

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA**

CAMILA MACHADO BALDAVIRA

**Impacto da via de sinalização Wnt/ β -catenina, matriz extracelular e transição
epitélio-mesenquimal nas alterações moleculares do estroma em carcinomas
pulmonares de não pequenas células**

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de Outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP

São Paulo

2023

CAMILA MACHADO BALDAVIRA

**Impacto da via de sinalização Wnt/ β -catenina, matriz extracelular e transição
epitélio-mesenquimal nas alterações moleculares do estroma em carcinomas
pulmonares de não pequenas células**

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

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Luiza
Capelozzi

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de Outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Baldavira, Camila Machado

Impacto da via de sinalização Wnt/ β -catenina, matriz extracelular e transição epitélio-mesenquimal nas alterações moleculares do estroma em carcinomas pulmonares de não pequenas células / Camila Machado Baldavira.

-- São Paulo, 2023.

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

Programa de Patologia.

Orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Descritores: 1.Neoplasias pulmonares 2.Via de sinalização Wnt 3.Colágeno
4.Glicosaminoglicanos 5.Transição epitelial-mesenquimal 6.Carcinoma
pulmonar de células não pequenas 7.Imunofluorescência 8.Imuno-histoquímica
9. Microscopia eletrônica

USP/FM/DBD-020/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Baldavira CM. Impacto da via de sinalização Wnt/ β -catenina, matriz extracelular e transição epitélio-mesenquimal nas alterações moleculares do estroma em carcinomas pulmonares de não pequenas células [doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Aprovada em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Silvana e João Carlos, que estão ao meu lado em todos os momentos, mesmo que distantes fisicamente, nunca falta carinho, apoio e força. São exemplos de vida, de caráter e que sempre me ensinaram os caminhos corretos da vida.

Ao meu marido Pedro, que está junto comigo nesta caminhada, sempre me motivando e acreditando em mim.

Ao meu irmão Felipe que mesmo a muitos quilômetros de distância, sempre me apoia e incentiva, vibrando a cada conquista.

À minha avó Heloisa (*in memoriam*), que também me ajudou a chegar aonde estou hoje.

Aos meus amigos, os quais prefiro não nomearei para não cometer a injustiça de não citar alguém, que sempre acreditaram no meu potencial e não me deixam desistir nos momentos de fraqueza. Obrigada por terem orgulho da amiga cientista de vocês!

Às minhas amigas e companheiras de trabalho, Tabatha e Juliana, com as quais posso dividir minhas dúvidas, “pitacos”, alegrias e tristezas da difícil jornada da vida acadêmica.

À Prof.^a Vera Luiza Capelozzi, uma pessoa muito especial, com quem tenho o imenso prazer de trabalhar, por toda compreensão, paciência, carinho, conhecimento, apoio e incentivos durante toda jornada. Obrigada por acreditar no meu trabalho.

Aos demais professores, funcionários e colaboradores, que contribuíram para a construção deste trabalho, direta ou indiretamente, seja com amostras, ensinamentos, técnicas, troca de informações, etc.

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2018/20403-6).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico, CNPq (303735/2021-0)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES (001)

“Vejam bem, todas as coisas são complexas e, ao mesmo tempo, muito simples. Essa é a regra básica que controla o mundo. Não podemos nos esquecer disso. Mesmo quando as coisas parecem e são complexas, na verdade a motivação por trás é bem simples. A questão é: o que nós buscamos. A motivação é, em outras palavras, a raiz do desejo. O importante é encontrar essa raiz e, para isso, é preciso cavar para além da superfície confusa da realidade. Cavar até o fim. Cavar até encontrar essa raiz.”

(Haruki Murakami – Crônica do Pássaro de Corda)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver)/ Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro... [et al.]. --3. ed. rev. ampl. mod. - - São Paulo: SIBi/USP, 2016.

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

Baldavira CM. Impacto da via de sinalização Wnt/ β -catenina, matriz extracelular e transição epitélio-mesenquimal nas alterações moleculares do estroma em carcinomas pulmonares de não pequenas células [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O câncer de pulmão representa um problema de saúde mundial, sendo o principal tipo de tumor responsável pelas mortes por câncer. Nesse contexto, o microambiente tumoral e a matriz extracelular (MEC) apresentam-se como de extrema relevância. Assim, este estudo teve como objetivo explorar o valor prognóstico da transição epitélio-mesenquimal (TEM), sinalização Wnt e expressão de proteínas da MEC em pacientes com carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC) com estádios clínicos I-III. Para isso, utilizamos 120 cortes de tecidos de pacientes e avaliamos a imuno-histoquímica, a imunofluorescência e a microscopia eletrônica de transmissão (MET) de cada um desses marcadores. Também usamos análise *in silico* para validar nossos dados. Encontramos uma forte expressão de E-caderina e β -catenina, o que reflete o processo diferencial de invasão da MEC. Também notamos uma forte expressão de sulfato de condroitina (SC) e colágenos tipos III e V. Isso sugere que, após a TEM, a membrana basal (MB) aumentou a motilidade das células invasivas. As proteínas da TEM foram diretamente associadas ao WNT5A e aos colágenos tipos III e V, o que sugere que a via WNT os impulsiona. Por outro lado, o heparan sulfato (HS) foi associado a WNT3A e SPARC, enquanto WNT1 foi associado ao SC. Curiosamente, a associação entre WNT1 e Col IV sugeriu feedback negativo de WNT1 ao longo do MB. Em nossa coorte, WNT3A, WNT5A, HS e SPARC desempenharam um papel importante no modelo de regressão de Cox, influenciando a sobrevida global (SG) dos pacientes, seja direta ou indiretamente, com a expressão SPARC estratificando a SG em dois grupos: 97 meses para alta expressão; e 65 para baixa expressão. Em conclusão, o presente estudo identificou um conjunto de proteínas que podem desempenhar um papel significativo na previsão do prognóstico de pacientes com CPNPC com estádios clínicos I-III.

Descritores: Neoplasias pulmonares. Via de sinalização Wnt. Colágeno. Glicosaminoglicanos. Transição epitelial-mesenquimal. Carcinoma pulmonar de células não pequenas. Imunofluorescência. Imuno-Histoquímica. Microscopia eletrônica.

Baldavira CM. Impact of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, extracellular matrix and epithelial-mesenchymal transition on stromal molecular alterations in non-small cell lung carcinomas [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Lung cancer still represents a global health problem, being the main type of tumor responsible for cancer deaths. In this context, the tumor microenvironment, and the extracellular matrix (ECM) pose as extremely relevant. Thus, this study aimed to explore the prognostic value of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), Wnt signaling, and ECM proteins expression in patients with non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) with clinical stages I-III A. For that, we used 120 tissue sections from patients and evaluated the immunohistochemical, immunofluorescence, and transmission electron microscopy (TEM) of each of these markers. We also used *in silico* analysis to validate our data. We found a strong expression of E-cadherin and β -catenin, which reflects the differential ECM invasion process. Therefore, we also noticed a strong expression of chondroitin sulfate (CS) and collagens III and V. This suggests that, after EMT, the basal membrane (BM) enhanced the motility of invasive cells. EMT proteins were directly associated with WNT5A, and collagens III and V, which suggests that the WNT pathway drives them. On the other hand, heparan sulfate (HS) was associated with WNT3A and SPARC, while WNT1 was associated with CS. Interestingly, the association between WNT1 and Col IV suggested negative feedback of WNT1 along the BM. In our cohort, WNT3A, WNT5A, heparan sulfate, and SPARC played an important role in the Cox regression model, influencing the overall survival (OS) of patients, be it directly or indirectly, with the SPARC expression stratifying the OS into two groups: 97 months for high expression; and 65 for low expression. In conclusion, the present study identified a set of proteins that may play a significant role in predicting the prognosis of NSCLC patients with clinical stages I-III A.

Descriptors: Lung neoplasms. Wnt signaling pathway. Collagen. Glycosaminoglycans. Epithelial-mesenchymal transition. Non-small-cell lung cancer. Immunofluorescence. Immunohistochemistry. Microscopy, electron.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC - adenocarcinoma
APC - *Adenomatous Polyposis Coli*
BSA - albumina de soro bovino
CAMKII - proteína cálcio/calmodulina cinase tipo II
CCE - carcinoma de células escamosas
CGC - carcinoma de grandes células
CK1 α - caseína quinase 1 alfa
CPNPC – carcinoma pulmonar de não pequenas células
CPPC - carcinoma pulmonar de pequenas células
CPTAC - *Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium*
DAAM1 - ativador de morfogênese associado a Disheveled 1
DAG - diacilglicerol
Dvl - proteínas Disheveled
FGF-2 - fator de crescimento de fibroblastos 2
Fz - receptor transmembrana Frizzled
GAGs - glicosaminoglicanas
GP - glicoproteínas
GSK3 β - glicogênio sintase quinase 3 beta
HE - hematoxilina-eosina
HS - heparan sulfato
ICESP - Instituto do Câncer de São Paulo
IDH - índice de desenvolvimento humano
IF - imunofluorescência
IHC - imuno-histoquímica
ILK - quinase ligada à integrina
InCor - Instituto do Coração
IP3 - inositol 1,4,5-trifosfato
JNK - c-Jun N-terminal quinase
LEF - fator de intensificador linfóide
LRP - receptor de lipoproteína de baixa densidade
MAT - microambiente tumoral
MB - membrana basal

MEC - matriz extracelular
MET - microscopia eletrônica de transmissão
MMP-3 - metaloproteinase 3 de matriz
MP_{2,5} - material particulado de diâmetro inferior a 2,5µm
NFAT - fator nuclear de células T ativadas
OMS - Organização Mundial de Saúde
PBS - tampão fosfato salino
PCP - polaridade celular planar
PG - proteoglicanas
PKC - proteína quinase C
PLC - fosfolipases C
qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa
ROCK - Rho quinase
SC - sulfato de condroitina
SG - sobrevivência global
SPARC - proteína secretada, acídica e rica em cisteína
TCF - fator de células T
TCGA - *The Cancer Genome Atlas*
TEM - transição epitélio-mesenquimal
TGFβ - fator de crescimento transformador-β
TKIs - inibidores de tirosina quinase
TMA - *tissue microarray*
TNM - tumor-nódulo-metástase
VEGF - fator de crescimento endotelial vascular
WNT - glicoproteínas Wingless/integrases

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Características demográficas e clinicopatológicas dos pacientes (N=120) ... | 46 |
| Tabela 2. Associação entre os subtipos histológicos de CPNPC e as variáveis morfométricas E-caderina e β -catenina (Qui-quadrado de Pearson; $P < 0,05$)..... | 48 |
| Tabela 3. Associação entre os subtipos histológicos de CPNPC e as variáveis morfométricas da matriz extracelular (Qui-quadrado de Pearson; $P < 0,05$) | 56 |
| Tabela 4. Associação entre os subtipos histológicos de CPNPC e as variáveis morfométricas da via de sinalização Wnt e SPARC (Qui-quadrado de Pearson; $P < 0,05$) | 63 |
| Tabela 5. Associação entre características clinicopatológicas e expressão média (% de expressão positiva) de E-caderina, β -catenina, proteínas sinalizadoras WNTs e SPARC (teste t e ANOVA, $P < 0,05$) | 66 |
| Tabela 6. Associação entre características clinicopatológicas e expressão média (% de expressão positiva) de glicosaminoglicanas e tipos de colágeno (teste t e ANOVA, $P < 0,05$) | 67 |
| Tabela 7. Variáveis associadas à sobrevida global em 120 pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas. A análise univariada e multivariada empregou um modelo de riscos proporcionais de Cox (Qui-quadrado 33,223; $P < 0,001$)..... | 69 |
| Tabela 8. Características clinicopatológicas e expressão média de mRNA de E-caderina, β -catenina, proteínas de sinalização WNTs e SPARC (banco de dados TCGA, N = 939; teste qui-quadrado, $P < 0,05$)..... | 76 |
| Tabela 9. Características clinicopatológicas e expressão média de mRNA de colágeno tipos I, III, IV e V (banco de dados TCGA, N=939; teste qui-quadrado, $P < 0,05$)..... | 77 |
| Tabela 10. Medidas obtidas no software QuPath para marcadores da TEM, via de sinalização WNT e SPARC..... | 104 |
| Tabela 11. Medidas obtidas no software QuPath para GAGs e tipos de colágenos.... | 108 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ranking Nacional de Câncer como Causa de Morte em Idades <70 Anos em 2019.. | 20 |
| Figura 2. Dez principais tipos de câncer para a estimativa de novos casos de câncer e mortes por sexo, Estados Unidos, 2022..... | 22 |
| Figura 3. Distribuição espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da traqueia, dos brônquios e dos pulmões por 100 mil habitantes, estimadas para o ano de 2023, distribuídos por Unidade da Federação. | 23 |
| Figura 4. Fatores de risco associados ao câncer de pulmão em indivíduos nunca fumantes. | 24 |
| Figura 5. Colorações de hematoxilina-eosina (HE) dos três subtipos histológicos principais de carcinoma pulmonar de não pequenas células. | 25 |
| Figura 6. Alterações da matriz extracelular no câncer. | 30 |
| Figura 7. Visão esquemática do processo de transição epitélio-mesenquimal..... | 33 |
| Figura 8. Via Wnt dependente de β -catenina. | 36 |
| Figura 9. Via Wnt independente de β -catenina.. | 37 |
| Figura 10. Gráficos de violino mostrando as proteínas do processo de transição epitelial-mesenquimal analisada através do software QuPath (N=120)..... | 47 |
| Figura 11. Expressão imuno-histoquímica de marcadores relacionados à transição epitélio-mesenquimal em tumores e grupos invasivos de carcinoma de grandes células, adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas (N=120). | 50 |
| Figura 12. Expressão de marcadores relacionados à transição epitélio-mesenquimal. Imagens visualizadas ao microscópio de imunofluorescência mostrando tumores e grupos invasivos de carcinoma de grandes células, adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas (N=120). | 51 |
| Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão de carcinoma de grandes células, adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas visualizado no interior do tumor, membrana basal e matriz intersticial. | 52 |
| Figura 14. Expressão imuno-histoquímica de marcadores para glicosaminoglicanos em tumores e grupos invasivos de carcinoma de grandes células, em adenocarcinoma e no carcinoma de células escamosas (N=120). | 54 |
| Figura 15. Gráficos de violino mostrando as glicoproteínas da matriz extracelular e os colágenos da matriz analisados através do software QuPath (N=120). | 55 |

| | |
|---|-----|
| Figura 16. Microscopia eletrônica de transmissão de carcinoma de grandes células, adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas visualizado na membrana basal e matriz intersticial. | 57 |
| Figura 17. Co-análise da imunofluorescência de sulfato de condroitina e colágeno tipo I nos diferentes subtipos histológicos de carcinoma pulmonar de não pequenas células. | 58 |
| Figura 18. Co-análise da imunofluorescência de sulfato de condroitina e colágeno tipo III nos diferentes subtipos histológicos de carcinomas pulmonares de não pequenas células. | 59 |
| Figura 19. Co-análise da imunofluorescência de heparan sulfato e colágeno tipo IV nos diferentes subtipos histológicos de carcinoma pulmonar de não pequenas células. | 59 |
| Figura 20. Co-análise da imunofluorescência de sulfato de condroitina e colágeno tipo V nos diferentes subtipos histológicos de carcinoma pulmonar de não pequenas células. | 60 |
| Figura 21. Expressão imuno-histoquímica de WNTs e SPARC em carcinoma de grandes células, adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas (N=120). | 61 |
| Figura 22. Gráficos de violino mostrando as proteínas da via de sinalização Wnt e a proteína SPARC analisadas através do software Qupath (N=120). | 62 |
| Figura 23. Correlação entre os marcadores de interesse. | 64 |
| Figura 24. Curva de sobrevivência para expressão SPARC. | 68 |
| Figura 25. Expressão de mRNA dos marcadores de interesse em adenocarcinoma pulmonar a partir de dados obtidos do “ <i>The Cancer Genome Atlas</i> ” (TCGA). | 72 |
| Figura 26. Expressão de mRNA dos marcadores de interesse em no carcinoma de células escamosas do pulmão a partir de dados obtidos do “ <i>The Cancer Genome Atlas</i> ” (TCGA). | 73 |
| Figura 27. Expressão das proteínas de interesse no adenocarcinoma a partir de dados obtidos do Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (CPTAC). | 74 |
| Figura 28. Curvas de Kaplan Meier para nossos marcadores de interesse obtidas na base de dados KM-Plotter. | 78 |
| Figura 29. Rede de interação proteína-proteína obtida na ferramenta STRING para nossas proteínas de interesse. | 79 |
| Figura 30. Análise de enriquecimento Metascape. | 81 |
| Figura 31. Controles negativos de imunofluorescência para E-caderina e β -catenina nos diferentes subtipos histológicos de CPNPC. | 111 |
| Figura 32. Controles negativos de imunofluorescência para sulfato de condroitina e heparan sulfato (verde) e colágeno tipos I, III, IV e V (vermelho). | 112 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 2.1 | CÂNCER DE PULMÃO | 20 |
| 2.1.1 | <i>EPIDEMIOLOGIA</i> | 20 |
| 2.1.2 | <i>FATORES DE RISCO E EXPOSIÇÃO AMBIENTAL</i> | 24 |
| 2.1.3 | <i>CLASSIFICAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA</i> | 25 |
| 2.1.4 | <i>ESTADIAMENTO TNM DO CÂNCER DE PULMÃO</i> | 26 |
| 2.1.5 | <i>DIAGNÓSTICO, TRIAGEM E TRATAMENTO</i> | 26 |
| 2.2 | MICROAMBIENTE TUMORAL | 27 |
| 2.3 | MATRIZ EXTRACELULAR NO CÂNCER..... | 28 |
| 2.3.1 | <i>PRINCIPAIS COMPONENTES DA MATRIZ</i> | 30 |
| 2.3.1.1 | <i>COLÁGENOS</i> | 30 |
| 2.3.1.2 | <i>GLICOPROTEÍNAS, PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANAS</i> | 31 |
| 2.4 | TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL | 32 |
| 2.5 | VIA DE SINALIZAÇÃO WNT | 35 |
| 2.5.1 | <i>VISÃO GERAL</i> | 35 |
| 2.5.1.1 | <i>SINALIZAÇÃO WNT DEPENDENTE DE B-CATENINA</i> | 35 |
| 2.5.1.2 | <i>SINALIZAÇÃO WNT INDEPENDENTE DE B-CATENINA</i> | 36 |
| 2.5.2 | <i>WNT E O CÂNCER DE PULMÃO</i> | 37 |
| 2.5.3 | <i>SINALIZAÇÃO WNT NA METÁSTASE TUMORAL</i> | 38 |
| 2.6 | A PROTEÍNA SPARC..... | 39 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |
| 3.1 | COORTE DE ESTUDO | 41 |
| 3.2 | CONSTRUÇÃO DAS LÂMINAS DE <i>TISSUE MICROARRAY</i> (TMA) | 41 |
| 3.3 | AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA E DE IMUNOFLORESCÊNCIA | 42 |
| 3.4 | QUANTIFICAÇÃO POR ANÁLISE DE IMAGEM..... | 43 |
| 3.5 | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) | 43 |
| 3.6 | ANÁLISE <i>IN SILICO</i> | 44 |
| 3.7 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 45 |
| 4 | RESULTADOS | 45 |
| 4.1 | CARACTERIZAÇÃO DA COORTE DO ESTUDO NSCLC | 45 |
| 4.2 | VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS EPITÉLIO-MESENQUIMAIS | 47 |
| 4.3 | VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS DA MATRIZ EXTRACELULAR..... | 53 |
| 4.4 | EXPRESSÃO MORFOMÉTRICA DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT E DA PROTEÍNA SPARC..... | 60 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.5 | CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS TEM, WNTs, SPARC E MEC | 63 |
| 4.6 | ASSOCIAÇÕES ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS | 65 |
| 4.7 | VALOR PROGNÓSTICO DAS VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS | 68 |
| 4.8 | VALIDAÇÃO DO ESTUDO DE COORTE POR MINERAÇÃO DE DADOS <i>IN SILICO</i> | 71 |
| 4.8.1 | MRNA E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS | 71 |
| 4.8.2 | ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO E PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS | 74 |
| 4.8.3 | VALOR PROGNÓSTICO DOS GAGs, SPARC, MARCADORES DE TEM E TIPOS DE COLÁGENO | 78 |
| 4.8.4 | INTERAÇÃO BIOLÓGICA ENTRE GAGs, SPARC, MARCADORES DE TEM E TIPOS DE COLÁGENO | 79 |
| 5 | DISCUSSÃO | 82 |
| | REFERENCIAS | 89 |
| | APÊNDICE A – MEDIDAS OBTIDAS NO SOFTWARE QUPATH | 104 |
| | APÊNDICE B – CONTROLES NEGATIVOS PARA AS IMAGENS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA | 111 |
| | APÊNDICE C – FOLHA DE ROSTO DA PUBLICAÇÃO REFERENTE A TESE | 113 |

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC) constitui o tumor epitelial maligno mais frequente do pulmão, correspondendo a 85% dos casos. Sua classificação inclui principalmente três subtipos histológicos: adenocarcinoma (ADC); carcinoma de células escamosas (CCE); e carcinoma de grandes células (CGC) [1]. Globalmente, o CPNPC continua sendo a principal causa de mortalidade por câncer [2]. No Brasil, a sobrevida global (SG) em cinco anos é estimada em 18% [3]. Normalmente, esses baixos valores de SG estão relacionados a presença de metástases a distância, mesmo quando o paciente é submetido a ressecção cirúrgica radical. Uma das grandes questões associadas a este processo de recorrência tumoral pode estar ligada a metástases ocultas, que ainda são difíceis de detectar, mesmo com os avanços clínicos atuais [4].

Os processos metastáticos requerem que as células malignas invadam o tecido circundante por meio de várias etapas. Duas dessas etapas são de particular importância: o processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM); e migração celular através do tecido para os vasos [5]. Para que ambos os processos ocorram de forma satisfatória, as células tumorais devem expressar certas características essenciais, principalmente aquelas que afetam sua capacidade de aderir a diferentes moléculas presentes na matriz extracelular (MEC) e em outras superfícies celulares [6]. Além disso, também é extremamente relevante a forma como a MEC é remodelada, uma vez que, sua reestruturação permite a mobilidade celular, e, conseqüentemente, facilitando o processo de metástase [6].

O CPNPC geralmente se desenvolve a partir das células epiteliais que revestem o epitélio bronquiolar e alveolar [7, 8], e, devido ao isso, o processo de TEM é extremamente relevante. Isso porque é através do processo de TEM que as células mudam seu fenótipo epitelial em favor de um fenótipo mesenquimal móvel [9]. Para isso, as células epiteliais interagem com a membrana basal e sofrem múltiplas alterações bioquímicas que permitem a alteração do fenótipo celular. Como resultado, as células tumorais adquirem capacidades migratórias aprimoradas, capacidade de invasão e produção significativamente aumentada de moléculas de MEC [10]. Assim, a MEC torna-se crucial para que as células progridam neste fenótipo mesenquimal, revertendo assim às suas origens epiteliais após a invasão do sítio secundário [11]. Logo, as células tumorais tornam-se capazes de reepitelizar no local metastático, vital para a colonização e desenvolvimento de extensões metastáticas [12].

Ademais, a MEC fornece às células suporte e ancoragem histoarquitetônicos. Sendo composta por uma rede complexa de componentes altamente reticulados, incluindo proteínas fibrosas, glicoproteínas, proteoglicanos e polissacarídeos [13]. As propriedades biomecânicas e bioquímicas da MEC regulam a sobrevivência, proliferação, diferenciação e motilidade celular através da ação de proteínas como SPARC, sulfato de condroitina (CS), heparan sulfato (HS) e colágenos [14-17]. E, as alterações moleculares que ocorrem na MEC têm sido potencialmente associadas ao carcinoma invasivo. Além disso, as modificações sofridas pela MEC podem modular importantes vias de sinalização na morfogênese tecidual, como a via de sinalização Wnt. A sinalização anormal desta via já está associada a vários tipos de câncer, onde exerce um efeito tumorigênico [18, 19]. Além disso, essa via também tem sido descrita como influenciando o processo de TEM, e, conseqüentemente, atuando sobre o crescimento e progressão tumoral [18].

Nesse sentido, vários estudos investigaram os componentes do MEC individualmente. No entanto, até onde sabemos, não há estudos investigando os componentes estruturais da MEC combinados com o comportamento da TEM e a via de sinalização Wnt em tecidos de CPNPC. Assim, o presente estudo analisou os padrões de MEC em diferentes tipos de CPNPC e os associou com a expressão de marcadores de TEM e proteínas WNT, e com as características clínico-patológicas e evolução dos pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer de Pulmão

2.1.1 *Epidemiologia*

O câncer representa um grande problema de saúde pública mundial, sendo uma das principais causas de morte prematura (menores de 70 anos) em todo mundo, sendo também uma importante restrição para o crescimento da expectativa de vida [19; 20]. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2019, o câncer foi a primeira ou segunda principal causa de mortes antes dos 70 anos em 112 de 183 países, e ocupou a terceira posição em mais 23 (**Figura 1**) [21].

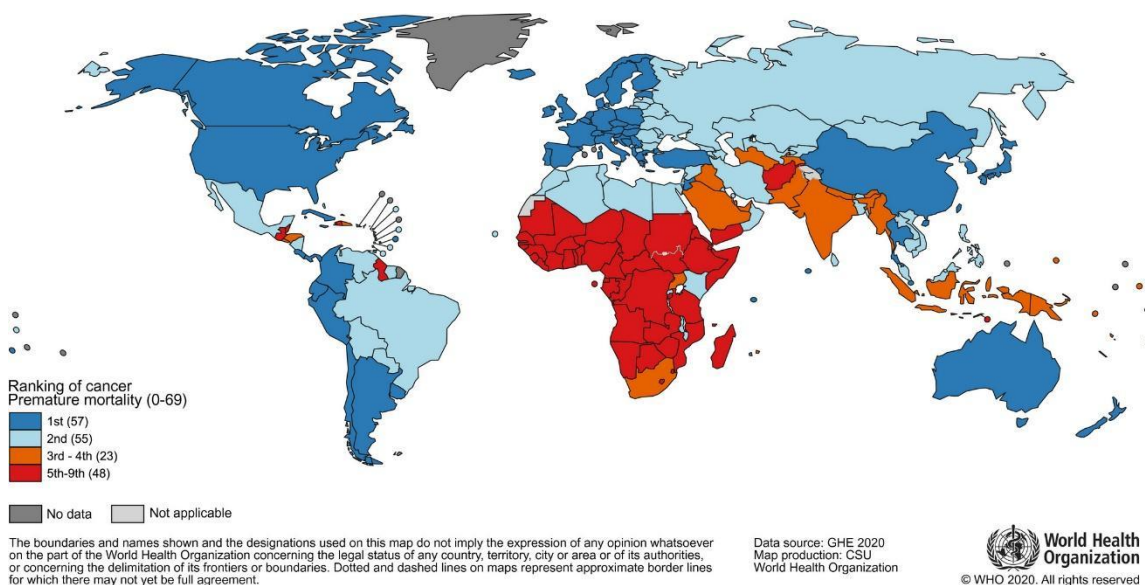


Figura 1. Ranking Nacional de Câncer como Causa de Morte em Idades <70 Anos em 2019. Os números de países representados em cada grupo de classificação estão incluídos na legenda. Fonte: WHO, 2020 [22].

Contudo, com a pandemia do coronavírus, o diagnóstico e tratamento de câncer foram afetados negativamente, devido à redução de acesso a cuidados e o medo dos pacientes à exposição ao COVID-19 [23]. Tal cenário afetou também o levantamento de dados epidemiológicos, e, dessa forma, poderá ser vista uma redução a curto prazo na incidência de casos de câncer, com aumento de diagnósticos em estágio avançado e aumento da mortalidade [24]. Sendo assim, todas as estatísticas referentes aos anos de 2020 a 2022, foram comprometidos. E, com isso, o que se tem disponível de mais recente quanto os dados de incidência e mortalidade estão de 2 a 4 anos atrasado em relação ao ano atual. Isso corre devido ao tempo necessário para coleta, compilação de dados, controle de qualidade e disseminação dos mesmos [23].

Em 2020, houve uma estimativa de 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes por câncer em todo o mundo. Estima-se ainda que, para ambos os sexos, metade dos casos e 58,3% das mortes por câncer tenham ocorrido na Ásia – onde se encontra 59,5% da população mundial. Na Europa, os dados apontam 22,8% do total de casos e 19,6% das mortes, embora o continente seja responsável por apenas 9,7% da população global [21]. Ainda assim, ressalta-se que variações numéricas quanto ao número de casos e óbitos em muitos países em desenvolvimento também podem estar relacionadas à falta de um sistema de notificações centralizado, e, assim, muitos casos podem não ser notificados, reduzindo a real incidência da doença [25].

Para o câncer de pulmão as estimativas, em 2020, eram de 2,2 milhões de novos casos e 1,8 milhões de mortes. Sendo o segundo tipo de câncer mais diagnosticado (1 a cada 10 diagnósticos, 11,4%), e a principal causa de morte (1 a cada 5 óbitos, 18%). O câncer de pulmão representa a principal causa de morbidade e mortalidade em homens e, em mulheres, ocupa o terceiro lugar em incidência e o segundo em mortalidade. As taxas de incidência e mortalidade são, aproximadamente, duas vezes maiores em homens do que em mulheres, variando de acordo com a região (de 1,2 na América do Norte a 5,6 no norte da África). Essas taxas também variam de acordo com o índice de desenvolvimento humano (IDH); em países com IDH alto ou muito alto esses valores são de 3 a 4 vezes maiores que em países de IDH médio ou baixo [21]. Todavia, esse padrão poderá ser futuramente alterado de acordo com o comportamento do consumo de tabaco, visto que, 80% dos fumantes com mais de 15 anos residem em países de baixo e médio IDH [26]. Acredita-se ainda que, em 2022, aproximadamente 81% das mortes por câncer de pulmão sejam causadas diretamente pelo tabagismo ou do fumo passivo [27].

Nos Estados Unidos, o câncer representa a segunda principal causa de morte. E, estima-se que, em 2022, ocorram, aproximadamente, 1.918.000 novos casos de câncer e 609.000 mortes por câncer, sendo atribuídas ao câncer de pulmão aproximadamente 350 mortes por dia [23, 28]. O câncer de pulmão ainda é a segunda causa de mortes em homens e mulheres nos Estados Unidos (**Figura 2**).

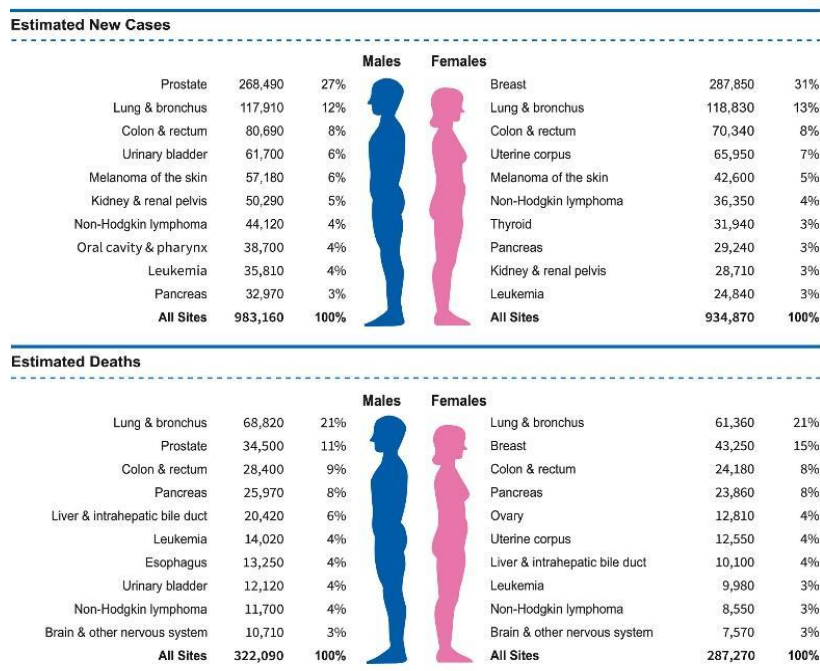


Figura 2. Dez principais tipos de câncer para a estimativa de novos casos de câncer e mortes por sexo, Estados Unidos, 2022. As estimativas são arredondadas para o 10 mais próximo e excluem câncer de pele basocelular e de células escamosas e carcinoma in situ, exceto bexiga urinária. A classificação é baseada em projeções modeladas e pode diferir dos dados observados mais recentes. Fonte: Siegel et al., 2022; American Cancer Society, 2022 [23, 28].

Já no Brasil, para o triênio de 2023-2025, há uma estimativa de que ocorram 704 mil novos casos de câncer. Quando excluído câncer de pele não melanoma, o câncer de pulmão o quarto mais incidente entre os brasileiros (4,6%). Essa incidência também varia de acordo com a região geográfica, sendo o Sul e Sudeste as regiões que concentram os maiores números de casos (cerca de 70%), com predomínio dos cânceres de próstata e mama, cólon e reto. Entre os homens, o câncer de próstata continua sendo o mais predominante; para as mulheres, o câncer de mama é o de maior incidência [19]. A **Figura 3** ilustra a distribuição espacial das taxas brutas da incidência de neoplasias do aparelho respiratório (traqueia, brônquios e pulmões) estimadas para o ano de 2023 em nosso país.

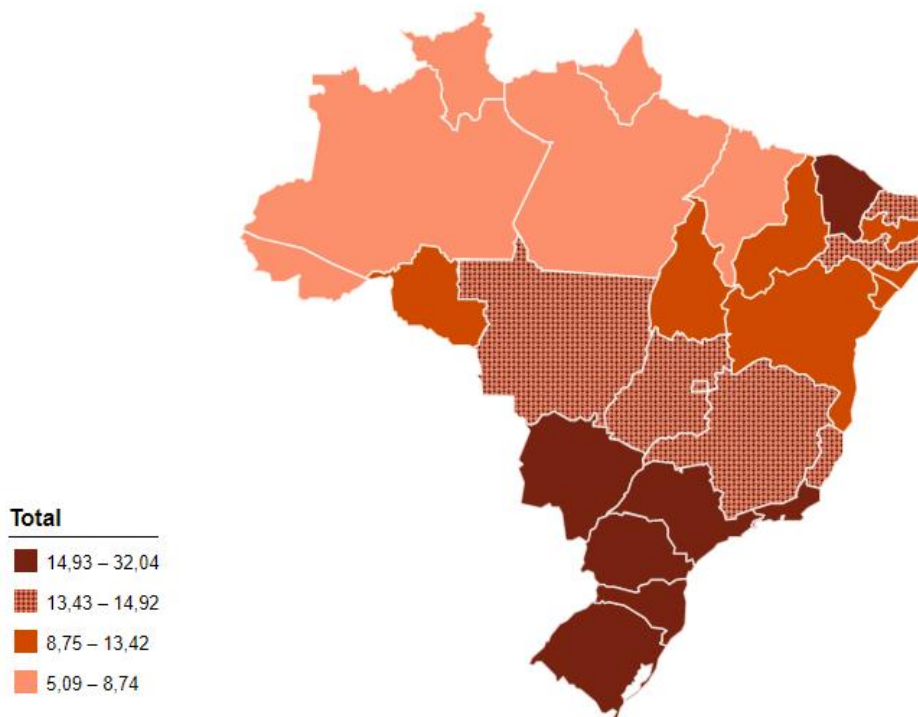


Figura 3. Distribuição espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da traqueia, dos brônquios e dos pulmões por 100 mil habitantes, estimadas para o ano de 2023, distribuídos por Unidade da Federação. Fonte: INCA, 2022 [19].

A sobrevida de pacientes com câncer de pulmão em 5 anos após o diagnóstico é de apenas 10% a 20% na maioria dos países, sendo maior no Japão, Israel e República da Coreia [29]. Nos Estados Unidos já se observa que a incidência de câncer de pulmão em estágio avançado vem reduzindo, e a taxa de diagnóstico em estágio inicial vem aumentando cerca de 4.5% ao ano, com ganho na proporção de sobrevida relativa em 3 anos, de 21% em 2004 para 31% em 2018 [23]. Esses dados coincidem com as mudanças atuais aplicadas à prática clínica associada ao tratamento e/ou ao rastreamento do câncer. Além disso, campanhas para cessação do tabagismo também têm aumentado visando maior redução no número de casos.

Ademais, as perspectivas quanto à sobrevivência têm se tornado promissoras para todos os estágios de câncer de pulmão, com aumento da porcentagem de pessoas que vivem pelo menos 3 anos após o diagnóstico. Houve também aumento da sobrevida média de 8 para 13 meses [30]. Porém, esses ganhos de sobrevida estão majoritariamente ligados ao CPNPC e refletem os avanços de procedimentos diagnósticos e cirúrgicos [31, 32], bem como de terapias direcionadas às mutações drive mais comuns [33]. Os impactos da imunoterapia ainda não são diretamente vistos, mas acredita-se que seus resultados trarão impactos positivos nas estatísticas futuras. Somam-se também a esses fatores o aumento ao acesso a cuidados [34] e o aumento de diagnósticos em estágio inicial da doença [35].

2.1.2 Fatores de risco e exposição ambiental

Entre os fatores de risco conhecidos, os mais frequentemente reportados no câncer de pulmão são: estilo de vida, exposição ambiental e ocupacional. No entanto, a forma como esses fatores irão atuar podem variar de acordo com a localização geográfica, gênero, ancestralidade genética, predisposição genética, além de suas interações sinérgicas [36].

O fator de risco mais reconhecido no desenvolvimento do câncer de pulmão é o tabagismo, e, embora a nicotina não seja cancerígena, existem outras substâncias presentes na fumaça do cigarro que são consideradas cancerígenas pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer [36]. Além disso, charutos e cachimbos também foram associados a uma maior chance de desenvolver câncer de pulmão [37]. Cabe ressaltar ainda que a exposição passiva ao fumo também leva o indivíduo ao risco de desenvolver câncer de pulmão.

Há ainda outros fatores de risco adicionais para o desenvolvimento do câncer de pulmão. Entre eles, os mais bem estudados incluem: a exposição à fumaça de combustível doméstico (biomassa), como madeira, resíduos de colheita e carvão [38-41]; a poluição do ar ambiente, com material particulado de diâmetro inferior a $2,5\mu\text{m}$ ($\text{MP}_{2,5}$), dióxido de nitrogênio e dióxido de enxofre [42-44]; outras exposições ambientais, como ao radônio e ao arsênio [45-48]; riscos ocupacionais, como a exposição ao amianto [49-51] e outros compostos orgânicos e metálicos [52, 53]; entre outros. Alguns desses fatores de risco associados ao câncer de pulmão estão representados na **Figura 4**, abaixo.

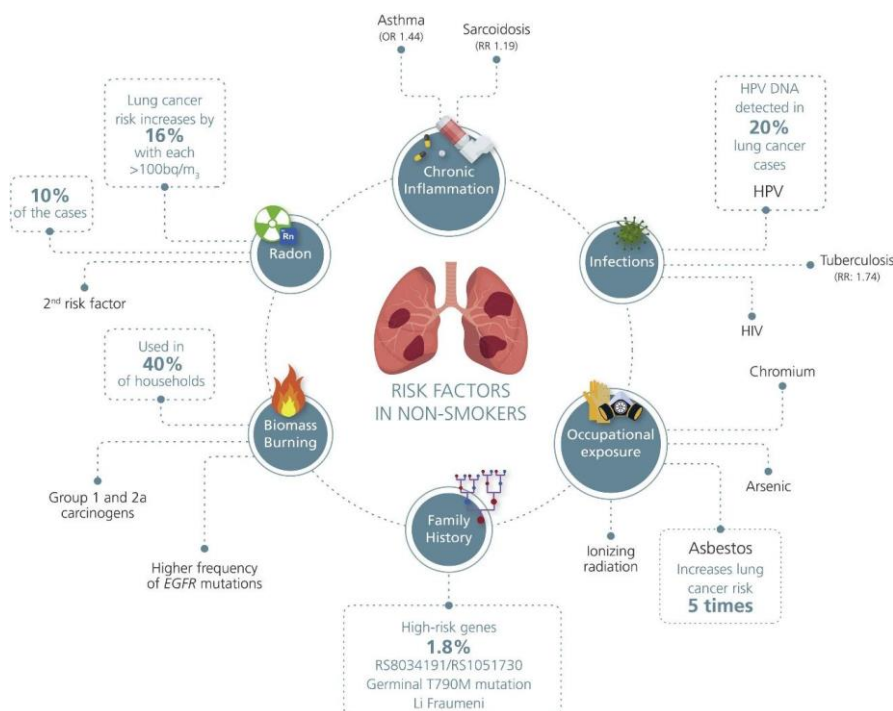


Figura 4. Fatores de risco associados ao câncer de pulmão em indivíduos nunca fumantes. Fonte: Corrales et al., 2020 [41].

