcinoma de pequenas células	5
Não consta	14
Tabagismo	
Sim	35
Não	13
Ex-fumantes	36
Não consta	6

Para o grupo de risco (portadores de DPOC) foram selecionados 25 pacientes dos quais 17 homens e 8 mulheres, todos portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica. A mediana de idade dos pacientes estudados foi de 65,5 anos (variação 38 a 79 anos). Em relação ao tabagismo consta que 3 pacientes eram tabagistas, 7 não eram fumantes, 12 eram ex-fumantes e 3 não tinham esta informação no prontuário. Foram considerados como ex-fumantes os pacientes que abandonaram o hábito tabagista a mais de 1 ano. Suas características demográficas encontram-se descritas na Tabela 11.

Tabela 11. *Características demográficas dos 25 pacientes portadores de DPOC quanto à idade, sexo e tabagismo.*

Total de pacientes	25
Idade (anos)	64 (38-79)[a]
Sexo	17 homens, 8 mulheres
Tabagismo Sim Não Ex-fumantes Não consta	 3 7 12 3

Para o grupo controle foram selecionados 15 voluntários saudáveis para a coleta de escarro. Suas características demográficas estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12. *Características demográficas dos 15 voluntários saudáveis quanto à idade, sexo e tabagismo.*

Total de voluntários	15
Idade (anos)	65 (23-86)[a]
Sexo	6 homens, 9 mulheres
Tabagismo Sim Não	 2 13

Foram selecionados 15 voluntários, dos quais 6 homens e 9 mulheres, todos sem nenhum histórico de doença pulmonar crônica e raio-X de tórax documentado. A mediana de idade dos voluntários avaliados foi de 65 anos (variação de 23 a 86 anos). Em relação ao tabagismo consta que 2 voluntários eram tabagistas e 13 não eram fumantes.

No SVOC-USP foram coletadas amostras de secreção endobrônquica de 63 cadáveres. Deste total foram excluídos 37 casos que tiveram como causa mortis doenças crônicas de pulmão. Ao final foram analisadas 26 amostras e as características destes casos encontram-se descritas na tabela 13.

Tabela 13. *Características demográficas dos 26 casos selecionados no SVOC-USP para formação de um segundo grupo controle.*

Total de casos	26
Idade (anos)	69,5 (44-91)[a]
Sexo	10 homens, 16 mulheres
Tabagismo Não	 26
Causa Mortis Edema pulmonar Cardiopatia Isquêmica Infarto do miocárdio AVC Hemopericárdio	 15 2 6 1 2

5.5 Análise dos níveis de AH no escarro

Primeiramente foi realizada a análise descritiva de cada um dos grupos avaliados. Os dados obtidos encontram-se na Tabela 14. O grupo composto pelas amostras de secreção endobrônquica provenientes do SVOC-USP apresentou níveis de AH muito elevados para ser considerado como um grupo controle normal (Mediana: 42,06ng/mg de proteína; variação entre 3,82ng/mg e 331,39ng/mg) e por essa razão a sua utilização dentro deste trabalho como um segundo grupo controle foi descartada.

Tabela 14. *Análise descritiva dos valores de AH presente no escarro dos grupos selecionados (ng/mg de proteína).*

Grupo	Nº casos	Média	Mediana	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Controle	15	12,5862	8,7297	8,18541	4,30	31,29
DPOC	25	19,3120	19,7829	11,0686	0,15	48,21
Câncer	90	196,2283	31,7216	692,3456	1,16	5226,50
SVOC	26	70,9442	42,0623	78,9856	3,82	331,39

Após a análise descritiva os grupos com Câncer, DPOC e controle foram comparados e foi observado um padrão de concentração de AH diferente entre eles. A concentração de AH (ng/mg de proteína) foi significativamente maior nos pacientes com câncer do que nos pacientes com DPOC ou do grupo controle (mediana 31,72 vs 19,78 vs 8,72 ng/mg de proteína, respectivamente, $p<0.001$) (Figura 13).

Houve ainda significância estatística quando o grupo de pacientes com câncer foi comparado somente com o grupo controle (mediana 31,72 vs 8,72 ng/mg de proteína; p<0.001) (Fig 14) e o mesmo ocorreu ao compararmos os grupos câncer e DPOC (mediana 31,72 vs 19,78ng/mg de proteína; p=0.002)(Fig 15)

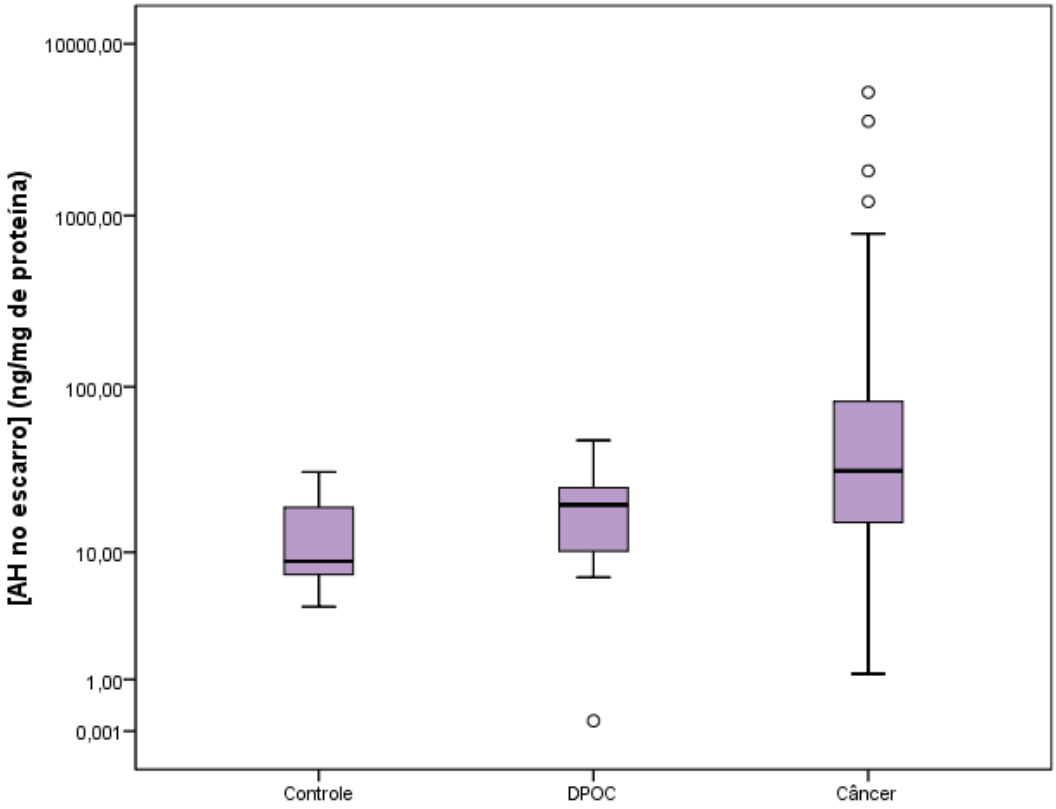

Figura 13: *Comparação do AH presente nos três grupos analisados: Controle, DPOC e Câncer (p<0.001). Escala Log10.*

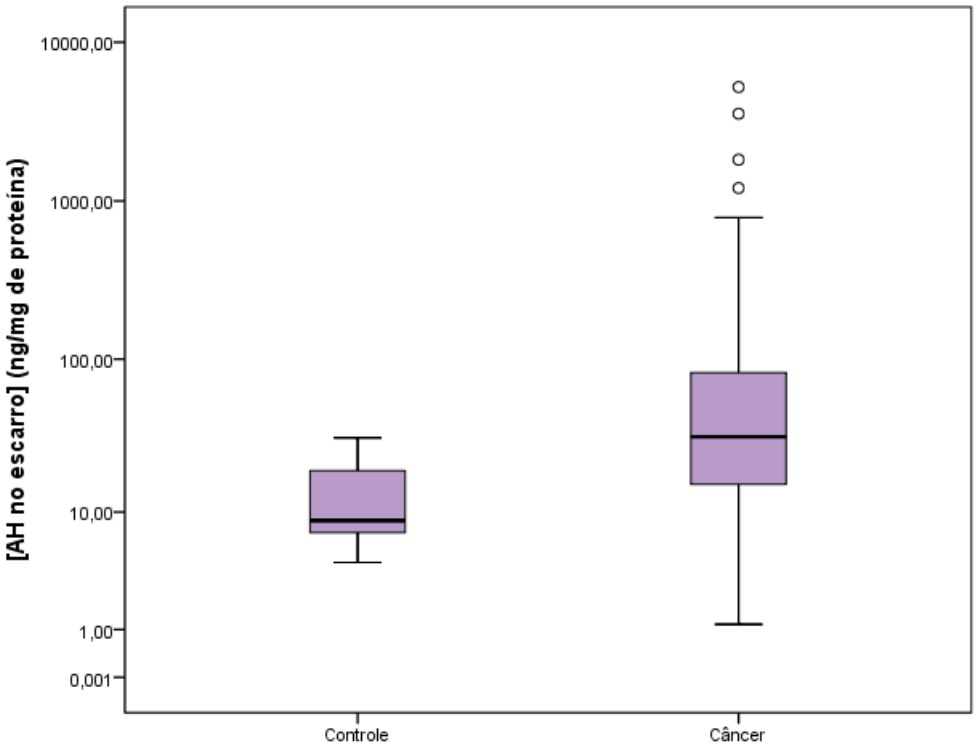

Figura 14: *Comparação do AH presente nos grupos Controle e Câncer (p<0.001). Escala Log10.*