2.1.3 Classificação anatomopatológica

O câncer de pulmão é uma doença heterogênea e possui muitas características clinicopatológicas [54]. Classificado de acordo com sua histologia e com o uso de alguns marcadores imuno-histoquímicos, o câncer de pulmão é dividido em duas formas principais: carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC), que representam cerca de 15% dos casos, e carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC), mais frequentes, representando 85% dos casos. Clinicamente, essa classificação histológica do câncer de pulmão é bastante relevante, pois os testes moleculares e uso o de terapias-alvo são guiadas através dela.

O CPPC é um carcinoma neuroendócrino altamente agressivo que ocorre principalmente em tabagistas e ex-tabagistas, tendo prognóstico extremamente ruim, independente do estágio, além disso, cerca de dois terços dos pacientes com CPPC têm doença metastática à distância no diagnóstico inicial [55].

Já o CPNPC origina-se de células brônquicas ou alveolares e constituem a forma mais comum de câncer de pulmão primário. Sua classificação, segundo a OMS, se subdivide em três subtipos histológicos principais (**Figura 5**): adenocarcinoma (ADC), carcinoma de células escamosas (CCE), e carcinoma de grandes células (CGC) [54, 56].

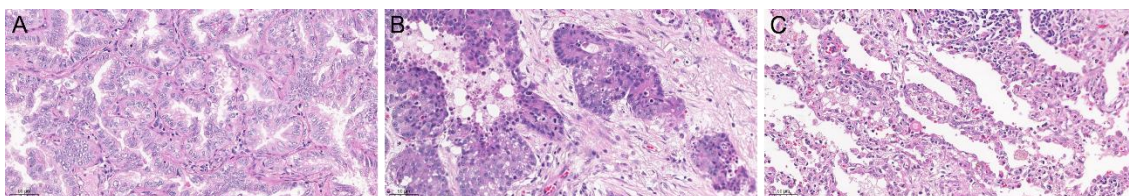


Figura 5. Colorações de hematoxilina-eosina (HE) dos três subtipos histológicos principais de carcinoma pulmonar de não pequenas células. (A) Adenocarcinoma. (B) Carcinoma de células escamosas. (C) Carcinoma de grandes células. Coloração Hematoxilina-Eosina. Captura: 20x. Fonte: Elaborada pelo autor.

Os ADCs são o tipo mais comum de câncer de pulmão e representam em torno de 40% dos cânceres de pulmão, 60% dos CPNPC e mais de 70% dos casos ressecados cirurgicamente [54, 57]. Normalmente, os ADCs surgem a partir de pneumócitos tipo II ou de células Clara presentes no epitélio glandular do parênquima pulmonar [58]. Esses tumores geralmente expressam marcadores imuno-histoquímicos como o fator de transcrição da tireoide (TTF-1) e NapsinaA [2, 57]. De acordo com a classificação feita em 2015 pela OMS, os ADCs são ainda subdivididos em: in situ (ou lesão pré-invasiva), minimamente invasivo, ou invasivo; essa classificação baseia-se na extensão da invasividade [54, 59].

Os CCEs ocorrem, normalmente, na porção central do pulmão, ao longo das vias aéreas principais [57]. Esse subtipo histológico é encontrado em 25% a 30% dos casos de câncer de pulmão [2]. Os marcadores comumente utilizados para demonstrar a diferenciação dos CCEs são: p40, CK5, CK6 e desmogleina-3 [60]. Os CCEs já foram a histologia mais comum, tendo sua incidência reduzida de maneira considerável, isso se deve a redução das taxas de tabagismo em países de alta renda, bem como em modificações na composição do cigarro [61].

Por fim, o CGC representa de 5% a 10% dos casos de câncer de pulmão, são tumores tipicamente menos diferenciados e compostos por grandes células, com grandes núcleos e citoplasma abundante. Sua incidência também está diminuindo, mas, neste caso, é resultado do uso de novas técnicas de imunofenotipagem, que permitem uma melhor caracterização dos ADC e CCE menos diferenciados [2].

2.1.4 Estadiamento TNM do câncer de pulmão

O atendimento aos pacientes com câncer de pulmão é, atualmente, baseado em seu estadiamento. E, desta forma, o correto estadiamento do tumor é de extrema importância, visto que, além de classificar a extensão da doença, também direciona decisões clínicas e o prognóstico dos pacientes [62].

O padrão internacionalmente aceito atualmente é a classificação tumor-nódulo-metástase (TNM) proposta pela União Internacional para o Controle do Câncer (do inglês, Union for International Cancer Control). A sistema TNM é definido por três categorias: o tamanho e/ou extensão do tumor primário (categoria T); o envolvimento de linfonodos regionais (categoria N) e a presença, ou não, de metástases à distância (categoria M) [62].

Esse sistema de classificação é constantemente revisado. Para câncer de pulmão, essa classificação se encontra em sua oitava edição, publicada em 2016, substituindo versões anteriores [63].

2.1.5 Diagnóstico, Triagem e Tratamento

A evolução clínica do câncer de pulmão está intimamente relacionada ao estágio no momento do diagnóstico, pois ele determinará as opções de tratamento a serem adotadas e o prognóstico do paciente. No câncer de pulmão, muitas vezes, o diagnóstico não é feito até que a doença esteja em estágio avançado [23, 64].

Dessa forma, há grande importância quanto ao processo de triagem para que se possa fazer detecção precoce da doença, buscando, assim, uma melhora no prognóstico do paciente.

Técnicas de triagem utilizando radiografias de tórax ou análise citológica de escarro ainda não forneceram benefícios prognósticos em ensaios clínicos [65, 66]. Porém, o uso de tomografia computadorizada tem se mostrado bastante eficiente quando utilizada como ferramenta de triagem anual em pacientes de alto risco, reduzindo as taxas de morte por câncer de pulmão [67, 68]. Todavia, embora os resultados de rastreamento tenham se mostrado eficientes, ainda há muitos desafios para sua adoção, como custos, as taxas de resultados falso-positivos, entre outros [2].

As opções de tratamento para o câncer de pulmão variam de acordo com a classificação histológica e o seu estágio. No caso do CPNPC, pacientes em estágio patológico I ou II são submetidos a ressecção cirúrgica completa, caso não haja contraindicações. Tratamentos como radioterapia, quimioterapia, ablação térmica percutânea, entre outros, são aplicados como tratamento adjuvante em pacientes operados, ou então utilizados em pacientes que não podem ser submetidos a cirurgia ou em estágio avançado da doença [2].

2.2 Microambiente Tumoral

Logo que o tumor se estabelece, ele também desenvolve uma relação íntima com o microambiente em que está inserido, e, de forma dinâmica e mútua, células cancerígenas e componentes do microambiente tumoral (MAT) estabelecem condições para sobrevivência tumoral, invasão local e disseminação metastática [69]. Em outras palavras, uma interação cooperativa entre as células e seu microambiente são essenciais para a homeostase do tecido normal e, também, para o desenvolvimento e a progressão do tumor [70-72].

O MAT não conta apenas com a combinação de células tumorais e matriz extracelular, mas também células-tronco cancerígenas, células de vasos sanguíneos adjacentes, fibroblastos, células imunes, moléculas sinalizadoras, entre outras [73, 74]. A combinação destes componentes origina interações complexas e utilizam processos semelhantes aos utilizados pelos órgãos durante o desenvolvimento [75]. Estudos prévios demonstraram o efeito direto nas células tronco cancerígenas por moléculas como metaloproteinase 3 de matriz (MMP-3) e ligantes Wnt [76, 77].

O MAT é constituído de células de carcinoma e sarcoma, além de componentes hematopoiéticos, mesenquimais e componentes não celulares, toda essas estruturas contribuem para a heterogeneidade do tumor [78, 79]. O que o torna um meio complexo e dinâmico com resposta contínua para a progressão tumoral [80]. Além disso, o tumor influencia o MAT através de sinais parácrinos extracelulares para indução da tolerância imune e suporte da angiogênese tumoral [79]. Outro componente importante deste sistema são as células tronco cancerígenas, que têm sido relacionadas a processos de sinalização mediados pelo MAT, com modulação imune e formação de nichos inflamatórios [81-83], podendo atuar também na resistência terapêutica [84].

Todavia, sabe-se que a composição real do MAT e a forma como ele se modula para o desenvolvimento e a progressão do câncer pode variar entre pacientes e tipos de câncer [83]. Uma compreensão refinada do MAT, de seus papéis e moléculas associadas, são de grande importância para a compreensão do comportamento biológico dos diferentes tumores. Esses dados são de grande interesse em estudos prospectivos, principalmente aos ligados à terapêutica baseadas no MAT para o gerenciamento e controle do câncer, seja atuando em processos pró tumorigênicos ou em moléculas do MAT, como alvos terapêuticos [85].

2.3 Matriz Extracelular no Câncer

A matriz extracelular (MEC) é um componente essencial nos tecidos e órgãos, sendo fundamental para a existência de organismos multicelulares. Ela regula e ajusta processos celulares em todo o organismo, desde o início do desenvolvimento até a morte, ou seja, a MEC é fundamental durante o desenvolvimento do organismo, o reparo tecidual e a homeostase de tecidos e órgãos [86]. A matriz, além de fornecer às células suporte e proteção arquitetônica e mecânica, também promove uma série de sinais que regulam e ajustam processos celulares, como proliferação, sobrevivência celular, determinação do destino celular, migração e invasão celular e morfogênese tecidual [87].

A MEC é composta por diversas macromoléculas, como colágenos, glicoproteínas, proteínas elásticas e microfibrilares, proteoglicanos, enzimas, entre outras, que, conjuntamente, mantêm as atividades e funções biomecânicas do corpo [88, 89]. Além disso, estes componentes influenciam na adesão, proliferação e comunicação celular. A maioria das proteínas da MEC são classificadas em dois grupos principais: proteínas fibrosas (colágenos, fibronectina, elastina e laminina) e glicosaminoglicanos (ácido hialurônico, sulfato de condroitina, sulfato de queratana e heparan sulfato), essas proteínas estruturam-se formando um arcabouço para os tecidos [90].

No câncer, a MEC torna-se desregulada, apresentando alterações bioquímicas, biomecânicas, arquitetônicas e topográficas, que desempenhando tanto funções pró tumorigênicas quanto anti tumorigênicas, afetando, principalmente a migração celular [86, 91].

Em tumores sólidos há grande quantidade de MEC, podendo representar até 60% da massa tumoral. Neste caso, a grande deposição de colágeno e fibroblastos resulta em desmoplasia. Na desmoplasia, o tecido fibrótico depositado dentro e ao redor dos tumores é formado em resposta à lesão tecidual com deposição excessiva e/ou anormal da MEC, alterando sua estrutura. Essa perda de organização da matriz e da homeostase é, muitas vezes, considerada uma marca registrada dos tumores sólidos. Além disso, esse processo, está intensamente associado ao mau prognóstico dos pacientes [69, 86]. Sabe-se também que, o aumento da deposição de colágenos, proteoglicanos, proteínas e glicoproteínas na matriz prejudicam a eficácia de compostos como quimioterápicos [85].

A MEC pode ser alterada de diversas maneiras durante a progressão tumoral. Ocorrem não apenas alterações bioquímicas como também mudanças biofísicas (densidade molecular, rigidez, tensão, etc.). Na **Figura 6** é possível observar as diversas alterações que ocorrem na matriz no câncer, todas ocorrendo de maneira ordenada e dinâmica. As modificações bioquímicas e de composição matricial são predominantemente impulsionadas por células estromais não malignas (**Figura 6a**) [92], que criam espaços únicos dentro do tumor e levam a alterações no sequestro local de fatores de crescimento, citocinas e de outras moléculas inorgânicas (**Figura 6b**). Essas mudanças alteram também a hidratação da MEC (**Figura 6c**), devido à concentração de glicosaminoglicanos (GAGs), como sulfato de condroitina (SC) e ácido hialurônico (AH), afetando a difusão e perfusão de moléculas no tumor. Podem ocorrer ainda modificações pós-traducionais (**Figura 6d**), que propiciam mudanças nas propriedades biomecânicas da matriz (**Figura 6e**), ativando vias de sinalização em todas as células presentes no microambiente. Além disso, alterações na matriz alteram sua densidade (**Figura 6f**), alterando sua estrutura, organização e porosidade (**Figura 6g**), que, em conjunto com a degradação e a renovação irregular dessa matriz (**Figura 6h**), alteram o número e o espaçamento dos ligantes de adesão e de interação celular (**Figura 6i**) [86].

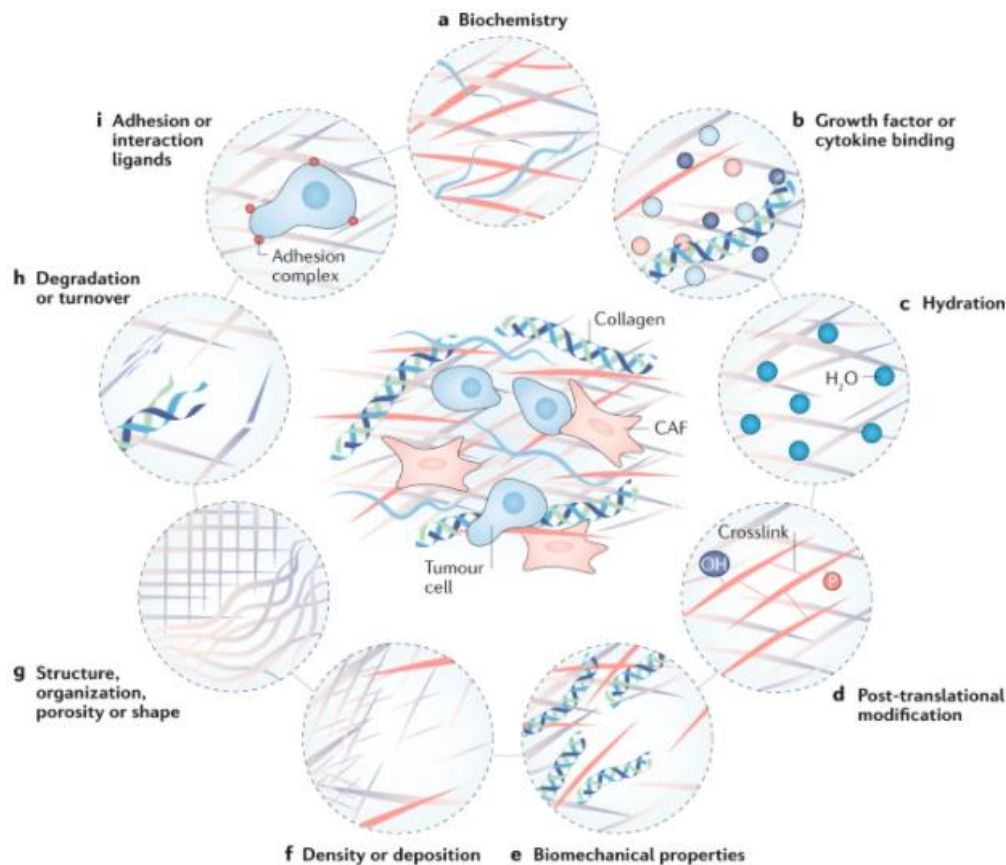


Figura 6. Alterações da matriz extracelular no câncer. FONTE: Cox, 2021 [86].

Vale ressaltar que cada matriz é única, tendo suas propriedades adequadas local e globalmente, por parâmetros biofísicos e bioquímicos [93]. Essas referências permitem que a matriz estabeleça sua função como andaime e suporte mecânico, além de apresentar ligantes para fixação e interação celular [13, 94].

2.3.1 Principais componentes da matriz

2.3.1.1 Colágenos

Colágenos são elementos estruturais fundamentais da matriz e, geralmente, também são as proteínas mais abundantes ali presentes. Atualmente estão descritos 28 tipos de colágenos [95], todos apresentam três cadeias polipeptídicas (cadeias α) com repetições glicina-XY, onde, normalmente, X é prolina e Y, 4-hidroxiprolina [96], esses componentes são responsáveis por determinar a flexibilidade (glicina) e/ou rigidez (prolina) conformacional [97]. As variações na estrutura dessas cadeias são as responsáveis pela diversidade dos tipos de colágeno quanto à plasticidade, flexibilidade e padrão de reconhecimento [97]. A importância associada a essas proteínas está no fato de que elas oferecem resistência mecânica e sítios bioativos para adesão celular, além de regularem o processo de migração celular [98].

Os diferentes tipos de colágenos podem ser classificados em quatro diferentes famílias de acordo com seus conjuntos supramoleculares. São elas: colágenos formadores de fibrilas (I, II, III, V, XI, XXVI, XXVII); colágenos associados a fibrilas com hélices triplas interrompidas (IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XXIV), que se ligam à superfície das fibrilas de colágeno em vez de formar fibrilas por si mesmos; colágenos formadores de rede (IV, VIII, X); e colágenos ancorados na membrana (XIII, XVII, XXIII, XXV) [95]. Entre eles, os colágenos tipo I, tipo III e tipo V são produzidos principalmente por fibroblastos, enquanto o colágeno tipo IV é majoritariamente expresso por células endoteliais e epiteliais. Em algumas condições, células tumorais e macrófagos associados a tumores também podem produzir moléculas de colágeno [99, 100].

Na desmoplasia tumoral, o principal componente é o colágeno do tipo I, estando associado a sobrevivência celular tumoral e a metástase em muitos tumores [101]. No tumor, o que se observa, na maioria das vezes, é uma mudança na orientação das fibras de colágeno [102-104]. Além disso, no câncer, essas proteínas também sofrem mudanças na quantidade e nos tipos de modificações pós-traducionais a quais serão submetidas, influenciando a mudança comportamental das células do MAT [90]. Porém, nem todos os tipos de colágeno apresentam características pró tumorigênicas, e a mistura de todos eles controlam a complacência, rigidez, porosidade e propriedades viscoelásticas e bioquímicas da matriz na homeostase tecidual e no câncer [86].

2.3.1.2 Glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanas

Glicoproteínas (GP) e proteoglicanos (PG) são formadas por cadeias repetidas de carboidratos ligadas a um núcleo proteico. Enquanto as GP apresentam cadeia oligossacarídicas curtas e ramificadas ligadas covalentemente a uma cadeia polipeptídica central, as PG são proteínas glicosiladas formadas por uma proteína central a qual se ligam várias cadeias de glicosaminoglicanas (GAGs), ligadas covalentemente e carregadas negativamente. Além da diferença estrutural, as PG também diferem de outras GP quanto a função e localização [86].

As GAGs são polissacarídeos lineares longos e com cadeias não ramificadas, são constituídas por unidades repetidas de dissacarídeos. Existem duas classes principais de GAGs: as não sulfatadas, como o ácido hialurônico; e as sulfatadas, como sulfato de condroitina, sulfato de dermatan, sulfato de queratano, heparan sulfato e heparina.

GP e PG preenchem o espaço intersticial e reduzem o estresse físico na matriz devido a sua alta viscosidade e capacidade de resistir a forças compressivas, elas também regulam processos celulares de adesão, proliferação, motilidade e diferenciação [105], além de criarem uma rede organizada e coesa de moléculas matriciais. Em tumores sólidos, essas GP e PG podem apresentar funções promotoras ou supressoras [106].

GP também atuam como co-receptores de superfície celular, modulando a sinalização celular a jusante. No câncer, a modulação dessas sinalizações pode envolver processos como sobrevivência celular, quimiorresistência, invasão e modulação da transição epitélio-mesênquima [107, 108]. Outro ponto importante pelas quais essas moléculas estão responsáveis é a hidratação do tecido, sendo função principal das GAGs, como sulfato de condroitina e ácido hialurônico [109].

As GAGs também estão envolvidas em uma variedade de processos biológicos, incluindo interações célula-matriz e ativando quimiocinas, enzimas e fatores de crescimento [110]. Esses processos são mediados pela capacidade das GAGs para interagirem e influenciam o comportamento de muitas proteínas, incluindo proteases, moléculas de adesão e citocinas [111].

Além disso, sugere-se que a função dos PGs/GAGs no câncer seja parcialmente dependente da concentração e distribuição espacial dessas moléculas, além da duração temporal do evento. Dessa forma, estudos têm relacionado o metabolismo desordenado de PGs/GAGs com a malignidade do tumor, onde, por exemplo, o processo de síntese do sulfato de condroitina foi mais ativo em vários tipos de câncer em comparação com tecidos normais [112].

Atualmente, sugere-se que a atividade pró tumorigênica ou anti tumorigênica das GP, PG e GAGs sejam dependentes do tecido, do contexto e do tipo de tumor, sendo direcionadas por misturas de moléculas matriciais presentes em determinados momentos e em sítios específicos [86, 113, 114].

2.4 Transição epitélio-mesenquimal

O mecanismo de transição epitélio-mesenquimal (TEM) compreende diversas mudanças dinâmicas na alteração fenotípica de células epiteliais para mesenquimais, que resultam em modificações funcionais quanto à migração e invasão celular. Esse processo ocorre em diversas condições fisiológicas e patológicas, associado a diversos sinais indutores, reguladores, transcrpcionais e efetores [11].

A TEM inicia-se em resposta a sinais recebidos do microambiente celular. As células epiteliais apresentam junções célula-célula estáveis, polaridade apical-basal e interações com a membrana basal, porém, quando são iniciadas em resposta a TEM, ocorrem modificações na expressão gênica e nos mecanismos de regulação pós-traducionais que reprimem essas características e resultam na aquisição de características mesenquimais. Nesse caso, a célula passa a apresentar morfologia e citoarquitetura semelhante à dos fibroblastos, além de uma maior capacidade migratória e invasiva [11].

As células epiteliais, normalmente, apresentam polaridade apical-basal, ligação por junções apertadas e junções aderentes, sendo, essa última formada por moléculas de E-caderina. Essas características são fundamentais para a integridade estrutural do epitélio. Após a ativação da TEM, a expressão de E-caderina é reprimida, levando a perda da morfologia típica das células epiteliais, passando a apresentar então morfologia mesenquimal, normalmente associada a expressão de N-caderina, vimentina e fibronectina (**Figura 7**) [12, 115].

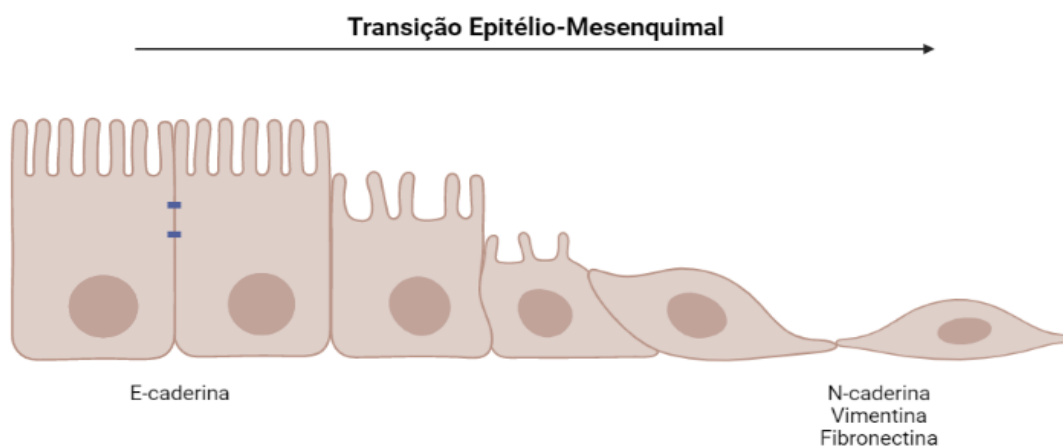


Figura 7. Visão esquemática do processo de transição epitélio-mesenquimal. Fonte: Elaborada pelo autor, criado utilizando o BioRender¹

A TEM é um processo guiado por diversos fatores de transcrição (como, por exemplo, Snail, Twist, Zeb e outros) que induzem o processo, atuando em diferentes combinações que viabilizam a expressão de genes que promovem o estado celular mesenquimal e reprimem genes que mantêm o estado celular epitelial [115-118]. Uma série de estudos tem indicado que a TEM funciona como um processo epigenético não dependente de alterações na sequência do DNA, tanto em células normais, como em neoplásicas [119]. Desta maneira, não é possível determinar a expressão desse processo e seus efeitos biológicos pelo sequenciamento genético das células tumorais.

¹ <https://biorender.com/>

No câncer, a TEM é guiada pelos fatores de transcrição e acaba por conferir características ao tumor que são essenciais para sua progressão maligna, incluindo propriedades de iniciação tumoral, motilidade, capacidade de disseminação e resistência adquirida a quimioterápicos [120-124]. Além disso, algumas proteínas associadas ao processo de TEM vêm sendo utilizadas na rotina de patologistas como marcadores, pois mostraram-se úteis para identificação da malignidade do tumor de alto grau [125].

No microambiente tumoral, o estroma apresenta aspectos bastante semelhantes aos do estroma de tecidos normais durante a inflamação e cicatrização de feridas. Componentes como macrófagos e fibroblastos presentes nesse ambiente são responsáveis por ativar sinalizações que induzem a TEM em vários tipos de cânceres [72, 126]. De maneira contrária, as células tumorais também conseguem expressar marcadores associados à TEM que modulam as atividades dos componentes presentes no estroma do microambiente [127].

O processo de TEM pode ser induzido através de diversas vias de sinalização intracelulares que são ativadas quando as células epiteliais encontram sinais específicos liberados por células presentes no estroma tumoral [12]. Dentre essas diversas vias podemos citar algumas, como: a do fator de crescimento transformador- β (TGF β); Wnt; NOTCH; PI3K-AKT; ERK-MAPK; p38 MAPK; e JNK. Essas vias atuam sobre o crescimento, proliferação celular, migração e motilidade celular, além da indução da TEM [12].

No presente trabalho, destacamos a via de sinalização Wnt, tanto a via dependente de β -catenina, como a independente. A via dependente de β -catenina vem sendo considerada um ativador chave do processo TEM [128], estando descrito que ela promove a progressão maligna tumoral através da regulação TEM e de células tronco cancerígenas em vários tipos de câncer [129-133]. No caso da sinalização Wnt independente de β -catenina, foi reportado que ela induzia a TEM através da proteína quinase C [134]. Além da influência de WNT5A para indução de vimentina e repressão de E-caderina em melanoma [134].

2.5 Via de Sinalização Wnt

2.5.1 Visão geral

A família das glicoproteínas Wingless/integrasse (WNT), quando secretadas, interagem com diversos receptores transmembrana, isso faz com que elas estejam envolvidas em variados aspectos do desenvolvimento, fisiologia e fisiopatologia nos mamíferos. Assim, essas glicoproteínas acabam então sendo críticas para o desenvolvimento e função de diferentes órgãos, incluindo o sistema respiratório [135]. Na espécie humana 19 genes são responsáveis por codificar as moléculas de WNTs que atuarão em diversos receptores e estimularão diversas vias de transdução de sinal intracelular [136].

A sinalização Wnt envolve diversas vias de comunicação célula-célula que ocorrem quando uma célula recebe uma molécula sinal WNT produzida por outra célula e, em resposta, ativa uma série de eventos bioquímicos intracelulares [137]. Essa via de sinalização é evolutivamente conservada no reino animal, sendo fundamental para direcionar a proliferação, polaridade e destino celular durante o desenvolvimento embrionário e a homeostase tecidual no indivíduo adulto [138, 139]. Qualquer irregularidade no correto funcionamento desta via resulta em condições patológicas, como defeitos congênitos, câncer e outras doenças [140].

As cascatas de sinalização desencadeadas por essas moléculas são separadas em dois tipos: sinalização Wnt canônica, dependente de β -catenina; e não canônica, independente de β -catenina, essa classe é subdividida, sendo as classicamente abordadas a via Wnt/PCP (Polaridade Celular Planar) e a vias Wnt/Ca⁺. A literatura atual tem pontuado a nomenclatura de canônica e não canônica como desatualizada, desta forma, adiante iremos nos referir às vias Wnt como dependentes ou independentes de β -catenina.

2.5.1.1 Sinalização Wnt dependente de β -catenina

A via de sinalização Wnt dependente de β -catenina é ativada através da interação de Wnt com o receptor transmembrana Frizzled (Fz) e LRP5/LRP6 (LRPs são proteínas relacionadas ao receptor de lipoproteína de baixa densidade) [136]. Na ausência de Wnt (estado inativo de sinalização; **Figura 8** - esquerda) ocorre a fosforilação da β -catenina pelo complexo de destruição, formada por AXIN, APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), GSK3 β (glicogênio sintase quinase 3 beta) e CK1 α (caseína quinase 1 alfa), levando a ubiquitinação por β -TrCP [141] e o direcionamento para degradação proteossômica [140]. A ausência de β -catenina no núcleo tem como resultado a ligação do complexo repressor formado por TCF (fator de células T)/LEF (fator de intensificador linfóide) e TLE/Grouche ao gene alvo, reprimindo sua atividade.

Porém, se há ligação do Wnt (**Figura 8** - direita) ao receptor Fz e ao co-receptor LRP, os receptores LRP são fosforilados por CK1 α e GSK3 β , com recrutamento de proteínas Disheveled (Dvl) para a membrana plasmática [142], que inativam o complexo de destruição de β -catenina. Dessa forma, ocorre uma estabilização e acúmulo de β -catenina citoplasmático, que se transloca para o núcleo, onde interage com TCF/LEF, recruta co-ativadores modificadores de histona, como CBP/p300, BRG1, BCL9 e Pygo [143], transcrevendo os genes alvo [18, 144]. Esta sinalização foi associada à regulação da diferenciação e proliferação celular [144, 145].

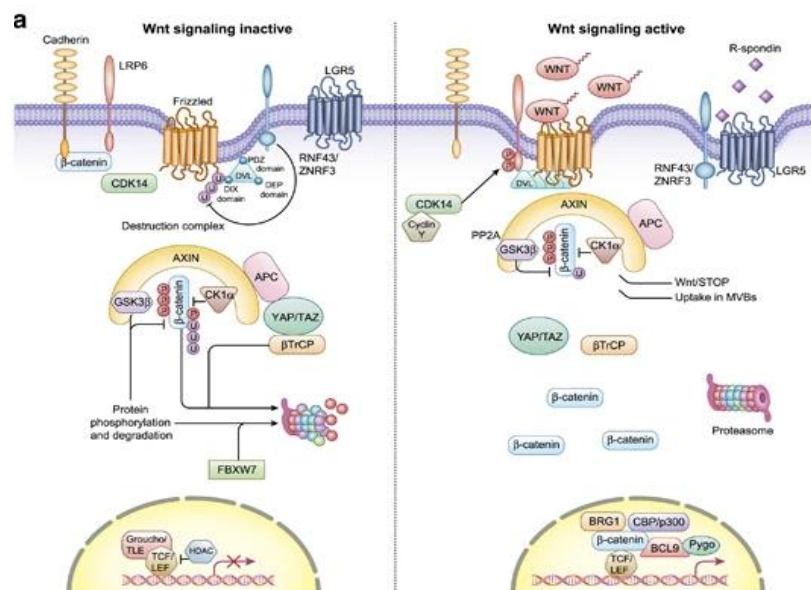


Figura 8. Via Wnt dependente de β -catenina. Fonte: Zhan et al., 2017 [144].

2.5.1.2 Sinalização Wnt independente de β -catenina

A sinalização Wnt independente de β -catenina (**Figura 9**) também é iniciada através da ligação de uma proteína WNT aos um dos receptores Fz presentes na membrana celular, no entanto, os Fz e outros receptores WNT, como ROR2 e RYK, atuam independentemente de LRP5/6 [135]. Na via de sinalização Wnt/PCP ocorre através da ligação de Wnt ao complexo receptor ROR-Fz que recruta e ativa Dvl [146]. Quando ativado, o Dvl desencadeia a ativação da GTPase Rho através da desinibição de DAAM1 (ativador de morfogênese associado a Disheveled 1) citoplasmática [147]. As GTPase Rac1 e Rho juntos desencadeiam ROCK (Rho quinase) e JNK (c-Jun N-terminal quinase), levando a rearranjos no citoesqueleto e/ou respostas transcricionais, promovendo a migração celular polarizada [18, 144]. A via Wnt/PCP foi descrita na regulação da polaridade celular durante a morfogênese [18].

Já a via Wnt/Ca⁺ ativa a PLC (fosfolipases C), que produz DAG (diacilglicerol) e IP₃ (inositol 1,4,5-trifosfato), levando a fluxos intracelulares de cálcio que ativam PKC (proteína quinase C), calcineurina e quinases moduladas por cálcio (CAMKII - proteína cálcio/calmodulina cinase tipo II), isto ativa o regulador transcricional NFAT (fator nuclear de células T ativadas). Consequentemente há resposta transcricional e/ou citoesquelética dependente de cálcio, importante no processo de migração celular [18, 135, 144]. Essa via foi associada a patologias como câncer, inflamação e doenças neurodegenerativas [148].

Atualmente são descritas outras vias de sinalização Wnt independentes de β -catenina, são elas: WNT/YAP/TAZ alternativa e a sinalização WNT/STOP [149-151].

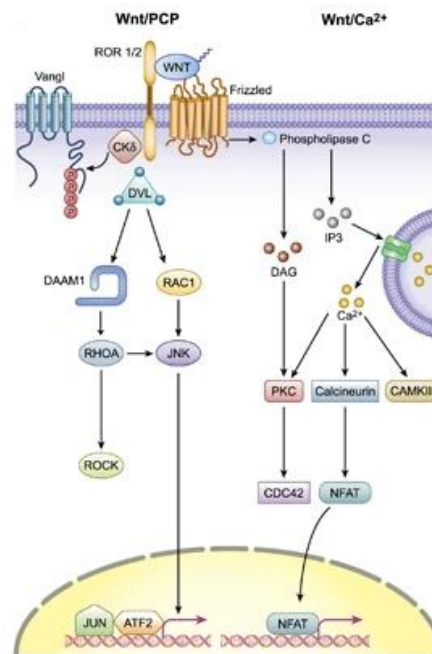


Figura 9. Via Wnt independente de β -catenina. Fonte: Zhan et al., 2017 [144].

2.5.2 Wnt e o câncer de pulmão

A via de sinalização Wnt é bastante importante em vários aspectos do desenvolvimento, da fisiologia e da fisiopatologia humana. Dessa forma, qualquer irregularidade em seu funcionamento pode resultar em condições patológicas, como defeitos congênitos, câncer e outras doenças.

No pulmão, a sinalização Wnt é essencial na organogênese pulmonar, onde controla a proliferação, a diferenciação, a polaridade e a especificação celular. Durante esse processo, vários WNTs e receptores são expressos em diferentes estágios de desenvolvimento do pulmão embrionário [152, 153].

Contudo, além de atuar no desenvolvimento pulmonar, a sinalização Wnt, quando aberrante, já foi descrita por contribuir em patologias pulmonares, como asma, fibrose pulmonar idiopática, doença pulmonar obstrutiva crônica e câncer de pulmão [135, 154].

No câncer em geral são muito comuns as alterações e as mutações nos componentes da via de sinalização Wnt [144, 155]. No câncer de pulmão, as mutações de β -catenina não são muito frequentes, como ocorrem em outros tipos de câncer, como o de cólon [156]. Ademais, ainda é controverso o papel potencial da β -catenina no câncer de pulmão, especialmente no CPNPC. Alguns estudos demonstram que a β -catenina tem sua expressão aumentada no CPNPC e sua inibição atenuaria a proliferação celular, e com isso, poderia funcionar como estratégia para o tratamento do câncer de pulmão [157]. Todavia, estudos clínicos reportam que a expressão de β -catenina associa-se a um melhor prognóstico para o paciente, através da interação com E-caderina, limitando a possibilidade de metástase [158]. Apresentam-se ainda, estudos que demonstram um papel importante da via de sinalização Wnt independente da β -catenina no câncer de pulmão [159]. De maneira geral, tem sido abordado que, em câncer de pulmão, as alterações na sinalização Wnt/ β -catenina podem contribuir para o início do tumor, enquanto a via independente de β -catenina possa contribuir com a progressão do tumor [160].

Cabe ressaltar que, embora ainda haja lacunas quanto ao impacto da sinalização Wnt no câncer de pulmão, há grande interesse em seu estudo por apresentar potenciais alvos terapêuticos.

2.5.3 Sinalização Wnt na metástase tumoral

A metástase tumoral é comum em estágios avançados da doença, e é um dos principais desafios terapêuticos. Durante a terapia, uma das principais mudanças adaptativas dos tumores está associada à transição epitélio-mesenquimal [161]. São diversos os fatores de transcrição envolvidos nesse processo, e estudos recentes têm apresentado resultados que associam moléculas da via de sinalização Wnt a esses fatores. Entre eles é possível citar SNAI2, cuja concentração citoplasmática é mantida sob controle através da fosforilação de GSK3 β e subsequente ubiquitinação por β -TrCP. No câncer de mama, a ativação da via Wnt dependente de β -catenina estabiliza SNAI2 através da inibição de GSK3 β , iniciando o processo de transição epitélio-mesenquimal [162]. Outro fator é o ASPP2, que se liga a um complexo β -catenina/E-caderina através do qual inibe a fosforilação N-terminal de β -catenina, estabilizando-a. No câncer hepatocelular e de mama, quando ASPP2 tem sua expressão reduzida, inicia-se o processo de transição epitélio-mesenquimal, tendo sido também associado a baixa sobrevida dos pacientes [163].

Além disso, evidências têm demonstrado que exossomos (pequenas vesículas secretadas pelas células para comunicação intercelular) apresentam potencial através dos quais os tumores iniciam seu ninho metastático [164]. Em estudos prévios, viu-se que esses exossomos apresentam potencial para o transporte de ligantes ativos de Wnt [165] ou para incorporar β -catenina [166].

Em suma, estudos recentes têm trazido novas informações quanto ao envolvimento das vias de sinalização Wnt, tanto dependente de β -catenina quanto independente, de forma a apoiarem o processo de metástase tumoral de maneira altamente específica no tecido [144].

2.6 A proteína SPARC

A proteína SPARC (proteína secretada, acídica e rica em cisteína) vem sendo reportada por estar envolvida em diversos e importantes processos biológicos, como: interações célula-célula e célula-matriz, remodelamento da MEC, mineralização óssea, proliferação, migração, apoptose, adesão, diferenciação, cicatrização de feridas, e no processo de TEM [167-176]. Além de todos esses diversos processos, a atividade dessa glicoproteína também tem se mostrado responsável por modular a atividade de ILK (quinase ligada à integrina) e regular a deposição e maturação do colágeno durante a remodelação da MEC [170, 174-176]. Outros estudos reportaram que SPARC é responsável por aumentar a atividade e produção das metaloproteinases da matriz [177], bem como regular a atividade de fatores de crescimento, como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos 2) [172, 177,178]. Podendo-se dizer então que essa proteína é responsável pela manutenção de uma grande diversidade de células e tecidos [167, 171-174, 179, 180].

Além dessa grande gama de funções, a proteína SPARC também tem sido citada como fator envolvido no crescimento, na invasão e na metástase tumoral, vista a importância do microambiente, da MEC e da TEM para o câncer [168, 181]. Todavia, o papel do SPARC na tumorigênese e na progressão tumoral ainda são contraditórios, essa proteína é normalmente expressa por células estromais [182] e, pode apresentar tanto função como supressor tumoral, como função pró-oncogênica [183-185]. Em suma, diversos estudos relatam que tanto a expressão de SPARC, quanto sua ação sobre o câncer seja dependente do contexto e de outros aspectos, como a atividade de outras proteínas, o tipo tumoral e seu estágio, bem como o MAT em que está inserido [181, 185-187].

No CPNPC, estudos reportaram que a expressão de SPARC é baixa nas células tumorais, devido à metilação do DNA, sendo alta nos fibroblastos estromais, o que configura uma condição favorável para o crescimento e a metástase tumoral [188-190]. Em alguns estudos de CPNPC, o aumento dos níveis de SPARC se correlacionaram a uma pior sobrevida global e menor tempo livre de doença [188, 191]. No CPPC, os níveis de SPARC são mais altos no tecido tumoral que no tecido presente no MAT, e essa expressão elevada foi associada a uma pior sobrevida global dos pacientes [192].

Considerando a diversidade no comportamento da glicoproteína SPARC sobre o câncer, seus resultados são bastante promissores para sua utilização como possível biomarcador, dada sua relação com metástase e desfecho clínico [186, 187, 193, 194].

3 OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo explorar o valor prognóstico da transição epitélio-mesenquimal, da sinalização Wnt e da expressão de proteínas da matriz extracelular em pacientes com carcinoma pulmonar de não pequenas células em estádios clínicos I-III.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coorte de estudo

Realizamos um estudo retrospectivo utilizando amostras de pacientes com CPNPC da Unidade de Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas do Instituto do Coração (InCor), do Instituto do Câncer de São Paulo (ICESP) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, operados entre 2004 e 2012. Para a inclusão no estudo foram aceitas amostras com diagnóstico histológico de CPNPC estágio I, II ou IIIA, com amostras de tecido adequadas obtidas de cirurgia torácica. Foram excluídas do estudo amostras de procedimento cirúrgico paliativo ou peças fixadas inadequadamente em parafina.

Os dados dos pacientes foram coletados por meio de dados eletrônicos presentes no REDcap hospedado no Instituto do Câncer de São Paulo (ICESP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; foram coletadas informações como: sexo, idade, histórico de tabagismo, histologia e estágio da doença - de acordo com a 8ª edição da Classificação TNM de Tumores Malignos da União Internacional para o Controle do Câncer [63] –, bem como tratamentos sistêmicos ou loco-regionais subsequentes, eventual recorrência e óbito. Todos os pacientes foram acompanhados por meio de consultas mensais com o oncologista e submetidos a tomografias de crânio, tórax e abdome a cada seis meses nos primeiros cinco anos e anualmente a partir de então. A sobrevida global (SG) serviu como desfecho primário e foi definida como o primeiro contato até a morte por câncer de pulmão recorrente.

O presente estudo foi realizado de acordo com as normas de Boas Práticas Clínicas e os princípios da Declaração de Helsinki. Os Comitês de Ética Interna de todas as instituições participantes aprovaram este protocolo de estudo sob o número 150443/2019.

4.2 Construção das lâminas de *Tissue Microarray* (TMA)

As lâminas de TMA foram construídas com 120 amostras de tecido tumoral primário coletadas consecutivamente utilizando três núcleos de tecido de 1,5 mm obtidos das porções centrais, intermediária e periférica das áreas tumorais mais representativas. Essas áreas foram selecionadas e marcadas por um patologista experiente em amostras corada por hematoxilina-eosina (HE). Tecidos hepáticos e renais normais foram utilizados para o controle e a orientação das lâminas. Os tumores foram classificados histologicamente de acordo com as diretrizes da Organização Mundial da Saúde de 2015 sobre a classificação do câncer de pulmão [54].

4.3 Avaliação imunohistoquímica e de imunofluorescência

Para realizar os ensaios de imuno-histoquímica (IHC) e imunofluorescência (IF), primeiro testamos as imunocolorações em tecidos inteiros e seções de TMA para garantir a uniformidade. Foram realizados controles negativos para verificar a especificidade da coloração utilizando isotipos para controle de anticorpos. Os cortes de TMA (N=120) foram corados com imunoperoxidase e anticorpos contra: E-caderina (1:100; Boster Biological), β -catenina (1:100; Santa Cruz), heparan sulfato (1:500; Santa Cruz), sulfato de condroitina (1:100, Santa Cruz), WNT1 (1:100, Santa Cruz), WNT3A (1:100, Abnova), WNT5A (1:400, Abnova), WNT5B (1:50, Santa Cruz) e SPARC (1:400, BIOSS).

Para realizar o ensaio de imunofluorescência, desparafinamos as seções de TMA (N=120) em xilol, hidratamos em etanol graduado e as expusemos a uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% e ácido fórmico para inibir a atividade da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão citrato em pH 9,0 e aquecida em panela de pressão Pascal (125°C por 1 minuto). Locais inespecíficos foram bloqueados com albumina de soro bovino a 5% em tampão fosfato salino (PBS) por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpos contra: E-caderina (1:100; Boster Biological), β -catenina (1:100; Santa Cruz), heparan sulfato (1:500; Santa Cruz), sulfato de condroitina (1:100, Santa Cruz), anti-colágeno humano tipo I (1:700; Rockland Inc.), anti-colágeno humano tipo III (1:200; Rockland Inc.), anti-colágeno humano tipo IV (1: 100; Dako) e anti-colágeno humano tipo V (1:1000; Rockland Inc.). Essas seções de TMA foram então lavadas em PBS com Tween 20 a 0,05% e incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente com IgG de cabra anti-camundongo conjugada com Alexa 488 (1:200, Invitrogen, Eugene, OR, EUA) e conjugada com Alexa 488 IgG anti-coelho de cabra (1:200, Invitrogen, Eugene, OR, EUA). Para controles negativos e de autofluorescência, os cortes foram incubados com PBS e soro normal de coelho ou camundongo ao invés do anticorpo específico. Os núcleos foram contrastados com 0,4 mM/mL de 4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Dicloridrato (DAPI; Molecular Probes™, Invitrogen, Eugene, OR, EUA) por 15 minutos em temperatura ambiente. Finalmente, os espécimes foram montados em glicerol tamponado e suas imagens foram visualizadas em um microscópio de imunofluorescência (OLYMPUS BX51) e escaneadas digitalmente com aumento de 20× usando um scanner Panoramic 250 (3DHistech, Budapeste, Hungria).

4.4 Quantificação por análise de imagem

Para medir a expressão IHC de cada marcador diferente e quantificar a expressão da proteína, as lâminas de TMA foram escaneadas digitalmente com ampliação de 40x usando um scanner Panoramic 250 (3DHitech, Budapeste, Hungria). As seções de TMA coradas foram analisadas usando QuPath (versão 0.2.3; Centro de Pesquisa do Câncer e Biologia Celular, Universidade de Edimburgo, Edimburgo, Escócia), uma plataforma de software de análise de imagem de código aberto [195]. Durante o processo de pontuação, avaliamos todos os núcleos para excluir manualmente quaisquer amostras inválidas (menos de 10% de tumor por núcleo ou artefato).

O QuPath nos permitiu usar um método simples, automatizado e semiassistido para quantificar os TMAs. Primeiro, submetendo cada lâmina de TMA digitalizada a uma série de avaliações automatizadas, como: análise vetorial de coloração; detecção de área total de tecido; separação tumoral de áreas não tumorais; e detecção celular. Em seguida, é preciso estabelecer o limite de positividade para cada um de nossos marcadores por tentativa e erro, e, posteriormente, as células consideradas positivas passam por um processo de validação feito por um patologista especialista antes de aplicá-las ao array completo. Ao final da análise o software QuPath nos fornece o número de células positivas por mm² de tecido e a respectiva porcentagem de células positivas na área analisada. Como os GAGs fazem parte da matriz extracelular – seja na superfície celular ou secretados na forma de PGs, bem como tipos de colágeno – as medidas adotadas para o presente trabalho foram as porcentagens relativas à expressão positiva dentro do tumor ou estroma (os dados obtidos para cada amostra estão apresentados nas **Tabela 10** e **Tabela 11** do **Apêndice A**). Daqui em diante, nos referiremos a baixa expressão sempre que a densidade celular positiva for igual ou inferior à expressão média na coorte e a alta expressão sempre que a densidade celular positiva cair acima desse corte médio.

4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para análise por microscopia eletrônica de transmissão, os tecidos foram fixados em tampão glutaraldeído 2% e pós-fixados em OsO₄ 1%. As amostras foram lavadas durante a noite em solução salina 0,9% contendo uranila e sacarose e finalmente embebidas em Epon. Finalmente, as amostras foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas com um microscópio eletrônico JEOL JEM-1010.

4.6 Análise *in silico*

A plataforma UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>) foi usada para analisar dados no The Cancer Genome Atlas (TCGA) [196, 197] para investigar a expressão relativa de mRNA de nossos genes de interesse (E-caderina, β -catenina, colágenos tipo I, III, IV e V, WNT1, WNT3A, WNT5A, WNT5B e SPARC) em ADC, CCE e amostras normais. O nível de expressão de mRNA dos genes analisados foi normalizado para transcrição por milhão de leituras, e apenas um valor P não superior a 0,01, de acordo com o teste T de Student, foi significativo. A plataforma UALCAN também foi consultada para obter a expressão de nossas proteínas de interesse em ADC presentes no conjunto de dados do Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (CPTAC) [196, 198, 199]. A expressão da proteína foi normalizada de acordo com o Z-score. Este banco de dados não continha valores para as proteínas WNT1, WNT3A e WNT5B. Além disso, o banco de dados não incorporou dados para amostras CCE ou CGC até o momento.

Neste estudo, as características clinicopatológicas dos pacientes, bem como os níveis de expressão de mRNA para os marcadores de interesse, foram obtidos no cBio Cancer Genomics (cBioPortal) [200, 201]. Essas informações foram coletadas do banco de dados TCGA (Pan Cancer Atlas) para ADC e CEC. Para ser consistente com nosso modelo de estudo, selecionamos pacientes nos estádios patológicos I, II ou IIIA. Dados dessa base de dados que não atenderam a esse critério foram excluídos.

O valor da significância prognóstica das moléculas de interesse neste estudo em CPNPC foi avaliado usando o banco de dados Kaplan-Meier plotter [202]. As amostras de pacientes foram divididas em duas coortes, de acordo com a expressão mediana de cada gene (alta vs. baixa expressão). O banco de dados do plotter Kaplan-Meier calculou o valor log-rank P e a taxa de risco (HR) com intervalos de confiança de 95% (CI).

Ressaltamos ainda que a expressão de mRNA de enzimas envolvidas na biossíntese de GAGs precisa ser avaliada de outra forma (por exemplo, a análise de todos os proteoglicanos derivados), uma vez que os GAGs são polissacarídeos sintetizados no Golgi, não sendo facilmente mensuráveis por análises convencionais de mRNA. Assim, as análises acima descritas não foram feitas para os GAGs (HS e CS).

A plataforma STRING foi consultada para revelar as interações funcionais entre as proteínas avaliadas neste presente estudo e para mapear sua rede de interação proteína-proteína (PPI) [203, 204]. Também utilizamos o Metascape [205] para elucidar a função e os processos biológicos envolvidos no enriquecimento dos genes correspondentes às proteínas de nosso interesse.

4.7 Análise estatística

Como nossos dados apresentaram distribuição próxima da normal, utilizamos o teste T, ANOVA e teste do qui-quadrado de Pearson para associar expressão proteica, características clínico-patológicas e histótipos. O modelo de riscos proporcionais de Cox foi então usado para analisar a associação entre a taxa de OS e outras covariâncias. Quaisquer parâmetros considerados clinicamente relevantes ou com $P \leq 0,2$ na análise univariada foram considerados para a análise multivariada. No entanto, os dados do banco de dados TCGA apresentaram uma distribuição não normal, então usamos testes estatísticos não paramétricos. Por fim, utilizamos os softwares estatísticos IBM SPSS (versão 22; Armonk, NY, EUA) e RStudio (versão 2022.02.0, PBC, Boston, MA, USA; <https://www.rstudio.com>) para realizar as análises e plotar os gráficos. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da coorte do estudo NSCLC

A **Tabela 1** mostra as características demográficas e clínico-patológicas dos 120 pacientes incluídos no estudo. Os pacientes tinham idade mediana de 65 anos (variação, 30-80 anos) e foram distribuídos de forma muito semelhante entre homens (66, 55%) e mulheres (54, 45%). 71 pacientes (79,8%) tinham história de tabagismo. Classificamos histologicamente a maioria das amostras como ADC (73, 60,8%), seguido por CCE (40, 33,3%) e CGC (7, 5,8%). 91 pacientes (75,8%) estavam nos estádios T1 e T2, com maior proporção de pacientes (79, 65,8%) no estágio linfonodal N0. Após a ressecção cirúrgica, o tamanho médio do tumor foi de 4,46 cm (variando de 1 a 13 cm) e uma classificação patológica identificou 39 pacientes no estágio I (32,5%), 56 no estágio II (46,7%) e 25 no estágio IIIA (20,8 %). 49 pacientes (42,2%) receberam quimioterapia adjuvante e 32 pacientes (27,6%) receberam radioterapia adjuvante. O seguimento médio foi de 57,3 meses (variação, 0-181) e, durante este período, 31 pacientes (31,3%) tiveram recidiva e 65 pacientes morreram.

Tabela 1. Características demográficas e clinicopatológicas dos pacientes (N=120)

| Características | Número de pacientes (%) |
|--|--------------------------------|
| Idade (anos) | |
| <i>Mediana(intervalo)</i> | 65 (30 – 88) |
| ≤65 | 64 (53,3%) |
| >65 | 56 (46,7%) |
| Gênero | |
| <i>Masculino</i> | 66 (55,0%) |
| <i>Feminino</i> | 54 (45,0%) |
| Tabagismo^a | |
| <i>Fumante/Ex-fumante</i> | 71 (79,8%) |
| <i>Não fumante</i> | 18 (20,2%) |
| Carga tabágica^a (maços/anos) | |
| <i>Média (intervalo)</i> | 53,9 (1,5-150) |
| Subtipo histológico | |
| <i>Adenocarcinoma</i> | 73 (60,8%) |
| <i>Carcinoma de células escamosas</i> | 40 (33,3%) |
| <i>Carcinoma de grandes células</i> | 7 (5,8%) |
| Estádio T[†] | |
| <i>T1</i> | 30 (25,0%) |
| <i>T2</i> | 61 (50,8%) |
| <i>T3</i> | 23 (19,2%) |
| <i>T4</i> | 6 (5,0%) |
| Estádio N[†] | |
| <i>N0</i> | 79 (65,8%) |
| <i>N1</i> | 24 (20,0%) |
| <i>N2</i> | 17 (14,2%) |
| Estádio Patológico[†] | |
| <i>I</i> | 39 (32,5%) |
| <i>II</i> | 56 (46,7%) |
| <i>IIIA</i> | 25 (20,8%) |
| Tamanho do tumor (cm)^a | |
| <i>Média (intervalo)</i> | 4,46 (1,0-13,0) |
| Tratamento adjuvante | |
| Quimioterapia^a | |
| <i>Não recebeu</i> | 67 (57,8%) |
| <i>Recebeu</i> | 49 (42,2%) |
| Radioterapia^a | |
| <i>Não recebeu</i> | 84 (72,4%) |
| <i>Recebeu</i> | 32 (27,6%) |
| Seguimento (meses)^a | |
| <i>Média (intervalo)</i> | 57,3 (0-181) |
| Recidiva^a | 31 (31,3%) |
| Status^a | |
| <i>Morto</i> | 65 (65,7%) |

^a Alguns casos apresentaram perda de informação durante o seguimento: tabagismo (31); carga tabágica (53); tamanho do tumor (2); quimioterapia (4); radioterapia (4); seguimento (21); recidiva (21); status (21).

[†] Em acordo com a 8ª Edição da Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão [63].

5.2 Variáveis morfométricas epitélio-mesenquimais

Em um primeiro momento analisamos o fenótipo da transição epitélio-mesenquimal (TEM) através da expressão das proteínas E-caderina e β -catenina usando IHC e IF. Além disso, observamos as junções epiteliais e o padrão ultraestrutural usando MET.

A expressão média da E-caderina nas células tumorais foi de $23,99\% \pm 1,49$ células positivas. Para β -catenina, a expressão média foi de $21,24\% \pm 0,90$ células positivas. Quando comparamos diferentes subtipos histológicos, observamos que as amostras de CGC expressaram níveis mais baixos de ambos os marcadores quando comparadas a ADC e CCE (**Figura 10**), com diferença significativa entre CGC e CCE para expressão de E-caderina ($P = 0,03$); enquanto ADC e CCE tiveram comportamentos de expressão semelhantes para ambos os marcadores. A **Tabela 2** mostra a distribuição desses dois marcadores por subtipos histológicos.

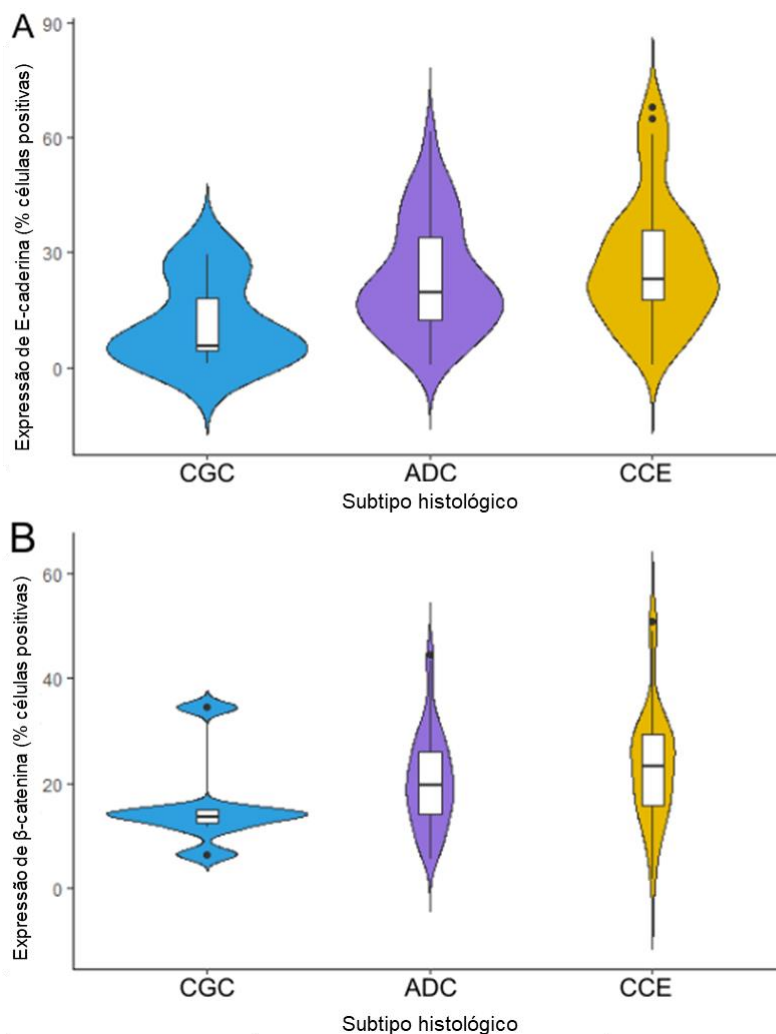


Figura 10. Gráficos de violino mostrando a expressão das proteínas do processo de transição epitelial-mesenquimal analisada através do software QuPath (N=120). A expressão das proteínas foi demonstrada entre os três tipos histológicos do carcinoma pulmonar de não pequenas células para (A) E-caderina e (B) β -catenina. Fonte: organizada pelo autor.

Tabela 2. Associação entre os subtipos histológicos de CPNPC e as variáveis morfométricas E-caderina e β -catenina (Qui-quadrado de Pearson; $P < 0,05$).

| Expressão proteica | Subtipo histológico | | | P |
|---|---------------------|------------|----------|--------------|
| | ADC | CCE | CGC | |
| <i>E-caderina</i> | | | | 0.474 |
| ≤ 23.99% | 43 (35.8%) | 20 (16.7%) | 5 (4.2%) | |
| > 23.99% | 30 (25.0%) | 20 (16.7%) | 2 (1.7%) | |
| <i>β-catenina</i> | | | | 0.002 |
| ≤ 21.25% | 48 (40.7%) | 14 (11.9%) | 6 (5.1%) | |
| > 21.25% | 24 (20.3%) | 25 (21.2%) | 1 (0.8%) | |

Abreviaturas: ADC, adenocarcinoma; CCE, carcinoma de células escamosas; CGC, carcinoma de grandes células

E-caderina e β -catenina foram expressas no limite celular em todos os três principais histótipos (**Figura 11** e **Figura 12** - o controle negativo referente a **Figura 12** pode ser encontrada na **Figura 31** no **Apêndice B**), refletindo o padrão ultraestrutural que é caracterizada pela presença de junções aderentes funcionais (**Figura 13**).

No CGC, ambos os marcadores da TEM foram dispostos logo abaixo da membrana plasmática, formando uma fina barreira cortical ao redor de cada célula maligna (**Figura 11C**, **Figura 11F**, **Figura 12A**, **Figura 12C**), de acordo com as microvilosidades curtas e interdigitação celular observadas sob a MET (**Figura 13A-F**). Projeções semelhantes a dedos interdigitavam células adjacentes, enquanto desmossomos ligavam pequenos grupos de células (**Figura 13A**). Notavelmente, o CGC invasivo foi caracterizado por longas saliências de células dissecando a membrana basal (MB) para invadir a matriz circundante (**Figura 13B**). No CGC apresentou expressão para E-caderina e β -catenina tanto na membrana plasmática quanto no citoplasma (**Figura 11B**, **Figura 11E**; respectivamente). Isso sugere uma proliferação tumoral modesta e invasão isolada da matriz circundante.

No ADC, ambos os marcadores da TEM foram ainda mais evidentes na membrana plasmática (**Figura 11I**, **Figura 11L**, **Figura 12E**, **Figura 12G**). No entanto, também encontramos expressão dos marcadores da TEM no citoplasma de algumas células. Isso indica invadopódios focais, que se ligam à matriz, como visto na MET (**Figura 13C**). Células adenocarcinomatosas invasivas mostraram forte coloração de E-caderina e β -catenina no citoplasma e membrana plasmática (**Figura 11H**, **Figura 11K**), o que indica invasão do estroma circundante por grupos de células malignas com formato fusiforme (**Figura 13D**) e alta proliferação tumoral.

Por fim, no CCE, ambos os marcadores da TEM foram altamente evidentes e formaram pontos ao longo da membrana plasmática (**Figura 11O, Figura 11R**), com células escamosas invasivas também mostrando expressão de E-caderina e β -catenina no citoplasma (**Figura 11N, Figura 11Q**). A MET das amostras de CCE mostrou células adjacentes conectadas por complexos juncionais constituídos por desmossomos (**Figura 13F**). Durante a invasão da matriz circundante, observamos uma evidente transformação de células fusiformes com projeções fusiformes estendendo-se para dentro da MB e o desprendimento de células escamosas.

Os resultados acima sugerem então que, durante a TEM, a forte expressão de E-caderina e β -catenina observada na microscopia de luz reflete a ultraestrutura de fragmentação e perda de continuidade das junções epiteliais aderentes. Isso permite a invasão da MEC por células malignas individuais, no caso de CGC, e grupos de células, no caso de ADC e CCE.

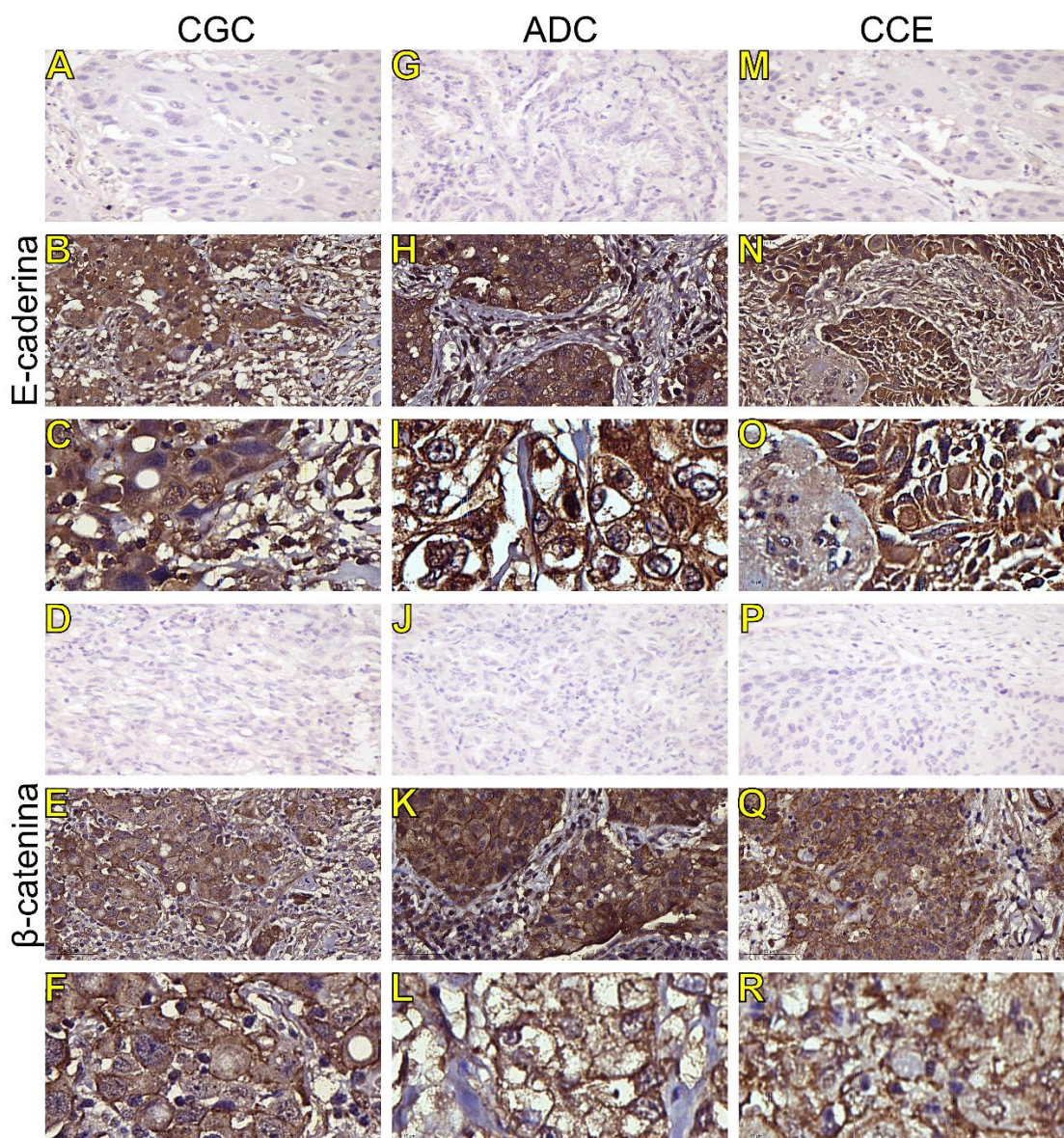


Figura 11. Expressão imuno-histoquímica de marcadores relacionados à transição epitélio-mesenquimal em tumores e grupos invasivos de carcinoma de grandes células (B-C, E-caderina; E-F, β -catenina; respectivamente), adenocarcinoma (H-I, E-caderina; K-L, β -catenina; respectivamente) e carcinoma de células escamosas (N-O, E-caderina; Q-R, β -catenina; respectivamente) (N=120). O controle negativo da reação é representado pela primeira linha em ambos os marcadores (A, D, G, J, M, P). Ampliação original: 40x (superior) e 100x (inferior). Abreviações: CGC, carcinoma de grandes células; ADC, adenocarcinoma; CCE: carcinoma de células escamosas. Fonte: organizada pelo autor.

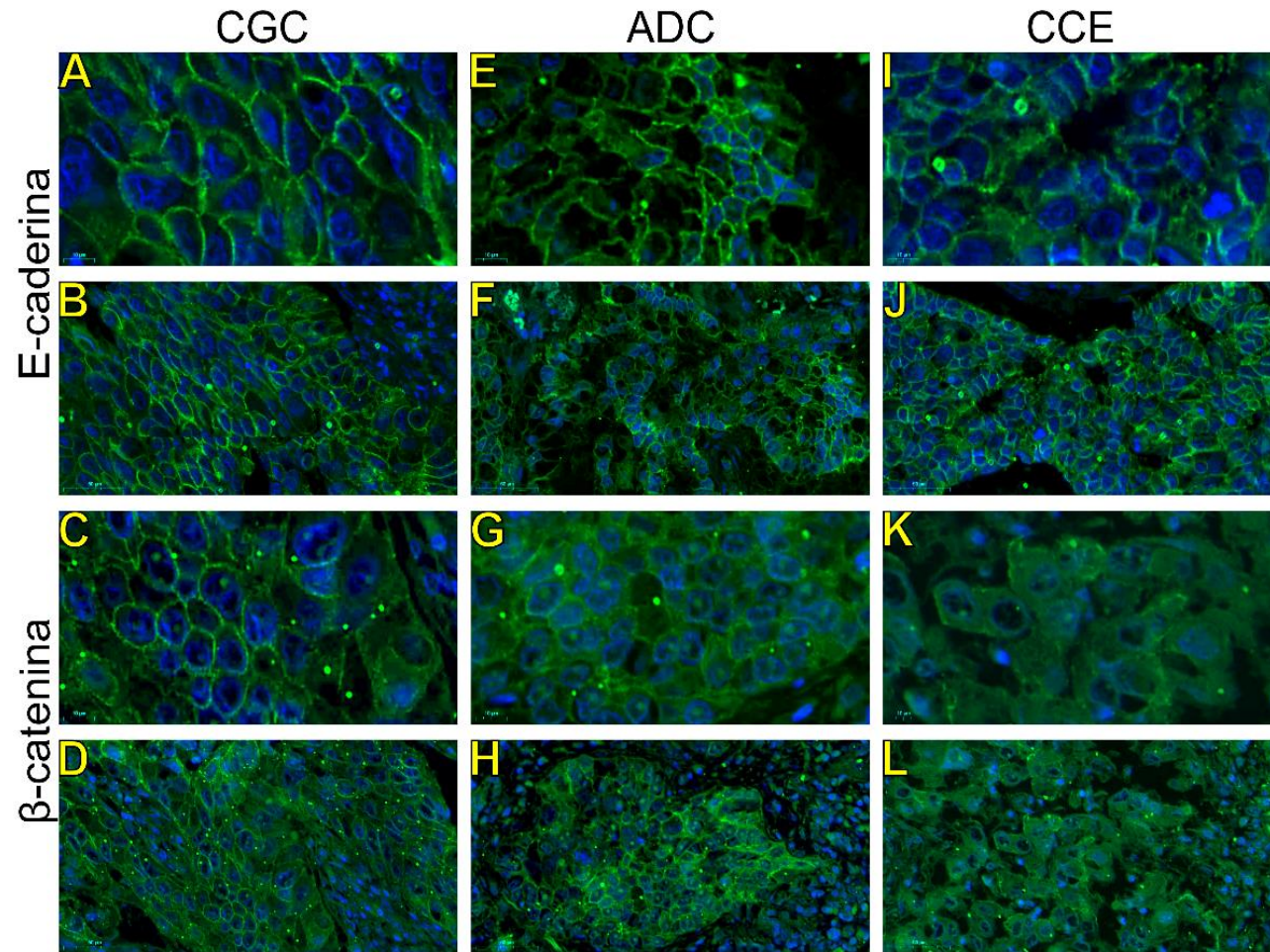


Figura 12. Expressão de marcadores relacionados à transição epitélio-mesenquimal. Imagens visualizadas ao microscópio de imunofluorescência mostrando tumores e grupos invasivos de carcinoma de grandes células (A-B, E-caderina; C-D, β-catenina; respectivamente), adenocarcinoma (E-F, E-caderina; G-H, β-catenina; respectivamente) e carcinoma de células escamosas (I-J, E-caderina; K-L, β-catenina; respectivamente) (N=120). Ampliação original: 100x (superior) e 40x (inferior). Abreviações: CGC, carcinoma de grandes células; ADC, adenocarcinoma; CCE: carcinoma de células escamosas. Fonte: organizada pelo autor.

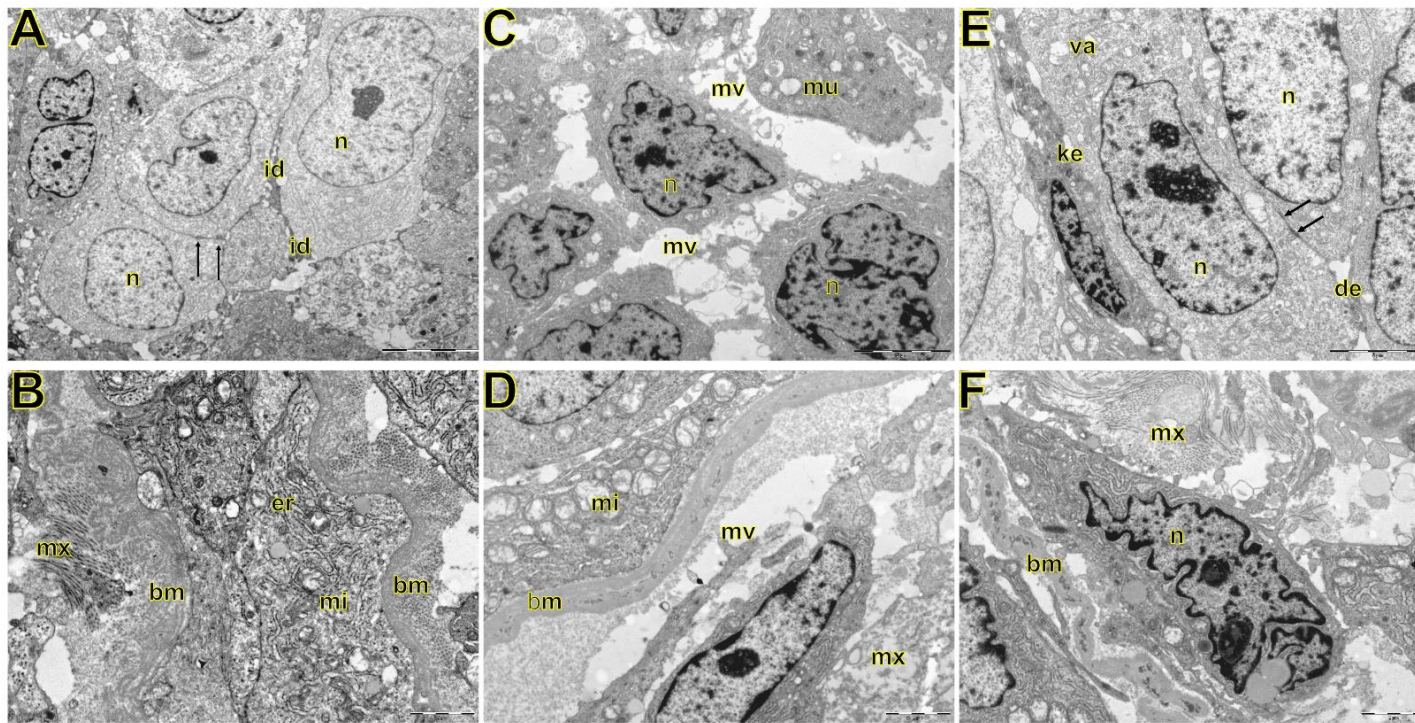


Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão de carcinoma de grandes células (A, B), adenocarcinoma (C, D) e carcinoma de células escamosas (E, F) visualizado no interior do tumor, membrana basal e matriz intersticial. A: carcinoma de grandes células mostrando grandes células tumorais com abundante luz ou pouco citoplasma escuro. Os núcleos (n) são eucromáticos e freqüentemente exibem invaginações mais ou menos profundas com um a dois nucléolos proeminentes. A membrana celular apresentou microvilosidades muito curtas (mi) densamente compactadas. Células adjacentes foram interdigitadas (id) com células vizinhas. Em B1, observe o carcinoma invasivo de grandes células com organelas proeminentes, incluindo mitocôndrias (mi) e retículo endoplasmático (er) projetando-se e dissecando a membrana basal (bm) para invadir a matriz circundante (mx). C1: adenocarcinoma apresentando células redondas com acentuada irregularidade do núcleo, citoplasma claro e interdigitação por microvilosidades esparsas e curtas (mv). Vacúolos de mucina (mu) podem ser visualizados dispersos no citoplasma. Em D1, células invasivas projetam a membrana basal (bm) mostrando numerosas organelas como mitocôndrias (mi) e microvilosidades curtas projetadas em direção à matriz (mx) assumindo o fenótipo fusiforme. E1: célula escamosa mostrando células parcialmente coesas por complexos juncionais (desmossomas, des). Algumas células apresentam núcleo (n) pálido e regular com nucléolo evidente. Células adjacentes são conectadas por numerosas junções aderentes (setas) em seus domínios laterais mostrando a polaridade celular. Alguns autofagossomos (va) podem ser observados no citoplasma. As células escuras exibem filamentos de queratina no citoplasma (ke). Em F1, as células escamosas invasivas assumem forma alongada, acentuada irregularidade do núcleo dissecando a membrana basal (bm) e as fibras colágenas da matriz (mx). Fonte: organizada pelo autor.

5.3 Variáveis morfométricas da matriz extracelular

Em uma etapa seguinte, examinamos variáveis morfométricas ligadas à MEC, incluindo os glicosaminoglicanos (GAGs) - heparan sulfato (HS) e sulfato de condroitina (SC) -, e colágenos tipo I (Col I), tipo III (Col III), tipo IV (Col IV) e tipo V (Col V).

Iniciando nossa análise com os GAGs, observamos que a expressão média de HS foi de $1,55\% \pm 0,11$ células positivas. Esse comportamento coincidiu com imunocoloração fraca em todos os três histótipos principais (**Figura 14**). A maioria das amostras de ADC e CCE apresentou menor expressão de HS quando comparada com CGC, mas sem significância estatística (**Figura 15, Tabela 3**). Em contraste, a expressão média de SC foi de $11,91\% \pm 0,75$ células positivas, o que concorda com a forte imunomarcagem observada de forma semelhante em todos os três subtipos histológicos (**Figura 15, Tabela 3**).

O arranjo do SC no CGC ocorreu logo abaixo da membrana plasmática. Esse arranjo do SC formou uma barreira cortical espessa ao seu redor (**Figura 14E, Figura 14F**), em concordância com o BM espessa visto sob MET (**Figura 16A**). Além disso, houve forte coloração de SC tanto na membrana plasmática quanto no citoplasma (**Figura 14E, Figura 14F**; respectivamente), um sinal de rápida proliferação das células malignas invadindo a MEC intersticial.

No ADC, a presença de SC foi ainda mais evidente na MB (**Figura 14K, Figura 14L**), embora também seja encontrada no citoplasma de algumas células. Isso indica invadopódios focais, que se ligam ao BM, conforme observado na MET (**Figura 16C**). Células adenocarcinomas invasivas apresentaram intensa coloração de SC no citoplasma e na membrana plasmática (**Figura 14K, Figura 14L**). A intensa coloração de SC mostra uma rápida invasão da MEC circundante por grupos de células com alto status de proliferação tumoral.

Em contraste, o SC no CCE invasivo foi consideravelmente mais evidente do que em outros histótipos, formando uma espessa barreira ao longo da MB com forte expressão de SC no citoplasma (**Figura 14Q, Figura 14R**).

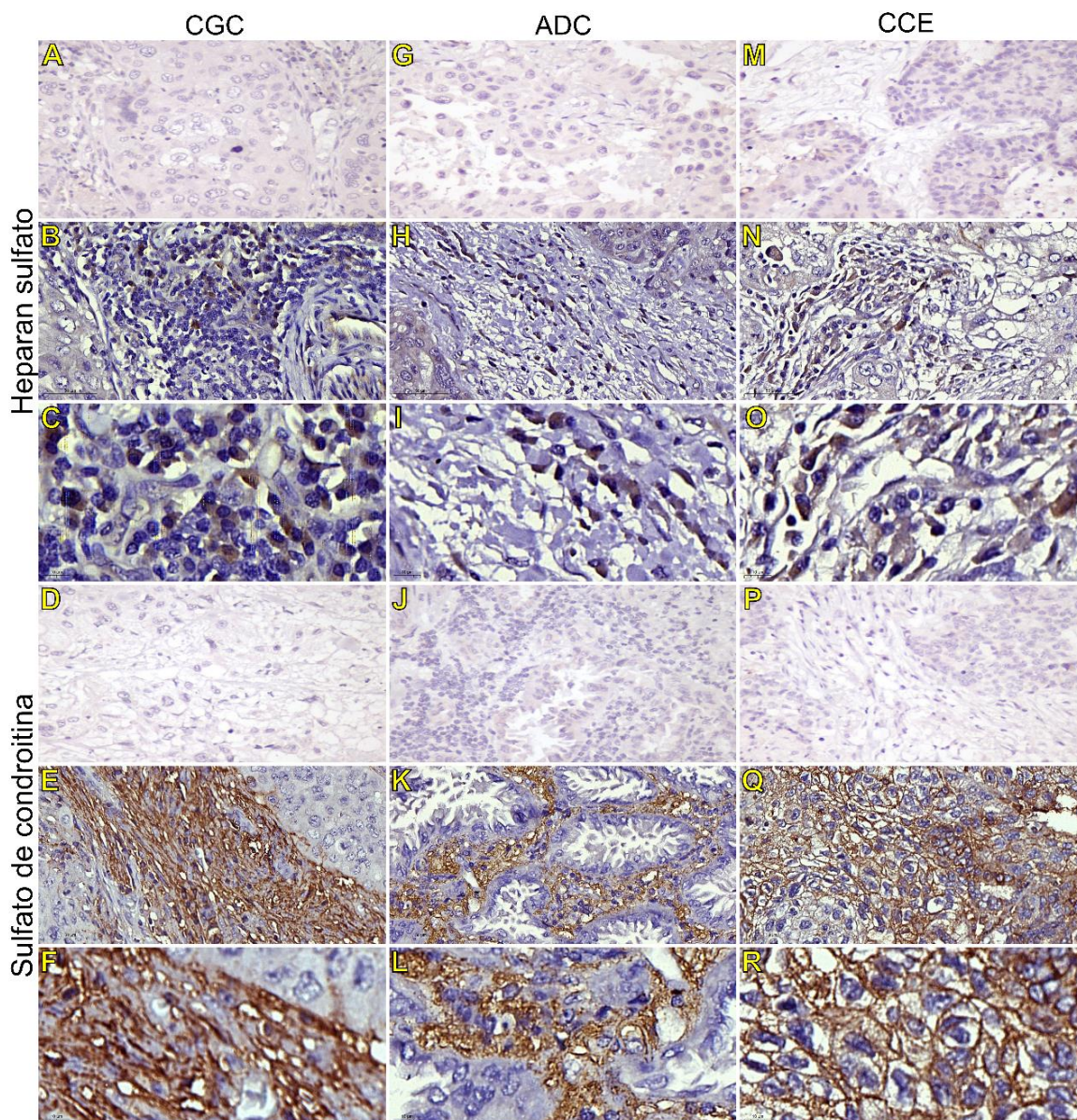


Figura 14. Expressão imuno-histoquímica de marcadores para glicosaminoglicanos em tumores e grupos invasivos de carcinoma de grandes células (B e C, heparan sulfato; E e F, sulfato de condroitina; respectivamente), em adenocarcinoma (H e I, heparan sulfato; K e L, sulfato de condroitina; respectivamente) e no carcinoma de células escamosas (N e O, heparan sulfato; Q e R, sulfato de condroitina; respectivamente) (N=120). Para ambos os marcadores, a primeira linha ilustra o controle negativo. Ampliação original: 40X e 100X. Abreviaturas: CGC, carcinoma de células grandes; ADC, adenocarcinoma; CCE: carcinoma de células escamosas. Fonte: organizada pelo autor.