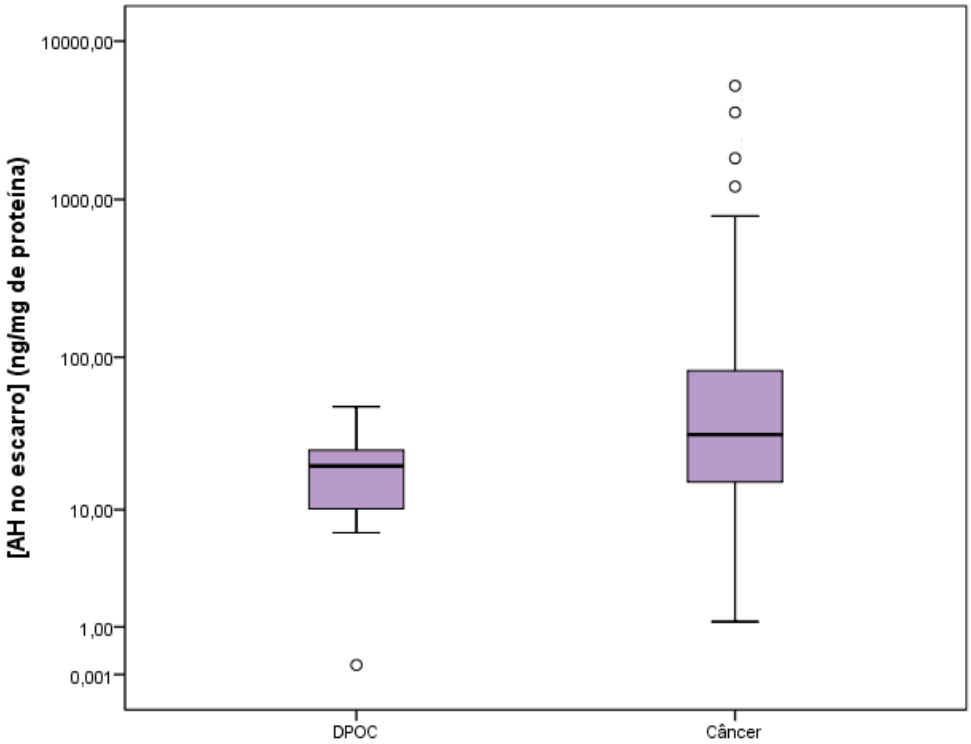

Figura 15: *Comparação do AH presente nos grupos DPOC e Câncer (p=0.002). Escala Log10.*

Houve também diferença estatística significativa ao compararmos os grupos DPOC e controle separadamente do grupo com câncer (mediana 19,78 vs 8,72 ng/mg de proteína; p=0.02) (Fig 16).

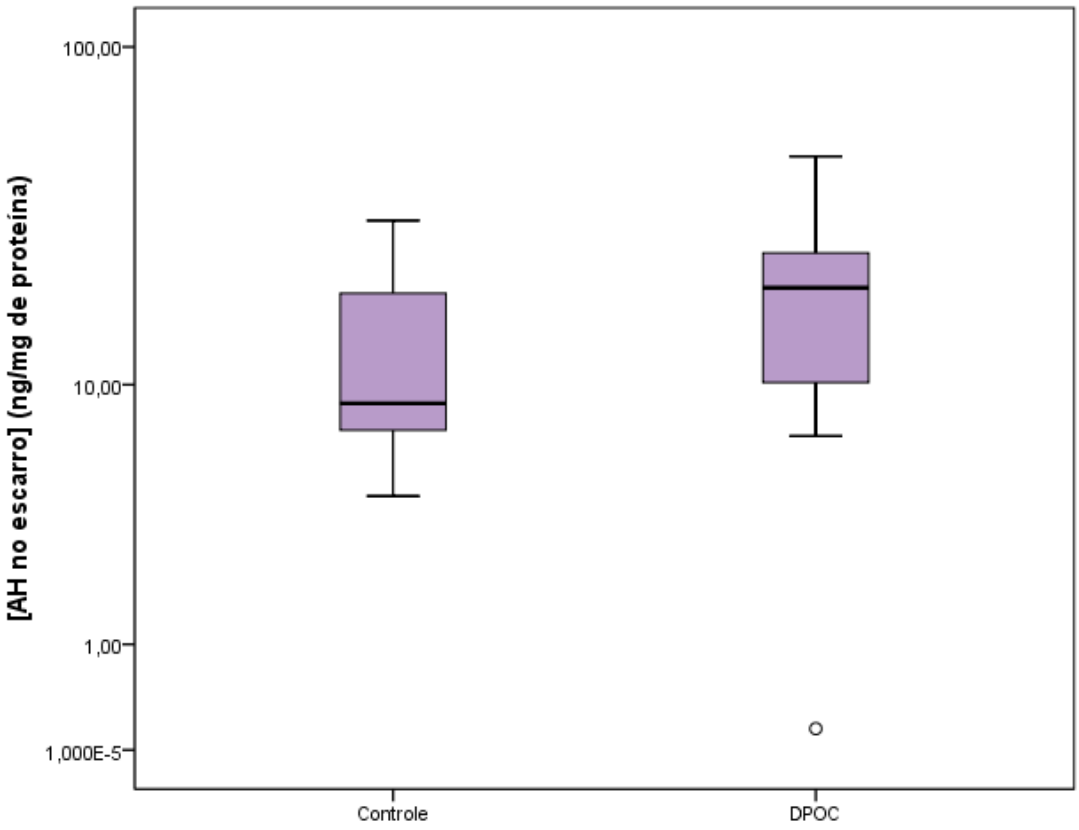

Figura 16: *Comparação do AH presente nos grupos Controle e DPOC (p=0.02). Escala Log10.*

As concentrações de AH encontradas no grupo câncer foram correlacionadas com os diferentes tipos histológicos dos indivíduos e foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0.01) (Fig 17).

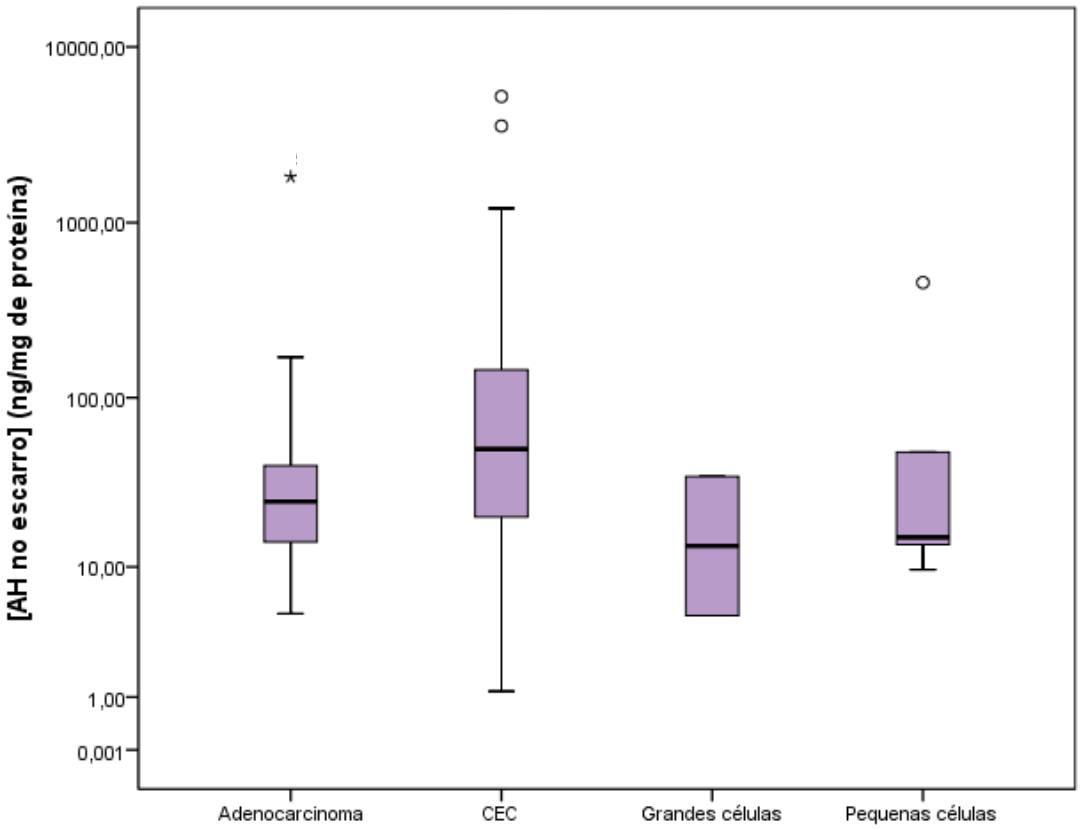

Figura 17: *Diferença nos níveis de AH presente em cada um dos tipos histológicos (p=0.01). Escala Log10.*

Ao correlacionarmos os níveis do composto analisado com os diferentes estadios clínicos dos pacientes observou-se que não há diferença significativa entre os grupos (p=0.9) (Fig 18)

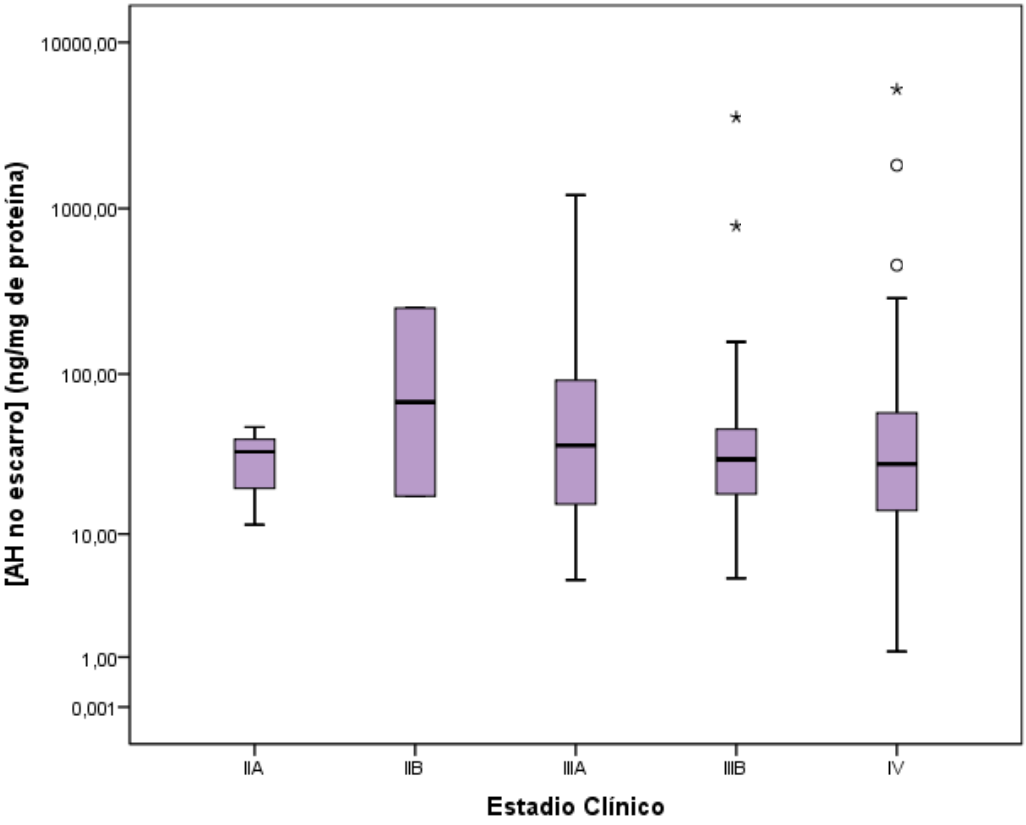

Figura 18: *Diferença nos níveis de AH presente em cada um dos estádios clínicos (p=0.9) Escala Log10.*