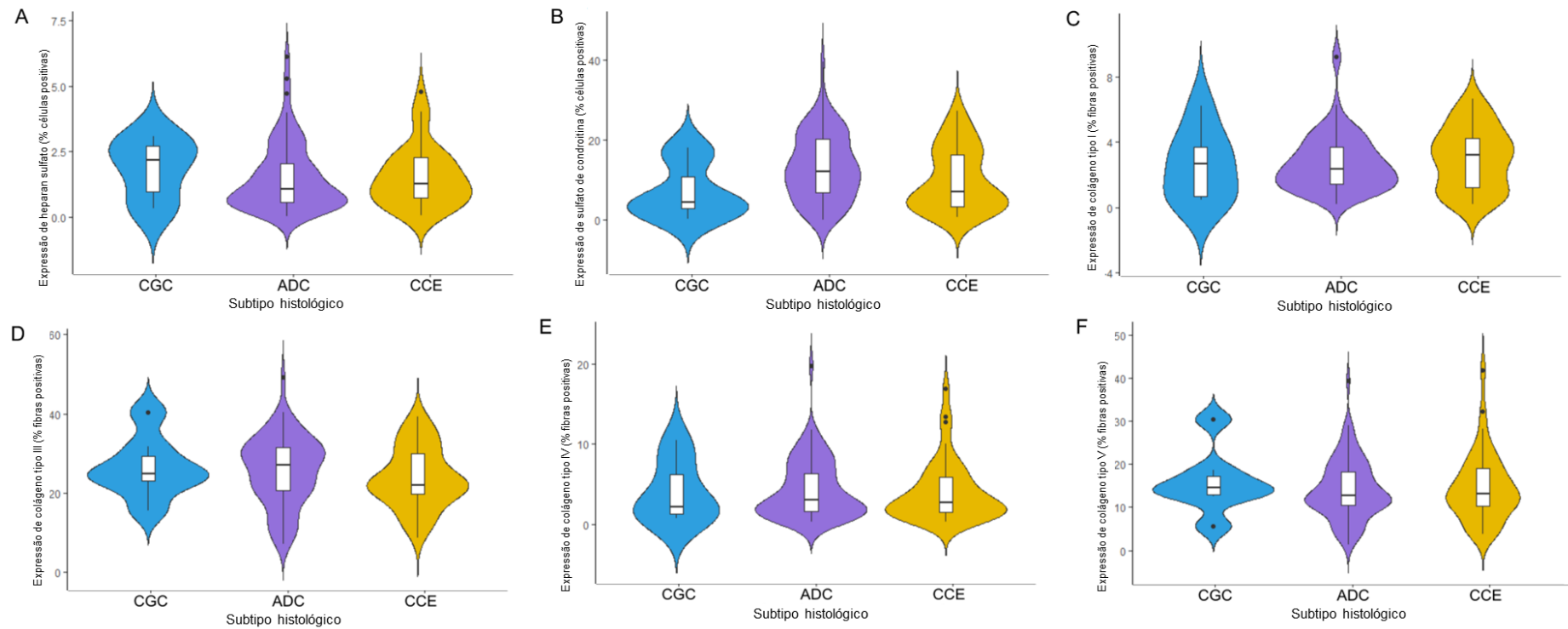


Figura 15. Gráficos de violino mostrando a expressão das glicoproteínas da matriz extracelular e dos colágenos da matriz analisados através do software QuPath (N=120). A expressão das proteínas foi demonstrada entre os três tipos histológicos do carcinoma pulmonar de não pequenas células para (A) heparan sulfato, (B) sulfato de condroitina, (C) colágeno tipo I, (D) colágeno tipo III, (E) colágeno tipo IV e (F) colágeno tipo V. Abreviaturas: CGC, carcinoma de células grandes; ADC, adenocarcinoma; CCE: carcinoma de células escamosas. Fonte: organizada pelo autor.

Tabela 3. Associação entre os subtipos histológicos de CPNPC e as variáveis morfométricas da matriz extracelular (Qui-quadrado de Pearson; $P < 0,05$)

| Expressão proteica | Subtipo histológico | | | P |
|--|---------------------|------------|----------|-------|
| | ADC | CCE | CGC | |
| <i>Heparan Sulfato</i> ^a | | | | 0.215 |
| ≤ 1.55% | 45 (37.8%) | 23 (19.3%) | 2 (1.7%) | |
| > 1.55% | 27 (22.7%) | 17 (14.3%) | 5 (4.2%) | |
| <i>Sulfato de condroitina</i> | | | | 0.307 |
| ≤ 11.92% | 38 (31.7%) | 26 (21.7%) | 5 (4.2%) | |
| > 11.92% | 35 (29.2%) | 14 (11.7%) | 2 (1.7%) | |
| <i>Col I</i> | | | | 0.123 |
| ≤ 2.81% | 45 (37.5%) | 17 (14.2%) | 3 (2.5%) | |
| > 2.81% | 28 (23.3%) | 23 (19.2%) | 4 (3.3%) | |
| <i>Col III</i> | | | | 0.175 |
| ≤ 25.04% | 40 (33.3%) | 26 (21.7%) | 2 (1.7%) | |
| > 25.04% | 33 (27.5%) | 14 (11.7%) | 5 (4.2%) | |
| <i>Col IV</i> | | | | 0.857 |
| ≤ 4.30% | 44 (36.7%) | 26 (21.7%) | 4 (3.3%) | |
| > 4.30% | 29 (24.2%) | 14 (11.7%) | 3 (2.5%) | |
| <i>Col V</i> | | | | 0.089 |
| ≤ 14.42% | 49 (40.8%) | 22 (18.3%) | 2 (1.7%) | |
| > 14.42% | 24 (20.0%) | 18 (15.0%) | 5 (4.2%) | |

^aA variável apresentou uma informação faltante.

Abreviaturas: ADC, adenocarcinoma; CCE, carcinoma de células escamosas; CGC, carcinoma de grandes células; Col I, colágeno tipo I; Col III, colágeno tipo III, Col IV, colágeno tipo IV; Col V, colágeno tipo V.

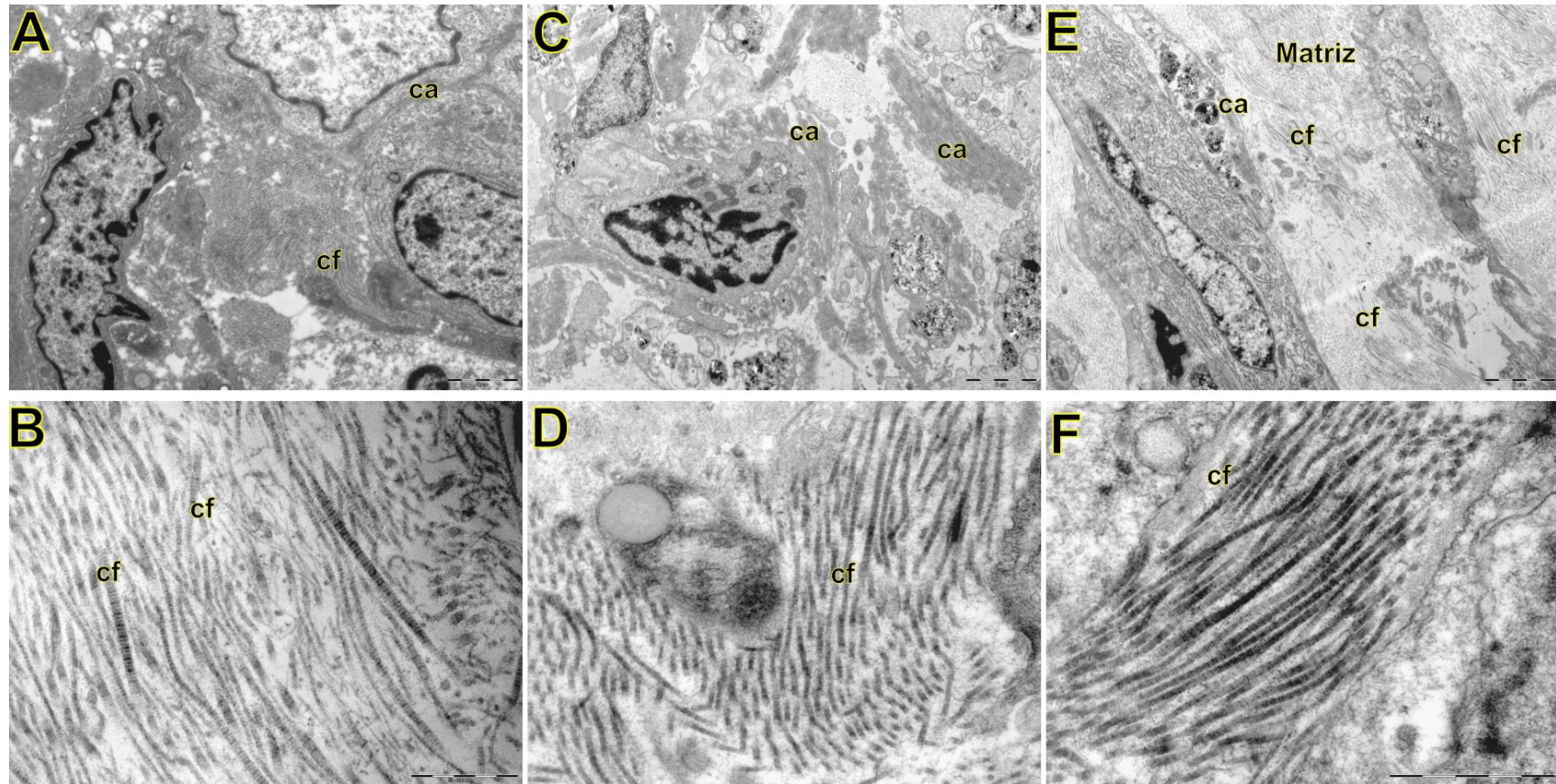


Figura 16. Microscopia eletrônica de transmissão de carcinoma de grandes células (A, B), adenocarcinoma (C, D) e carcinoma de células escamosas (E, F) visualizado na membrana basal e matriz intersticial. **A**: em pequeno aumento o carcinoma de grandes células mostra células tumorais grandes anormais com citoplasma abundantemente claro ou pouco escuro, densamente coeso. Em **B**, em grande aumento, observamos a matriz intersticial composta por colágenos fibrilares (cf) misturados em uma matriz amorfa escassa. **C**: em pequeno aumento, o adenocarcinoma mostra células redondas aberrantes com acentuada irregularidade do núcleo, matriz da membrana basal espessa na junção das células tumorais com a matriz intersticial sugerindo invadopódio. Em **D** (grande aumento) observamos colágeno fibrilar (cf). **E**: um pequeno aumento mostra células escamosas invasivas alongadas com o colágeno amorfo (ca) ao longo da matriz da membrana basal. A matriz intersticial é abundante e composta por colágeno fibrilar (cf) imerso em uma matriz amorfa composta por heparan sulfato e sulfato de condroitina. Em **F**, um grande aumento exibiu principalmente fibras grossas e distorcidas e microfibrilas de colágeno fibrilar (cf) na matriz intersticial.

Quando quantificamos os diferentes tipos de colágeno neste contexto, a expressão média de colágeno foi de $2,80\% \pm 0,16$ fibras positivas para Col I, $25,04\% \pm 0,76$ fibras positivas para Col III, $4,29\% \pm 0,33$ fibras positivas para Col IV e $14,41\% \pm 0,66$ fibras positivas para Col V. A expressão de todos os quatro marcadores foi semelhante nos três subtipos histológicos (**Figura 15, Tabela 3**).

A **Figura 17 a Figura 20** mostram as co-análises IF de SC/HS e tipos de colágeno (o controle negativo para essas reações pode ser encontrado na **Figura 32** no **Apêndice B**). A matriz intersticial de ADC e CCE mostrou uma forte fluorescência avermelhada das fibras Col I; por outro lado, SC é representado por uma forte fluorescência esverdeada ao longo da MB em ADC e CGC (**Figura 17**). Enquanto as fibras Col III são vistas em uma cor fluorescente fortemente avermelhada na matriz intersticial de CGC, ADC e CCE (**Figura 18B, 18F, 18J**), o SC mostrou uma fraca fluorescência esverdeada na MB dos três histótipos (**Figura 18C, Figura 18G, Figura 18K**). A intensidade de refringência de Col IV (vermelho) e HS (verde) na MB foi forte em ADC e fraca em CCE e CGC (**Figura 19**). Ressaltamos que o Col V (vermelho) e o SC (verde) apresentaram fluorescência mais intensa em CGC em comparação com ADC e CCE (**Figura 20**).

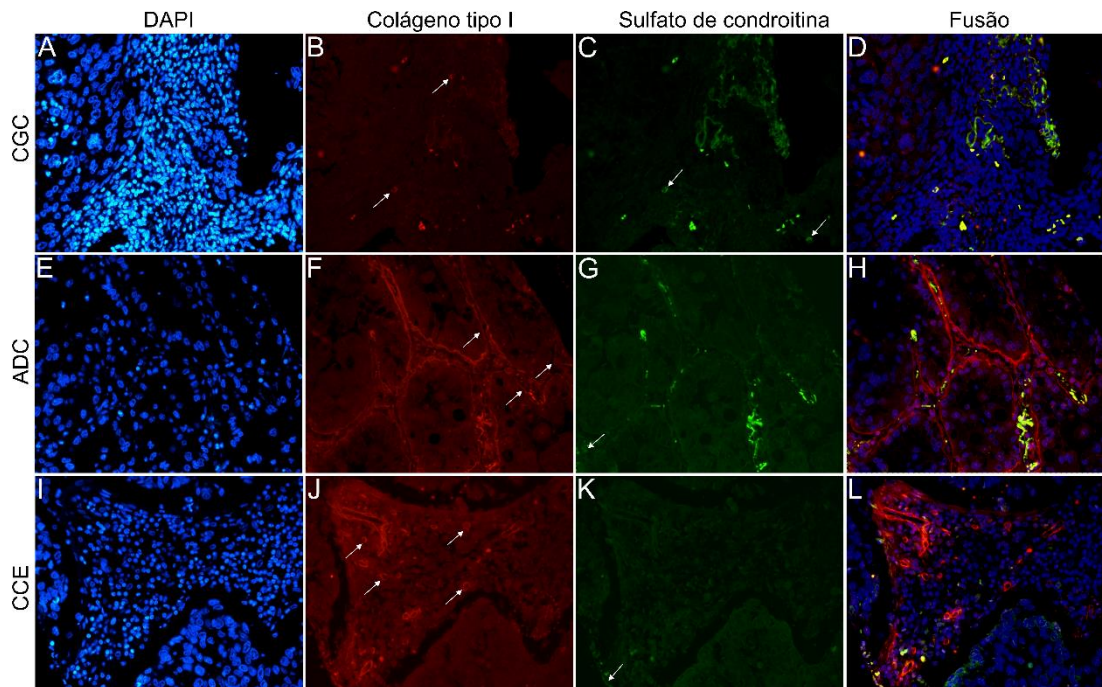


Figura 17. Co-análise da imunofluorescência de sulfato de condroitina (verde; C, G e K) e colágeno tipo I (vermelho; B, F e J) nos diferentes subtipos histológicos de carcinoma pulmonar de não pequenas células. Os núcleos corados estão representados em azul (DAPI; A, E e I). As imagens D, H e L representam a fusão do mesmo campo dessas três colorações. As setas em branco indicam expressão positiva dos marcadores. Ampliação original: 40x. Abreviaturas: CGC, carcinoma de grandes células; ADC, adenocarcinoma; CCE, carcinoma de células escamosas. Fonte: Elaborada pelo autor.

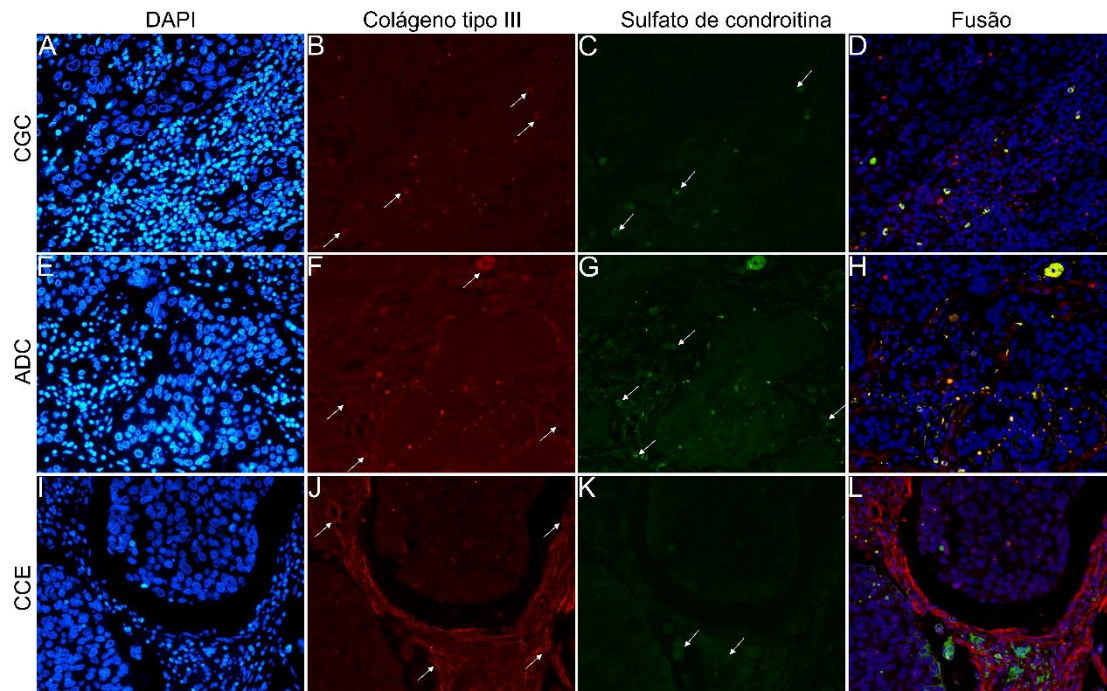


Figura 18. Co-análise da imunofluorescência de sulfato de condroitina (verde; C, G e K) e colágeno tipo III (vermelho; B, F e J) nos diferentes subtipos histológicos de carcinomas pulmonares de não pequenas células. Os núcleos corados estão representados em azul (DAPI; A, E e I). As imagens D, H e L representam a fusão do mesmo campo dessas três colorações. As setas em branco indicam expressão positiva dos marcadores. Ampliação original: 40x. Abreviaturas: CGC, carcinoma de grandes células; ADC, adenocarcinoma; CCE, carcinoma de células escamosas. Fonte: Elaborada pelo autor.

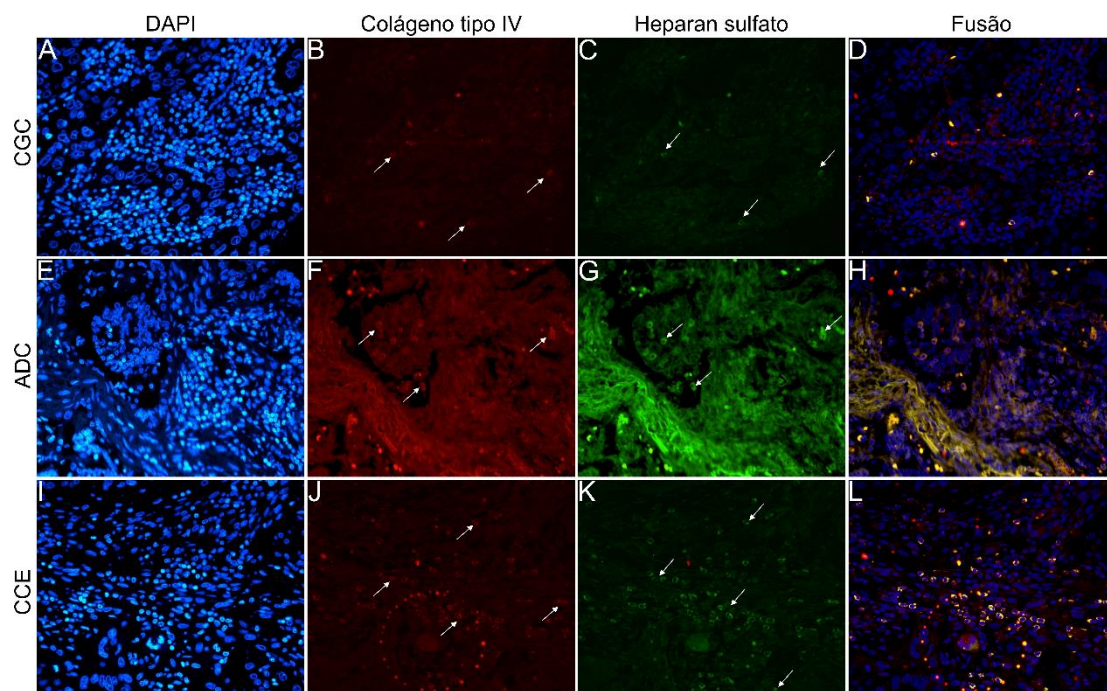


Figura 19. Co-análise da imunofluorescência de heparan sulfato (verde; C, G e K) e colágeno tipo IV (vermelho; B, F e J) nos diferentes subtipos histológicos de carcinoma pulmonar de não pequenas células. Os núcleos corados estão representados em azul (DAPI; A, E e I). As imagens D, H e L representam a fusão do mesmo campo dessas três colorações. As setas em branco indicam expressão positiva dos marcadores. Ampliação original: 40x. Abreviaturas: CGC, carcinoma de grandes células; ADC, adenocarcinoma; CCE, carcinoma de células escamosas. Fonte: Elaborada pelo autor.

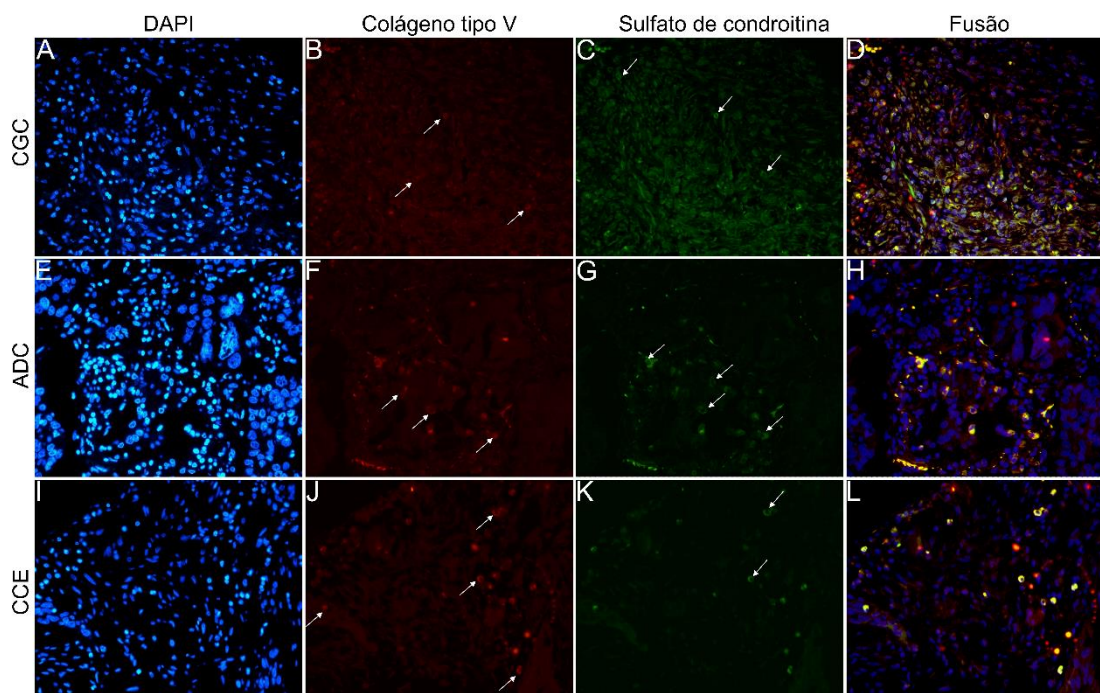


Figura 20. Co-análise da imunofluorescência de sulfato de condroitina (verde; C, G e K) e colágeno tipo V (vermelho; B, F e J) nos diferentes subtipos histológicos de carcinoma pulmonar de não pequenas células. Os núcleos corados estão representados em azul (Dapi; A, E e I). As imagens D, H e L representam a fusão do mesmo campo dessas três colorações. As setas em branco indicam expressão positiva dos marcadores. Ampliação original: 40x. Abreviaturas: CGC, carcinoma de grandes células; ADC, adenocarcinoma; CCE, carcinoma de células escamosas. Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados acima sugerem que, após a TEM, a forte expressão de SC, com a forte refringência de Col III e Col V, pode aumentar a motilidade de células invasivas dos três histótipos através da MB para a MEC intersticial.

5.4 Expressão morfométrica da via de sinalização Wnt e da proteína SPARC

Em seguida, avaliamos a via de sinalização Wnt por meio da expressão das proteínas WNT1, WNT3A, WNT5A e WNT5B em histótipos de CPNPC. A família de proteínas Wnt desencadeia uma cascata de sinalização relevante que regula o desenvolvimento e está associada ao câncer. Também examinamos a variável morfométrica SPARC, uma glicoproteína multifuncional envolvida com as proteínas TEM, remodelamento da MEC e na via Wnt.

A expressão média de WNT1, WNT3A, WNT5A e WNT5B nas células tumorais foi respectivamente $13,55\% \pm 0,89$, $19,16\% \pm 0,94$, $42,47\% \pm 1,35$ e $3,74\% \pm 0,26$ células positivas, o que coincide com uma expressão moderada de WNT1 e WNT3A, uma expressão fraca de WNT5B, mas uma expressão citoplasmática intensa de WNT5A nos três subtipos histológicos (**Figura 21**). No entanto, apenas a expressão de WNT5A mostrou uma diferença estatística significativa entre os subtipos histológicos (CCE versus tumores não escamosos, **Figura 22**, **Tabela 4**).

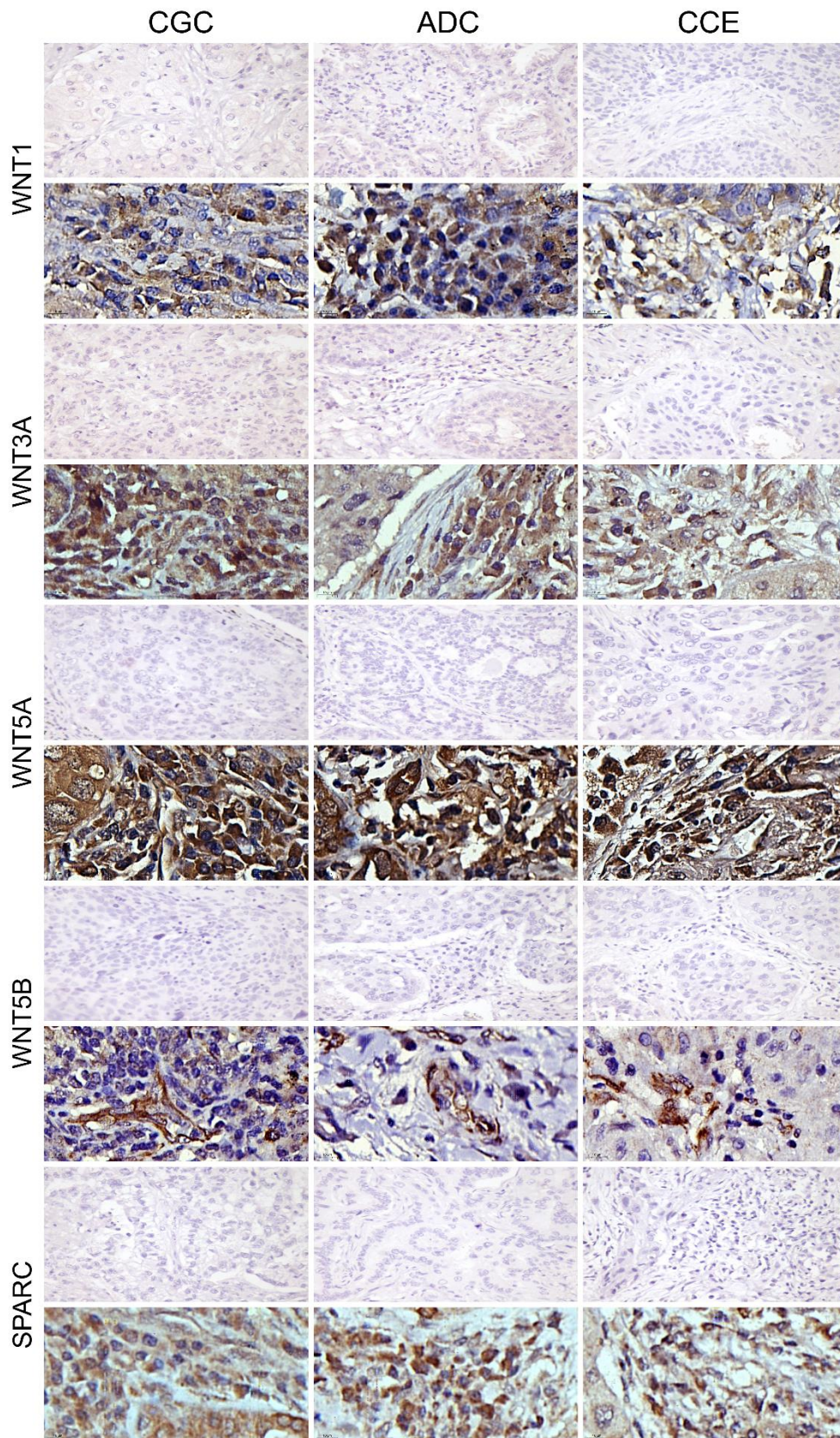


Figura 21. Expressão imuno-histoquímica de WNTs e SPARC em carcinoma de grandes células, adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas (N=120). Para ambos os marcadores, a primeira linha ilustra o controle negativo. Ampliação original: 40X e 100X. Abreviaturas: CGC, carcinoma de grandes células; ADC, adenocarcinoma; CCE: carcinoma de células escamosas. Fonte: Elaborada pelo autor.

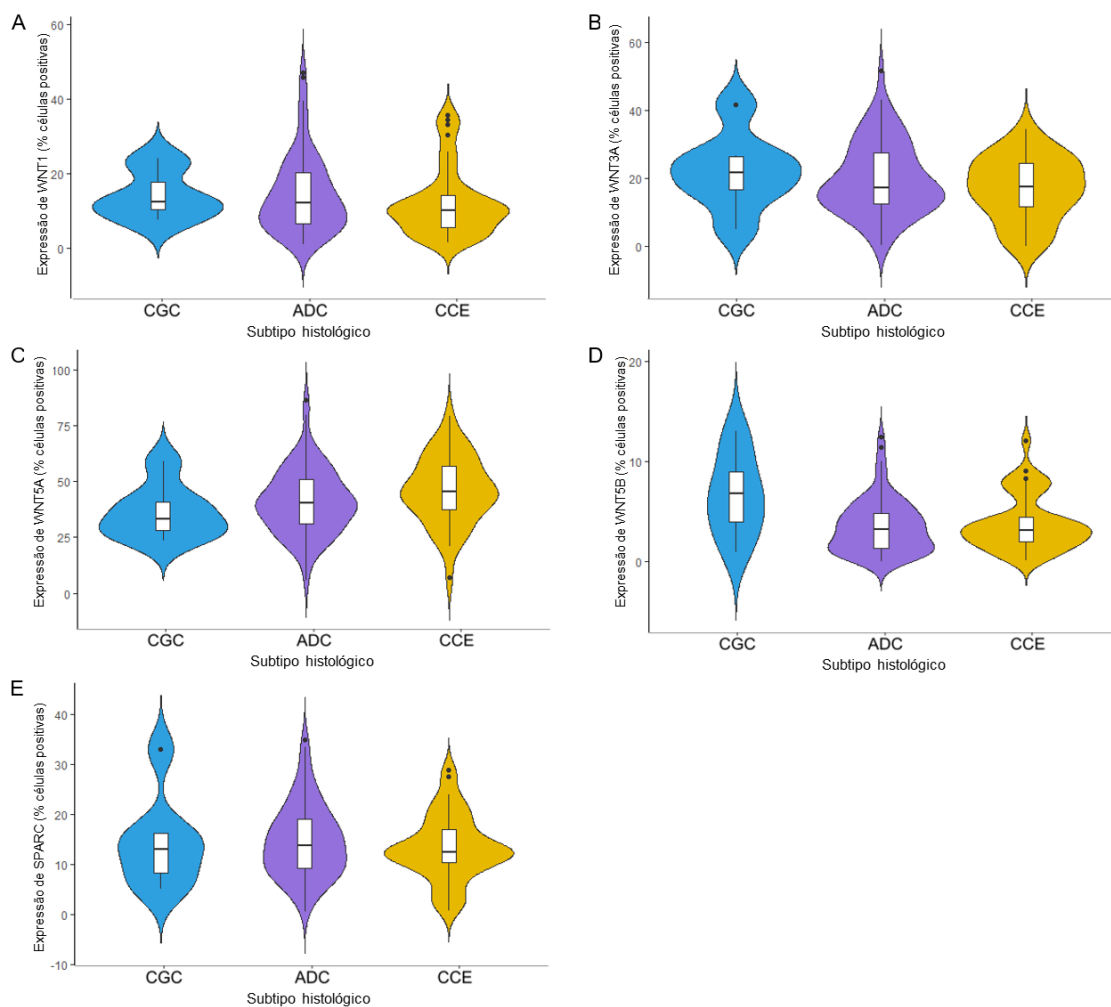


Figura 22. Gráficos de violino mostrando a expressão das proteínas da via de sinalização Wnt e da proteína SPARC analisadas através do software QuPath (N=120). A expressão das proteínas foi demonstrada entre os três tipos histológicos do carcinoma pulmonar de não pequenas células para (A) WNT1, (B) WNT3A, (C) WNT5A, (D) WNT5B e (E) SPARC. Abreviaturas: CGC, carcinoma de grandes células; ADC, adenocarcinoma; CCE: carcinoma de células escamosas. Fonte: organizada pelo autor.

Tabela 4. Associação entre os subtipos histológicos de CPNPC e as variáveis morfométricas da via de sinalização Wnt e SPARC (Qui-quadrado de Pearson; $P < 0,05$)

| Expressão proteica | Subtipo histológico | | | P |
|---------------------------|---------------------|------------|----------|--------------|
| | ADC | CCE | CGC | |
| WNT1 ^a | | | | 0.165 |
| ≤ 13.55% | 43 (36.4%) | 26 (22.0%) | 2 (1.7%) | |
| > 13.55% | 29 (24.6%) | 13 (11.0%) | 5 (4.2%) | |
| WNT3A ^a | | | | 0.387 |
| ≤ 19.17% | 40 (33.9%) | 20 (16.9%) | 2 (1.7%) | |
| > 19.17% | 32 (27.1%) | 19 (16.1%) | 5 (4.2%) | |
| WNT5A | | | | 0.002 |
| ≤ 42.48% | 46 (38.3%) | 13 (10.8%) | 6 (5.1%) | |
| > 42.48% | 27 (22.5%) | 27 (22.5%) | 1 (0.8%) | |
| WNT5B | | | | 0.258 |
| ≤ 3.75% | 44 (36.7%) | 24 (20.0%) | 2 (1.7%) | |
| > 3.75% | 29 (24.2%) | 16 (13.3%) | 5 (4.2%) | |
| SPARC | | | | 0.966 |
| ≤ 14.25% | 42 (35.0%) | 24 (20.0%) | 4 (3.3%) | |
| > 14.25% | 31 (25.8%) | 16 (13.3%) | 3 (2.5%) | |

^a Alguns casos apresentam dados ausentes: WNT1 (2); WNT3A (2).

Abreviaturas: ADC, adenocarcinoma; CCE, carcinoma de células escamosas; CGC, carcinoma de grandes células

Para SPARC, a expressão média no estroma tumoral foi de 14,24% ± 0,65 células positivas, com proporções semelhantes entre os histótipos. Embora a coloração citoplasmática tenha sido predominantemente positiva nas células do estroma em todos os casos de CPNPC, também observamos coloração SPARC fraca em células tumorais em todos os três subtipos histológicos (**Figura 22**). Não houve diferença estatística na expressão de SPARC entre os três histótipos (**Figura 22, Tabela 4**).

Esses achados mostram a importância da expressão de WNT5A em todos os histótipos e sua possível associação com a progressão do tumor.

5.5 Correlação entre as variáveis morfométricas TEM, WNTs, SPARC e MEC

O próximo passo foi explorar se as proteínas WNT ou SPARC orquestraram mecanicamente as mudanças fenotípicas e moleculares no CPNPC. Isso sugeriria TEM e MEC como ligações intrínsecas entre o desenvolvimento e a progressão do câncer.

A **Figura 23** mostra a correlação entre as variáveis morfométricas do tumor e do estroma. A E-caderina correlacionou-se fortemente com β -catenina ($\rho = 0,617$, $P < 0,001$) e WNT5A ($\rho = 0,672$, $P < 0,001$) e moderadamente com Col III ($\rho = 0,336$, $P < 0,001$). A β -catenina também se correlacionou fortemente com WNT5A ($\rho = 0,693$, $P < 0,001$).

O HS correlacionou-se moderadamente com WNT3A ($\rho = 0,401$, $P < 0,001$) e SPARC ($\rho = 0,376$, $P < 0,001$), enquanto o SC correlacionou-se moderadamente com WNT1 ($\rho = 0,406$, $P < 0,001$). Col IV foi inversamente associado de maneira moderada com WNT1 ($\rho = -0,346$, $P < 0,001$), enquanto Col V foi moderadamente correlacionado com Col III ($\rho = 0,329$, $P < 0,001$). WNT1 também apresentou uma correlação moderada com WNT3A ($\rho = 0,403$, $P < 0,001$). Por fim, WNT3A apresentou correlação moderada com WNT5B ($\rho = 0,340$, $P < 0,001$).

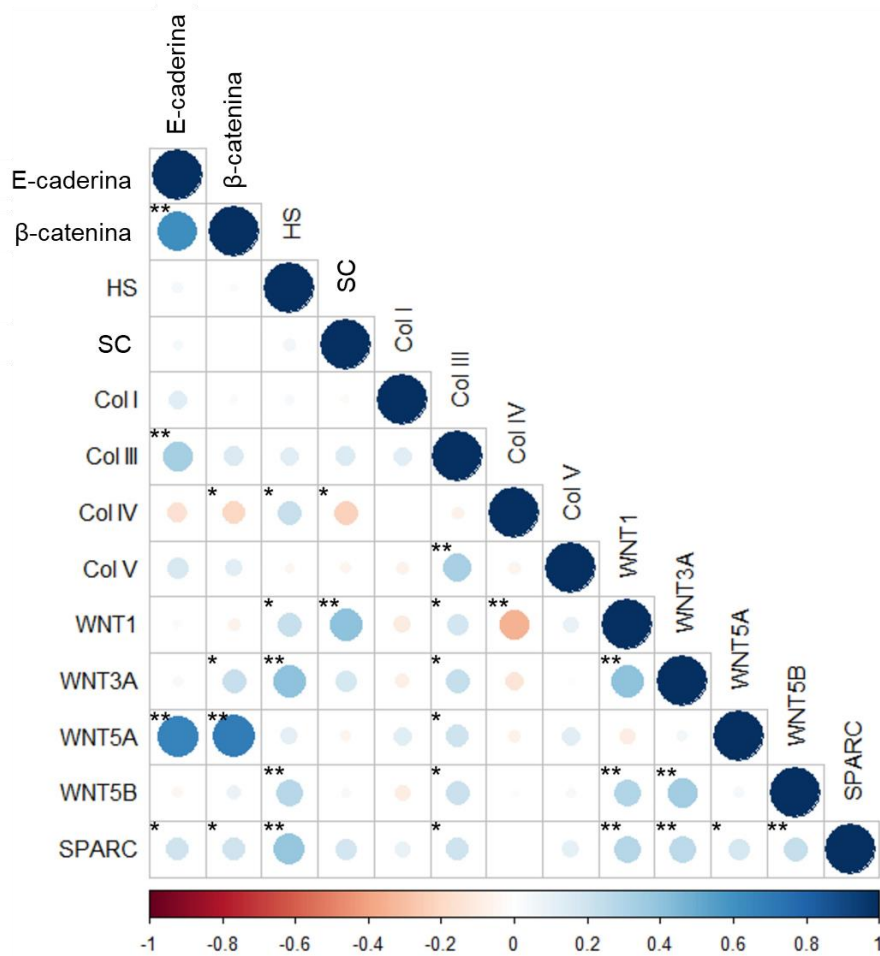


Figura 23. Correlação entre os marcadores de interesse. A graduação das cores representa a correlação positiva ou negativa. O tamanho do ponto representa o rho de Spearman, pontos maiores possuem valores mais próximos de |1|, portanto, correlação mais forte. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Abreviaturas: HS, heparan sulfato; SC, sulfato de condroitina; Col I, colágeno tipo I; Col III, colágeno tipo III, Col IV, colágeno tipo IV; Col V, colágeno tipo V. Fonte: organizada pelo autor.

Esses resultados sugerem que a via WNT5A dirigiu a TEM e a sinalização de síntese do Col III e do Col V. Por outro lado, WNT3A e SPARC regulam HS, enquanto WNT1 regula diretamente SC. Um loop de feedback negativo WNT1 controlou a síntese de Col IV ao longo do MB.

5.6 Associações entre características clínico-patológicas e variáveis morfométricas

A **Tabela 5** mostra as características clínico-patológicas estratificadas por E-caderina, β -catenina, proteínas sinalizadoras WNTs e SPARC. A significância estatística foi encontrada entre menor expressão de E-caderina e pacientes mais jovens ($P = 0,04$), pacientes com CGC ($P = 0,03$) e tumores menores que 3 cm ($P = 0,02$). Também encontramos significância estatística entre tumores menores que 3 cm e maior expressão de WNT1 ($P = 0,05$) e menor expressão de WNT5A ($P = 0,04$). Pacientes com CGC apresentaram maior expressão de WNT5B ($P = 0,01$).

Encontramos significância marginal entre menor expressão de WNT1 em pacientes do sexo masculino ($P = 0,07$) e tumor em estágio II versus estágio I ($P = 0,06$). Esta significância marginal sugere que o aumento da expressão de WNT1 ocorre em estágios iniciais da carcinogênese, que então diminui à medida que o tumor cresce. Houve também significância marginal entre menor expressão de WNT3A e pacientes mais jovens ($P = 0,07$) e entre tumores maiores que 3 cm ($P = 0,07$). Finalmente, menor expressão SPARC teve uma significância marginal em pacientes que receberam quimioterapia adjuvante ($P = 0,07$).

Não encontramos associação significativa entre histórico de tabagismo, estágio T, estágio N, recaída e os marcadores analisados. A expressão de β -catenina não apresentou associação significativa com as características clínico-patológicas.

A **Tabela 6** mostra a associação entre características clínico-patológicas, GAGs e tipos de colágeno. Houve uma associação significativa entre menor expressão de SC e tumores maiores que 3 cm ($P = 0,05$). Por sua vez, menor expressão de Col IV foi associada a pacientes mais jovens ($P = 0,05$) e do sexo feminino ($P = 0,004$). Tumores no estágio N2 tenderam a expressar menor Col V no estroma ($P = 0,05$) quando comparados ao N0, assim como tumores de pacientes que receberam quimioterapia adjuvante ($P = 0,03$).

Quando comparado ao estágio I ($P = 0,06$), encontramos uma significância marginal entre menor expressão de SC e tumor no estágio II, e entre menor expressão de Col IV em pacientes que receberam quimioterapia ($P = 0,06$). Não encontramos diferenças estatísticas entre as características clínico-patológicas e HS, Col I e Col III.

Tabela 5. Associação entre características clinicopatológicas e expressão média (% de expressão positiva) de E-caderina, β -catenina, proteínas sinalizadoras WNTs e SPARC (teste t e ANOVA, $P < 0,05$)

| Características | E-caderina | β -catenina | WNT1 | WNT3A | WNT5A | WNT5B | SPARC |
|-----------------------------|---------------------|-------------------|--------------------|-------------|--------------------|---------------------|--------------|
| Idade (anos) | | | | | | | |
| ≤65 | 21,35±1,66* | 21,01±1,26 | 13,89±1,29 | 17,54±1,27& | 41,56±1,82 | 3,86±0,39 | 14,05±0,84 |
| > 65 | 27,00±2,30 | 21,51±1,32 | 13,19±1,26 | 20,96±1,39 | 43,52±2,03 | 3,61±0,36 | 14,47±1,03 |
| Gênero | | | | | | | |
| Masculino | 25,24±1,91 | 21,10±1,14 | 12,11±1,04& | 18,57±1,25 | 43,21±1,84 | 3,79±0,32 | 13,83±0,86 |
| Feminino | 22,46±2,08 | 21,43±1,48 | 15,39 ±1,53 | 19,92±1,46 | 41,58±2,01 | 3,69±0,43 | 14,77±1,01 |
| Tabagismo | | | | | | | |
| Fumante/Ex-fumante | 28,15±1,79 | 23,06±1,23 | 13,28±1,28 | 18,45±1,18 | 44,61±1,69 | 3,74±0,33 | 14,62±0,86 |
| Não fumante | 27,85±4,10 | 22,00±2,22 | 13,80±2,52 | 21,27±2,64 | 43,16±4,05 | 3,16±0,63 | 13,44±1,53 |
| Subtipo histológico | | | | | | | |
| ADC | 23,23±1,70 | 20,59±1,08 | 14,24±1,22 | 20,00±1,26 | 41,04±1,71 | 3,45±0,32 | 14,69±0,86 |
| CCE | 27,57±2,63 | 23,48±1,73 | 12,19±1,48 | 17,11±1,49 | 46,18±2,39 | 3,79±0,44 | 13,42±1,03 |
| CGC | 11,52±4,17*# | 15,54±3,35 | 14,17±2,45 | 22,13±4,30 | 36,28±4,58 | 6,61±1,57*## | 14,35±3,53 |
| Estádio T | | | | | | | |
| T1 | 21,55±2,55 | 24,53±1,94 | 15,76±2,32 | 20,12±2,05 | 41,37±2,67 | 3,93±0,60 | 13,61±1,18 |
| T2 | 24,78±2,06 | 19,78±1,09 | 13,50±1,12 | 20,24±1,24 | 42,64±1,87 | 3,83±0,32 | 15,26±1,01 |
| T3 | 25,20±3,58 | 20,86±2,24 | 11,63±1,89 | 16,51±2,30 | 42,27±3,45 | 3,32±0,65 | 13,24±1,16 |
| T4 | 23,57±3,92 | 21,55±6,23 | 10,81±2,92 | 14,08±3,86 | 47,14±5,70 | 3,63±1,94 | 11,08±3,14 |
| Estádio N | | | | | | | |
| N0 | 25,22±1,79 | 22,11±1,13 | 13,55±1,21 | 19,55±1,13 | 42,37±1,63 | 3,69±0,31 | 14,81±0,77 |
| N1 | 20,11±2,85 | 19,66±2,29 | 13,63±1,59 | 20,31±2,49 | 41,77±3,74 | 4,44±0,73 | 12,59±1,63 |
| N2 | 23,73±3,65 | 19,42±0,91 | 13,48±1,98 | 15,90±2,24 | 43,96±2,69 | 3,03±0,59 | 13,59±1,81 |
| Estádio Patológico | | | | | | | |
| I | 26,39±2,66 | 24,03±1,65 | 16,48±2,00 | 20,71±1,64 | 43,21±2,46 | 3,85±0,47 | 15,85±1,20 |
| II | 23,02±2,08 | 19,99±1,30 | 11,83±2,00&& | 19,59±1,34 | 41,78±2,05 | 3,91±0,33 | 13,95±0,90 |
| III A | 22,05±2,75 | 19,38±1,89 | 12,19±1,42 | 15,60±2,29 | 42,97±2,77 | 3,22±0,74 | 12,36±1,50 |
| Tamanho do tumor | | | | | | | |
| ≤3 cm | 20,60±1,86* | 22,18±1,41 | 15,80±1,66* | 21,29±1,54 | 39,42±2,08* | 4,07±0,42 | 15,15±1,05 |
| >3 cm | 27,02±1,96 | 20,68±1,20 | 12,02±0,96 | 17,84±1,17& | 45,05±1,76 | 3,60±0,34 | 13,75±0,85 |
| Recidiva | | | | | | | |
| Não | 23,96±1,90 | 21,70±1,25 | 14,02±1,28 | 19,19±1,20 | 42,60±1,90 | 3,90±0,37 | 15,09±0,88 |
| Sim | 24,38±2,71 | 19,98±1,94 | 12,79±1,37 | 17,05±1,87 | 42,85±2,66 | 3,47±0,44 | 12,98±1,29 |
| Tratamento adjuvante | | | | | | | |
| <i>Quimioterapia</i> | | | | | | | |
| Não | 22,39±1,84 | 21,40±1,23 | 14,27±1,33 | 19,75±1,24 | 41,45±1,87 | 3,89±0,36 | 15,48±0,92 |
| Sim | 26,60±2,33 | 21,24±1,46 | 12,85±1,26 | 18,97±1,56 | 43,61±2,07 | 3,72±0,41 | 12,97±0,91\$ |
| <i>Radioterapia</i> | | | | | | | |
| Não | 24,48±1,94 | 22,06±1,02 | 13,93±1,16 | 19,78±1,17 | 42,57±1,59 | 3,86±0,32 | 14,55±0,76 |
| Sim | 23,33±3,09 | 19,45±2,06 | 12,95±1,45 | 18,48±1,75 | 41,80±2,82 | 3,71±0,48 | 14,08±1,39 |

* $P > 0,05$; #CCE vs. CGC - $P = 0,03$; ##ADC vs. CGC - $P = 0,01$, e CCE vs. CGC - $P = 0,04$; & $P = 0,07$; &&Estádio Patológico I vs. II - $P = 0,06$; \$ $P = 0,06$. **Abreviaturas:** ADC, adenocarcinoma; CCE, carcinoma de células escamosas; CGC, carcinoma de grandes células.

Tabela 6. Associação entre características clinicopatológicas e expressão média (% de expressão positiva) de glicosaminoglicanas e tipos de colágeno (teste t e ANOVA, P<0,05)

| Características | HS | SC | Col I | Col III | Col IV | Col V |
|-----------------------------|-----------|--------------------|-----------|------------|--------------------|---------------------|
| Idade (anos) | | | | | | |
| ≤65 | 1,52±0,16 | 12,21±1,06 | 2,85±0,21 | 23,67±1,00 | 3,64±0,35* | 13,63±0,87 |
| > 65 | 1,58±0,15 | 11,59±1,09 | 2,75±0,28 | 26,60±1,13 | 5,03±0,58 | 15,32±1,02 |
| Gênero | | | | | | |
| Masculino | 1,59±0,16 | 10,95±0,97 | 3,09±0,23 | 25,52±1,01 | 5,12±0,53 | 13,94±0,93 |
| Feminino | 1,50±0,16 | 13,10±1,18 | 2,47±0,23 | 24,45±1,16 | 3,29±0,34** | 15,01±0,96 |
| Tabagismo | | | | | | |
| Fumante/Ex-fumante | 1,63±0,16 | 10,71±0,93 | 2,91±0,21 | 26,69±0,99 | 3,82±0,40 | 15,15±0,93 |
| Não fumante | 1,24±0,22 | 14,52±2,10 | 2,94±0,46 | 25,78±2,15 | 4,20±0,66 | 15,79±1,87 |
| Subtipo histológico | | | | | | |
| ADC | 1,52±0,15 | 13,31±0,98 | 2,72±0,20 | 25,58±1,03 | 4,41±0,43 | 14,17±0,82 |
| CCE | 1,55±0,18 | 10,20±1,23 | 3,01±0,30 | 23,80±1,20 | 4,14±0,60 | 14,63±1,26 |
| CGC | 1,86±0,43 | 7,18±2,62 | 2,57±0,82 | 26,50±2,97 | 4,07±1,43 | 15,85±2,86 |
| Estádio T | | | | | | |
| T1 | 1,19±0,16 | 13,98±1,67 | 2,46±0,34 | 24,47±1,56 | 3,72±0,52 | 15,50±1,41 |
| T2 | 1,76±0,17 | 11,74±1,07 | 2,99±0,25 | 26,15±1,13 | 4,92±0,54 | 13,00±0,82 |
| T3 | 1,23±0,20 | 9,67±1,46 | 2,50±0,31 | 23,44±1,46 | 3,63±0,68 | 16,61±1,91 |
| T4 | 2,43±0,69 | 12,05±2,55 | 3,91±0,28 | 22,83±2,55 | 3,44±0,74 | 14,98±1,54 |
| Estádio N | | | | | | |
| N0 | 1,49±0,13 | 12,31±0,97 | 2,78±0,20 | 25,79±0,93 | 4,41±0,43 | 15,50±0,88 |
| N1 | 1,50±0,28 | 10,69±1,51 | 2,80±0,37 | 23,10±1,52 | 4,41±0,75 | 13,40±1,13 |
| N2 | 1,91±0,35 | 11,84±1,97 | 2,95±0,46 | 24,30±2,33 | 3,59±0,75 | 10,85±1,34*# |
| Estádio Patológico | | | | | | |
| I | 1,35±1,16 | 14,30±1,38 | 2,83±0,34 | 26,90±1,45 | 4,31±0,67 | 14,84±1,27 |
| II | 1,53±0,16 | 10,34±1,08&## | 2,60±0,22 | 24,68±1,12 | 4,63±0,48 | 14,93±0,98 |
| III A | 1,95±0,32 | 11,47±1,57 | 3,38±0,32 | 23,00±1,38 | 3,66±0,59 | 12,65±1,30 |
| Tamanho do tumor | | | | | | |
| ≤3 cm | 1,56±0,19 | 13,72±1,27 | 2,67±0,25 | 25,43±1,17 | 3,84±0,42 | 14,51±0,97 |
| >3 cm | 1,57±0,14 | 10,65±0,92* | 2,90±0,23 | 24,90±1,03 | 4,64±0,50 | 14,48±0,93 |
| Recidiva | | | | | | |
| Não | 1,60±0,16 | 11,71±0,95 | 3,02±0,23 | 25,57±1,05 | 4,21±0,47 | 15,10±0,98 |
| Sim | 1,55±0,20 | 13,19±1,75 | 2,50±0,29 | 23,38±1,47 | 4,40±0,59 | 14,24±1,19 |
| Tratamento adjuvante | | | | | | |
| <i>Quimioterapia</i> | | | | | | |
| Não | 1,56±0,15 | 12,56±1,10 | 2,69±0,24 | 25,58±1,06 | 4,75±0,50 | 15,68±0,89 |
| Sim | 1,51±0,17 | 11,03±1,07 | 2,94±0,24 | 24,48±1,16 | 3,57±0,41& | 12,71±1,04* |
| <i>Radioterapia</i> | | | | | | |
| Não | 1,52±0,14 | 12,00±0,93 | 2,95±0,20 | 24,89±0,93 | 4,40±0,41 | 14,78±0,88 |
| Sim | 1,58±0,19 | 11,70±1,43 | 2,38±0,28 | 25,72±1,47 | 3,86±0,57 | 13,50±0,93 |

*P>0,05; **P>0,01; #N0 vs. N2, P=0,05; &P=0,07; ##Estádio I vs. Estádio II P=0,06. **Abreviaturas:** ADC, adenocarcinoma; CCE, carcinoma de células escamosas; CGC, carcinoma de grandes células; HS, heparan sulfato; SC, sulfato de condroitina; Col I, colágeno tipo I; Col III, colágeno tipo III, Col IV, colágeno tipo IV; Col V, colágeno tipo V.

5.7 Valor prognóstico das variáveis morfométricas

Dos 120 pacientes de nossa coorte, 65 evoluíram para óbito. Em uma análise univariada (**Tabela 7**), a SG para toda a coorte foi significativamente influenciada por: gênero (HR 0,39 para masculino versus feminino, IC 0,20-0,75, $P = 0,004$), estágio T (HR 2,69 para T3-T4 versus T1- T2, CI 1,46 – 4,94, $P = 0,001$), tamanho do tumor (HR 1,95 para $> 3\text{cm}$ versus $\leq 3\text{cm}$, CI 1,08-3,53, $P = 0,026$), metástases (HR 2,98 para presente versus ausente, CI 1,60-5,53, $P = 0,001$) e radioterapia (HR 0,40 para não versus sim, IC 0,21-0,76, $P = 0,005$). Também observamos que as altas expressões de SPARC e WNT3A no estroma do tumor tiveram uma influência significativa na SG (HR 0,55 para expressão alta versus baixa, CI 0,30-1,00, $P = 0,050$; HR 0,54 para expressão alta versus baixa, CI 0,30–0,99, $P = 0,046$; respectivamente).

Por outro lado, em uma análise multivariada, sexo, estágio T, tamanho do tumor, metástases, terapia adjuvante e SPARC foram significativamente associados com a SG, enquanto a alta expressão de HS teve apenas uma associação marginal com a SG ($P = 0,055$). WNT3A e WNT5A foram covariáveis neste modelo matemático (Qui-quadrado 33,223; $P < 0,001$). A SG média foi de 97 meses para pacientes com expressão SPARC $>14,25\%$ em comparação com 65 meses para pacientes com expressão $\leq 14,25\%$ (**Figura 24**).

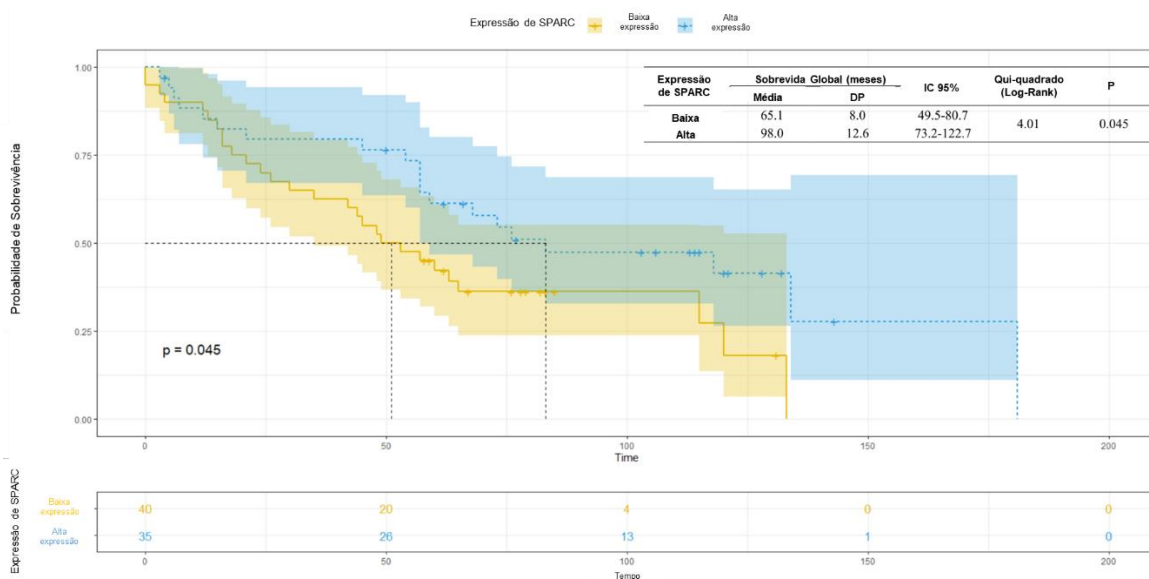


Figura 24. Curva de sobrevivência para expressão SPARC. A linha azul representa a alta expressão de SPARC e a linha amarela a baixa expressão de SPARC.

Tabela 7. Variáveis associadas à sobrevida global em 120 pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas. A análise univariada e multivariada empregou um modelo de riscos proporcionais de Cox (Qui-quadrado 33,223; P<0,001).

| Variáveis | Média SG (meses) | Análise univariada ^a | | | Análise multivariada ^b | |
|--------------------------------|---------------------|---------------------------------|--------|--------------|-----------------------------------|--------------|
| | | HR (95% IC) | HR | P | HR (95% IC) | P |
| Idade (anos, mediana) | | | | | | |
| ≤ 65 (referência) | 74 | | | | | |
| > 65 | 82 | 0,96 (0,54-1,71) | -0,039 | 0,895 | | |
| Gênero | | | | | | |
| Masculino (referência) | 59 | | | | | |
| Feminino | 107 | 0,39 (0,20-0,75) | -0,942 | 0,004 | 0,39(0,17-0,90) | 0,028 |
| Tabagismo | | | | | | |
| Não fumante (referência) | 95 | | | | | |
| Fumante/EX-fumante | 84 | 1,38(0,67-2,89) | 0,327 | 0,382 | | |
| Subtipo histológico | | | | | | |
| Adenocarcinoma (referência) | 83 | | | 0,245 | | |
| Carcinoma de células escamosas | 74 | 1,65(0,89-3,09) | 0,498 | 0,120 | | |
| Carcinoma de grandes células | 60 | 1,88(0,45-7,94) | 0,633 | 0,389 | | |
| Estádio T† | | | | | | |
| T1+T2 (referência) | 97 | | | | | |
| T3+T4 | 45 | 2,69(1,46-4,94) | 0,989 | 0,001 | 2,14(1,03-4,74) | 0,041 |
| Estádio N† | | | | | | |
| N0 (referência) | 85 | | | 0,497 | | |
| N1 | 55 | 1,63(0,71-3,70) | 0,486 | 0,247 | | |
| N2 | 75 | 0,992(0,45-2,16) | -0,008 | 0,983 | | |
| Estádio Patológico† | | | | | | |
| I+II (referência) | 87 | | | | | |
| III | 66 | 1,35(0,71-2,58) | 0,301 | 0,362 | | |
| Tamanho do tumor | | | | | | |
| ≤ 3 cm (referência) | 100 | | | | | |
| > 3 cm | 61 | 1,95(1,08-3,53) | 0,669 | 0,026 | 3,65(1,58-8,40) | 0,002 |
| Recidiva | | | | | | |
| Ausente (referência) | 99 | | | | | |
| Presente | 48 | 2,98(1,60-5,53) | 1,091 | 0,001 | 2,65(1,27-5,51) | 0,009 |
| Terapia adjuvante | | | | | | |
| Quimioterapia | | | | | | |
| Sim (referência) | 64 | | | | | |
| Não | 91 | 0,62(0,35-1,11) | -0,469 | 0,110 | 4,61(1,74-12,20) | 0,002 |
| Radioterapia | | | | | | |
| Sim (referência) | 45 | | | | | |
| Não | 91 | 0,40(0,21-0,76) | -0,906 | 0,005 | 0,22(0,08-0,59) | 0,003 |

Tabela 7 (continuação). Variáveis associadas à sobrevida global em 120 pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas. A análise univariada e multivariada empregou um modelo de riscos proporcionais de Cox (Qui-quadrado 33,223; P<0,001).

| Expressão protéica | | | | | | | |
|--------------------------------|----|-----------------|--------|--------------|------------------|--|--------------|
| (≤ média vs > média) | | | | | | | |
| Heparan Sulfato | | | | | | | |
| ≤ 1.55% (referência) | 72 | | | | | | |
| > 1.55% | 91 | 0.77(0.42-1.41) | -0.258 | 0.402 | 0.44(0.19-1.02) | | 0.055 |
| Sulfato de Condroitina | | | | | | | |
| ≤ 11.92% (referência) | 85 | | | | | | |
| > 11.92% | 74 | 1.02(0.57-1.82) | 0.022 | 0.941 | | | |
| Col I | | | | | | | |
| ≤ 2.81% (referência) | 78 | | | | | | |
| > 2.81% | 78 | 1.12(0.62-2.01) | 0.114 | 0.703 | | | |
| Col III | | | | | | | |
| ≤ 25.04% (referência) | 81 | | | | | | |
| > 25.04% | 77 | 0.92(0.52-1.64) | -0.080 | 0.786 | | | |
| Col IV | | | | | | | |
| ≤ 4.30% (referência) | 86 | | | | | | |
| > 4.30% | 67 | 1.30(0.70-2.42) | 0.264 | 0.405 | | | |
| Col V | | | | | | | |
| ≤ 14.42% (referência) | 72 | | | | | | |
| > 14.42% | 87 | 0.83(0.46-1.49) | -0.184 | 0.535 | | | |
| E-caderina | | | | | | | |
| ≤ 23.99% (referência) | 91 | | | | | | |
| > 23.99% | 71 | 1.35(0.75-2.44) | 0.300 | 0.320 | | | |
| β-catenina | | | | | | | |
| ≤ 21.25% (referência) | 87 | | | | | | |
| > 21.25% | 77 | 1.08(0.60-1.93) | 0.076 | 0.799 | | | |
| WNT1 | | | | | | | |
| ≤ 13.55% (referência) | 85 | | | | | | |
| > 13.55% | 73 | 1.11(0.62-2.00) | 0.108 | 0.715 | | | |
| WNT3A | | | | | | | |
| ≤ 19.17% (referência) | 61 | | | | | | |
| > 19.17% | 97 | 0.54(0.30-0.99) | -0.612 | 0.046 | 1.44(0.69-3.01) | | 0.334 |
| WNT5A | | | | | | | |
| ≤ 42.48% (referência) | 88 | | | | | | |
| > 42.48% | 68 | 1.36(0.73-2.51) | 0.306 | 0.329 | 0.768(0.35-1.66) | | 0.501 |
| WNT5B | | | | | | | |
| ≤ 3.75% (referência) | 80 | | | | | | |
| > 3.75% | 77 | 0.97(0.54-1.73) | -0.034 | 0.908 | | | |
| SPARC | | | | | | | |
| ≤ 14.25% (referência) | 65 | | | | | | |
| > 14.25% | 98 | 0.55(0.30-1.00) | -0.601 | 0.050 | 0.31(0.13-0.75) | | 0.009 |

^b A análise univariada foi realizada sem nenhum ajuste para gerar razões de risco com intervalos de confiança de risco individual para cada um dos parâmetros de sobrevida. ^c A análise multivariada foi realizada para analisar os efeitos de vários parâmetros de risco na sobrevida. [†] De acordo com a 8ª Edição da Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão [63]. Abreviaturas: SG, sobrevida global; HR, Hazard Ratio (coeficiente β); IC, Intervalo de Confiança; Col I, colágeno tipo I; Col III, colágeno tipo III; Col IV, colágeno tipo IV; Col V, colágeno tipo V.

5.8 Validação do estudo de coorte por mineração de dados *in silico*

5.8.1 Expressão de mRNA e proteínas

Para criar uma possibilidade de comparação entre nossos dados, amostras normais e outros resultados, usamos a plataforma UALCAN para analisar o banco de dados TCGA e obter níveis de expressão de mRNA de nossos marcadores de interesse (exceto para os GAGs, como previamente citado em nossa metodologia), em ADC e CCE. O banco de dados não incluía dados para CGC até o momento do presente estudo.

Em comparação com tecidos normais, em ADC (**Figura 25**) os níveis de expressão de mRNA de E-caderina, β -catenina, Col I, Col III, Col IV, WNT1 e WNT5B mostraram regulação positiva significativa ($P < 0,01$, para todos os marcadores citados), enquanto o nível de expressão de mRNA de WNT3A mostrou regulação negativa significativa ($P < 0,01$) quando comparado ao tecido normal.

Para CCE (**Figura 26**), os níveis de expressão mRNA de E-caderina, Col I, Col III, Col V, WNT5A e WNT5B mostraram regulação positiva significativa ($P < 0,01$, para todos os marcadores citados) e apenas o nível de expressão de mRNA de WNT3A mostrou regulação negativa significativa ($P < 0,01$) quando comparado ao tecido normal.

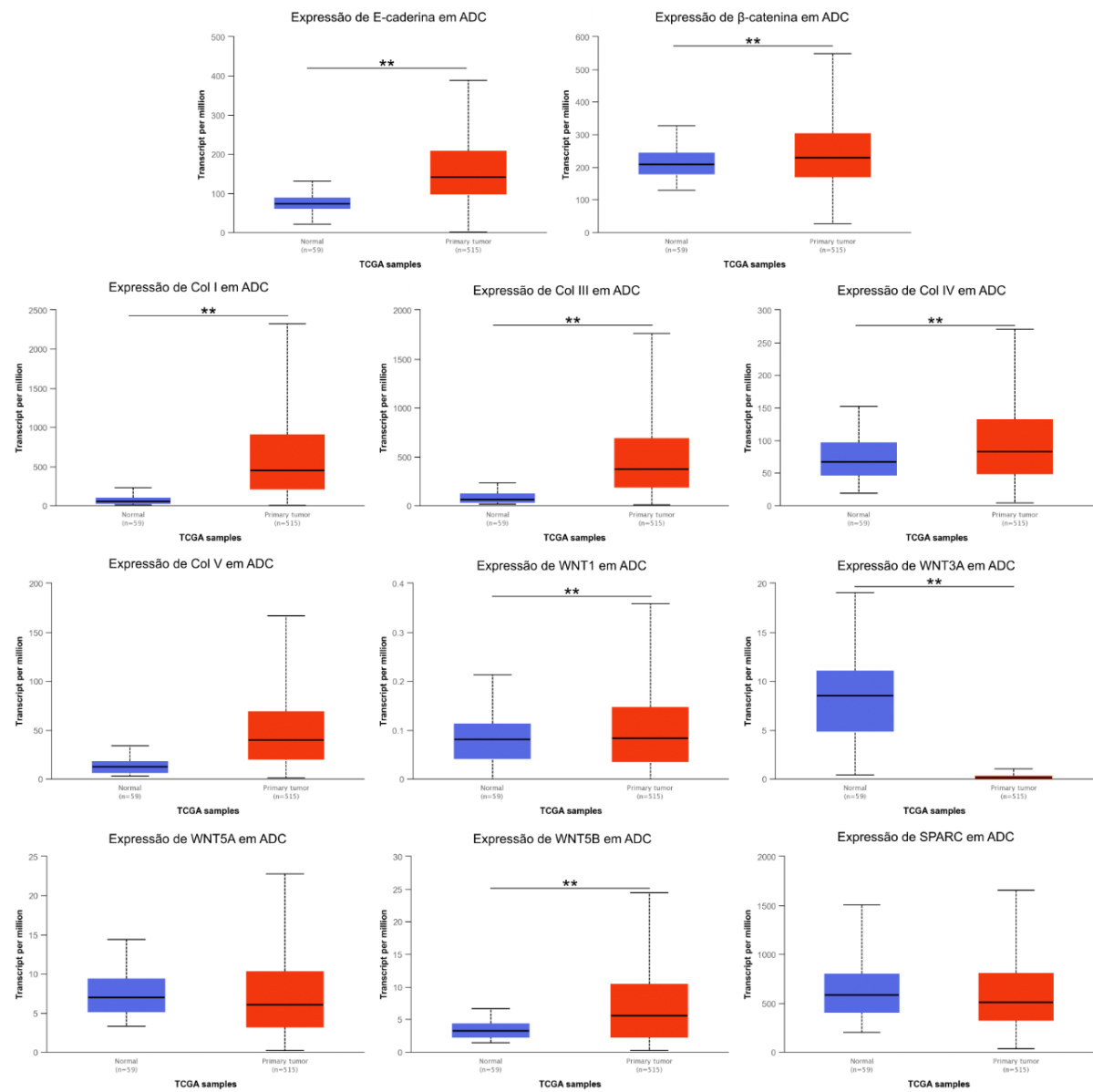


Figura 25. Expressão de mRNA dos marcadores de interesse em adenocarcinoma pulmonar a partir de dados obtidos do “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA). **P<0,01. Abreviaturas: ADC, adenocarcinoma pulmonar; Col, tipo de colágeno.

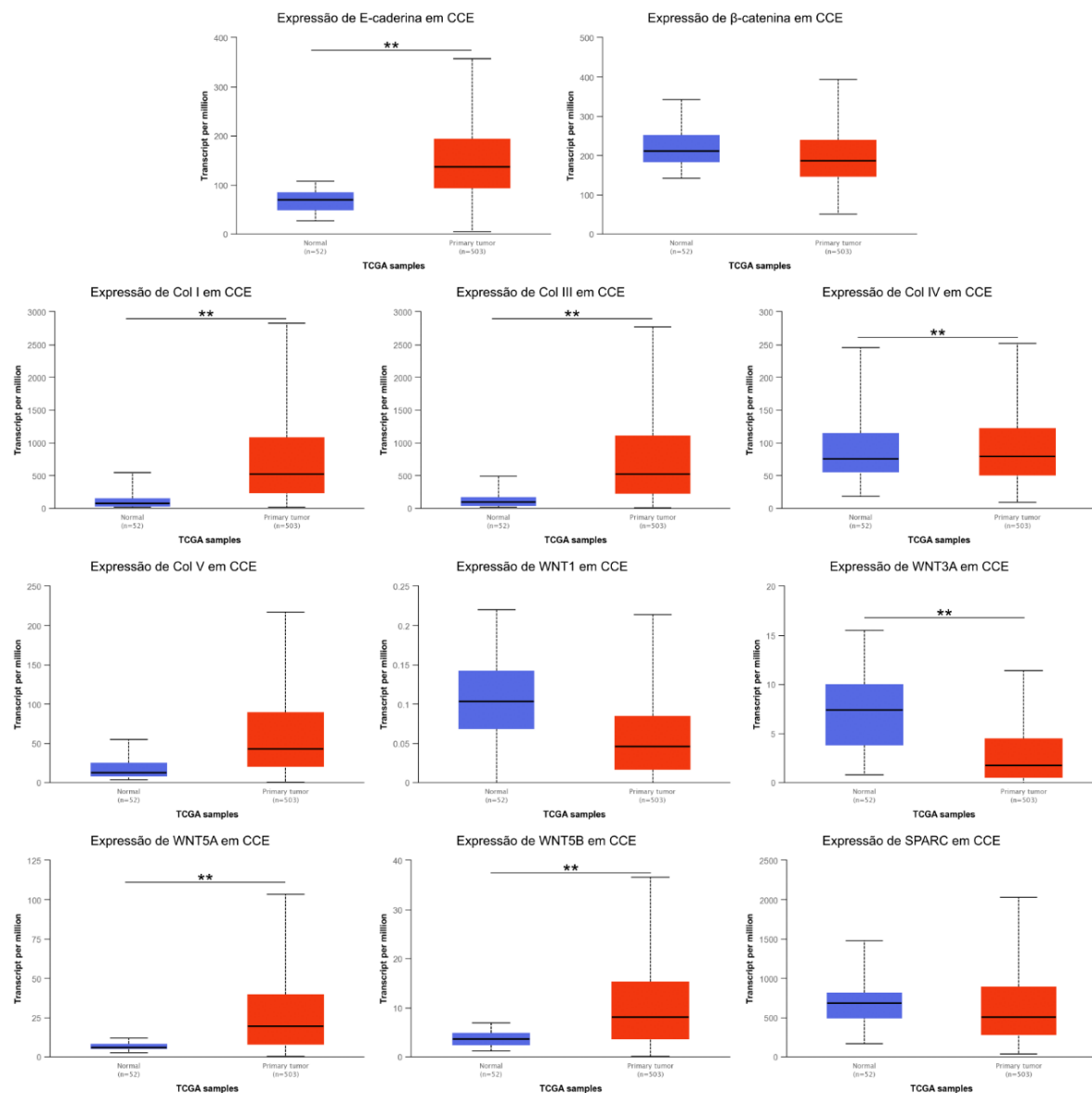


Figura 26. Expressão de mRNA dos marcadores de interesse em no carcinoma de células escamosas do pulmão a partir de dados obtidos do “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA). ** $P < 0,01$. Abreviaturas: CCE, carcinoma de células escamosas; Col, tipo de colágeno.

Usamos a mesma plataforma para analisar dados de expressão de proteínas do *Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium* (CPTAC). Até o momento deste estudo, o banco de dados do CPTAC continha apenas amostras de ADC, mas incluía dados sobre a maioria das moléculas exploradas em nosso estudo, exceto WNT1, WNT3A e WNT5B. Em comparação com tecidos normais, E-caderina, Col I, Col III, Col V, WNT5A e SPARC mostraram superexpressão significativa ($P < 0,01$, exceto SPARC, $P = 0,02$; **Figura 27**), enquanto β -catenina, HS, CS e Col IV mostraram subexpressão significativa ($P < 0,01$; **Figura 27**).

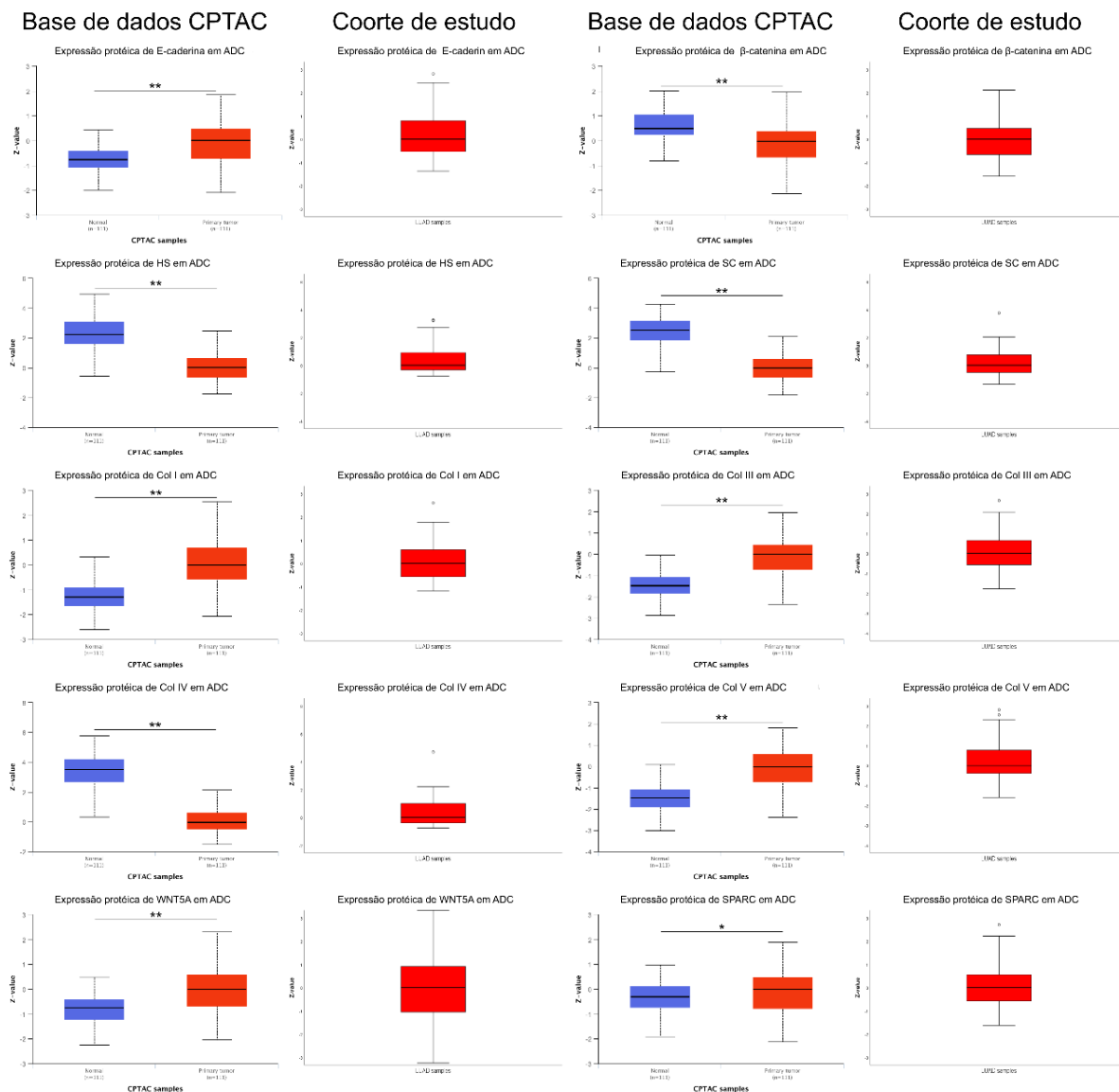


Figura 27. Expressão das proteínas de interesse no adenocarcinoma a partir de dados obtidos do *Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium* (CPTAC). * $P<0,05$, ** $P<0,01$. Abreviaturas: ADC, adenocarcinoma pulmonar; HS, sulfato de heparano; SC, sulfato de condroitina; Col, tipo de colágeno.

Consistente com nossos dados, os resultados das proteínas E-caderina, Col I, Col III, Col V, WNT5A e SPARC foram superexpressos em ADC, enquanto β-catenina, HS, CS e Col IV foram subexpressos.

5.8.2 Associação entre expressão e parâmetros clínico-patológicos

Usando os dados do TCGA (Pan Cancer Atlas), coletamos dados do cBio Cancer Genomics Portal, que incluiu dados clínicos de 939 pacientes com ADC e CCE nos estádios patológicos I a IIIA, como nossa coorte. Também coletamos a expressão de mRNA de todos os nossos marcadores de interesse para esse mesmo grupo de indivíduos.