As análises do AH também foram correlacionadas com os outros aspectos clínicos tais como idade, tabagismo, sexo, anos-maço, localização do tumor (T), comprometimento de linfonodos (N) e metástases (M), entretanto nenhuma dessas correlações foi estatisticamente significante (p=0.6; p=0.7; p=0.09; p=0.2; p=0.9; p=0.6; p=0.7; respectivamente)

5.6 Análise de Curva ROC

Curvas ROC (receiver operating characteristic) foram construídas para demonstrar a habilidade diagnóstica do AH presente no escarro em discriminar pacientes com câncer de pacientes com DPOC e de pessoas saudáveis.

Os níveis de AH encontrados no escarro dos indivíduos do grupo controle e do grupo com câncer foram analisados usando a sensibilidade e especificidade.

A curva ROC construída com esses dados (Fig 19) apresentou uma área abaixo da curva de 0,82. Os valores de sensibilidade e especificidade encontrados em cada ponto de corte estão demonstrados na Tabela 15 (Anexo 10). Para quantidades de AH maiores que 31,44ng/mg de proteína a especificidade foi de 100% e a sensibilidade de 51%. O ponto de corte que apresentou maiores valores de especificidade e sensibilidade simultaneamente foi para valores de AH maiores ou iguais a 11,1363 ng/mg de proteína. O desempenho diagnóstico do AH nesse ponto está demonstrado na tabela 16.

O mesmo foi realizado com os grupos DPOC e Câncer. Nesta comparação a área abaixo da curva ROC foi de 0,69 (Fig 20). Os valores de sensibilidade e especificidade encontrados em cada ponto de corte estão demonstrados na Tabela 17 (Anexo 11). Para um especificidade de 100% e sensibilidade de 33% o ponto de corte foi para quantidades de AH maiores que 48,3ng/mg de proteína. A maior especificidade e sensibilidade ocorreram num

ponto de corte de 23,5197 ng/mg de proteína e o desempenho do marcador neste ponto encontra-se descrito na tabela 18.

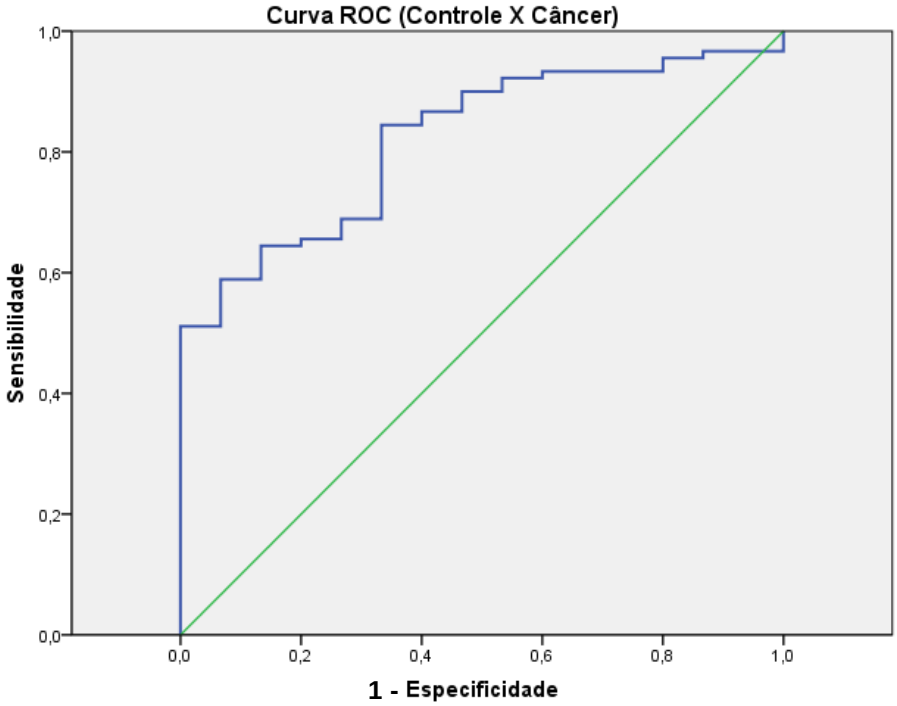

Figura 19: *Curva ROC representando a habilidade diagnóstica da dosagem do AH no escarro para diferenciar pacientes com câncer de pessoas saudáveis. Área =0,82.*

Tabela 16: *Matriz de Confusão considerando a classificação da quantidade de AH no escarro dicotomizada em relação a presença ou ausência de câncer.(Grupos Voluntários Saudáveis e Câncer)*

			Grupo		Total
			Controle	Câncer	
Quantidade do AH no escarro	<11,1363	Nº Casos	9	12	21
		% em relação ao todo	60,0% VN	13,3% FN	20,0%
	>=11,1363	Nº Casos	6	78	84
		% em relação ao todo	40,0% FP	86,7% VP	80,0%
Total		Nº Casos	15	90	105
		% em relação ao todo	100,0%	100,0%	100,0%

*VN: Verdadeiros negativos; FN: Falsos negativos; VP: Verdadeiros positivos; FP: Falsos positivos

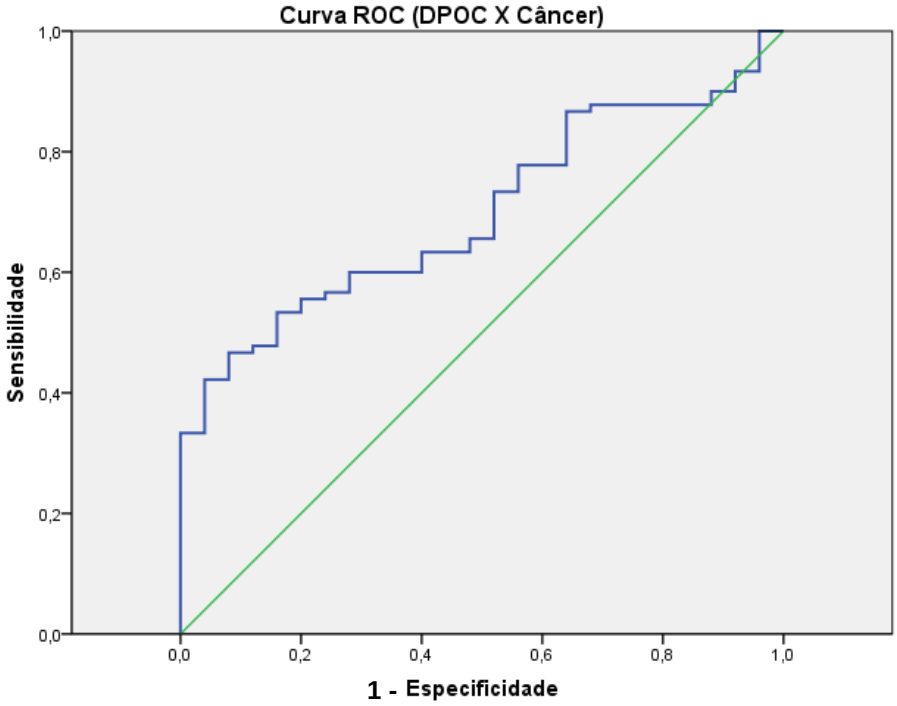

Figura 20: *Curva ROC representando a habilidade diagnóstica da dosagem do AH no escarro para diferenciar pacientes com câncer de pacientes com DPOC. Área =0,69.*

Tabela 18: *Matriz de Confusão considerando a classificação da quantidade de AH no escarro dicotomizada em relação à presença ou ausência de câncer. (Grupos DPOC e Câncer)*

			Grupo		Total
			DPOC	Câncer	
Quantidade do AH no escarro	<23,5197	Nº Casos	18	36	54
		% em relação ao todo	72,0% VN	40,0% FN	47,0%
	>=23,5197	Nº Casos	7	54	61
		% em relação ao todo	28,0% FP	60,0% VP	53,0%
Total		Nº Casos	25	90	115
		% em relação ao todo	100,0%	100,0%	100,0%

*VN: Verdadeiros negativos; FN: Falsos negativos; VP: Verdadeiros positivos; FP: Falsos positivos

6. Discussão

No presente estudo, após considerarmos as evidências que envolvem o AH como componente importante no desenvolvimento e progressão de algumas neoplasias como o câncer de próstata, bexiga e mama, levantamos a hipótese de que esse componente da MEC poderia ter um papel relevante no câncer de pulmão como marcador prognóstico e/ou diagnóstico. Verificamos a relação entre a concentração do ácido hialurônico presente em espécimes tumorais e escarro de pacientes com câncer de pulmão, DPOC e voluntários saudáveis. As implicações do AH no desenvolvimento e progressão das neoplasias, além do impacto no prognóstico e/ou diagnóstico passamos a discutir.