Ao correlacionar esses dados, notamos associação entre gênero e expressão de β -catenina, WNT1, WNT3A, WNT5A e WNT5B; e uma diferença significativa entre os histótipos e a expressão de β -catenina, WNT1, WNT3A, WNT5A e WNT5B. Também observamos uma diferença significativa entre a expressão de WNT1 e estágio T2 e estágio N1. Nos pacientes que desenvolveram metástase durante o seguimento, observamos uma diferença significativa entre a expressão de β -catenina, WNT3A e WNT5A. Não encontramos diferença estatística entre outras características clínico-patológicas e a expressão desses marcadores (**Tabela 8**).

Utilizando a mesma análise para os marcadores de estoma, observamos uma diferença significativa entre os histótipos e a expressão de Col III. Não encontramos diferenças significativas entre nenhuma outra característica clínico-patológica e a expressão desses marcadores (**Tabela 9**).

Tabela 8. Características clinicopatológicas e expressão média de mRNA de E-caderina, β -catenina, proteínas de sinalização WNTs e SPARC (banco de dados TCGA, N = 939; teste qui-quadrado, P <0,05).

| Características | E-caderina | | P | β -catenina | | P | WNT1 | | P | WNT3A | | P | WNT5A | | P | WNT5B | | P | SPARC | | P |
|--|------------|-------|------|-------------------|-------|------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|------|
| | Baixa | Alta | | Baixa | Alta | | Baixa | Alta | | Baixa | Alta | | Baixa | Alta | | Baixa | Alta | | Baixa | Alta | |
| Idade (anos)^a | | | 0,98 | | | 0,13 | | | 0,79 | | | 0,08 | | | 0,62 | | | 0,15 | | | 0,24 |
| ≤65 | 21,7% | 21,4% | | 20,5% | 22,6% | | 21,4% | 21,7% | | 22,9% | 20,2% | | 21,7% | 21,4% | | 22,6% | 20,5% | | 22,4% | 20,7% | |
| >65 | 28,6% | 28,3% | | 29,9% | 26,9% | | 28,7% | 28,2% | | 26,9% | 29,9% | | 27,7% | 29,2% | | 27,1% | 29,8% | | 27,3% | 29,6% | |
| Gênero^a | | | 0,69 | | | 0,002 | | | 0,01 | | | <0,001 | | | 0,005 | | | 0,04 | | | 0,60 |
| Masculino | 30,0% | 29,2% | | 32,0% | 27,2% | | 31,6% | 27,6% | | 25,9% | 33,3% | | 27,3% | 31,9% | | 27,8% | 31,4% | | 30,1% | 29,1% | |
| Feminino | 20,0% | 20,8% | | 17,8% | 22,9% | | 18,3% | 22,5% | | 24,2% | 16,6% | | 22,7% | 18,1% | | 22,0% | 18,7% | | 19,9% | 20,9% | |
| Subtipo histológico^a | | | 0,60 | | | <0,001 | | | <0,001 | | | <0,001 | | | <0,001 | | | <0,001 | | | 0,90 |
| ADC | 24,8% | 25,8% | | 19,4% | 31,1% | | 19,6% | 30,9% | | 39,1% | 11,5% | | 36,8% | 13,7% | | 28,9% | 21,7% | | 25,4% | 25,1% | |
| CCE | 25,2% | 24,2% | | 30,6% | 18,9% | | 30,4% | 19,1% | | 10,9% | 38,5% | | 13,2% | 36,3% | | 21,1% | 28,3% | | 24,6% | 24,9% | |
| Estádio T^a | | | 0,47 | | | 0,24 | | | 0,001 | | | 0,72 | | | 0,77 | | | 0,96 | | | 0,68 |
| T1 | 15,3% | 13,5% | | 15,5% | 13,3% | | 11,5% | 17,3% | | 15,1% | 13,8% | | 14,8% | 14,0% | | 14,1% | 14,7% | | 15,2% | 13,7% | |
| T2 | 27,4% | 30,0% | | 27,0% | 30,4% | | 31,3% | 26,1% | | 28,5% | 28,9% | | 28,3% | 29,1% | | 28,8% | 28,6% | | 27,7% | 29,7% | |
| T3 | 6,6% | 5,8% | | 6,7% | 5,7% | | 6,5% | 5,9% | | 6,0% | 6,3% | | 6,3% | 6,0% | | 6,3% | 6,0% | | 6,3% | 6,0% | |
| T4 | 0,8% | 0,6% | | 0,8% | 0,6% | | 0,6% | 0,8% | | 0,5% | 0,9% | | 0,5% | 0,9% | | 0,6% | 0,8% | | 0,8% | 0,6% | |
| Estádio N^a | | | 0,32 | | | 0,68 | | | 0,03 | | | 0,41 | | | 0,06 | | | 0,59 | | | 0,85 |
| N0 | 34,2% | 32,5% | | 33,3% | 33,5% | | 31,7% | 35,0% | | 33,0% | 33,7% | | 33,4% | 33,4% | | 32,4% | 34,4% | | 33,6% | 33,2% | |
| N1 | 10,9% | 11,6% | | 11,3% | 11,1% | | 13,1% | 9,4% | | 11,1% | 11,3% | | 10,1% | 12,3% | | 11,5% | 11,0% | | 11,0% | 11,5% | |
| N2 | 4,7% | 6,1% | | 4,9% | 5,9% | | 5,3% | 5,5% | | 6,1% | 4,7% | | 6,4% | 4,4% | | 5,8% | 5,0% | | 5,7% | 5,1% | |
| Estádio Patológico^a | | | 0,29 | | | 0,53 | | | 0,08 | | | 0,82 | | | 0,60 | | | 0,89 | | | 0,73 |
| I | 28,8% | 26,3% | | 27,4% | 27,7% | | 25,6% | 29,6% | | 27,6% | 27,5% | | 26,8% | 28,4% | | 27,2% | 27,9% | | 27,0% | 28,2% | |
| II | 14,2% | 15,7% | | 15,6% | 14,3% | | 16,1% | 13,9% | | 14,7% | 15,3% | | 15,3% | 14,7% | | 15,1% | 14,9% | | 15,3% | 14,7% | |
| IIIa | 6,9% | 8,0% | | 6,9% | 8,0% | | 8,1% | 6,8% | | 7,8% | 7,1% | | 7,9% | 7,0% | | 7,7% | 7,2% | | 7,8% | 7,1% | |
| Recidiva^a | | | 0,23 | | | 0,02 | | | 0,23 | | | 0,009 | | | <0,001 | | | 0,82 | | | 0,82 |
| Não | 31,5% | 34,1% | | 35,5% | 30,1% | | 32,7% | 32,9% | | 30,8% | 34,8% | | 29,2% | 36,4% | | 31,7% | 33,9% | | 33,1% | 32,5% | |
| Sim | 18,1% | 16,3% | | 15,5% | 18,8% | | 15,5% | 18,8% | | 19,6% | 14,8% | | 20,6% | 13,8% | | 16,9% | 17,4% | | 17,1% | 17,3% | |
| Radioterapia^a | | | 0,91 | | | 0,91 | | | 0,24 | | | 0,14 | | | 0,67 | | | 0,34 | | | 0,46 |
| Sim | 5,8% | 6,3% | | 6,0% | 6,0% | | 5,3% | 6,7% | | 6,9% | 5,2% | | 6,3% | 5,8% | | 6,5% | 5,5% | | 6,5% | 5,5% | |
| Não | 43,1% | 44,8% | | 44,7% | 43,3% | | 44,2% | 43,8% | | 42,9% | 45,1% | | 43,4% | 44,6% | | 42,8% | 45,2% | | 43,8% | 44,2% | |
| Status^a | | | 0,95 | | | 0,84 | | | 0,74 | | | 0,74 | | | 0,46 | | | 0,20 | | | 0,84 |
| Vivo | 30,8% | 31,0% | | 31,1% | 30,7% | | 30,6% | 31,2% | | 31,2% | 30,6% | | 30,3% | 31,5% | | 29,8% | 32,0% | | 31,1% | 30,7% | |
| Morto | 19,2% | 19,0% | | 18,9% | 19,3% | | 19,4% | 18,8% | | 18,8% | 19,4% | | 19,7% | 18,5% | | 20,2% | 18,0% | | 18,9% | 19,3% | |

^aAlguns casos faltam dados: Idade (37); Gênero (9); Subtipo histológico (7); estágio T (9); estágio N (22); Estádio patológico (12); Recidiva (148); Radioterapia (107); Status (7). Abreviaturas: ADC, adenocarcinoma; CCE, carcinoma de células escamosas.

Tabela 9. Características clinicopatológicas e expressão média de mRNA de colágeno tipos I, III, IV e V (banco de dados TCGA, N=939; teste qui-quadrado, P<0,05)

| Características | Col I | | P | Col III | | P | Col IV | | P | Col V | | P |
|--|-------|-------|------|---------|-------|--------|--------|-------|------|-------|-------|------|
| | Baixa | Alta | | Baixa | Alta | | Baixa | Alta | | Baixa | Alta | |
| Idade (anos)^a | | | 0,79 | | | 0,08 | | | 0,62 | | | 0,15 |
| ≤65 | 21,4% | 21,7% | | 22,9% | 20,2% | | 21,7% | 21,4% | | 22,6% | 20,5% | |
| >65 | 28,7% | 28,2% | | 26,9% | 29,9% | | 27,7% | 29,2% | | 27,1% | 29,8% | |
| Gênero^a | | | 0,51 | | | 0,35 | | | 0,95 | | | 1,00 |
| Masculino | 29,0% | 30,2% | | 28,8% | 30,4% | | 29,5% | 29,8% | | 29,7% | 29,6% | |
| Feminino | 21,0% | 19,8% | | 21,2% | 19,6% | | 20,4% | 20,3% | | 20,3% | 20,4% | |
| Subtipo histológico^a | | | 0,36 | | | <0,001 | | | 0,29 | | | 0,15 |
| ADC | 26,1% | 24,5% | | 28,5% | 22,0% | | 24,4% | 26,2% | | 26,5% | 23,5% | |
| CCE | 23,9% | 25,5% | | 21,5% | 28,0% | | 25,6% | 23,8% | | 24,0% | 26,0% | |
| Estádio T^a | | | 0,40 | | | 0,23 | | | 0,14 | | | 0,52 |
| T1 | 15,6% | 13,2% | | 15,9% | 12,9% | | 15,3% | 13,5% | | 15,2% | 13,7% | |
| T2 | 28,0% | 29,5% | | 27,4% | 30,0% | | 28,7% | 28,7% | | 28,3% | 29,1% | |
| T3 | 5,7% | 6,7% | | 5,9% | 6,5% | | 5,1% | 7,3% | | 5,7% | 6,7% | |
| T4 | 0,8% | 0,6% | | 0,8% | 0,6% | | 0,9% | 0,5% | | 0,9% | 0,5% | |
| Estádio N^a | | | 0,15 | | | 0,28 | | | 0,39 | | | 0,85 |
| N0 | 34,7% | 32,1% | | 34,4% | 32,4% | | 34,4% | 32,4% | | 33,4% | 33,4% | |
| N1 | 9,9% | 12,5% | | 10,1% | 12,3% | | 10,4% | 12,1% | | 11,0% | 11,5% | |
| N2 | 5,5% | 5,3% | | 5,6% | 5,2% | | 5,2% | 5,6% | | 5,7% | 5,1% | |
| Estádio patológico^a | | | 0,14 | | | 0,27 | | | 0,25 | | | 0,64 |
| I | 29,1% | 26,0% | | 28,8% | 26,3% | | 28,8% | 26,3% | | 28,0% | 27,1% | |
| II | 13,7% | 16,3% | | 13,9% | 16,1% | | 14,2% | 15,7% | | 14,2% | 15,7% | |
| IIIA | 7,1% | 7,8% | | 7,2% | 7,7% | | 6,8% | 8,1% | | 7,6% | 7,3% | |
| Recidiva^a | | | 0,60 | | | 0,77 | | | 0,18 | | | 0,33 |
| Não | 31,2% | 34,4% | | 32,0% | 33,6% | | 33,1% | 32,5% | | 30,8% | 34,8% | |
| Sim | 17,1% | 17,3% | | 17,2% | 17,2% | | 15,5% | 18,8% | | 17,4% | 16,9% | |
| Radioterapia^a | | | 0,17 | | | 0,34 | | | 0,39 | | | 0,29 |
| Sim | 6,6% | 5,4% | | 6,5% | 5,5% | | 5,3% | 6,7% | | 6,5% | 5,5% | |
| Não | 41,6% | 46,4% | | 42,8% | 45,2% | | 42,9% | 45,1% | | 42,1% | 45,9% | |
| Status^a | | | 0,20 | | | 0,54 | | | 0,31 | | | 0,74 |
| Vivo | 32,0% | 29,8% | | 31,4% | 30,4% | | 31,8% | 30,0% | | 31,2% | 30,6% | |
| Morto | 18,0% | 20,2% | | 18,6% | 19,6% | | 18,2% | 20,0% | | 18,8% | 19,4% | |

^aAlguns casos faltam dados: Idade (37); Gênero (9); Subtipo histológico (7); estágio T (9); estágio N (22); Estádio patológico (12); Recidiva (148); Radioterapia (107); Status (7). Abreviaturas: ADC, adenocarcinoma; CCE, carcinoma de células escamosas; Col I, colágeno tipo I; Col III, colágeno tipo III, Col IV, colágeno tipo IV; Col V, colágeno tipo V.

5.8.3 Valor prognóstico dos GAGs, SPARC, marcadores de TEM e tipos de colágeno

Usamos a análise no Kaplan-Meier plotter para encontrar a correlação entre os níveis de expressão e SG em pacientes com CPNPC para todos os marcadores analisados em nosso estudo (Figura 28).

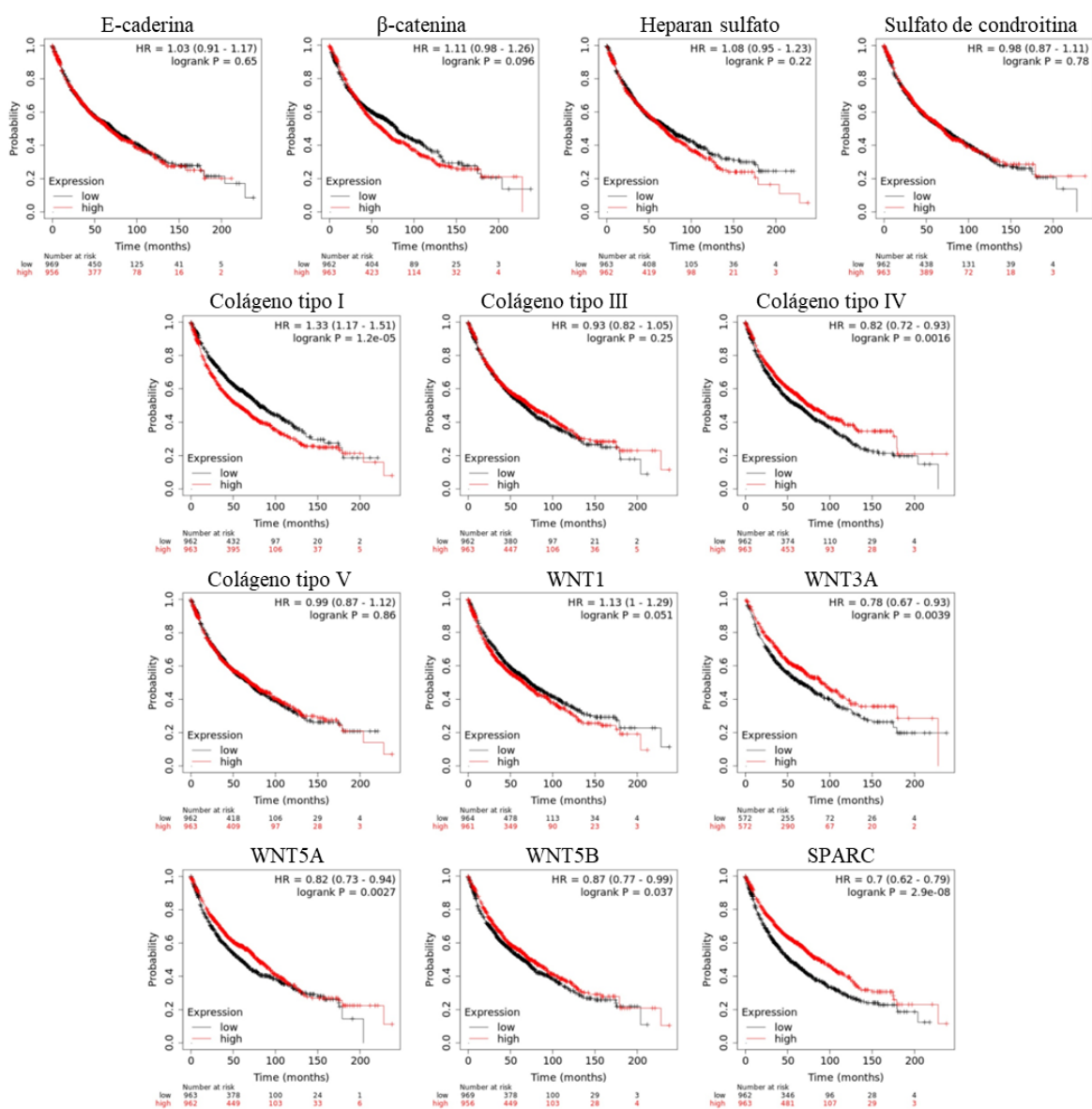


Figura 28. Curvas de Kaplan Meier para nossos marcadores de interesse obtidas na base de dados KM-Plotter. A linha preta representa uma baixa expressão do marcador e a linha vermelha, a alta expressão.

Definimos o corte para expressão alta ou baixa usando a expressão mediana do grupo (dados não paramétricos). Como mostrado na **Figura 28**, pacientes com alta expressão de Col IV, WNT3A, WNT5A, WNT5B e SPARC tiveram SG mais longa ($P < 0,05$). Por outro lado, a baixa expressão de Col I e WNT1 correlacionou-se com SG mais longa ($P \leq 0,05$). Não encontramos efeito de significância estatística de E-caderina, β -catenina, HS, CS, Col III e Col V na SG.

5.8.4 Interação biológica entre GAGs, SPARC, marcadores de TEM e tipos de colágeno

Diante do exposto, nosso próximo passo foi realizar uma análise de enriquecimento funcional usando o banco de dados STRING, uma ferramenta de busca para interação de proteínas, para encontrar uma rede significativa de interação proteína-proteína (PPI). A **Figura 29** mostra a organização molecular desta rede. A rede é feita de nós conectados diferencialmente, cada nó representa uma proteína e as arestas representam suas interações dinâmicas. O valor-P do enriquecimento PPI foi $<1,0e-16$. Isso mostra que essas proteínas estão, pelo menos parcialmente, conectadas biologicamente como um grupo.

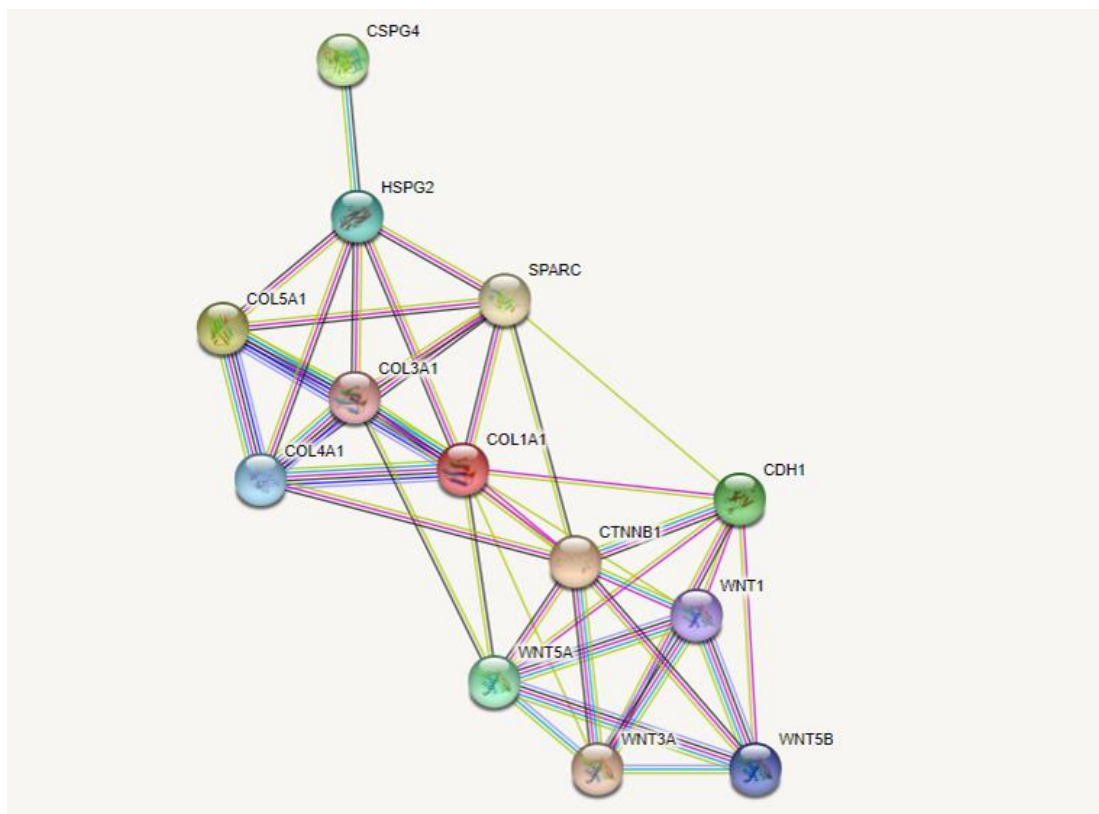


Figura 29. Rede de interação proteína-proteína obtida na ferramenta STRING para nossas proteínas de interesse.

Também realizamos uma análise no Metascape para avaliar a função e o processo biológico dos genes correspondentes às proteínas de nosso interesse. A **Figura 30A** mostra o *heatmap* de termos enriquecidos nas listas de genes de entrada. Os principais termos observados foram: "transição epitelial para mesenquimal no câncer colorretal", "proteoglicanos da MEC" e "proteoglicanos no câncer". A **Figura 30B** mostra a rede formada por esses termos enriquecidos. A **Figura 30C** mostra os processos biológicos de *Gene Ontology* de nível superior. Os termos estatisticamente mais significativos dentro desse grupo foram "processo de desenvolvimento", "sinalização", "resposta ao estímulo" e "processo celular".

Tomados em conjunto, esses resultados *in silico* sugerem uma forte integração entre nossas proteínas de interesse e processos celulares fundamentais na carcinogênese, o que confirma nossos resultados experimentais.

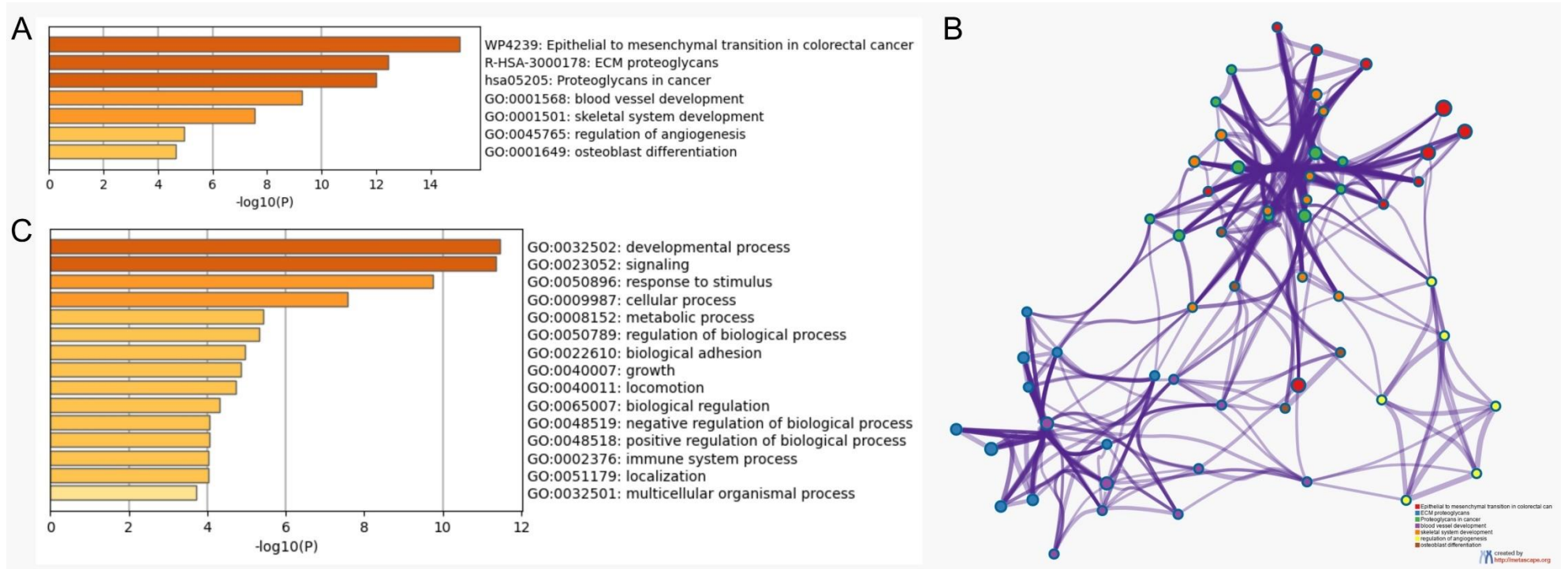


Figura 30. Análise de enriquecimento Metascape. (A) Termos enriquecidos nas listas de genes de entrada. (B) Rede formada por esses termos enriquecidos. (C) Processos biológicos estavam envolvidos na lista de genes colorida de acordo com o valor de P.

6 DISCUSSÃO

No cenário de nossa coorte de estudo, as metástases loco-regionais e distantes não previstas pelo estágio TNM e a classificação histológica são as possíveis razões para falhas de ressecção cirúrgica na cura de alguns pacientes com CPNPC em estágio inicial. A questão de interesse é se as informações auxiliares coletadas das células tumorais ou de seu estroma tumoral podem nos ajudar a melhorar a estratificação de risco e a seleção de pacientes para tratamento sistêmico adjuvante. O desenvolvimento da invasão de células cancerígenas e metástases certamente abrange uma série de estágios complexos e sequenciais. Entre eles estão o TEM, a perda das membranas basais e o remodelamento das barreiras da matriz extracelular intersticial pelas células tumorais. Esses processos são considerados importantes porque o microambiente pulmonar reprogramado pelo tumor promove tanto tumores pulmonares primários quanto metástases, contribuindo principalmente para barreiras mecânicas e funcionais [72]. A perda dessas barreiras facilita a migração das células tumorais e a penetração do tumor pelos vasos sanguíneos [86, 206-208]. Outras glicoproteínas importantes também presentes no câncer de pulmão são as WNTs e a SPARC. Essas glicoproteínas atuam no remodelamento da matriz extracelular e da TEM e proporcionam crescimento tumoral e metástase [188-190, 210].

Portanto, para entender a relação entre TEM, barreiras matricelulares e o processo metastático, realizamos análises passo a passo. Primeiro usamos IHC, IF e MET para caracterizar as proteínas da TEM, glicosaminoglicanos, tipos de colágeno, proteínas SPARC e WNT nos subtipos histológicos ADC, CCE e CGC. Em seguida, examinamos a associação clínica entre esses marcadores e os dados de 120 pacientes com CPNPC removidos cirurgicamente. Posteriormente, analisamos o impacto desses marcadores na sobrevida dos pacientes. Por fim, validamos os dados de nossa coorte do estudo usando dados *in silico*. Embora uma das principais limitações de nosso estudo seja o pequeno número de casos de CPNPC usados, os dados obtidos por IHC, IF e MET e a análise de imagem aplicada visam minimizar essa limitação. Assim, fornecemos novas evidências de que as células de CPNPC podem expressar proteínas da TEM e proteínas matricelulares com conhecida função de barreira mecânica. A expressão dessas proteínas está associada tanto à via Wnt quanto a uma sobrevida global significativamente mais longa do paciente. Também descobrimos que há forte integração entre nossas proteínas de interesse, e que sua expressão/comportamento presentes nos dados em grandes bancos de dados é semelhante ao que obtivemos neste trabalho e atuam em processos celulares fundamentais na carcinogênese.

Enquanto a maioria dos estudos avalia a progressão do CPNPC por perda de genes supressores de tumor e/ou ativação de oncogenes [210], descrevemos a progressão do CPNPC durante as alterações fenotípicas da TEM, tornando as células tumorais invasivas e capazes de metastatizar órgãos distantes. Outra principal característica inovadora de nosso estudo foi a descrição da relação entre componentes TEM-MEC-via de sinal Wnt com subtipos histológicos, estágio TNM e sobrevida. Ao longo de nosso estudo, mostramos que, durante o processo de TEM, a baixa expressão de E-caderina e β -catenina criou uma barreira deficiente da porção tumoral contra a invasão tumoral. A sinalização Wnt, principalmente a através da WNT5A, e a glicoproteína SPARC potencializaram essa barreira e facilitaram a progressão do tumor.

Também descobrimos que os GAGs associados a tumores e barreiras mecânicas de colágeno reforçaram as barreiras funcionais entre TEM, proteínas WNT e células malignas. As barreiras mecânicas de colágeno correspondem a diferentes níveis de HS, SC e fibras de colágeno, que se reorganizam para localizar e caracterizar as células malignas. Nesse cenário, inferimos que o SC, Col III e Col V também têm uma grande chance de criar uma barreira mecânica contra células malignas e impedir a invasão da MEC intersticial. É importante ressaltar que a alta expressão de WNT1, SC e Col V foi associada a tumores nos estádios I e N0-N1. Esses achados sugerem que o aumento da expressão desses marcadores ocorre em estágios iniciais da carcinogênese, que diminui com o crescimento do tumor. Portanto, esses marcadores surgem como promissores para decisões terapêuticas antes da cirurgia. Além disso, também observamos a influência direta e indireta de WNT3A, WNT5A, HS e SPARC na sobrevida global de pacientes com CPNPC em estágio inicial. Essa influência mostra que existe uma regulação relevante entre esses componentes na progressão tumoral. No entanto, existem alguns pontos importantes que precisam ser abordados, conforme discutido abaixo.

A primeira questão a ser abordada é a importância das alterações fenotípicas do tipo TEM para a interação entre a matriz de colágeno e as células malignas. Observamos que a intensidade de espalhamento foi maior em células malignas TEM-positivas de CCE e ADC em comparação com CGC, para promover a invasão da MEC por células malignas individuais, no caso de CGC, e por grupos de células no caso de ADC e CCE. Assim, esses achados descrevem uma TEM parcial - por exemplo, um TEM híbrida [211, 212] - como o fenótipo imunológico hierárquico predominante no CCE e ADC do pulmão em comparação com o CGC. Isso sugere a noção emergente de que uma TEM parcial, mas não necessariamente uma TEM completa, está associada à progressão tumoral agressiva [213]. Conforme relatado recentemente, não há transição mesenquimal em um TEM híbrida, pois as células tumorais retêm a E-caderina [214]. Isso poderia explicar a alta expressão de E-caderina encontrada em nosso trabalho,

principalmente em CCE e ADC. Também observamos uma forte correlação entre as proteínas de TEM e WNT5A. O WNT5A pode interagir com o tumor, funcionando tanto como supressor quanto como promotor [160, 215]. Ao atuar na adesão celular, motilidade e polaridade celular, o WNT5A interage com efetores intracelulares através da via de sinalização Wnt e com estruturas da MEC. Assim, atua de diferentes formas no processo de TEM e no complexo β -catenina/E-caderina [216, 217].

Além disso, essas modificações da TEM resultaram da disseminação do câncer e invasão da MEC, levando a alterações nos GAGs e na organização estrutural fibrilar dos colágenos visualizados em IF e MET. Essas mudanças causam então a degeneração dos GAGs/colágeno endógenos e o surgimento de novos GAGs/colágeno de organização estrutural diminuída, conforme descrito anteriormente no câncer de mama [218]. Além disso, na MET, demonstramos limites célula-célula consideravelmente maiores, sugerindo junções aderentes anormais devido à propagação do câncer na MEC intersticial. Como mencionado, o tecido perde a adesão célula-célula, causando diminuição da rigidez de ligação intermolecular de longo alcance para Col I, Col III e Col V, com a ruptura da estrutura das fibrilas de colágeno, bem como HS/SC. Estudos anteriores descreveram que algumas células cancerígenas podem produzir colágeno tipos I, III, IV, V e VI [99, 100, 219]. A alteração na deposição desses colágenos fibrilares altera a rigidez da matriz tumoral e pode contribuir para o comportamento metastático das células tumorais, mediado, por exemplo, por fibroblastos associados ao câncer [220]. Além disso, a remodelação tecidual é uma etapa crucial durante a carcinogênese, uma transformação das células epiteliais estando associada a metaloproteinases na degradação do colágeno pela síntese de proteínas da matriz fibrilar e não fibrilar [221].

Em nossa coorte, observamos alta expressão de Col III e V e baixa expressão de Col I e IV. Observamos a mesma expressão aumentada de Col III no tecido de câncer pancreático [222]. No que diz respeito à expressão de Col I, foi proposto que a interação de células epiteliais com Col I contribui para o aumento da motilidade celular que acompanha a TEM, crítica na progressão da doença [223]. No câncer colorretal, Col I foi descrito como regulador negativo da expressão de E-caderina e β -catenina [224]. No entanto, não observamos correlação entre as proteínas Col I e TEM. A expressão desses marcadores em nosso estudo foi inversa, sugerindo uma possível resposta a alterações na MEC. Além disso, a redução da montagem estrutural e consequente diminuição da expressão de HS e Col I e IV na MEC pode estar associada à atividade de colagenases, um grupo de enzimas degradadoras de colágeno [225]. Além disso, houve alteração não apenas na concentração de colágenos fibrilares, mas também nos níveis de GAGs imunorreativos, como HS e SC, e seus proteoglicanos. Essa mudança pode alterar a rigidez da

MEC e participar do processo de TEM [226, 227]. Embora esses compostos não alterem as características biomecânicas da MEC, eles podem desempenhar um papel importante na remodelação da MEC tumoral [226].

No presente estudo também ficou evidente que, nas alterações de nível supramolecular no colágeno na MEC invadida pelo câncer, houve uma associação, direta ou indireta, com a sinalização feita por WNT1, WNT3A e WNT5A. Isso abriu caminho para a classificação do CPNPC e melhor compreensão dos mecanismos de crescimento do câncer. Esses achados podem ser confirmados por estudos recentes que demonstraram que a via de sinalização Wnt/ β -catenina integra sinais de outras proteínas e vias de sinalização, como a possibilidade de a via ser modulada por integrinas [228]. Esses estudos sugerem que esse processo de modulação pode ser feito através da expressão de ligantes, receptores e inibidores WNT, ou através da modulação da concentração de β -catenina em diferentes tipos celulares [229].

Destacamos também que encontramos uma associação importante entre HS com SPARC e WNT3A. No estroma tumoral, a composição da MEC e a população de células ali presentes são bastante diferentes quando comparadas ao tecido normal. À medida que o tumor se desenvolve, também ocorre uma série de processos que remodelam o tecido estromal para regular a progressão do tumor. Em geral, várias glicoproteínas, colágenos, GAGs, proteoglicanos e muitas outras proteínas que promovem a proliferação e motilidade celular conduzem esse processo de modificação na MEC [230-232]. Entre os GAGs, o HS, quando clivado pela heparanase, altera sua estrutura e função e contribui para a remodelação mediada por tumor de ambas as superfícies celulares e da MEC [233-235]. Também é conhecido que os proteoglicanos de HS regulam extracelularmente a sinalização WNT, incluindo WNT3A [236]. Assim, essas atividades aumentam a biodisponibilidade dos fatores de crescimento ligados ao HS [237] que recrutam células malignas metastáticas e sustentam sua sobrevivência e crescimento, conduzindo assim o processo metastático. Estudos anteriores relatam que o HS desempenha um papel crucial na proliferação celular e metástase no câncer de mama [238], rhabdomyosarcoma [239] e NSCLC [240]. Além disso, mudanças no microambiente também afetam a expressão e a função de outras moléculas, como SPARC. Trata-se de uma glicoproteína matricelular que participa diretamente do processo de remodelamento da MEC, regulando processos como a secreção de metaloproteinases e interações célula-matriz [181]. Estudos recentes mostraram que SPARC favoreceu a migração e invasão de células de carcinoma endometrial *in vitro* e *in vivo* [241].

Também descobrimos que SC foi correlacionado com WNT1. O SC é uma glicoproteína transmembrana com um grande domínio extracelular e um curto domínio intracelular. Seu domínio extracelular inclui subdomínios que podem interagir com vários componentes da MEC,

como Col V e Col VI. Assim, promovem a ativação de vias oncogênicas, fatores de crescimento e a TEM, aumentando a migração de células malignas [242-244]. Como é amplamente aceito, os GAGs podem moldar gradientes de morfogênese e modular a sinalização da morfogênese por meio de suas afinidades de ligação com uma variedade de moléculas de sinalização devido às suas várias estruturas [245]. Além disso, como pudemos observar neste estudo, um aumento na expressão de SC nos tecidos foi descrito em vários tipos de tumor [246-249]. Assim, pode-se sugerir que esse aumento poderia influenciar o remodelamento da MEC (como mencionado anteriormente para HS), alterando o microambiente tumoral e modificando os processos de sinalização celular. Embora não tenhamos localizado nenhum outro estudo que demonstre essa afinidade direta entre SC e WNT1, nosso achado pode ser apoiado pelo estudo que mostrou que SC-E (um SC com nível aumentado de dissacarídeos 4,6-O-dissulfatados) inibiu a via de sinalização Wnt em ensaios *in vitro* usando células de câncer de mama [250].

Outra questão importante a ser abordada é o impacto das variáveis morfométricas nas características clínico-patológicas. Histologicamente, observamos que o CPNPC englobava um espectro bimodal de malignidades. De um lado, estão os subtipos ADC e CCE, ambos caracterizados pelo processo de TEM, associados a considerável desmoplasia devido ao acúmulo de componentes da MEC, que estiveram intimamente associados à invasão da membrana basal por grupos de células na MET. No lado oposto, está o CGC, um subtipo de CPNPC composto por células malignas imersas em um estroma desmoplásico pobre com baixo processo de TEM, e baixos níveis de componentes da membrana basal e da MEC intersticial, associados à invasão por células isoladas na MET. Clinicamente, descobrimos que pacientes mais jovens apresentavam tumores agressivos de menor tamanho, histótipo CGC, com baixa expressão de E-caderina e Col IV e alta expressão de WNT1 e WNT5B. Além disso, tumores grandes (maiores que 3,0 cm) apresentaram baixa expressão de SC e maior expressão de WNT5A. Notavelmente, a alta expressão de WNT1, SC e Col V foi associada a tumores nos estádios I e II e N0-N1, sugerindo que o aumento da expressão desses marcadores ocorre em estágios muito anteriores da carcinogênese. Considerando os achados discutidos até aqui, é possível perceber que, por vezes, as moléculas estudadas no microambiente aqui apresentado podem não atuar diretamente nas características clínicas, afetando a agressividade do tumor. No entanto, o comportamento observado é muito consistente com a remodelação desse ambiente para progressão e metástase. Isso nos leva a especular que o estudo desses compostos é importante para a análise dos pacientes em estágio inicial quanto à evolução e na intenção de evitar que os pacientes operados tenham recidivas por possíveis metástases ocultas.

Observamos um resultado consistente em nossa análise de regressão de Cox. Realizamos esta análise para examinar o impacto das variáveis morfométricas na sobrevivência. Observamos que a SG, para toda a coorte, foi significativamente influenciada pelo gênero, estágio T, tamanho do tumor, metástases e radioterapia. Também observamos uma influência significativa para melhor SG pela maior expressão de SPARC e WNT3A no estroma tumoral. Na análise multivariada, houve associação significativa entre sexo, estágio T, tamanho do tumor, metástase, terapia adjuvante e SPARC e SG. A alta expressão de HS apresentou influência marginal para a SG. WNT3A e WNT5A foram covariáveis neste modelo matemático. A SG média foi de 97 meses para pacientes com expressão SPARC >14,25% em comparação com 65 meses para pacientes com expressão \leq 14,25%. Esses achados são consistentes com a literatura, na qual há associação entre baixa expressão de SPARC e pior prognóstico em carcinoma endometrial [241], câncer colorretal [251, 252] e CPNPC [253]. Além disso, é descrito que, dependendo do microambiente do tumor, o SPARC pode atuar tanto como um supressor tumoral quanto como um oncogene [241]. Assim, especulamos que as proteínas HS e WNT, que influenciaram nosso modelo de regressão, podem afetar essas questões sobre o efeito paradoxal do SPARC. Uma vez que os proteoglicanos HS modulam a sinalização WNT, as modificações HS influenciam a progressão da doença [254-256]. Além disso, temos todo o processo de modificação do MEC discutido anteriormente.