Análise do AH nos espécimes

No presente estudo demonstramos uma elevação significativa nos níveis de AH nos espécimes tumorais quando comparados com a quantidade existente nos espécimes não tumorais. Essa elevação dos níveis de AH manteve-se altamente significativa mesmo quando os espécimes tumorais foram histologicamente categorizados como carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas. Foram utilizados como espécimes não tumorais amostras provenientes da margem livre da ressecção cirúrgica e a utilização destas amostras pode ser considerada como uma limitação do estudo, uma vez que, apesar de não apresentarem células tumorais, este tecido pode ter sofrido

alguma modificação pelo fato de fazer parte de um órgão já acometido pelo câncer. Presume-se, portanto que a diferença nas quantidades de AH encontradas entre espécimes tumorais e não tumorais poderia ser ainda maior se os espécimes utilizados como controles fossem provenientes de um pulmão saudável.

No presente estudo, os resultados obtidos sugerem que o AH possa exercer um papel fundamental no desenvolvimento e progressão do câncer de pulmão uma vez que esse componente da MEC, ao interagir com as células tumorais e com as células do estroma pode influenciar a adesão, divisão, proliferação e metástases das células neoplásicas. Durante muito tempo acreditou-se que o envolvimento do AH nas neoplasias estivesse atribuído somente à sua capacidade de atrair água facilitando a movimentação das células. Entretanto, atualmente sabe-se que esta molécula tem a capacidade de ativar vias de sinalização intracelulares que estimulam a migração e invasão celular. Essa capacidade do AH de influenciar tantos comportamentos celulares está intimamente relacionada com suas moléculas de adesão como o CD44 e o RHAMM uma vez que estas moléculas têm a capacidade de ativar diversas vias de sinalização intracelulares com papéis na diferenciação e multiplicação das células (Turley et al., 2002). Dessa maneira, o AH pode desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento dos tumores facilitando seu crescimento e dispersão em outros tecidos. Esse resultado reforça ainda a necessidade de mais estudos envolvendo esta molécula e o câncer de pulmão, como já

demonstrado para outros componentes da MEC, sabidamente envolvidos na carcinogênese de diversos tecidos (Theocharis et al., 2010). Embora a associação entre os níveis de AH e os tecidos tumorais já foi descrita para uma série de tumores (Bernert et al., 2011; Bharadwaj et al., 2007; Kramer et al., 2011; Pelosi et al., 2007), as informações relacionadas a contribuição deste composto na tumorigênese de pulmão são extremamente limitadas. De fato, Pirinen et al. (2001) demonstraram maior expressão de AH por células tumorais e estromais de NSCLC, evento esse associado à menor grau de diferenciação e a maior taxa de recidiva tumoral. Em outros estudos, Ohashi et al.(2007) e Auvinen et al. (2000) mostraram, in vitro, que a adição exógena de AH a linhagens celulares de NSCLC promove quimio-resistência e também é capaz de aumentar a invasibilidade por aumento da produção de metaloproteinases.

Não houve associação entre as concentrações do AH com idade, sexo, história de tabagismo e estadiamento dos pacientes, porém nossos resultados tiveram impacto na sobrevida dos pacientes. Houve significância estatística entre as concentrações de AH presente nos tecidos tumorais e a sobrevida dos pacientes (p=0.05). Pacientes cujos tumores exibiram quantidades de AH acima de 364,36 µg/g de tecido seco presente no tecido tumoral apresentaram menor sobrevida global que pacientes cujos tumores evidenciaram AH abaixo de 364,36 ug/g. Tais resultados corroboram estudos recentes de Jossefsson et al. (2011) ao demonstrarem que pacientes com câncer de próstata e elevadas concentrações de AH no estroma tumoral apresentaram menor sobrevida que

pacientes com tumores exibindo baixas concentrações. A mesma correlação entre AH e sobrevida foi previamente demonstrada por Antilla et al. (2000) em pacientes com câncer de ovário. Já no câncer de pulmão, Pirinen et al. (2001) utilizando técnicas de imunohistoquímica demonstraram que pacientes portadores de adenocarcinomas com alta expressão de AH no estroma apresentaram menor sobrevida.

Análise do AH no escarro

Demonstramos que pacientes com câncer de pulmão apresentam elevações altamente significativas da produção de AH no escarro, despontando como potencial marcador diagnóstico de malignidade. independente da idade, sexo, carga de tabágica do paciente e estadiamento. Em ordem decrescente, constatamos que o escarro de pacientes com câncer de pulmão contém altas concentrações de AH, vindo a seguir o escarro de pacientes com DPOC e finalmente os voluntários saudáveis. Esse fenômeno, em virtude da alta significância estatística encontrada, é de extrema relevância, pois até onde temos conhecimento, trata-se de inédita constatação de um potencial marcador diagnóstico de câncer de pulmão em espécimes obtidos por técnica não-invasiva. A significância manteve-se elevada mesmo quando as concentrações do AH no escarro foram comparadas entre pacientes com câncer vs voluntários saudáveis, pacientes com câncer vs DPOC e pacientes DPOC vs voluntários

saudáveis. Claramente, houve elevação da produção de AH no escarro de pacientes com DPOC, porém a produção no escarro de pacientes com câncer de pulmão foi ainda maior. Esses resultados são corroborados pelo estudo de Dentener et al. (2005) que demonstraram uma elevação significativa na concentração do AH no escarro dos pacientes com DPOC em relação ao escarro de voluntários saudáveis tabagistas. Vislumbra-se que esses resultados podem decorrer de surtos de inflamação e reparação a que são susceptíveis os pacientes portadores de DPOC culminando com o remodelamento da MEC pulmonar.

Ainda no presente estudo, ao considerarmos os tipos histológicos de câncer de pulmão, constatamos através do escarro diferenças na produção do AH. Conforme esperado, escarros de pacientes com carcinomas de células escamosas apresentaram elevados valores de AH, provavelmente por serem tumores centrais na árvore respiratória. É sabido que a produção do AH pode ocorrer através de células normais e células tumorais e assim sendo, a íntima relação entre o tumor e a árvore respiratória interfere com a composição e produção elevada, favorecendo, portanto, a maior quantidade do composto nas amostras. Além disso, outros exames realizados no escarro como a citologia, por exemplo, tem mais rentabilidade nos casos de carcinomas de células escamosas exatamente pelo fato da sua localização mais central capaz de influenciar mais de perto a produção do escarro (Fernandez et al., 2002).

Surpreendentemente, demonstramos que pacientes com câncer de pulmão apresentam elevações da produção de AH no escarro, independente da idade, sexo e carga tabágica. Particularmente, o aumento da produção do AH no escarro dos pacientes com câncer foi independente do estadiamento. Tal resultado permite vislumbrar que a concentração do AH no escarro independe da fase de progressão tumoral, provavelmente como reflexo das modificações sofridas pela MEC já no início da carcinogênese, ou seja, na fase das transformações neoplásicas. De acordo com Wistuba e Gazdar (2006) nessa fase já há um remodelamento do tecido e da MEC que podem surtir efeitos na composição do escarro e na produção do AH. É sabido que a interação entre as células tumorais e o microambiente neoplásico, representado pela 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. Outros componentes do microambiente tumoral tais como as citocinas, fatores de crescimento, células do sistema imunológico, fibroblastos entre outros apresentam interação com as células tumorais e entre si criando sistemas extremamente complexos que também contribuem para o

remodelamento da MEC. A relação entre alguns desses fatores e a produção de AH nos tecidos tumorais já vem sendo desvendada conforme mostram alguns estudos. Em um destes estudos, Berdiaki et al. (2008), demonstraram que a adição de TGF-β2 nas culturas de células de fibrosarcoma resultou num aumento na expressão de mRNA de HAS2 e aumentou a expressão de versican, outro importante componente da MEC. Em um estudo recente relacionado ao câncer de pulmão Chow et al. (2010) observaram que a adição de TGF-β + IL-1β em culturas celulares foi capaz de estimular a produção de AH.

Apesar dessa elevada diferença observada entre os grupos, um dos fatores limitantes desta parte do estudo foi o recrutamento de pessoas saudáveis na mesma faixa etária dos pacientes com câncer de pulmão e com radiografias de tórax documentadas para a coleta de amostras de escarro para o grupo controle. Em função desta dificuldade, existe uma grande diferença entre o número de casos doentes e o número de casos normais. Mediante este problema, recorremos para a coleta de secreção endobrônquica de cadáveres provenientes do SVOC-USP uma vez que havia a possibilidade de coleta de grande número de amostras em curto prazo. Entretanto, constatamos que essas amostras não puderam compor um grupo controle, pois apresentaram valores de AH muito elevados, mais elevados até que os de pacientes com câncer de pulmão. Por essa razão esse grupo não foi considerado útil para comparação. Acredita-se que esse fenômeno tenha ocorrido em função das

amostras de secreção endobrônquica apresentarem contaminação com sangue e células. Esse fator pode ter influenciado diretamente na dosagem de proteínas utilizadas como referência para a expressão dos valores de AH encontrados no escarro.

Apesar de todas intercorrências, o considerável aumento do AH no escarro de pacientes com câncer de pulmão e a constatação de alterações ocorridas já no início da carcinogênese conferem ao AH um perfil promissor como marcador diagnóstico.

Potencial Rastreador e de Exclusão do AH

No presente estudo o AH desponta como um importante marcador de rastreamento do câncer de pulmão e exclusão de doenças pulmonares que afetam a MEC como a DPOC. Esse potencial foi avaliado através da construção de curvas ROC. Para a discussão dos resultados apresentados é importante ressaltar que a curva ROC é uma ferramenta estatística destinada a descrever quantitativamente o desempenho de um teste diagnóstico cujo resultado é expresso sob a forma de variável continua ou ordinal. Ao construir uma curva ROC valores de sensibilidade e especificidade são gerados. Os valores de especificidade correspondem à probabilidade do teste em fornecer resultados verdadeiros negativos e a sensibilidade representa a probabilidade do teste em fornecer resultados verdadeiros positivos. Martinez et al. (2003) discorrem que

a regra básica de decisão para a busca de um ponto de corte que gere uma resposta dicotômica (doente ou não doente) em geral é definida pelo ponto onde sensibilidade e especificidade são simultaneamente maiores.