Para completar esses resultados dos papéis da E-caderina, β -catenina, Col I, Col III, Col V, WNT1 e WNT5B em CPNPC, exploramos, *in silico*, se o nível de mRNA dessas proteínas está relacionado ao resultado clínico de os pacientes. Confirmamos que em ADC e CCE houve uma regulação positiva significativa dos níveis de expressão de mRNA de E-caderina, β -catenina, Col I, Col III, Col V, WNT1 e WNT5B, enquanto houve uma regulação negativa significativa da expressão de mRNA WNT3A. Através dos dados do *Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium* (CPTAC) para expressão de proteína, disponível apenas para ADC, confirmamos que houve uma superexpressão significativa de E-caderina, Col I, Col III, Col V, WNT5A e proteína SPARC, enquanto houve uma subexpressão significativa de β -catenina, HS, CS e Col IV. O comportamento da expressão dessas proteínas foi semelhante em nosso estudo, comprovando a consistência de nossos resultados, mesmo com nossa menor casuística. Quanto às características clínico-patológicas, observamos algumas correlações entre β -catenina, proteínas WNT e subtipos histológicos (ADC e CCE), que observamos apenas com β -catenina e WNT5A em nosso estudo. No entanto, exceto para a expressão WNT1 e estádios T e N, os dados também não mostraram correlações significativas com o estágio patológico ou TNM, como em nosso estudo. As curvas de Kaplan-Meier mostraram que pacientes com maior expressão de Col IV,

WNT3A, WNT5A, WNT5B e SPARC tiveram uma SG mais longa, enquanto pacientes com maior expressão de Col I e WNT1 tiveram uma SG mais curta. A função e o processo biológico dos genes correspondentes às proteínas de nosso interesse mostraram que os processos biológicos de nível superior do *Gene Ontology* envolvidos foram "processo de desenvolvimento", "sinalização", "resposta a estímulos" e "processo celular".

Em resumo, os dados apresentados fornecem evidências hierárquicas importantes de que genes e proteínas associados a TEM, via de sinal WNT e MEC estão envolvidos no sinal proliferativo de células cancerígenas, desmossomos espaçados, facilitando a motilidade celular. Essa evidência sugere etapas sequenciais para invasão do tumor primário e metástase em pacientes que estavam em estágios iniciais e que foram submetidos à ressecção cirúrgica. É importante ressaltar que este estudo indica que o CPNPC com expressão aumentada de proteínas de barreira mecânica e baixa expressão da barreira proliferativa funcional apresenta baixo risco de mortalidade do paciente por metástase e novos alvos terapêuticos promissores. Além disso, a visão mecanicista das principais descobertas precisa ser complementada com dados *in vitro*. Portanto, neste cenário emergente de tratamentos personalizados, estudos futuros são necessários para incluir tais observações na clínica, como base de um biomarcador medido na circulação e/ou urina para selecionar pacientes que possam se beneficiar destes.

Referencias

1. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med.* 2011;32(4):605-44. doi: 10.1016/j.ccm.2011.09.001
2. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(8):1623-1640. doi: 10.1016/j.mayocp.2019.01.013.
3. Araujo LH, et al. Lung cancer in Brazil. *J Bras Pneumol.* 2018;44(1):55-64. doi: 10.1590/S1806-37562017000000135.
4. Coello MC, et al. Prognostic significance of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2004;5(4):214-25. doi: 10.3816/CLC.2004.n.002.
5. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883-99. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025.
6. Pudełko A, et al. The dual role of the glycosaminoglycan chondroitin-6-sulfate in the development, progression and metastasis of cancer. *FEBS J.* 2019;286(10):1815-1837. doi: 10.1111/febs.14748.
7. Dunnill MS. *Pulmonary Pathology.* New York: Churchill Livingstone; 1982. p. 293-334.
8. Askin FB, Kaufman DG. Histomorphology of human lung cancer. In *Carcinogenesis, A Comprehensive Survey.* Vol. 8, Cancer of the Respiratory Tract: Predisposing Factors (Mass MJ, Kaufman DG, Siegfried JM, Steele VE, Nesnow S, eds). New York: Raven Press. 1985. p. 17-21.
9. Wang Y, Zhou BP. Epithelial-mesenchymal Transition---A Hallmark of Breast Cancer Metastasis. *Cancer Hallm.* 2013;1(1):38-49. doi: 10.1166/ch.2013.1004.
10. Kuo DS, Labelle-Dumais C, Gould DB. COL4A1 and COL4A2 mutations and disease: insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. *Hum Mol Genet.* 2012;21(R1):R97-110. doi: 10.1093/hmg/ddc346.
11. Yang J, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(6):341-352. doi: 10.1038/s41580-020-0237-9.
12. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(2):69-84. doi: 10.1038/s41580-018-0080-4.
13. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science.* 2009;326(5957):1216-9. doi: 10.1126/science.1176009.
14. Fabrizio FP, et al. Potential Prognostic Role of SPARC Methylation in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cells.* 2020;9(6):1523. doi: 10.3390/cells9061523.
15. Mizumoto S, et al. Expression of N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase involved in chondroitin sulfate synthesis is responsible for pulmonary metastasis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:656319. doi: 10.1155/2013/656319.
16. Bourgot I, et al. Reciprocal Interplay Between Fibrillar Collagens and Collagen-Binding Integrins: Implications in Cancer Progression and Metastasis. *Front Oncol.* 2020;10:1488. doi: 10.3389/fonc.2020.01488.
17. Miao L, et al. Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer and promotes cell invasion via epithelial-to-mesenchymal transition. *Med Oncol.* 2013;30(3):626. doi: 10.1007/s12032-013-0626-4.

18. Patel S, et al. Wnt Signaling and Its Significance Within the Tumor Microenvironment: Novel Therapeutic Insights. *Front Immunol.* 2019;10:2872. doi: 10.3389/fimmu.2019.02872.
19. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2022.
20. Bray F, et al. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer.* 2021;127(16):3029-3030. doi: 10.1002/cncr.33587.
21. Sung H, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
22. World Health Organization (WHO). GLOBOCAN 2020. Graph production: IARC (<http://gco.iarc.fr/today>).
23. Siegel RL, et al. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(1):7-33. doi: 10.3322/caac.21708.
24. Yabroff KR, et al. Association of the COVID-19 Pandemic with Patterns of Statewide Cancer Services. *J Natl Cancer Inst.* 2021;djab122. doi: 10.1093/jnci/djab122.
25. Sartorius B, Sartorius K. How much incident lung cancer was missed globally in 2012? An ecological country-level study. *Geospat Health.* 2016;11(2):396. doi: 10.4081/gh.2016.396.
26. World Health Organization (WHO). WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2000-2025. third edition. Geneva: World Health Organization; 2019.
27. Islami F, et al. Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):31-54. doi: 10.3322/caac.21440.
28. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2022. Atlanta: American Cancer Society; 2022. [acesso em dezembro, 2022] Disponível em: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2022>
29. Allemani C, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet.* 2018;391(10125):1023-1075. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
30. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *SEER*Stat Database: Incidence-SEER 18 Registries Research Data + Hurricane Katrina Impacted Louisiana Cases, November 2020 Submission (2000-2018) <Katrina/Rita Population Adjustment>-Linked To County Attributes-Total U.S., 1969-2018 Counties.* National Cancer Institute, Division of Cancer Control and Population Sciences, Surveillance Research Program, Surveillance Systems Branch; 2021.
31. Rami-Porta R, et al. Lung cancer staging: a concise update. *Eur Respir J.* 2018;51(5):1800190. doi: 10.1183/13993003.00190-2018.
32. Jones GS, Baldwin DR. Recent advances in the management of lung cancer. *Clin Med (Lond).* 2018;18(Suppl 2):s41-s46. doi: 10.7861/clinmedicine.18-2-s41.
33. Minguet J, Smith KH, Bramlage P. Targeted therapies for treatment of non-small cell lung cancer--Recent advances and future perspectives. *Int J Cancer.* 2016;138(11):2549-61. doi: 10.1002/ijc.29915.

34. Liu Y, et al. Association of Medicaid Expansion Under the Patient Protection and Affordable Care Act With Non-Small Cell Lung Cancer Survival. *JAMA Oncol.* 2020;6(8):1289-1290. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.1040.
35. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *SEER*Stat Database: North American Association of Central Cancer Registries (NAACCR) Incidence Data-Cancer in North America Analytic File, 1995-2018, With Race/Ethnicity, Custom File With County, American Cancer Society Facts and Figures Projection Project (which includes data from the Center for Disease Control and Prevention's National Program of Cancer Registries, the Canadian Council of Cancer Registries' Provincial and Territorial Registries, and the National Cancer Institute's SEER Registries, certified by the NAACCR as meeting high-quality incidence data standards for the specified time periods)*. National Cancer Institute, Division of Cancer Control and Population Sciences, Surveillance Research Program; 2021.
36. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Health.* 2019;85(1):8. doi: 10.5334/aogh.2419.
37. Boffetta P, et al. Cigar and pipe smoking and lung cancer risk: a multicenter study from Europe. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(8):697-701. doi: 10.1093/jnci/91.8.697.
38. Kurmi OP, et al. Lung cancer risk and solid fuel smoke exposure: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* 2012;40(5):1228-37. doi: 10.1183/09031936.00099511.
39. Barone-Adesi F, et al. Risk of lung cancer associated with domestic use of coal in Xuanwei, China: retrospective cohort study. *BMJ.* 2012;345:e5414. doi: 10.1136/bmj.e5414.
40. Balmes JR. Household air pollution from domestic combustion of solid fuels and health. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143(6):1979-1987. doi: 10.1016/j.jaci.2019.04.016.
41. Corrales L, et al. Lung cancer in never smokers: The role of different risk factors other than tobacco smoking. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020;148:102895. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.102895.
42. Turner MC, et al. Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(12):1374-81. doi: 10.1164/rccm.201106-1011OC.
43. Raaschou-Nielsen O, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* 2013;14(9):813-22. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70279-1.
44. Hystad P, et al. Long-term residential exposure to air pollution and lung cancer risk. *Epidemiology.* 2013;24(5):762-72. doi: 10.1097/EDE.0b013e3182949ae7.
45. Turner MC, et al. Radon and lung cancer in the American Cancer Society cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(3):438-48. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-1153.
46. Ferreccio C, et al. Arsenic, tobacco smoke, and occupation: associations of multiple agents with lung and bladder cancer. *Epidemiology.* 2013;24(6):898-905. doi: 10.1097/EDE.0b013e31829e3e03.
47. Oberoi S, Barchowsky A, Wu F. The global burden of disease for skin, lung, and bladder cancer caused by arsenic in food. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(7):1187-94. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-1317.
48. Kang JK, Seo S, Jin YW. Health Effects of Radon Exposure. *Yonsei Med J.* 2019;60(7):597-603. doi: 10.3349/ymj.2019.60.7.597.

49. Nelson HK, Kelsey KT. The molecular epidemiology of asbestos and tobacco in lung cancer. *Oncogene*. 2002;21: 7284–7288. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205804>.
50. Markowitz SB, et al. Asbestos, asbestosis, smoking, and lung cancer. New findings from the North American insulator cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(1): 90–96. doi: <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0257OC>.
51. de Groot PM, et al. The epidemiology of lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2018;7(3):220-233. doi: 10.21037/tlcr.2018.05.06.
52. Vida S, et al. Occupational exposure to silica and lung cancer: Pooled analysis of two case-control studies in Montreal, Canada. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2010;19(6):1602–1611. doi: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0015>.
53. De Matteis S, et al. Impact of occupational carcinogens on lung cancer risk in a general population. *Int J Epidemiol*. 2012;41(3):711-21. doi: 10.1093/ije/dys042.
54. Travis WD, et al. Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1240-1242. doi: 10.1097/JTO.0000000000000663.
55. Rudin CM, et al. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):3. doi: 10.1038/s41572-020-00235-0.
56. Travis WD, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243-1260. doi: 10.1097/JTO.0000000000000630.
57. Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016;25(3):447-68. doi: 10.1016/j.soc.2016.02.003.
58. Pikor LA, et al. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer*. 2013;82(2):179-89. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.07.025.
59. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol*. 2017;7:193. doi: 10.3389/fonc.2017.00193.
60. Takamochi K, et al. Novel biomarkers that assist in accurate discrimination of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung. *BMC Cancer*. 2016;16(1):760. doi: 10.1186/s12885-016-2792-1.
61. Irwin RS, et al. Spread the word about the journal in 2013: from citation manipulation to invalidation of patient-reported outcomes measures to renaming the Clara cell to new journal features. *Chest*. 2013;143(1):1-4. doi: 10.1378/chest.12-2762.
62. Amin MB, et al, editors. *AJCC cancer staging manual*. 8th edition. New York: Springer; 2017.
63. Goldstraw P, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(1):39-51. doi: 10.1016/j.jtho.2015.09.009.
64. Kocher F, et al. Longitudinal analysis of 2293 NSCLC patients: a comprehensive study from the TYROL registry. *Lung Cancer*. 2015;87(2):193-200. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.12.006.
65. Soda H, et al. Limitation of annual screening chest radiography for the diagnosis of lung cancer. A retrospective study. *Cancer*. 1993;72(8):2341-6. doi: 10.1002/1097-0142(19931015)72:8<2341::aid-cncr2820720809>3.0.co;2-a.

66. Prorok PC, et al. Design of the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. *Control Clin Trials*. 2000;21(6 Suppl):273S-309S. doi: 10.1016/s0197-2456(00)00098-2.
67. Aberle DR, et al. National Lung Screening Trial Research Team. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011;365(5):395-409. doi: 10.1056/NEJMoa1102873.
68. Moyer VA; U.S. Preventive Services Task Force. Screening for lung cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 2014;160(5):330-8. doi: 10.7326/M13-2771.
69. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol*. 2020;30(16):R921-R925. doi: 10.1016/j.cub.2020.06.081.
70. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 23):5591-6. doi: 10.1242/jcs.116392.
71. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21(3):309-22. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
72. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423-37. doi: 10.1038/nm.3394.
73. Spill F, et al. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Curr Opin Biotechnol*. 2016;40:41-48. doi: 10.1016/j.copbio.2016.02.007.
74. Del Prete A, et al. Leukocyte trafficking in tumor microenvironment. *Curr Opin Pharmacol*. 2017;35:40-47. doi: 10.1016/j.coph.2017.05.004.
75. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*. 2010;18(6):884-901. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.012.
76. Mills CD, Lenz LL, Harris RA. A Breakthrough: Macrophage-Directed Cancer Immunotherapy. *Cancer Res*. 2016;76(3):513-6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1737.
77. Hu Y, et al. TWEAK-stimulated macrophages inhibit metastasis of epithelial ovarian cancer via exosomal shuttling of microRNA. *Cancer Lett*. 2017;393:60-67. doi: 10.1016/j.canlet.2017.02.009.
78. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(7):497-512. doi: 10.1038/nrd4253.
79. Korneev KV, et al. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. *Cytokine*. 2017;89:127-135. doi: 10.1016/j.cyto.2016.01.021.
80. LeBleu VS. Imaging the Tumor Microenvironment. *Cancer J*. 2015;21(3):174-8. doi: 10.1097/PPO.000000000000118.
81. Motz GT, Coukos G. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(10):702-11. doi: 10.1038/nri3064.
82. Bayne LJ, et al. Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer. *Cancer Cell*. 2012;21(6):822-35. doi: 10.1016/j.ccr.2012.04.025.
83. Bussard KM, et al. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res*. 2016;18(1):84. doi: 10.1186/s13058-016-0740-2.
84. Pujari R, Vidya N. Biology of tumor microenvironment: A review. *Am. J. Oral Med. Radiol*. 2015;2(4):177-181. ISSN: 2394-7721.

85. Arneth B. Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas)*. 2019;56(1):15. doi: 10.3390/medicina56010015.
86. Cox TR. The matrix in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(4):217-238. doi: 10.1038/s41568-020-00329-7.
87. Yamada KM, et al. Extracellular matrix dynamics in cell migration, invasion and tissue morphogenesis. *Int J Exp Pathol*. 2019;100(3):144-152. doi: 10.1111/iep.12329.
88. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
89. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.
90. Huang J, et al. Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):153. doi: 10.1038/s41392-021-00544-0.
91. Walker C, Mojares E, Del Río Hernández A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10):3028. doi: 10.3390/ijms19103028.
92. Tian C, et al. Proteomic analyses of ECM during pancreatic ductal adenocarcinoma progression reveal different contributions by tumor and stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(39):19609-19618. doi: 10.1073/pnas.1908626116.
93. Kai F, Drain AP, Weaver VM. The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. *Dev Cell*. 2019;49(3):332-346. doi: 10.1016/j.devcel.2019.03.026.
94. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(9):633-43. doi: 10.1038/nrm2957.
95. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):a004978. doi: 10.1101/cshperspect.a004978.
96. Xu S, et al. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *J Transl Med*. 2019;17(1):309. doi: 10.1186/s12967-019-2058-1.
97. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J*. 1991;5(13):2814-23. PMID: 1916105.
98. Fang M, et al. Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumour Biol*. 2014;35(4):2871-82. doi: 10.1007/s13277-013-1511-7.
99. Ohlund D, et al. Type IV collagen is a tumour stroma-derived biomarker for pancreas cancer. *Br J Cancer*. 2009;101(1):91-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6605107.
100. Qiu S, et al. Tumor-associated macrophages promote bladder tumor growth through PI3K/AKT signal induced by collagen. *Cancer Sci*. 2019;110(7):2110-2118. doi: 10.1111/cas.14078.
101. Cox TR, Erler JT. Molecular pathways: connecting fibrosis and solid tumor metastasis. *Clin Cancer Res*. 2014;20(14):3637-43. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1059.
102. Amatangelo MD, et al. Stroma-derived three-dimensional matrices are necessary and sufficient to promote desmoplastic differentiation of normal fibroblasts. *Am J Pathol*. 2005;167(2):475-88. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62991-4.
103. Provenzano PP, et al. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med*. 2006;4(1):38. doi: 10.1186/1741-7015-4-38.
104. Piersma B, Hayward MK, Weaver VM. Fibrosis and cancer: A strained relationship. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020;1873(2):188356. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188356.

105. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* 2015;42:11-55. doi: 10.1016/j.matbio.2015.02.003.
106. Vitale D, et al. Proteoglycans and glycosaminoglycans as regulators of cancer stem cell function and therapeutic resistance. *FEBS J.* 2019;286(15):2870-2882. doi: 10.1111/febs.14967.
107. Tavianatou AG, et al. Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *FEBS J.* 2019;286(15):2883-2908. doi: 10.1111/febs.14777.
108. Caon I, et al. Revisiting the hallmarks of cancer: The role of hyaluronan. *Semin Cancer Biol.* 2020;62:9-19. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.007.
109. Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:609-52. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.609.
110. Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 2006;20(1):9-22. doi: 10.1096/fj.05-4682rev.
111. Handel TM, et al. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:385-410. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161747.
112. Shi Y, et al. Integrative Analysis Reveals Comprehensive Altered Metabolic Genes Linking with Tumor Epigenetics Modification in Pan-Cancer. *Biomed Res Int.* 2019;2019:6706354. doi: 10.1155/2019/6706354.
113. Lambaerts K, Wilcox-Adelman SA, Zimmermann P. The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(5):662-9. doi: 10.1016/j.ceb.2009.05.002.
114. Yoneda A, et al. Breast and ovarian cancers: a survey and possible roles for the cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Histochem Cytochem.* 2012;60(1):9-21. doi: 10.1369/0022155411428469.
115. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-8. doi: 10.1172/JCI39104.
116. Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. *Int J Dev Biol.* 2009;53(8-10):1541-7. doi: 10.1387/ijdb.072410mn.
117. Thiery JP, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139(5):871-90. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
118. Nieto MA, et al. EMT: 2016. *Cell.* 2016;166(1):21-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028.
119. Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med.* 2013;19(11):1438-49. doi: 10.1038/nm.3336.
120. Mani SA, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133(4):704-15. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027.
121. Morel AP, et al. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One.* 2008;3(8):e2888. doi: 10.1371/journal.pone.0002888.
122. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene.* 2010;29(34):4741-51. doi: 10.1038/onc.2010.215.

123. Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(10):611-629. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.44.
124. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*. 2017;168(4):670-691. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.037.
125. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*. 2009; 119(6):1417-9. doi: 10.1172/JCI39675.
126. Kojima Y, et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(46):20009-14. doi: 10.1073/pnas.1013805107.
127. Terry S, et al. New insights into the role of EMT in tumor immune escape. *Mol Oncol*. 2017;11(7):824-846. doi: 10.1002/1878-0261.12093.
128. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays*. 2001;23(10):912-23. doi: 10.1002/bies.1132.
129. Derynck R, Muthusamy BP, Saetern KY. Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol*. 2014;31:56-66. doi: 10.1016/j.ceb.2014.09.001.
130. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*. 2014;7(344):re8. doi: 10.1126/scisignal.2005189.
131. Tammela T, et al. A Wnt-producing niche drives proliferative potential and progression in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2017;545(7654):355-359. doi: 10.1038/nature22334.
132. de Sousa e Melo F, et al. A distinct role for Lgr5⁺ stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature*. 2017;543(7647):676-680. doi: 10.1038/nature21713.
133. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*. 2017;23(10):1124-1134. doi: 10.1038/nm.4409.
134. Dissanayake SK, et al. The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2007;282(23):17259-71. doi: 10.1074/jbc.M700075200.
135. Skronska-Wasek W, et al. WNT receptor signalling in lung physiology and pathology. *Pharmacol Ther*. 2018;187:150-166. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.009.
136. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(12):767-79. doi: 10.1038/nrm3470.
137. Söderholm S, Cantù C. The WNT/ β -catenin dependent transcription: A tissue-specific business. *WIREs Mech Dis*. 2021;13(3):e1511. doi: 10.1002/wsbm.1511.
138. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.
139. Macdonald BT, Semenov MV, He X. SnapShot: Wnt/beta-catenin signaling. *Cell*. 2007;131(6):1204. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.036.
140. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006;127(3):469-80. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.018.
141. Latres E, Chiaur DS, Pagano M. The human F box protein beta-Trcp associates with the Cull1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene*. 1999;18(4):849-54. doi: 10.1038/sj.onc.1202653.

142. Metcalfe C, et al. Stability elements in the LRP6 cytoplasmic tail confer efficient signalling upon DIX-dependent polymerization. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 9):1588-99. doi: 10.1242/jcs.067546.
143. Lien WH, Fuchs E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes Dev.* 2014;28(14):1517-32. doi: 10.1101/gad.244772.114.
144. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene.* 2017;36(11):1461-1473. doi: 10.1038/onc.2016.304.
145. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 2006;281(32):22429-33. doi: 10.1074/jbc.R600015200.
146. Tree DR, et al. Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. *Cell.* 2002; 109(3):371-81. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00715-8.
147. Habas R, Kato Y, He X. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell.* 2001;107(7):843-54. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00614-6.
148. De A. Wnt/ Ca^{2+} signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2011;43(10):745-56. doi: 10.1093/abbs/gmr079.
149. Acebron SP, et al. Mitotic wnt signaling promotes protein stabilization and regulates cell size. *Mol Cell.* 2014;54(4):663-74. doi: 10.1016/j.molcel.2014.04.014.
150. Park HW, et al. Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell.* 2015;162(4):780-94. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.013.
151. Acebron SP, Niehrs C. β -Catenin-Independent Roles of Wnt/LRP6 Signaling. *Trends Cell Biol.* 2016;26(12):956-967. doi: 10.1016/j.tcb.2016.07.009.
152. De Langhe SP, Reynolds SD. Wnt signaling in lung organogenesis. *Organogenesis.* 2008;4(2):100-8. doi: 10.4161/org.4.2.5856.
153. Ota C, et al. Linking bronchopulmonary dysplasia to adult chronic lung diseases: role of WNT signaling. *Mol Cell Pediatr.* 2016;3(1):34. doi: 10.1186/s40348-016-0062-6.
154. Baarsma HA, Königshoff M. 'WNT-er is coming': WNT signalling in chronic lung diseases. *Thorax.* 2017;72(8):746-759. doi: 10.1136/thoraxjnl-2016-209753.
155. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005;434(7035):843-50. doi: 10.1038/nature03319.
156. Stewart DJ. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(1):djt356. doi: 10.1093/jnci/djt356.
157. Akiri G, et al. Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma. *Oncogene.* 2009;28(21):2163-72. doi: 10.1038/onc.2009.82.
158. Jin J, et al. Prognostic significance of β -catenin expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Transl Lung Cancer Res.* 2017;6(1):97-108. doi: 10.21037/tlcr.2017.02.07.
159. Li C, et al. Non-canonical WNT signalling in the lung. *J Biochem.* 2015;158(5):355-65. doi: 10.1093/jb/mvv081.
160. Kikuchi A, et al. Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiol (Oxf).* 2012;204(1):17-33. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02294.x.
161. Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol.* 2012;22(5-6):396-403. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.04.001.

162. Wu ZQ, et al. Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(41):16654-9. doi: 10.1073/pnas.1205822109.
163. Wang Y, et al. ASPP2 controls epithelial plasticity and inhibits metastasis through β -catenin-dependent regulation of ZEB1. *Nat Cell Biol*. 2014;16(11):1092-104. doi: 10.1038/ncb3050.
164. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91(4):431-7. doi: 10.1007/s00109-013-1020-6.
165. Gross JC, et al. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*. 2012;14(10):1036-45. doi: 10.1038/ncb2574.
166. Chairoungdua A, et al. Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol*. 2010;190(6):1079-91. doi: 10.1083/jcb.201002049.
167. Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest*. 2001;107(9):1049-54. doi: 10.1172/JCI12939.
168. Podhajcer OL, et al. The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev*. 2008;27(4):691-705. doi: 10.1007/s10555-008-9146-7.
169. Bradshaw AD. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(3):480-8. doi: 10.1016/j.biocel.2011.12.021.
170. Sangaletti S, et al. Defective stromal remodeling and neutrophil extracellular traps in lymphoid tissues favor the transition from autoimmunity to lymphoma. *Cancer Discov*. 2014;4(1):110-29. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0276.
171. Deckx S, et al. Extracellular SPARC increases cardiomyocyte contraction during health and disease. *PLoS One*. 2019;14(4):e0209534. doi: 10.1371/journal.pone.0209534.
172. Okura Y, et al. Interaction of Nerve Growth Factor β with Adiponectin and SPARC Oppositely Modulates its Biological Activity. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1541. doi: 10.3390/ijms20071541.
173. Wang Q, et al. Silencing of SPARC represses heterotopic ossification via inhibition of the MAPK signaling pathway. *Biosci Rep*. 2019;39(11):BSR20191805. doi: 10.1042/BSR20191805.
174. Melouane A, et al. Sparc, an EPS-induced gene, modulates the extracellular matrix and mitochondrial function via ILK/AMPK pathways in C2C12 cells. *Life Sci*. 2019;229:277-287. doi: 10.1016/j.lfs.2019.05.070.
175. Omi S, et al. Reduced fibrillar collagen accumulation in skeletal muscle of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC)-null mice. *J Vet Med Sci*. 2019;81(11):1649-1654. doi: 10.1292/jvms.19-0485.
176. Ramu I, et al. SPARC dependent collagen deposition and gemcitabine delivery in a genetically engineered mouse model of pancreas cancer. *EBioMedicine*. 2019;48:161-168. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.09.024.
177. McClung HM, et al. SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells. *Neurosci Lett*. 2007;419(2):172-7. doi: 10.1016/j.neulet.2007.04.037.
178. Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol*. 2001;19(8):816-27. doi: 10.1016/s0945-053x(00)00133-5.

179. Atorrasagasti C, et al. SPARC is required for the maintenance of glucose homeostasis and insulin secretion in mice. *Clin Sci (Lond)*. 2019;133(2):351-365. doi: 10.1042/CS20180714.
180. Li T, et al. SPARC induces phenotypic modulation of human brain vascular smooth muscle cells via AMPK/mTOR-mediated autophagy. *Neurosci Lett*. 2019;712:134485. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134485.
181. Arnold SA, Brekken RA. SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis. *J Cell Commun Signal*. 2009;3(3-4):255-73. doi: 10.1007/s12079-009-0072-4.
182. Socha MJ, et al. Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer. *Neoplasia*. 2009;11(2):126-35. doi: 10.1593/neo.81146.
183. Prada F, et al. SPARC endogenous level, rather than fibroblast-produced SPARC or stroma reorganization induced by SPARC, is responsible for melanoma cell growth. *J Invest Dermatol*. 2007;127(11):2618-28. doi: 10.1038/sj.jid.5700962.
184. Chlenski A, Cohn SL. Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. *Semin Cell Dev Biol*. 2010;21(1):55-65. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.11.018.
185. Nagaraju GP, et al. Molecular mechanisms underlying the divergent roles of SPARC in human carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2014;35(5):967-73. doi: 10.1093/carcin/bgu072.
186. Nagai MA, et al. Prognostic value of NDRG1 and SPARC protein expression in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;126(1):1-14. doi: 10.1007/s10549-010-0867-2.
187. Zhu A, et al. SPARC overexpression in primary tumors correlates with disease recurrence and overall survival in patients with triple negative breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(47):76628-76634. doi: 10.18632/oncotarget.10532.
188. Koukourakis MI, et al. Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma of non-small cell lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis of patients. *Cancer Res*. 2003;63(17):5376-80. PMID: 14500371.
189. Suzuki M, et al. Aberrant methylation of SPARC in human lung cancers. *Br J Cancer*. 2005;92(5):942-8. doi: 10.1038/sj.bjc.6602376. (Retraction published *Br J Cancer*. 2013 Feb 19;108(3):744)
190. Andriani F, et al. Diagnostic role of circulating extracellular matrix-related proteins in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2018 Sep 18;18(1):899. doi: 10.1186/s12885-018-4772-0.
191. Kurtul N, et al. Prognostic value of SPARC expression in unresectable NSCLC treated with concurrent chemoradiotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(20):8911-6. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.20.8911.
192. Xu J, et al. SPARC correlates with unfavorable outcome and promotes tumor growth in lung squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2019;110:104276. doi: 10.1016/j.yexmp.2019.104276.
193. Szynglarewicz B, et al. Ductal carcinoma in situ on stereotactic biopsy of suspicious breast microcalcifications: Expression of SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine) can predict postoperative invasion. *J Surg Oncol*. 2016;114(5):548-556. doi: 10.1002/jso.24373.
194. Güttlein LN, et al. Predictive Outcomes for HER2-enriched Cancer Using Growth and Metastasis Signatures Driven By SPARC. *Mol Cancer Res*. 2017;15(3):304-316. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0243-T
195. Bankhead P, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5.

196. Chandrashekar DS, et al. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia*. 2022;25:18-27. doi: 10.1016/j.neo.2022.01.001.
197. Chandrashekar DS, et al. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*. 2017;19(8):649-658. doi: 10.1016/j.neo.2017.05.002.
198. Zhang Y, et al. Proteogenomic characterization of 2002 human cancers reveals pan-cancer molecular subtypes and associated pathways. *Nat Commun*. 2022;13(1):2669. doi: 10.1038/s41467-022-30342-3. (Erratum in: *Nat Commun*. 2022;13(1):4688).
199. Chen F, et al. Pan-cancer molecular subtypes revealed by mass-spectrometry-based proteomic characterization of more than 500 human cancers. *Nat Commun*. 2019;10(1):5679. doi: 10.1038/s41467-019-13528-0.
200. Cerami E, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012;2(5):401-4. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095. (Erratum in: *Cancer Discov*. 2012;2(10):960)
201. Gao J, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013;6(269):pl1. doi: 10.1126/scisignal.2004088.
202. Lániczky A, Gyórfy B. Web-Based Survival Analysis Tool Tailored for Medical Research (KMplot): Development and Implementation. *J Med Internet Res*. 2021;23(7):e27633. doi: 10.2196/27633.
203. Szklarczyk D, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D605-D612. doi: 10.1093/nar/gkaa1074. (Erratum in: *Nucleic Acids Res*. 2021;49(18):10800)
204. Snel B, et al. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(18):3442-4. doi: 10.1093/nar/28.18.3442.
205. Zhou Y, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun*. 2019;10(1):1523. doi: 10.1038/s41467-019-09234-6.
206. Huang Z, et al. Epithelial-mesenchymal transition: The history, regulatory mechanism, and cancer therapeutic opportunities. *MedComm* (2020). 2022;3(2):e144. doi: 10.1002/mco2.144.
207. Miller RT. Mechanical properties of basement membrane in health and disease. *Matrix Biol*. 2017 Jan;57-58:366-373. doi: 10.1016/j.matbio.2016.07.001.
208. Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):771-85. doi: 10.1038/nrm3902.
209. Chen Y, et al. The involvement of noncanonical Wnt signaling in cancers. *Biomed Pharmacother*. 2021;133:110946. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110946.
210. Cooper WA, et al. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis*. 2013;5 Suppl 5(Suppl 5):S479-90. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.03.
211. Jolly MK, et al. Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Front Oncol*. 2015;5:155. doi: 10.3389/fonc.2015.00155.
212. Huang B, et al. Modeling the Transitions between Collective and Solitary Migration Phenotypes in Cancer Metastasis. *Sci Rep*. 2015;5:17379. doi: 10.1038/srep17379.
213. Jolly MK, et al. Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Oncotarget*. 2016;7(19):27067-84. doi: 10.18632/oncotarget.8166.

214. Zacharias M, et al. Bulk tumour cell migration in lung carcinomas might be more common than epithelial-mesenchymal transition and be differently regulated. *BMC Cancer*. 2018;18(1):717. doi: 10.1186/s12885-018-4640-y.
215. Endo M, et al. Insight into the role of Wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2015;314:117-48. doi: 10.1016/bs.ircmb.2014.10.003.
216. Matsumoto S, et al. Binding of APC and dishevelled mediates Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells. *EMBO J*. 2010;29(7):1192-204. doi: 10.1038/emboj.2010.26.
217. Medrek C, et al. Wnt-5a-CKI{alpha} signaling promotes {beta}-catenin/E-cadherin complex formation and intercellular adhesion in human breast epithelial cells. *J Biol Chem*. 2009;284(16):10968-79. doi: 10.1074/jbc.M804923200.
218. Pucci Minafra I, et al. Collagen changes in the ductal infiltrating (scirrhous) carcinoma of the human breast. A possible role played by type I trimer collagen on the invasive growth. *J Submicrosc Cytol*. 1986;18(4):795-805. PMID: 3023651.
219. Naba A, et al. Extracellular matrix signatures of human mammary carcinoma identify novel metastasis promoters. *Elife*. 2014;3:e01308. doi: 10.7554/eLife.01308.
220. Kwa MQ, Herum KM, Brakebusch C. Cancer-associated fibroblasts: how do they contribute to metastasis? *Clin Exp Metastasis*. 2019;36(2):71-86. doi: 10.1007/s10585-019-09959-0.
221. Coussens LM, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol*. 1996;3(11):895-904. doi: 10.1016/s1074-5521(96)90178-7.
222. Bachem MG, et al. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*. 1998;115(2):421-32. doi: 10.1016/s0016-5085(98)70209-4.
223. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 2001;411(6835):375-9. doi: 10.1038/35077241.
224. Kirkland SC. Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. *British journal of cancer*. 2009;101(2), 320–326. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605143>
225. Round AR, et al. A preliminary study of breast cancer diagnosis using laboratory based small angle x-ray scattering. *Physics in medicine and biology*. 2005;50(17), 4159–4168. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/50/17/017>
226. Brauchle E, et al. Biomechanical and biomolecular characterization of extracellular matrix structures in human colon carcinomas. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 2018;68-69, 180–193. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.016>
227. Yang J, et al. Chondroitin sulfate proteoglycan 4, a targetable oncoantigen that promotes ovarian cancer growth, invasion, cisplatin resistance and spheroid formation. *Translational oncology*. 2022;16, 101318. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101318>
228. Astudillo P, Larraín J. Wnt signaling and cell-matrix adhesion. *Current molecular medicine*. 2014;14(2),209–220. <https://doi.org/10.2174/1566524014666140128105352>
229. Astudillo P. Extracellular matrix stiffness and Wnt/ β -catenin signaling in physiology and disease. *Biochemical Society transactions*. 2020;48(3), 1187–1198. <https://doi.org/10.1042/BST20200026>

230. Werb Z, Lu P. The Role of Stroma in Tumor Development. *Cancer journal* (Sudbury, Mass.). 2015;21(4),250–253. <https://doi.org/10.1097/PPO.000000000000127>
231. Theocharis AD, et al. Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;97, 4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>
232. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS journal*. 2011;278(1), 16–27. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x>
233. Karamanos NK, et al. Matrix modeling and remodeling: A biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 2019;75-76,1–11. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.08.007>
234. Sanderson RD, Bandari SK, Vlodayky I. Proteases and glycosidases on the surface of exosomes: Newly discovered mechanisms for extracellular remodeling. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 2019;75-76, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.10.007>
235. Theocharis AD, Karamanos NK. Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 2019;75-76,220–259. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.10.008>
236. Mii Y, Takada S. Heparan Sulfate Proteoglycan Clustering in Wnt Signaling and Dispersal. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020;8,631. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00631>
237. Hammond E, et al. The Role of Heparanase and Sulfatases in the Modification of Heparan Sulfate Proteoglycans within the Tumor Microenvironment and Opportunities for Novel Cancer Therapeutics. *Frontiers in oncology*. 2014;4,195. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00195>
238. Zhang C, et al. A lung cancer gene GPC5 could also be crucial in breast cancer. *Molecular genetics and metabolism*. 2011;103(1),104–105. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.02.005>
239. Li F, et al. Glypican-5 stimulates rhabdomyosarcoma cell proliferation by activating Hedgehog signaling. *The Journal of cell biology*. 2011;192(4),691–704. <https://doi.org/10.1083/jcb.201008087>
240. Yang X, et al. Glypican-5 is a novel metastasis suppressor gene in non-small cell lung cancer. *Cancer letters*. 2013;341(2),265–273. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.08.020>
241. Wang L, et al. Low Levels of SPARC are Associated with Tumor Progression and Poor Prognosis in Human Endometrial Carcinoma. *OncoTargets and therapy*. 2020;13, 11549–11569. <https://doi.org/10.2147/OTT.S277795>
242. Burg, M. A., Nishiyama, A., & Stallcup, W. B. (1997). A central segment of the NG2 proteoglycan is critical for the ability of glioma cells to bind and migrate toward type VI collagen. *Experimental cell research*, 235(1), 254–264. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3674>
243. Wang X, et al. CSPG4 in cancer: multiple roles. *Current molecular medicine*. 2010;10(4), 419–429. <https://doi.org/10.2174/156652410791316977>
244. Yang J, et al. Chondroitin sulfate proteoglycan 4 enhanced melanoma motility and growth requires a cysteine in the core protein transmembrane domain. *Melanoma research*. 2019;29(4),365–375. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000574>

245. Yan D, Lin X. Shaping morphogen gradients by proteoglycans. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009;1(3),a002493. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002493>
246. Brauchle E, et al. Biomechanical and biomolecular characterization of extracellular matrix structures in human colon carcinomas. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 2018;68-69, 180–193. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.016>
247. Rangel MP, et al. Biomolecular analysis of matrix proteoglycans as biomarkers in non small cell lung cancer. *Glycoconjugate journal*. 2018;35(2),233–242. <https://doi.org/10.1007/s10719-018-9815-x>
248. Marolla AP, et al. Glycomics expression analysis of sulfated glycosaminoglycans of human colorectal cancer tissues and non-neoplastic mucosa by electrospray ionization mass spectrometry. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*. 2015;13(4),510–517. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015AO3477>
249. Svensson KJ, et al. Chondroitin sulfate expression predicts poor outcome in breast cancer. *International journal of oncology*. 2011;39(6),1421–1428. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1164>
250. Willis CM, Klüppel M. Chondroitin sulfate-E is a negative regulator of a pro-tumorigenic Wnt/beta-catenin-Collagen 1 axis in breast cancer cells. *PloS one*. 2014;9(8), e103966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103966>
251. Liu QZ, et al. Secreted protein acidic and rich in cysteine expression in human colorectal cancer predicts postoperative prognosis. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2015;19(10), 1803–1811. PMID: 26044224.
252. Liang JF, et al. Relationship and prognostic significance of SPARC and VEGF protein expression in colon cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*. 2010;29(1), 71. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-71>
253. Huang Y, et al. SPARC expression and prognostic value in non-small cell lung cancer. *Chinese journal of cancer*. 2012;31(11),541–548. <https://doi.org/10.5732/cjc.012.10212>
254. Capurro MI, et al. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer research*. 2005;65(14),6245–6254. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4244>
255. Lund ME, Campbell DH, Walsh BJ. The Role of Glypican-1 in the Tumour Microenvironment. *Advances in experimental medicine and biology*. 2020;1245, 163–176. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40146-7_8
256. Zittermann SI, et al. Soluble glypican 3 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *International journal of cancer*. 2010;126(6), 1291–1301. <https://doi.org/10.1002/ijc.24941>