Em nosso trabalho, com valores de concentração do AH acima de 11,13 ng/mg de proteína, encontramos sensibilidade de 87% e especificidade de 60% para rastreamento de pacientes com câncer de pulmão e voluntários saudáveis. Já com valores de concentração do AH acima de 31,44 ng/mg encontramos especificidade de 100% e sensibilidade de 51%. Estabelecendo este ponto, o teste do AH no escarro se mostra altamente relevante, pois tem potencial para diagnosticar o câncer de pulmão com certeza em 51% dos pacientes permitindo o início do tratamento antes dos procedimentos diagnósticos invasivos disponíveis. A especificidade de 100% significa que para valores acima de 31,44ng/mg de proteína não há falsos positivos, logo, o paciente que tiver um valor acima deste ponto de corte no teste do AH no escarro tem câncer e pode iniciar o tratamento. A desvantagem desse ponto de corte é que 49% das pessoas com câncer podem apresentar um diagnóstico falso negativo tornando o teste inconclusivo quando valores abaixo de 31,44ng/mg de proteína de AH no escarro forem detectados. Sendo assim, a aplicação clínica correta implica que qualquer paciente submetido a esse teste, com obtenção de AH menor que 31,44ng/mg de proteína no escarro, seja conduzido para a realização dos testes diagnósticos convencionais para esclarecimento. Sumarizando, há uma alta probabilidade (84%) de pacientes com câncer de pulmão apresentarem

quantidades mais elevadas de AH no escarro em relação aos voluntários saudáveis.

Embora a quantidade do AH seja sabidamente elevada em DPOC em relação aos pulmões normais, como demonstrado por Dentener et al. (2005), no presente trabalho conseguimos ainda excluir com sensibilidade de 33% e especificidade de 100%, os pacientes com DPOC em relação aos pacientes com câncer de pulmão para um ponto de corte de concentração de AH acima de 48,36ng/mg. Estabelecendo este ponto, o teste do AH no escarro se mostra significativo, pois tem capacidade para determinar a presença do câncer em considerável parte dos casos permitindo o início do tratamento dos pacientes antes dos procedimentos diagnósticos invasivos. Isso significa que o paciente avaliado pelo teste com AH acima de 48,36ng/mg de proteína no escarro permite evitar qualquer falso positivo concluindo que quem apresentar valores acima deste tem a doença e pode ser encaminhado para o tratamento. Sumarizando, observamos uma probabilidade de 69% para os pacientes com câncer apresentarem quantidades de AH maiores do que os pacientes com DPOC.

Cumpre ressaltar que o método de quantificação do AH empregado no presente estudo foi previamente utilizado por Passerotti et al. (2005), para demonstrar que a quantidade de AH presente na urina de pacientes portadores de Câncer de Bexiga tem potencial para determinar a presença de tumores residuais, mostrando a capacidade diagnóstica do teste.

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

Considerando os resultados aqui apresentados, fica claro que há grande possibilidade do teste do AH no escarro ter aplicação na prática clínica uma vez que trazem ao médico e ao paciente uma alternativa para a detecção da doença através de um teste não invasivo e de simples realização. Além disso, trata-se de um método de baixo custo quando comparado com os testes diagnósticos do câncer de pulmão tidos como padrão ouro tais como as radiologias, tomografias computadorizadas e broncoscopias. Sem dúvida para que essa aplicação prática seja possível é interessante e indispensável que os grupos designados para o desenvolvimento do teste sejam aperfeiçoados e o

mais próximo da situação real possível. Independente disto, frente aos resultados observados e discutidos até aqui, é indiscutível que o AH apresenta um papel no câncer de pulmão e, devido ao seu aumento nas neoplasias pulmonares, tem potencial para ser um novo marcador diagnóstico da doença.

7. CONCLUSÕES

Pela diferença nos níveis de AH encontrada nos espécimes tumorais em relação a espécimes não tumorais de pulmão e seu impacto na sobrevida dos pacientes, a dosagem do AH desponta como promissor marcador prognóstico no câncer de pulmão.

As diferenças encontradas nos espécimes teciduais foram também constatadas no escarro. Níveis decrescentes de AH foram detectados no escarro de pacientes com câncer de pulmão, pacientes com DPOC e voluntários saudáveis. Os valores quantificados foram independentes da idade, sexo, carga tabágica e estadiamento dos pacientes, e foram mais proeminentes no escarro de pacientes com carcinoma de células escamosas em relação aos outros tipos histológicos. A dosagem do AH no escarro desponta com perfil promissor no rastreamento de indivíduos com risco para câncer de pulmão.

Novos estudos prospectivos em uma escala maior de indivíduos são necessários para validar os resultados aqui apresentados.

8. ANEXOS

ANEXO 1 – TABELA 01

Tabela 01. *Características demográficas dos 46 pacientes selecionados no hospital AC Camargo para a coleta de amostras de tecido.*

Identificação Amostra tumoral	Idade	Sexo	Data Cirurgia	Status	Estadiamento	Tabagismo	Tipo Histológico	Identificação Amostra Normal
29T	70	F	ABR/06	ÓBITO	T2N0M0	NÃO	ADENOCARCINOMA	**29N**
31T	78	F	OUT/06	-	T1N0M0	ND	ADENOCARCINOMA	**31N**
32T	73	M	AGO/08	ÓBITO	T2N2M0	SIM	CEC	**32N**
36T	84	M	JUL/08	-	T2N0M0	SIM	CEC	**36N**
40T	71	M	MAR/06	ÓBITO	T2N2M0	SIM	ADENOCARCINOMA	**40N**
45T	74	M	JAN/04	ÓBITO	T3N0M0	SIM	ADENOCARCINOMA	**45N**
50T	68	F	MAI/04	-	ND	NÃO	GRANDES CÉLULAS	**50N**
53T	77	F	SET/04	-	T2N0M0	NÃO	ADENOCARCINOMA	**53N**
69T	44	F	JAN/05	ÓBITO	T2N2M0	NÃO	ADENOCARCINOMA	**69N**
78T	53	F	JUN/06	-	T2N1M0	NÃO	ADENOCARCINOMA	**78N**
79T	66	F	NC	-	T2N2M1	NÃO	ADENOCARCINOMA	**79N**
80T	78	M	FEV/06	ÓBITO	T2N0M0	NÃO	ADENOCARCINOMA	**80N**
84T	51	F	SET/06	-	T2N0M0	SIM	ADENOCARCINOMA	**84N**
85T	46	F	DEZ/06	-	T2N1M0	SIM	CEC	**85N**
86T	63	F	ABR/07	ÓBITO	ND	ND	ADENOCARCINOMA	**86N**
89T	65	F	FEV/07	-	T1N0M0	NÃO	ADENOCARCINOMA	**89N**
90T	62	F	OUT/07	ÓBITO	T2N2M0	ND	CEC	**90N**
91T	68	M	FEV/08	-	T1N0M0	SIM	CEC	**91N**
92T	59	M	JUN/07	-	T3N0M0	SIM	CEC	**92N**
95T	72	M	MAI/08	-	T2N0M0	NÃO	ADENOCARCINOMA	**95N**
98T	69	M	SET/07	-	T2N0M0	SIM	CEC	**98N**
113T	82	M	JUL/09	-	T1N0M0	SIM	ADENOCARCINOMA	**113N**
114T	72	M	JUL/00	ÓBITO	T1N2M0	NÃO	ADENOCARCINOMA	**114N**
115T	66	M	FEV/05	-	T4N0M0	SIM	CEC	**115N**
111T	74	M	OUT/09	-	T1N0M0	SIM	CEC	**111N**
118T	68	M	ABR/09	-	T2N0M0	SIM	CEC	**118N**
119T	53	M	JUN/05	-	T2N2M0	SIM	CEC	**119N**
126T	83	M	MAR/06	ÓBITO	T2N1M0	SIM	GRANDES CÉLULAS	**126N**
127T	58	M	MAR/06	ÓBITO	ND	ND	CEC	**127N**
128T	64	M	FEV/06	ÓBITO	T4N0M0	NÃO	CEC	**128N**
129T	64	M	AGO/08	-	ND	SIM	ADENOCARCINOMA	**129N**
132T	60	F	JUN/07	-	T2N0M0	SIM	ADENOCARCINOMA	**132N**

133T	70	F	MAI/07	-	T2N2M1	NÃO	ADENOCARCINOMA	**133N**
134T	52	F	AGO/07	-	T1N0M0	NÃO	ADENOCARCINOMA	**134N**
136T	79	M	DEZ/07	-	ND	SIM	GRANDES CÉLULAS	**136N**
137T	60	M	MAR/08	ÓBITO	T2N1M0	SIM	ADENOCARCINOMA	**137N**
140T	59	M	OUT/09	-	T3N0M0	NÃO	CARCINOMA POUCO DIFERENCIADO	**140N**
143T	58	M	JAN/09	-	T2N0M0	SIM	CEC	**143N**
146T	62	M	MAI/09	-	T1N0M0	SIM	ADENOCARCINOMA	**146N**
147T	51	M	ABR/09	-	ND	ND	ADENOCARCINOMA	**147N**
151T	61	M	AGO/09	ÓBITO	T2N3M0	SIM	ADENOCARCINOMA	**151N**
154T	64	M	DEZ/09	-	T3N0M0	NÃO	ADENOCARCINOMA	**154N**
156T	76	M	FEV/10	-	ND	SIM	CEC	**156N**
157T		F	JAN/10	-	ND	SIM	ADENOCARCINOMA	**157N**
158T	63	M	FEV/10	-	ND	SIM	CEC	**158N**

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

ANEXO 2 – TABELA 02

Tabela 2. *Re-classificação histológica dos 46 casos selecionados no hospital AC Camargo para a coleta de tecido.*

	Re-classificação Histológica
29T	Adenocarcinoma acinar
31T	Adenocarcinoma Mucinoso
32T	Adenocarcinoma sólido
36T	CEC classic
40T	Adenocarcinoma acinar
45T	Adenocarcinoma acinar
50T	Grandes Células
53T	Adenocarcinoma acinar
69T	Adenocarcinoma acinar
78T	Adenocarcinoma acinar
79T	Adenocarcinoma acinar
80T	Adenocarcinoma acinar
84T	Adenocarcinoma papilífero
85T	CEC clássico
86T	Adenocarcinoma acinar
89T	Adenocarcinoma acinar
90T	CEC basalóide
91T	CEC clássico
92T	CEC clássico
95T	Adenocarcinoma acinar
98T	CEC clássico
113T	Adenocarcinoma acinar
114T	Adenocarcinoma papilífero
115T	CEC clássico
111T	CEC clássico
118T	Adenocarcinoma in situ
119T	Grandes células
126T	Adenocarcinoma acinar
127T	CEC clássico
128T	CEC clássico
129T	Adenocarcinoma acinar
132T	Adenocarcinoma acinar

133T	Adenocarcinoma papilifero
134T	Adenocarcinoma in situ
136T	Grandes Células
137T	Adenocarcinoma acinar
140T	Grandes células
143T	CEC Basalóide
146T	Adenocarcinoma acinar
147T	Adenocarcinoma acinar
151T	Adenocarcinoma acinar
154T	Grandes células
156T	CEC clássico
157T	Adenocarcinoma entérico
158T	Grandes células

*CEC: carcinoma de células escamosas.