APÊNDICE A – Medidas obtidas no software QuPath

Tabela 10. Medidas obtidas no software QuPath para marcadores da TEM, via de sinalização WNT e SPARC

| Caso | E-caderina (%) | β -catenina (%) | WNT1 (%) | WNT3A (%) | WNT5A (%) | WNT5B (%) | SPARC (%) |
|--------------|----------------|-----------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 09.4566.58 | 31,42 | 29,40 | 30,36 | 22,96 | 41,49 | 2,86 | 13,99 |
| 09-5058-53 | 50,63 | 23,56 | 14,69 | 22,90 | 50,87 | 0,27 | 27,42 |
| 10-2138-58 | 23,43 | 21,53 | 15,40 | 16,32 | 38,98 | 1,51 | 17,57 |
| 10-3135-56 | 33,77 | 28,16 | 21,19 | 19,31 | 60,70 | 3,51 | 33,53 |
| 10-4822-55 | 45,76 | 20,13 | 20,87 | 14,89 | 45,93 | 2,00 | 7,81 |
| 10-6443-57 | 64,95 | 29,98 | 9,85 | 34,45 | 64,66 | 3,49 | 12,32 |
| 10-8255-54 | 37,42 | 25,91 | 8,14 | 25,36 | 41,62 | 3,72 | 22,75 |
| 10-8995-58 | 10,02 | 7,34 | 13,64 | 7,87 | 14,56 | 0,08 | 7,14 |
| 10-9639-52 | 37,44 | 25,53 | 27,03 | 17,49 | 46,56 | 3,49 | 5,42 |
| 11-2785-56 | 27,37 | 12,95 | 1,56 | 1,89 | 51,00 | 1,44 | 12,40 |
| 11-4249-4 | 19,07 | 12,64 | 13,50 | 8,34 | 34,80 | 0,62 | 10,23 |
| 11-4619-12 | 6,07 | 9,67 | 5,88 | 11,75 | 26,91 | 6,17 | 13,64 |
| 11-550-60 | 38,97 | 15,44 | 4,90 | 15,26 | 45,10 | 1,19 | 16,13 |
| 11-5877-66 | 48,13 | 35,72 | 37,90 | 34,96 | 65,43 | 2,90 | 19,67 |
| 11-8202-60 | 21,30 | 15,28 | 25,83 | 11,58 | 27,07 | 1,23 | 11,93 |
| 11-8485-67 | 28,27 | 30,67 | 15,85 | 18,52 | 53,14 | 3,18 | 24,28 |
| 11-8849-61 | 35,71 | 13,81 | 10,06 | 16,33 | 43,85 | 3,66 | 10,64 |
| 11-9061-66 | 37,41 | 11,72 | 12,35 | 11,05 | 50,71 | 4,08 | 8,72 |
| 12-11006-04 | 28,73 | 28,72 | 25,23 | 35,21 | 51,48 | 2,24 | 12,84 |
| 12-11406-23 | 44,98 | 29,45 | 33,15 | 26,57 | 55,03 | 4,15 | 17,83 |
| 12-12505-7 | 46,84 | 25,18 | 39,47 | 16,24 | 62,87 | 7,07 | 35,01 |
| 12-7274-15 | 19,20 | 18,49 | 22,14 | 19,90 | 44,99 | 4,30 | 11,70 |
| 12-8446-12 | 55,76 | 28,77 | 23,94 | 27,59 | 62,95 | 3,00 | 12,31 |
| 13-10712-15 | 48,15 | 10,02 | 12,05 | 6,74 | 42,29 | 1,83 | 7,46 |
| 16157-4 | 37,97 | 43,41 | 45,73 | 38,24 | 55,93 | 1,54 | 24,95 |
| 19011-2 | 20,10 | 17,67 | 21,10 | 27,42 | 42,53 | 12,45 | 6,62 |
| B09/709 -T4 | 17,52 | 21,74 | 12,15 | 12,43 | 34,44 | 5,90 | 11,48 |
| B09-1316 | 41,52 | 33,00 | 9,98 | 28,62 | 70,86 | 7,56 | 12,55 |
| B09-2373 | 29,19 | 13,44 | 12,84 | 15,49 | 42,91 | 10,45 | 5,07 |
| B09-2518 | 21,52 | 20,67 | 17,50 | 27,53 | 39,45 | 4,78 | 15,16 |
| B11-753 -T5 | 16,14 | 8,66 | 17,97 | 13,77 | 20,27 | 3,27 | 17,21 |
| B12-1333 -T3 | 56,48 | 27,71 | 8,40 | 26,02 | 46,65 | 1,41 | 16,51 |
| B12-926 | 16,19 | 30,25 | 47,02 | 24,61 | 55,08 | 6,55 | 23,42 |
| T11-1958-14 | 68,08 | 29,68 | 35,77 | 22,62 | 61,21 | 2,33 | 13,36 |
| T11-2995-5 | 15,44 | 27,70 | 23,37 | 35,03 | 41,37 | 1,11 | 13,79 |
| 09-1974-60 | 34,49 | 48,65 | 9,53 | 13,64 | 51,69 | 3,87 | 8,15 |
| 09-3544-65 | 32,27 | 8,01 | 1,44 | 0,05 | 79,51 | 0,69 | 4,25 |
| 09-4268-61 | 23,04 | 20,83 | 10,54 | 11,97 | 41,59 | 3,47 | 21,02 |
| 09-4314-59 | 25,67 | 25,91 | 6,60 | 28,04 | 36,72 | 0,70 | 14,87 |

Tabela 10 (continuação). Medidas obtidas no software QuPath para marcadores da TEM, via de sinalização WNT e SPARC

| Caso | E-caderina (%) | β -catenina (%) | WNT1 (%) | WNT3A (%) | WNT5A (%) | WNT5B (%) | SPARC (%) |
|-----------------|----------------|-----------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 10-1283-64 | 14,7 | 32,99 | 13,59 | 23,85 | 39,84 | 1,49 | 10,9 |
| 10-5022-57 | 40,35 | 29,41 | 10,04 | 15,2 | 54,58 | 0,78 | 7,71 |
| 10-7749-61 | 61,55 | 13,83 | 2,56 | 0,35 | 79,9 | 4,56 | 14,53 |
| 11-0309-59 | 21,03 | 16,06 | 5,63 | 2,86 | 45,01 | 0,2 | 3,83 |
| 11-2166-63 | 18,7 | 14,63 | 3,4 | 7,82 | 40,25 | 2,03 | 13,66 |
| 11-2171-52 | 8,18 | 34,2 | 3 | 14,75 | 21,02 | 1,95 | 12,08 |
| 11-2524-61 | 41,35 | 13,99 | 1,4 | 8,82 | 59,39 | 1,42 | 20,92 |
| 11-4696-60 | 58,87 | 43,18 | 4,1 | 20,83 | 66,78 | 0,71 | 12,32 |
| 11-4950-67 | 20,88 | 48,97 | 10,25 | 17,57 | 68,31 | 2,98 | 18,57 |
| 11-5596-16 | 37,06 | 21,6 | 5,23 | 11,99 | 41,93 | 3,55 | 13,41 |
| 11-5937-62 | 23,89 | 43,08 | 8,33 | 25,66 | 30,12 | 5,27 | 8,98 |
| 11-7615-59 | 45,6 | 21,44 | 1,04 | 5,14 | 42,92 | 4,76 | 30,8 |
| 11-8724-71 | 11,4 | 44,52 | 4,79 | 17,4 | 55,82 | 0,45 | 8,86 |
| 12.14412.25 | 18,49 | 29,51 | 3,57 | 27,69 | 58,2 | 2,67 | 8,36 |
| 12-6909-10 | 60,83 | 29,38 | 2,56 | 16,19 | 47,97 | 3,68 | 11,42 |
| 12-9923-19 | 32,43 | 26,68 | 6,41 | 9,84 | 52,62 | 2,08 | 13,24 |
| 13249-11 | 18,84 | 8,76 | 7,39 | 21,02 | 37,07 | 3,61 | 19,98 |
| B09-2352 | 12,38 | 23,42 | 6,27 | 21,93 | 32,34 | 3,37 | 9,5 |
| B10 – 2801 – T2 | 11,73 | 18,21 | 3,83 | 9,98 | 25,84 | 5,11 | 13,69 |
| B10-046 -T4 | 30,53 | 14,46 | 4,75 | 14,95 | 23,45 | 1,31 | 15,99 |
| B10-1033 – T4 | 38,91 | 28,32 | 5,49 | 13,52 | 51,85 | 1,86 | 7,97 |
| B10-2735 -T3 | 16,39 | 25 | 10,6 | 15,15 | 22,18 | 6,17 | 15,45 |
| B10-3011 | 3,28 | 17,01 | 6,94 | 20,4 | 16,62 | 9,21 | 15,28 |
| B11-1620 | 20,33 | 25,4 | 8,93 | 20,59 | 57,85 | 7,89 | 18,74 |
| B11-2263 -T5 | 12,22 | 25,42 | 5,58 | 32,84 | 29,08 | 1,8 | 23 |
| B11-2552 -T2 | 23,38 | 33,76 | 7,85 | 34,91 | 55,03 | 5,45 | 22,09 |
| B11-2611 – T2 | 31,51 | 18,07 | 10,01 | 7,1 | 43,08 | 1,66 | 24,06 |
| B11-2683 -T3 | 10,22 | 18,04 | 22,87 | 32,24 | 36,08 | 3,17 | 25,42 |
| B11-2789 -T2 | 25,15 | 14,41 | 7,24 | 15,01 | 32,95 | 2,67 | 11,62 |
| B11-502 -T2 | 19,99 | 15,5 | 4,05 | 13,72 | 22,88 | 4,41 | 16,81 |
| B12-772 - T4 | 0,68 | 23,2 | 2,62 | 1,36 | 5,78 | 0,66 | 11,36 |
| HC4161866R 4 | 5,59 | 11,43 | 7,4 | 26,68 | 23,37 | 6,71 | 13,1 |
| T11.1958-19 | 24,62 | 23,71 | 5,57 | 28,65 | 45,94 | 8,25 | 13,26 |
| T11-1642-9 | 14,1 | 23,83 | 4,48 | 7,46 | 57,59 | 1,43 | 4,58 |
| T11-3892-12 | 18,81 | 19,2 | 6,57 | 22,62 | 40,82 | 6,16 | 18,76 |
| 08-45798-61 | 24,65 | 13,46 | 22,32 | 17,89 | 58,99 | 12,97 | 16,36 |

Tabela 10 (continuação). Medidas obtidas no software QuPath para marcadores da TEM, via de sinalização WNT e SPARC

| Caso | E-caderina (%) | β -catenina (%) | WNT1 (%) | WNT3A (%) | WNT5A (%) | WNT5B (%) | SPARC (%) |
|--------------|----------------|-----------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 09-10-025-58 | 7,3 | 9,65 | 12,38 | 12,59 | 25,04 | 4,12 | 9,69 |
| 09-18306-62 | 9,68 | 18,76 | 14,62 | 18,08 | 34,69 | 8,04 | 12,27 |
| 09-20485-69 | 12,13 | 22,81 | 16,52 | 24,54 | 37,26 | 4,71 | 10,78 |
| 09-2229-61 | 6,55 | 12,5 | 7,27 | 13,92 | 26,73 | 2,61 | 9,25 |
| 09-22655-66 | 48,12 | 29,88 | 1,02 | 43,21 | 60,54 | 0 | 0,64 |
| 09-26147-53 | 4,89 | 5,54 | 10,5 | 33,19 | 25,82 | 8,59 | 18,74 |
| 09-29057-54 | 15,73 | 7,66 | 15,72 | 29,2 | 26,71 | 3,91 | 19,3 |
| 09-33899-60 | 18,57 | 14,14 | 25,54 | 20,21 | 38,78 | 3,92 | 16,4 |
| 09-34862-59X | 20,11 | 12,14 | 22,03 | 17,4 | 33,86 | 0,57 | 16,67 |
| 09-3661-61 | 28,52 | 50,86 | 3,03 | 1,07 | 66,43 | 0,23 | 0,87 |
| 09-46848-58 | 17,6 | 25,84 | 16,49 | 22,77 | 45,95 | 12,08 | 20,64 |
| 10-24972-64 | 21,49 | 23,11 | 9,08 | 8,44 | 44,45 | 1,03 | 2,66 |
| 10-2680-56 | 12,03 | 18,8 | 9,83 | 12,62 | 41,14 | 2,44 | 11,16 |
| 10-33904-58 | 10,7 | 21 | 17,84 | 51,65 | 26,84 | 1 | 5,18 |
| 10-34292-57 | 23,62 | 16,95 | 16,19 | 16,58 | 43,86 | 6,17 | 9,58 |
| 10-36089-63 | 16,44 | 18,24 | 14,56 | 16,72 | 48,16 | 6,08 | 10,86 |
| 10-45419-59 | 14,08 | 22,05 | 23,48 | 40,39 | 40,5 | 11,35 | 12,06 |
| 10-46301-58 | 36,74 | 17,8 | 11,64 | 24,49 | 53,55 | 7,84 | 28,96 |
| 391088-1 | 28,02 | 14,73 | 12,63 | 15,07 | 42,2 | 1,19 | 19,83 |
| 518820-2E | 6,38 | 6,34 | 13,67 | 18,46 | 25,2 | 3,67 | 15,06 |
| 519727-9B | 7,02 | 17,03 | 11,22 | 12,71 | 34,94 | 0,34 | 19,2 |
| 524935-0D | 13,43 | 17,5 | 19,92 | 26,52 | 24,88 | 4,43 | 16,46 |
| 538429-9J | 2,76 | 8,06 | 7,97 | 9,09 | 32,61 | 0,37 | 7,34 |
| 561853-3D | 22,52 | 21,01 | 11,69 | 0,37 | 29,71 | 4,34 | 6,83 |
| 588721-65 | 9,96 | 6,64 | 3,33 | 1,68 | 86,6 | 2,27 | 2,76 |
| 588721-6B | 34,02 | 20,64 | 31,51 | 15,22 | 47,49 | 1,52 | 29,09 |
| 591595-31A | 0,77 | 1,44 | 3,68 | 15,75 | 6,87 | 0,08 | 2,07 |
| 593657-8A | 4,3 | 14,98 | 12,32 | 26,23 | 33,31 | 4,59 | 6,38 |
| 600991-3B | 26,76 | 12,32 | 10,61 | 30,51 | 40,04 | 4,91 | 10,43 |
| 602098-4A | 8,92 | 24,07 | 24,93 | 39,79 | 37,95 | 3,77 | 13,8 |

Tabela 10 (continuação). Medidas obtidas no software QuPath para marcadores da TEM, via de sinalização WNT e SPARC

| Caso | E-caderina (%) | β -catenina (%) | WNT1 (%) | WNT3A (%) | WNT5A (%) | WNT5B (%) | SPARC (%) |
|------------|----------------|-----------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 613994-9A | 7,9 | 14,6 | 21,27 | 16,71 | 37,42 | 9,04 | 16,72 |
| 613994-9E | 11,44 | 34,51 | 23,88 | 41,8 | 39,24 | 7,39 | 16,06 |
| 647573-6D | 19,65 | 17,84 | 12,58 | 29,94 | 31,14 | 4,62 | 5,96 |
| 651176-7D | 8,87 | 10,38 | 8,86 | 9,32 | 22,36 | 1,08 | 3,3 |
| 655159-9K | 8,42 | 6,46 | 9,41 | 30,45 | 36,71 | 2,35 | 17,13 |
| 661922-3B | 37,45 | 28,39 | 12,47 | 5,48 | 56,93 | 3,15 | 27,57 |
| 667653-7 | 32,04 | 26,78 | 10,83 | 21,79 | 46,59 | 6,65 | 9,38 |
| 689410-0K | 23,14 | 21,33 | 9,95 | 18,84 | 63,03 | 2,51 | 13,11 |
| 692397-6B | 17,13 | | | | 34,36 | 2,51 | 20,97 |
| 70-7051-9A | 4,4 | 14,59 | 8,01 | 5,05 | 27,41 | 0,93 | 10,41 |
| 710369-7A | 1,06 | 6,38 | 12,43 | 21,81 | 28,75 | 3,21 | 33,09 |
| 7304315 A | 5,06 | 19,15 | 17,94 | 12,01 | 30,6 | 6,05 | 9,85 |
| B09-1842 | 15,63 | 28,36 | 34,56 | 32,27 | 40,39 | 9,95 | 24,44 |
| B10-1733 | 0,86 | | | | 29,55 | 0,55 | 7,79 |
| B11-1266 | 21,65 | 14,55 | 34,48 | 24,93 | 44,06 | 6,74 | 21,31 |

Tabela 11. Medidas obtidas no software QuPath para GAGs e tipos de colágenos

| Caso | HS (%) | SC (%) | Col I (%) | Col III (%) | Col IV (%) | Col V (%) |
|---------------|--------|--------|-----------|-------------|------------|-----------|
| 09.4566-58 | 0,93 | 18,03 | 0,21 | 21,89 | 0,47 | 11,89 |
| 09-5058-53 | 2,73 | 17,90 | 9,20 | 37,55 | 1,91 | 27,55 |
| 10-2138-58 | 0,59 | 20,09 | 1,02 | 35,00 | 2,40 | 5,22 |
| 10-3135-56 | 0,88 | 14,24 | 6,27 | 32,77 | 5,52 | 12,77 |
| 10-4822-55 | 1,04 | 19,84 | 1,74 | 33,72 | 0,39 | 3,72 |
| 10-6443-57 | 1,50 | 4,73 | 5,45 | 39,17 | 2,44 | 19,17 |
| 10-8255-54 | 2,88 | 11,45 | 2,33 | 49,29 | 1,15 | 10,29 |
| 10-8995-58 | 0,10 | 16,23 | 3,14 | 28,93 | 0,45 | 28,93 |
| 10-9639-52 | 0,28 | 25,55 | 2,82 | 39,39 | 0,77 | 9,39 |
| 11-2785-56 | 0,54 | 17,33 | 3,90 | 34,24 | 1,06 | 4,24 |
| 11-4249-4 | 0,77 | 7,83 | 3,70 | 29,65 | 3,34 | 19,65 |
| 11-4619-12 | 0,52 | 9,03 | 1,69 | 30,56 | 2,70 | 10,56 |
| 11-550-60 | 2,61 | 12,16 | 4,75 | 31,00 | 5,64 | 21,00 |
| 11-5877-66 | 2,96 | 21,25 | 3,49 | 35,56 | 0,49 | 15,56 |
| 11-8202-60 | 0,40 | 19,28 | 3,20 | 22,00 | 1,52 | 32,33 |
| 11-8485-67 | 1,57 | 23,58 | 1,45 | 33,78 | 1,16 | 23,78 |
| 11-8849-61 | 1,16 | 6,23 | 1,02 | 38,15 | 16,89 | 28,15 |
| 11-9061-66 | 0,87 | 15,61 | 2,26 | 34,39 | 1,22 | 24,39 |
| 12-11006-04 | 2,02 | 20,31 | 0,77 | 40,24 | 3,45 | 20,24 |
| 12-11406-23 | 1,45 | 22,79 | 1,34 | 35,90 | 0,36 | 15,90 |
| 12-12505-7 | 4,00 | 7,70 | 2,13 | 38,70 | 3,12 | 18,70 |
| 12-7274-15 | 2,87 | 24,42 | 4,20 | 9,56 | 0,82 | 9,56 |
| 12-8446-12 | 2,42 | 27,42 | 6,61 | 30,28 | 4,70 | 10,28 |
| 13-10712-15 | 0,59 | 1,60 | 0,43 | 21,40 | 1,09 | 11,40 |
| 16157-4 | 0,50 | 24,92 | 1,19 | 29,37 | 0,77 | 39,37 |
| 19011-2 | 0,78 | 16,32 | 4,52 | 33,32 | 2,11 | 13,32 |
| B09/709 -T4 | 0,06 | 23,33 | 3,39 | 24,89 | 1,80 | 14,89 |
| B09-1316 | 0,19 | 4,23 | 4,99 | 33,18 | 0,76 | 13,18 |
| B09-2373 | 1,58 | 0,24 | 0,45 | 40,45 | 2,22 | 30,45 |
| B09-2518 | 0,58 | 39,60 | 0,83 | 32,40 | 8,42 | 12,40 |
| B11-753 -T5 | 0,43 | 11,75 | 5,01 | 34,68 | 3,37 | 4,68 |
| B12-1333 - T3 | 0,72 | 17,15 | 4,03 | 31,40 | 1,72 | 11,40 |
| B12-926 | 1,35 | 15,53 | 2,90 | 29,95 | 2,82 | 20,95 |
| T11-1958-14 | 1,25 | 11,50 | 2,87 | 35,85 | 1,15 | 15,85 |
| T11-2995-5 | 0,39 | 22,80 | 1,98 | 37,57 | 2,67 | 17,57 |
| 09-1974-60 | 1,62 | 15,45 | 4,20 | 25,17 | 2,10 | 15,17 |
| 09-3544-65 | 0,06 | 0,64 | 3,99 | 21,44 | 3,34 | 11,44 |
| 09-4268-61 | 0,50 | 10,43 | 3,67 | 25,39 | 10,73 | 15,39 |
| 09-4314-59 | 1,92 | 10,20 | 4,80 | 21,58 | 2,09 | 11,58 |
| 10-1283-64 | 1,57 | 9,36 | 0,90 | 7,04 | 3,61 | 7,04 |
| 10-5022-57 | 1,15 | 4,24 | 1,10 | 21,44 | 4,07 | 1,44 |
| 10-7749-61 | 0,55 | 7,71 | 1,90 | 20,99 | 4,07 | 10,99 |
| 11-0309-59 | 0,26 | 2,08 | 2,07 | 13,03 | 1,13 | 23,03 |
| 11-2166-63 | 1,63 | 0,64 | 3,23 | 14,97 | 2,50 | 4,97 |
| 11-2171-52 | 1,22 | 9,15 | 0,33 | 16,40 | 7,83 | 6,40 |
| 11-2524-61 | 0,31 | 4,39 | 2,88 | 11,92 | 6,25 | 23,92 |
| 11-4696-60 | 0,32 | 11,90 | 1,92 | 12,58 | 3,43 | 28,58 |
| 11-4950-67 | 0,58 | 3,53 | 0,99 | 33,64 | 1,23 | 23,64 |
| 11-5596-16 | 0,77 | 3,57 | 3,20 | 8,70 | 1,79 | 41,91 |
| 11-5937-62 | 1,78 | 10,66 | 0,22 | 19,50 | 2,24 | 10,50 |
| 11-7615-59 | 0,60 | 12,73 | 9,20 | 27,00 | 1,65 | 10,90 |
| 11-8724-71 | 1,75 | 16,44 | 1,03 | 28,80 | 1,54 | 15,50 |

Tabela 11 (continuação). Medidas obtidas no software QuPath para GAGs e tipos de colágenos

| Caso | HS (%) | SC (%) | Col I (%) | Col III (%) | Col IV (%) | Col V (%) |
|-----------------|--------|--------|-----------|-------------|------------|-----------|
| 12.14412.25 | 0,83 | 2,76 | 5,27 | 22,6 | 1,76 | 5,22 |
| 12-6909-10 | 1,35 | 2,09 | 1,84 | 23 | 12,77 | 11,7 |
| 12-9923-19 | 0,97 | 7,35 | 5,45 | 23,9 | 8,1 | 3,72 |
| 13249-11 | 2,91 | 22,78 | 2,44 | 33,9 | 9,16 | 18,16 |
| B09-2352 | 1,05 | 14,09 | 3,12 | 27,8 | 8,23 | 11 |
| B10 – 2801 – T2 | 0,6 | 2,71 | 2,89 | 19,5 | 5,97 | 18,23 |
| B10-046 -T4 | 1,83 | 3,63 | 3,35 | 24 | 7,47 | 10,29 |
| B10-1033 – T4 | 2,07 | 3,34 | 2,67 | 19 | 5,15 | 5,24 |
| B10-2735 -T3 | 0,07 | 14,66 | 1,79 | 28,9 | 5,58 | 20 |
| B10-3011 | 1,28 | 12,46 | 3,99 | 29,5 | 4,88 | 11,56 |
| B11-1620 | 2,06 | 8,07 | 4,29 | 25,6 | 7,2 | 19,35 |
| B11-2263 -T5 | 2,4 | 3,11 | 3,4 | 22 | 4 | 15,76 |
| B11-2552 -T2 | 2,22 | 4,18 | 1,5 | 32,1 | 0,68 | 22 |
| B11-2611 – T2 | 1,72 | 2,37 | 1,32 | 29,9 | 6,3 | 23,78 |
| B11-2683 -T3 | 3,62 | 13,85 | 2,35 | 31,2 | 9,86 | 21,8 |
| B11-2789 -T2 | 1,7 | 5,88 | 0,99 | 20,9 | 7,77 | 24,39 |
| B11-502 -T2 | 0,91 | 1,01 | 1,43 | 29,9 | 5,4 | 20,24 |
| B12-772 - T4 | 0,09 | 3,68 | 2,22 | 28,7 | 7,91 | 15,9 |
| HC4161866R4 | 0,4 | 3,19 | 6,23 | 31,7 | 7,93 | 18,7 |
| T11.1958-19 | 2,28 | 2,69 | 0,43 | 21,4 | 2,15 | 11,28 |
| T11-1642-9 | 0,39 | 5,63 | 3,14 | 12,15 | 2,29 | 8,15 |
| T11-3892-12 | 1,73 | 10,42 | 1,26 | 28,7 | 6,3 | 11,3 |
| 08-45798-61 | 3,09 | 18,06 | 3,21 | 24,89 | 1,69 | 13,32 |
| 09-10-025-58 | 1,03 | 4,76 | 5,45 | 24,1 | 1,64 | 14,89 |
| 09-18306-62 | 3,76 | 16,02 | 0,55 | 28,7 | 10,06 | 13,18 |
| 09-20485-69 | 0,84 | 15,85 | 0,86 | 30,1 | 1,49 | 20,67 |
| 09-2229-61 | 3,57 | 0,06 | 4,68 | 30,4 | 10,3 | 12,4 |
| 09-22655-66 | 1,71 | 4,5 | 3,79 | 31,4 | 11,18 | 4,68 |
| 09-26147-53 | 6,14 | 22,99 | 3,99 | 29,8 | 8,07 | 19,4 |
| 09-29057-54 | 3,14 | 6,66 | 3,62 | 25,6 | 2,91 | 11,4 |
| 09-33899-60 | 4,72 | 0,29 | 4,5 | 15,9 | 2,27 | 10,6 |
| 09-34862-59X | 0,71 | 23,85 | 1,89 | 17,9 | 1,03 | 15,85 |
| 09-3661-61 | 0,2 | 7,25 | 3,14 | 12,15 | 4,74 | 17,57 |
| 09-46848-58 | 3,94 | 3,12 | 2,3 | 25,17 | 1,92 | 8,15 |
| 10-24972-64 | 4,79 | 7,05 | 4,2 | 21,44 | 4,52 | 15,17 |
| 10-2680-56 | 0,75 | 21,13 | 4,56 | 21,9 | 1,15 | 11,44 |
| 10-33904-58 | 0,76 | 14,87 | 4,7 | 20,7 | 0,97 | 15,39 |
| 10-34292-57 | 1,23 | 28,2 | 0,9 | 10,4 | 0,71 | 11,58 |
| 10-36089-63 | 5,3 | 15,3 | 1,2 | 11,9 | 7,8 | 7,04 |
| 10-45419-59 | 1,72 | 10,49 | 1,9 | 7,04 | 1,7 | 2,13 |
| 10-46301-58 | 4,02 | 6,18 | 2,07 | 21,44 | 2,97 | 9,89 |
| 391088-1 | 1,94 | 15,25 | 2,56 | 20,99 | 19,78 | 13,8 |
| 518820-2E | 1,85 | 25,8 | 0,33 | 13,03 | 3,54 | 4,65 |
| 519727-9B | 2,96 | 20,58 | 2,76 | 15,4 | 8,63 | 5,7 |
| 524935-0D | 0,54 | 30,41 | 1,99 | 16,4 | 2,16 | 13,4 |
| 538429-9J | 0,71 | 9,08 | 0,99 | 12,6 | 2,56 | 18,3 |
| 561853-3D | 0,23 | 6,17 | 3,34 | 12,58 | 3,82 | 13,64 |
| 588721-65 | 0,38 | 0,64 | 1,42 | 23,6 | 1,75 | 11,25 |
| 588721-6B | 1,09 | 21,32 | 1,20 | 8,7 | 0,72 | 10,5 |
| 591595-3 1A | 1,2 | 3,12 | 2,35 | 19,5 | 3,27 | 10,9 |
| 593657-8A | 2,86 | 5,97 | 0,87 | 26,9 | 10,46 | 14,5 |
| 600991-3B | 0,73 | 0,3 | 1,43 | 26,5 | 8,7 | 5,22 |
| 602098-4A | 0,38 | 11,17 | 2,3 | 22,6 | 2,69 | 12,76 |
| 613994-9A | 2,42 | 20,51 | 6,51 | 20,3 | 7,86 | 3,72 |
| 613994-9E | 2,17 | 15,84 | 0,45 | 23,9 | 0,89 | 15,8 |
| 647573-6D | 1,16 | 25,63 | 1,26 | 31,9 | 1,7 | 11 |
| 651176-7D | 0,86 | 10,73 | 4,66 | 27,8 | 6,15 | 16,7 |

Tabela 11 (continuação). Medidas obtidas no software QuPath para GAGs e tipos de colágenos

| Caso | HS (%) | SC (%) | Col I (%) | Col III (%) | Col IV (%) | Col V (%) |
|-------------|---------------|---------------|------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| 655159-9K | 3,35 | 21,67 | 4 | 19,5 | 11,75 | 11,77 |
| 661922-3B | 2,55 | 23,19 | 5,9 | 24 | 5,83 | 5,24 |
| 667653-7 | 2,34 | 15,54 | 0,54 | 19 | 6,84 | 20 |
| 689410-0K | 1,66 | 11,73 | 0,77 | 18 | 13,39 | 10,64 |
| 692397-6B | 0,64 | 6,53 | 5,78 | 19,9 | 5,95 | 19,01 |
| 70-7051-9A | 0,34 | 2,47 | 4,13 | 15,6 | 0,77 | 5,67 |
| 710369-7A | 2,6 | 4,49 | 2,68 | 22 | 4,55 | 12,5 |
| 7304315 A | 0,62 | 6,84 | 0,87 | 22,5 | 9,41 | 13,7 |
| B09-1842 | 2,63 | 3,84 | 2,53 | 22,9 | 0,59 | 11,5 |
| B10-1733 | | 20,36 | 2,3 | 24,9 | 6,08 | 14,3 |
| B11-1266 | 2,4 | 9,34 | 3,47 | 20,9 | 1,33 | 10,4 |

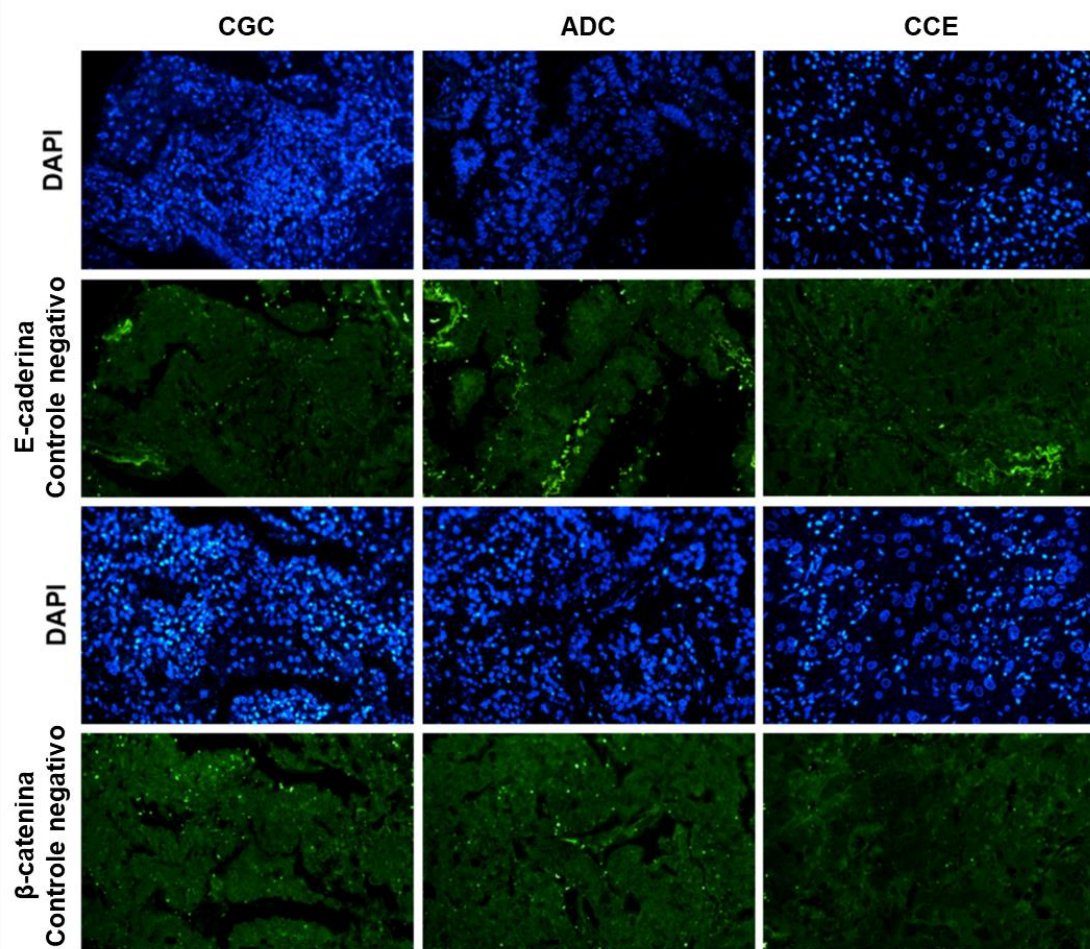
APÊNDICE B – Controles negativos para as imagens de imunofluorescência

Figura 31. Controles negativos de imunofluorescência para E-caderina e β -catenina nos diferentes subtipos histológicos de CPNPC. Os núcleos corados são representados em azul (DAPI). Ampliação original: 40X. Abreviaturas: CGC, carcinoma de grandes células; ADC, adenocarcinoma; CCE, carcinoma de células escamosas.

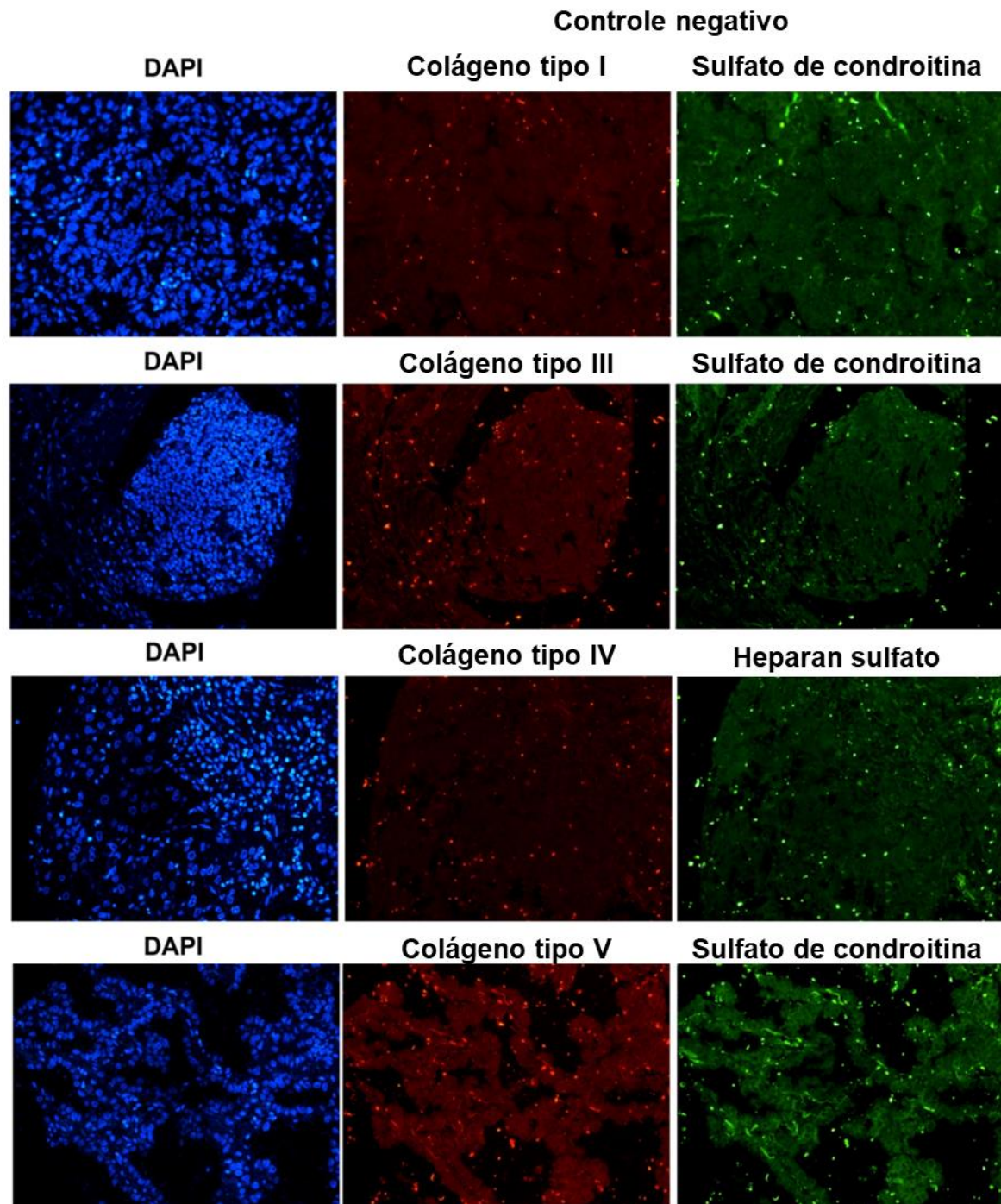


Figura 32. Controles negativos de imunofluorescência para sulfato de condroitina e heparan sulfato (verde) e colágeno tipos I, III, IV e V (vermelho). Os núcleos corados são representados em azul (DAPI). Ampliação original: 40X.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Rng Zhan,
Nanjing University School of Medicine,
China

REVIEWED BY

Jing Yang,
Chongqing Technology and Business
University, China
Chrysostomi Gialeli,
Lund University, Sweden

*CORRESPONDENCE

Camila Machado Baldavira
camilamachado@usp.br
Vera Luiza Capelozzi
vera.capelozzi@fm.usp.br

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Thoracic Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

RECEIVED 13 September 2022

ACCEPTED 27 October 2022

PUBLISHED 14 November 2022

CITATION

Baldavira CM, Prieto TG,
Machado-Rugolo J, de Miranda JT, de
Oliveira LKR, Velosa APP, Teodoro WR,
Ab'Saber A, Takagaki T and
Capelozzi VL (2022) Modeling
extracellular matrix through
histo-molecular gradient in NSCLC for
clinical decisions.
Front. Oncol. 12:1042766.
doi: 10.3389/fonc.2022.1042766

COPYRIGHT

© 2022 Baldavira, Prieto,
Machado-Rugolo, de Miranda,
de Oliveira, Velosa, Teodoro,
Ab'Saber, Takagaki and Capelozzi. This is an
open-access article distributed under
the terms of the Creative Commons
Attribution License (CC BY). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use,
distribution or reproduction is
permitted which does not comply with
these terms.

Modeling extracellular matrix through histo-molecular gradient in NSCLC for clinical decisions

Camila Machado Baldavira^{1a}, Tabatha Gutierrez Prieto¹,
Juliana Machado-Rugolo^{1,2}, Jurandir Tomaz de Miranda³,
Lizandre Keren Ramos de Oliveira³, Ana Paula Pereira Velosa³,
Walcy Rosolia Teodoro³, Alexandre Ab'Saber¹, Teresa Takagaki⁴
and Vera Luiza Capelozzi^{1a}

¹Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Health Technology Assessment Center, Clinical Hospital, Medical School of São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil, ³Rheumatology Division of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, ⁴Division of Pneumology, Instituto do Coração (Incor), University of São Paulo Medical School (USP), São Paulo, Brazil

Lung cancer still represents a global health problem, being the main type of tumor responsible for cancer deaths. In this context, the tumor microenvironment, and the extracellular matrix (ECM) pose as extremely relevant. Thus, this study aimed to explore the prognostic value of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), Wnt signaling, and ECM proteins expression in patients with non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) with clinical stages I-IIIa. For that, we used 120 tissue sections from patients and evaluated the immunohistochemical, immunofluorescence, and transmission electron microscopy (TEM) to each of these markers. We also used *in silico* analysis to validate our data. We found a strong expression of E-cadherin and β -catenin, which reflects the differential ECM invasion process. Therefore, we also noticed a strong expression of chondroitin sulfate (CS) and collagens III and V. This suggests that, after EMT, the basal membrane (BM) enhanced the motility of invasive cells. EMT proteins were directly associated with WNT5A, and collagens III and V, which suggests that the WNT pathway drives them. On the other hand, heparan sulfate (HS) was associated with WNT3A and SPARC, while WNT1 was associated with CS. Interestingly, the association between WNT1 and Col IV suggested negative feedback of WNT1 along the BM. In our cohort, WNT3A, WNT5A, heparan sulfate and SPARC played an important role in the Cox regression model, influencing the overall survival (OS) of patients, be it directly or indirectly, with the SPARC expression stratifying the OS into two