ANEXO 3 – TABELA 03

Tabela 03. *Dados demográficos dos 90 pacientes portadores de carcinomas de pulmão selecionados no ICESP e no HCB para a coleta de escarro.*

ID Amostra	Idade	Sexo	Estadiamento	Tabagismo	Anos-maco	Tipo Histológico (clínico)	Estádio (clínico)	Óbito	Fonte
ICESP 01	43	F	T4N2M1	NAO	0	SCLC	IV	-	ICESP
ICESP 02	45	F	T4N3M2	EX	40	ADENO	IV	-	ICESP
ICESP 03	70	M	T3N1M1	SIM	50	CEC	IV	-	ICESP
ICESP 04	37	F	T1N2M1	EX	*1*	ADENO	IV	-	ICESP
ICESP 05	57	M	T2N2M1	EX	25	ADENO	IV	-	ICESP
ICESP 06	56	M	T3N2M0	EX	30	CEC	IIIA	-	ICESP
ICESP 07	55	F	T4N1M1	SIM	20	CEC	IV	-	ICESP
ICESP 08	65	M	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*	-	ICESP
ICESP 09	56	M	T4N2M1	SIM	*ND*	ADENO	IV	-	ICESP
ICESP 10	52	F	T2N3M1	EX	40	ADENO	IV	SIM	ICESP
ICESP 11	59	M	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*	-	ICESP
ICESP 12	50	M	T4N0M1	SIM	51	CEC	IV	SIM	ICESP
ICESP 13	63	M	T4N3M1	SIM	50	CEC	IV	-	ICESP
ICESP 14	46	M	T4N3M0	EX	*ND*	GNDS CÉLS	IIIB	-	ICESP
ICESP 15	62	F	T4N0M1	NAO	0	CEC	IV	-	ICESP
ICESP 16	57	F	T3N3M0	SIM	120	CEC	IIIB	SIM	ICESP
ICESP 17	60	F	T4N2M0	SIM	*ND*	CEC	IIIB	-	ICESP
ICESP 18	81	M	T2N0M0	EX	20	ADENO	IB	SIM	ICESP
ICESP 19	54	M	T3N2M0	EX	50	CEC	IIIA	SIM	ICESP
ICESP 20	68	M	T3N0M0	SIM	*ND*	CEC	IIB	-	ICESP
ICESP 21	75	M	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*	-	ICESP
ICESP 22	72	M	T4N1M1	NAO	0	CEC	IV	SIM	ICESP
ICESP 23	61	F	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*	-	ICESP
HCB 26	75	M	T4N2M1	EX	50	ADENO	IV	-	HCB
HCB 27	89	M	T2N0M1	EX	100	CEC	*ND*	-	HCB
HCB 29	59	M	T4N3M1	SIM	90	SCLC	IV	-	HCB
HCB 30	49	M	T4N2M1	EX	30	SCLC	IV	-	HCB
HCB 31	58	M	T3N2M1	EX	37	CEC	IV	-	HCB
HCB 32	61	F	T4N0M1	EX	23,5	ADENO	IV	-	HCB
HCB 33	68	M	T4N0M0	EX	18,3	CEC	IIIB	-	HCB
HCB 36	62	F	T2N2M0	NAO	0	NEUROENDOCRINO	IIIA	-	HCB
HCB 37	60	F	T2N0M0	NAO	0	ADENO	IIA	-	HCB
HCB 39	55	F	T1N2M1	SIM	80	ADENO	IV	-	HCB

HCB 40	74	M	T4N3M0	EX	59	CEC	IIIB	-	HCB
HCB 41	65	F	*ND*	NÃO	0	ADENO	IV	-	HCB
HCB 42	44	F	T1N2M1	EX	30	ADENO	IV	-	HCB
HCB 43	64	F	T3N2M1	EX	0,1	ADENO	IV	-	HCB
HCB 44	65	M	T4N3M0	EX	26	ADENO	IIIB	-	HCB
HCB 45	56	M	T2N3MX	EX	54	ADENO	IIIB	-	HCB
HCB 46	75	M	*ND*	EX	30	*ND*	*ND*	-	HCB
HCB 47	65	M	*ND*	EX	5,7	*ND*	*ND*	SIM	HCB
HCB 48	61	M	T4N0M0	EX	70,5	*ND*	IIIB	-	HCB
HCB 50	60	F	M1	SIM	0	*ND*	*ND*	-	HCB
HCB 51	48	M	T4N2M1	SIM	70	ADENO	IV	-	HCB
HCB 53	50	M	T2N2M0	SIM	38	CEC	IIIA	-	HCB
HCB 54	71	M	T3N3M1	NAO	0	ADENO	IV	SIM	HCB
HCB 55	64	M	T3N3M1	EX	72	ADENO	IV	-	HCB
HCB 59	64	F	T2N3M0	EX	48	ADENO	IIIB	-	HCB
HCB 60	66	M	T3N1M1	EX	56	ADENO	IV	-	HCB
HCB 61	74	M	T2N3M0	EX	57	CEC	IIIB	-	HCB
HCB 62	75	F	T2N3MX	EX	30	ADENO	IIIB	-	HCB
HCB 63	53	M	T4N3M1	EX	72	CEC	*ND*	SIM	HCB
HCB 64	59	F	TXN3M0	EX	1,5	ADENO	*ND*	-	HCB
HCB 65	76	M	T3N3M0	EX	68	CEC	*ND*	SIM	HCB
HCB 66	59	M	T3N2M1	EX	63	CEC	IV	-	HCB
HCB 67	62	F	T4N2M1	EX	26	CEC	IIIB	-	HCB
HCB 68	81	M	T2N3M0	EX	45	CEC	IIIB	SIM	HCB
HCB 69	59	M	T4N0M1	EX	43	ADENO	IV	-	HCB
HCB 70	76	M	*ND*	EX		SCLC	IV	-	HCB
HCB 71	66	M	T2N2M0	EX	43	CEC	IIIA	-	HCB
HCB 72	52	F	T4N3M1	NAO	0	ADENO	IV	-	HCB
HCB 73	72	M	*ND*	NAO	0	ADENO	IV	SIM	HCB
HCB 75	45	F	T2N3M0	EX	60	ADENO	IIIB	-	HCB
HCB 77	58	M	T4N3M1	EX	9	CEC	IIIB	-	HCB
HCB 78	76	M	T4N2M0	EX	84	CEC	IIIB	-	HCB
HCB 79	64	F	T2N0M0	SIM	49	CEC	IB	-	HCB
HCB 82	77	M	*ND*	NAO	0	CEC	IV	-	HCB
HCB 83	57	M	T2N3M1	SIM	14,4	CEC	*ND*	-	HCB
HCB 85	65	M	*ND*	EX	126	ADENO	IV	-	HCB
HCB 86	57	F	T4N3M1	SIM	47	*ND*	*ND*	-	HCB
HCB 87	64	M	T3N3M1	EX	10	*ND*	*ND*	-	HCB
HCB 88	59	M	T4N3M1	EX	7,5	ADENO	*ND*	-	HCB
HCB 89	59	M	T3N2M1	SIM	100	ADENO	IV	-	HCB

HCB 90	54	M	T2N3M0	EX	74	ADENO	*ND*	-	HCB
HCB 93	64	M	T4N3M1	NÃO	0	ADENO	IV	-	HCB
HCB 94	54	F	*ND*	EX	7,6	NSCLC	*ND*	-	HCB
HCB 95	46	F	T3N0M0	SIM	10,2	CEC	IIB	-	HCB
HCB 96	78	M	T4N0M1	SIM	34	CEC	IV	-	HCB
HCB 97	60	F	*ND*	SIM	24	*ND*	*ND*	SIM	HCB
HCB 98	70	F	*ND*	NÃO	0	ADENO	IV	-	HCB
HCB 100	39	M	T4N3M1	NÃO	0	ADENO	IV	-	HCB
HCB 102	52	M	T4N2M0	EX	80	CEC	IIIB	-	HCB
HCB 103	78	M	T2N2M1	EX	15	ADENO	IV	-	HCB
HCB 104	67	M	*ND*	NÃO	0	*ND*	*ND*	SIM	HCB
HCB 105	65	M	T2N0M0	EX	54	CEC	IIA	-	HCB
HCB 106	74	F	*ND*	EX	3,4	*ND*	*ND*	-	HCB
HCB 107	73	M	T3N2M0	SIM	56	CEC	IIIA	-	HCB
HCB 108	68	M	T3N1M1	EX	125	ADENO	IV	-	HCB
HCB 109	63	M	*ND*	EX	15,3	SCLC	*ND*	-	HCB

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

ANEXO 4 – TABELA 04

Tabela 04 *– Dados demográficos dos 25 pacientes portadores de DPOC selecionados no HC-FMUSP para o grupo de alto risco.*

ID Amostra	Idade	Sexo	Tabagismo	Anos-maço
DPOC 01	78	M	3	7,5
DPOC 02	32	M	1	0
DPOC 03	68	M	2	12
DPOC 04	48	M	2	6,6
DPOC 05	68	F	2	61
DPOC 06	56	M	1	0
DPOC 08	65	M	3	126
DPOC 09	75	F	1	0
DPOC 10	66	M	3	100
DPOC 11	65	M	3	40
DPOC 12	72	F	3	40
DPOC 13	49	M	3	10
DPOC 14	78	F	3	30
DPOC 15	78	M	1	60
DPOC 16	57	M	3	30
DPOC 17	72	M	3	120
DPOC 18	ND	M	ND	ND
DPOC 19	59	M	3	20
DPOC 20	56	F	1	0
DPOC 21	ND	F	ND	ND
DPOC 22	62	M	1	0
DPOC 23	59	M	ND	ND
DPOC 24	85	M	3	100
DPOC 25	82	M	3	30
DPOC 26	72	F	1	0

ANEXO 5 – TABELA 05

Tabela 05. *Dados demográficos dos 15 pacientes sem histórico de doença pulmonar crônica selecionados no HC-FMUSP para o grupo controle.*

Amostra	IDADE	SEXO
AGD 01	65	F
AGD 02	77	F
AGD 03	86	F
AGD 04	58	M
AGD 05	70	F
AGD 07	57	F
AGD 09	78	F
AGD 10	78	F
AGD 11	44	M
AGD 12	23	F
AGD 13	53	M
AGD 14	59	F
AGD 15	69	M
AGD 16	86	M
AGD 17	61	M

ANEXO 6 – TABELA 06

Tabela 06. *Dados demográficos dos 26 casos selecionados no SVOC-USP para coleta de secreção endobrônquica para o grupo controle.*

CASO	SEXO	IDADE	CAUSA MORTIS
SVO 01	F	86	Edema Pulmonar
SVO 02	F	58	Edema Pulmonar
SVO 03	F	63	Infarto Agudo do Miocárdio
SVO 04	M	56	Acidente Vascular Cerebral
SVO 05	M	68	Edema Pulmonar
SVO 06	M	85	Edema Pulmonar
SVO 07	F	89	Edema Pulmonar
SVO 08	F	65	Hemopericárdio
SVO 09	F	85	Cardiopatia Isquêmica
SVO 10	F	76	Infarto Agudo do Miocárdio
SVO 11	F	74	Infarto Agudo do Miocárdio
SVO 12	F	69	Cardiopatia Isquêmica
SVO 13	F	70	Edema Pulmonar
SVO 14	M	44	Edema Pulmonar
SVO 15	F	91	Hemopericárdio
SVO 16	F	79	Edema Pulmonar
SVO 17	M	76	Edema Pulmonar
SVO 18	M	47	Edema Pulmonar
SVO 19	M	77	Edema Pulmonar
SVO 20	F	47	Infarto Agudo do Miocárdio
SVO 21	F	70	Edema Pulmonar
SVO 22	M	60	Edema Pulmonar
SVO 23	F	65	Edema Pulmonar
SVO 24	F	71	Infarto Agudo do Miocárdio
SVO 25	M	60	Edema Pulmonar
SVO 26	M	58	Infarto Agudo do Miocárdio

ANEXO 7 – TABELA 07

Tabela 07. *Critérios de inclusão e exclusão para cada um dos grupos selecionados para a coleta de escarro.*

GRUPO	***Critérios inclusão***	***Critérios exclusão***
Câncer de Pulmão	• Pacientes com câncer de pulmão confirmado por biópsia e/ou CT-tórax com tratamento em andamento ou não • Maiores de 18 anos	• Sem confirmação da neoplasia de pulmão • Pacientes com outras comorbidades pulmonares • Menores de 18 anos
Alto risco (DPOC)	• Pacientes com DPOC confirmada por história clínica, RX de tórax e espirometria • Maiores de 18 anos	• Pacientes com suspeita de neoplasia • Pacientes com tuberculose • Menores de 18 anos
Controle (HC-FMUSP)	• Pacientes sem histórico de doenças pulmonares crônicas • Pacientes com RX-tórax documentado • Pacientes sem histórico tabagista	• Pacientes com histórico de doenças pulmonares crônicas • Pacientes sem RX-tórax documentado • Pacientes com histórico tabagista atual ou passado
Controle (SVOC-SP)	• Casos com causa mortis não relacionada a doenças pulmonares crônicas • Casos sem histórico tabagista • Casos sem histórico de doença pulmonar crônica	• Casos com causa mortis relacionada a doenças pulmonares crônicas • Casos com histórico tabagista • Casos com histórico de doença pulmonar crônica

ANEXO 8 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – HC-FMUSP

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME: .:.....

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

ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:.....

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

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

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

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

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

ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:.....

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

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA**

"Relevância Clínica da concentração do ácido hialurônico em espécimens tumorais de pacientes portadores de carcinomas de pulmão**"**

ANEXO 8 – Termo de consentimento informado (continuação)

PESQUISADOR RESPONSÁVEL : Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi

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

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL : CRM N°25789

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Anatomia Patológica

3. **AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA**:

RISCO MÍNIMO	☐	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	X	RISCO MAIOR	☐

4.**DURAÇÃO DA PESQUISA** : 12 meses

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

1 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO

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

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

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

ANEXO 8 – Termo de consentimento informado (continuação)

2- PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS E PROPÓSITOS

Coleta do escarro

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

3- DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS

O risco envolvendo este estudo é baixo.

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

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

4- BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

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

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

5- PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS QUE POSSAM SER VANTAJOSOS PARA O INDIVÍDUO

Não se aplica.

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

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

ANEXO 8 – Termo de consentimento informado (continuação)

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

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

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

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária.

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

8- SALVAGUARDA DA CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE.

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

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

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

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

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

ANEXO 8 – Termo de consentimento informado (continuação)

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

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

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

*

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

ANEXO 9 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – HCB

HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS
Fundação Pio XII
O Hospital do Amor

Espaço para etiqueta

CDG 9

Termo de Informação e Consentimento

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

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

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

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

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

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

Declaração

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

Barretos,_____de_____de_____

Responsável ou Paciente

Nome:_____

RG:_____RGH:_____

20 bls 100fls 07/2006 mod 602

ANEXO 10 – TABELA 15

Tabela 15 *– Valores de ponto de corte com suas respectivas proporções de sensibilidade e especificidade referente à curva ROC entre amostras saudáveis e amostras de pacientes com câncer.*

Maior ou igual a:	Sensibilidade	1 - Especificidade
,1601	1,000	1,000
2,2827	,989	1,000
3,4642	,978	1,000
3,9098	,967	1,000
4,5172	,967	,933
4,7744	,967	,867
4,8514	,956	,867
4,9260	,956	,800
5,4116	,944	,800
6,2888	,933	,800
7,1747	,933	,733
7,6378	,933	,667
7,6778	,933	,600
7,7943	,922	,600
7,9351	,922	,533
8,2825	,911	,533
8,6490	,900	,533
9,0859	,900	,467
9,5183	,889	,467
10,0943	,878	,467
10,7176	,867	,467
11,1363	,867	,400
11,4727	,856	,400
11,6299	,844	,400
11,9533	,844	,333
12,4958	,833	,333
12,9400	,822	,333
13,3906	,811	,333
13,9921	,800	,333
14,2770	,789	,333
14,4947	,778	,333
14,9403	,767	,333
15,3090	,756	,333
15,5225	,744	,333
16,0601	,733	,333
16,8848	,722	,333
17,4311	,711	,333
17,8747	,700	,333
18,2034	,689	,333
18,4140	,689	,267
18,6817	,678	,267
19,1292	,667	,267
19,6747	,656	,267
20,0594	,656	,200
20,2698	,644	,200
20,6352	,644	,133
21,4289	,633	,133
21,9736	,622	,133
22,0778	,611	,133
22,9295	,600	,133
23,8681	,589	,133
24,3887	,589	,067
24,8464	,578	,067
25,5514	,567	,067
27,0761	,556	,067
28,0118	,544	,067
28,3146	,533	,067

29,2649	,522	,067
30,6411	,511	,067
31,4443	,511	,000
31,7216	,500	,000
31,8740	,489	,000
32,2153	,478	,000
32,9754	,467	,000
34,1605	,456	,000
34,9302	,444	,000
35,6038	,433	,000
37,3785	,422	,000
39,4557	,411	,000
41,0557	,400	,000
42,0889	,389	,000
44,0967	,378	,000
45,8881	,367	,000
46,2473	,356	,000
46,9405	,344	,000
47,9734	,333	,000
49,4050	,322	,000
50,5916	,311	,000
52,1224	,300	,000
55,6498	,289	,000
65,0967	,278	,000
76,4749	,267	,000
81,3052	,256	,000
86,7133	,244	,000
93,9476	,233	,000
102,8471	,222	,000
111,4977	,211	,000
118,0550	,200	,000
128,0007	,189	,000
145,0672	,178	,000
157,4710	,167	,000
163,1732	,156	,000
169,3123	,144	,000
177,1766	,133	,000
188,5410	,122	,000
222,0340	,111	,000
263,0092	,100	,000
281,5793	,089	,000
297,0079	,078	,000
380,8112	,067	,000
620,1812	,056	,000
995,8216	,044	,000
1514,2234	,033	,000
2683,8618	,022	,000
4386,2400	,011	,000
5227,5000	,000	,000

Área sob a curva – AH (Câncer *vs* Voluntários Saudáveis)

Àrea	Erro padrão	Significância	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite inferior	Limite Superior
,821	,048	,000	,727	,915

ANEXO 11 – TABELA 17

Tabela 17 *– Valores de ponto de corte com suas respectivas proporções de sensibilidade e especificidade referente à curva ROC entre amostras de pacientes com DPOC e amostras de pacientes com câncer.*

Maior ou igual a:	Sensibilidade	1 - Especificidade
-,8500	1,000	1,000
,6551	1,000	,960
2,2827	,989	,960
3,4642	,978	,960
4,1670	,967	,960
4,8854	,956	,960
5,4116	,944	,960
6,3603	,933	,960
7,2862	,933	,920
7,8559	,922	,920
8,2825	,911	,920
8,6334	,900	,920
9,0704	,900	,880
9,5183	,889	,880
9,6125	,878	,880
9,6371	,878	,840
9,8388	,878	,800
10,0952	,878	,760
10,1709	,878	,720
10,3896	,878	,680
10,7120	,867	,680
11,1307	,867	,640
11,4727	,856	,640
11,8374	,844	,640
12,4958	,833	,640
12,9400	,822	,640
13,3906	,811	,640
13,9921	,800	,640
14,2770	,789	,640
14,3457	,778	,640
14,3980	,778	,600
14,5470	,778	,560
14,9403	,767	,560
15,3090	,756	,560
15,5225	,744	,560
15,8004	,733	,560
16,2403	,733	,520
16,8848	,722	,520
17,4311	,711	,520
17,8747	,700	,520
18,3674	,689	,520
18,6817	,678	,520
19,1292	,667	,520
19,6280	,656	,520
20,0126	,656	,480
20,6078	,644	,480
20,9749	,633	,480
21,2296	,633	,440
21,6836	,633	,400
21,9736	,622	,400
22,0778	,611	,400
22,3533	,600	,400
22,6969	,600	,360
23,0269	,600	,320
23,5197	,600	,280
24,2866	,589	,280
24,8464	,578	,280
25,0019	,567	,280
25,6678	,567	,240
26,3787	,556	,240

27,2374	,556	,200
28,0118	,544	,200
28,2007	,533	,200
28,4264	,533	,160
29,2649	,522	,160
30,7927	,511	,160
31,7216	,500	,160
31,8740	,489	,160
31,9624	,478	,160
32,2768	,478	,120
32,9176	,467	,120
33,3633	,467	,080
34,1605	,456	,080
34,9302	,444	,080
35,6038	,433	,080
36,8307	,422	,080
37,9620	,422	,040
39,4557	,411	,040
41,0557	,400	,040
42,0889	,389	,040
44,0967	,378	,040
45,8881	,367	,040
46,2473	,356	,040
46,9405	,344	,040
47,8252	,333	,040
48,3613	,333	,000
49,4050	,322	,000
50,5916	,311	,000
52,1224	,300	,000
55,6498	,289	,000
65,0967	,278	,000
76,4749	,267	,000
81,3052	,256	,000
86,7133	,244	,000
93,9476	,233	,000
102,8471	,222	,000
111,4977	,211	,000
118,0550	,200	,000
128,0007	,189	,000
145,0672	,178	,000
157,4710	,167	,000
163,1732	,156	,000
169,3123	,144	,000
177,1766	,133	,000
188,5410	,122	,000
222,0340	,111	,000
263,0092	,100	,000
281,5793	,089	,000
297,0079	,078	,000
380,8112	,067	,000
620,1812	,056	,000
995,8216	,044	,000
1514,2234	,033	,000
2683,8618	,022	,000
4386,2400	,011	,000
5227,5000	,000	,000

Área sob a curva – AH (Câncer *vs* DPOC)

Àrea	Erro padrão	Significância	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite inferior	Limite Superior
,698	,050	,002	,600	,797

9. REFERÊNCIAS

Adcock IM, Caramorib G, Barnesa, PJ. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer: New Molecular Insights. *Respiration*. 2011;81(4):265-84.

Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 123(1 Suppl):21S-49S, 2003.

Anttila MA, Tammi RH, Tammi MI, Syrjanen KJ, Saarikoski SV, Kosma VM. High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 2000;60(1):150–155

Auvinen P, Tammi R, Parkkinen J, Tammi M, Agren U, Johansson R, Hirvikoski P, Eskelinen M, Kosma VM. Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *Am J Pathol.* 2000;156(2):529–536.

Bagashawe KD, Rustin GJS. Circulating tumor markers. In Perkhan M, Pinedo O H, Veronesi U, eds Oxford textbook of oncology. Oxford, Oxford University Press, 1995, p. 412-19.

Berdiaki A, Zafiropoulos A, Fthenou E, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Regulation of hyaluronan and versican deposition by growth factors in fibrosarcoma cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(2):194-202.

Bernert B, Porsch H, Heldin P. Hyaluronan Synthase 2 (HAS2) Promotes Breast Cancer Cell Invasion by Suppression of Tissue Metalloproteinase Inhibitor 1 (TIMP-1). *J Biol Chem* 2011;286(49):42349-59.

Bharadwaj AG, Rector K, Simpson MA. Inducible Hyaluronan Production Reveals Differential Effects on Prostate Tumor Cell Growth and Tumor Angiogenesis. *J Biol Chem* 2007;282(28):20561-72.

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

Chanez P, Holz O, Ind P, Djukanovic R, Maestrelli P and Sterk P. Sputum Induction. *European Respiratory Journey* 2002; 20:3S – 8S

Chow G, Tauler J, Mulshine JL. Cytokines and Growth Factors Stimulate Hyaluronan Production: Role of Hyaluronan in Epithelial toMesenchymal-Like Transition in Non-Small Cell Lung Cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 485468.

Colby TV, Wistuba II, Gazdar A. Precursors to pulmonary neoplasia. *Adv. Anat. Pathol.* 1998;5:205–15.

Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung Cancer: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician.* 2007;1;75(1):56-63.

Cotran RS, Kumar V, Robbins CT. Pathology Basis of Disease. 6 ed. Pliladelphia, W.B. Saunders, 1999; 89-112.

Delpech B, Girard N, Bertrand P, Courel NM, Chauzy C, Delpech A. Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. *J Int Med*. 1997;242:41–48.

Dentener MA, Vernooy JHJ, Hendriks S, Wouters EFM. Enhanced levels of hyaluronan in lungs of patients with COPD: relationship with lung function and local inflammation. *Thorax* 2005;60:114-119.

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

Fraser, JR, Laurent, TC, Laurent, UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine.* 1997;242:27S–33S.

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

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

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

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review [online], 1975-2008, National Cancer Institute, 2011. Bethesda, MD. [acesso em 26 dez 2011]. Disponível em: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/

Ichikawa T, Itano N, Sawai T, Kimata K, Koganehira Y, Saida T, Taniguchi S. Increased synthesis of hyaluronate enhances motility of human melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 1999;113(6):935-9.

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

Josefsson A, Adamo H, Hammarsten P, Granfors T, Stattin P, Egevad L, Laurent AE, Wikström P, Bergh A. Prostate cancer increases hyaluronan in surrounding nonmalignant stroma, and this response is associated with tumor growth and an unfavorable outcome. *Am J Pathol* 2011;Oct;179(4):1961-8.

Koyama H, Kobayashi N, Harada M, Takeoka M, Kawai Y, Sano K, Fujimori M, Amano J, Ohhashi T, Kannagi R, Kimata K, Taniguchi S, Itano N. Significance of tumor-associated stroma in promotion of intratumoral lymphangiogenesis: pivotal role of a hyaluronan-rich tumor microenvironment. *Am J Pathol.* 2008;172(1):179-93.

Kramer MW, Escudero DO, Lokeshwar SD, Golshani R, Ekwenna OO, Acosta K, Merseburger AS, Soloway M, Lokeshwar VB. Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis. *Cancer*. 2011;117(6):1197-209

Knudson, C.B., Knudson, W. Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism. *Clinical Orthopedics and Related Research* , 2004;427:152–162.

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

Martins JRM, Passerotti CC, Maciel RMB, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem* 2003; 319: 65-72

Martins M, Sucupira ED, Freitas, LMR, Selig L, Bethlem EP. Escarro induzido, recomendações do Programa de Controle de Tuberculose do Estado do Rio de Janeiro. *J. bras. pneumol.* [online] [acesso em 16 mar 2011] 2004;30(6): 591-592. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132004000600018&lng=en.

McDonald JA, Camenisch, TD. Hyaluronan: Genetic insights into the complex biology of a simple polysaccharide. *Glycoconj J.* 2003;19(4-5):331-9.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA)[online]. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011 [acesso em 26 dez 2011]. Disponível em: www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf

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

Misra S, Toole BP, Ghatak S. Hyaluronan constitutively regulates activation of multiple receptor tyrosine kinases in epithelial and carcinoma cells. *J Biol Chem* 2006;281(46):34936-41.

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

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

Ohashi R, Takahashi F, Cui R, Yoshioka M, Gu T, Sasaki S, Tominaga S, Nishio K, Tanabe KK, Takahashi K. Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell. *Cancer Letters*. 2007;252(2):225–234.

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

Pelosi P, Severgnini P, Rocco PR.The Extracellular Matrix of the Lung: The Forgotten Friend! In: Vincent, JL. *Intensive Care Medicine* New York:Springer New York; 2007;320-334.

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

Pirinen R, Tammi R, Tammi M, Hirvikoski P, Parkkinen JJ, Johansson R, Böhm J, Hollmén S, Kosma VM. Prognostic value of hyaluronan expression in non-small-cell lung cancer: increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001;95(1):12-7.

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

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

Schwartz MK. Cancer markers. In: De Vita JR, VT, Hellman S, Rosemberg SA. eds. Cancer: principles and practices of oncology. 4ed. Philadelphia, lippincott-Raven, 1993. p. 531-42.

Sekine Y, Katsura H, Koh E, Hiroshima K, Fujisawa T. Early detection of COPD is important for lung cancer surveillance. *Eur Respir J.* 2011; [Epub ahead of print]

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

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

Stern R, Asarib AA, Sugaharac KN. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *Eur J Cell Biol.* 2006;85(8):699-715.

Takagaki TY. Marcadores tumorais em carcinoma broncogênico. São Paulo, 1992. 83 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Bio. Chem.* 2002;277:4581–84.

Tan JX, Wang XY, Su XL, Li HY, Shi Y, Wang L, Ren GS. Upregulation of HYAL1 expression in breast cancer promoted tumor cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis. *PLoS One.* 2011;6(7):e22836.

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

Tengblad, A. A comparative study of the binding of cartilage link protein and the hyaluronate-binding region of the cartilage proteoglycan to hyaluronate-substituted Sepharose gel. *Biochem J* 1981;199:297-305.

Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. FEBS J. 2010:277:3904-3923.

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

Turino GM, Cantor JO. Hyaluronan in Respiratory Injury and Repair. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 1;167(9):1169-75.

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

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

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

APENDICE

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

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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 12/05/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0256/10**, intitulado: "**PROPOSTA: RELEVÂNCIA CLÍNICA DA CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO EM ESPÉCIMENS TUMORAIS DE PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMAS 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: **Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi**
Pesquisador (a) Executante: **Maristela Peres Rangel**

CAPPesq, 13 de Maio de 2010

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

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