

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO
HIALURÔNICO NO ESCARRO DE PACIENTES COM
CÂNCER DE PULMÃO, DOENÇA PULMONAR
OBSTRUTIVA CRÔNICA E INDIVÍDUOS NORMAIS**

JULIANO PRUDÊNCIO CHINOCA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente para
obtenção de Título de Mestre em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Vanessa Karen de Sá

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

C539a Chinoca, Juliano Prudêncio

Avaliação da concentração do ácido hialurônico no escarro de pacientes com câncer de pulmão, doença pulmonar obstrutiva crônica e indivíduos normais /

Juliano Prudêncio Chinoca - São Paulo 2021.

71p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Vanessa Karen de Sá

Descritores. 1. Ácido Hialurônico/Hyaluronic Acid. 2. Glicosaminoglicanos/
Glycosaminoglycans. 3. Neoplasias Pulmonares/Lung Neoplasms. 4. Biomarcadores/
Biomarkers

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através de auxílio à Pesquisa – Mestrado (nº 2015/26642-4).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nilde e Roberto, agradeço a todos os valores ensinados e bons exemplos transmitidos ao longo da minha vida. Com certeza aproveitei ao máximo cada um destes ensinamentos e me tornei a pessoa que hoje sou.

À minha amada esposa, Maria Carolina Lourenço-Chinoca, agradeço o apoio, a paciência e o companheirismo nos momentos mais difíceis da execução deste trabalho.

Ao meu irmão, Roberto Prudêncio Chinoca, por sempre me apoiar nas empreitadas mais difíceis da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Vanessa Karen de Sá, agradeço a oportunidade concedida e pela maneira como me conduziu na realização deste trabalho. Obrigado por me ouvir nos momentos de maiores tensões e por me incentivar nos momentos de cansaço e apreensão. O caminho percorrido não foi fácil, ainda mais quando não temos muito tempo para percorrê-lo. Isso tornou o desafio ainda maior, porém, carrego comigo a sensação de ter feito o meu melhor. Serei eternamente grato!

À Dra. Dirce Maria Carraro, por me abrir as portas do CIPE para esta nova empreitada na minha vida e pela excelente acolhida.

Ao Dr. Joao Roberto Maciel Martins, pelo apoio técnico e teórico na realização dos meus experimentos. Me faltam as palavras para agradecer todo a atenção que recebi em todas as vezes que precisei.

À Dra. Aline Mendes, sou muito grato por toda a ajuda que me foi dada durante estes 2 anos. Muito trabalho, acertos, erros e ajustes, mas no fim tudo deu certo! Agradeço a todos os alunos e professores do INFAR pela receptividade.

Ao Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro por toda a ajuda prestada, pela discussão dos casos, críticas construtivas e sugestões sempre pertinentes.

Ao Dr. Helano Carioca de Freitas, pela atenção e ajuda no recrutamento dos pacientes, agradeço também as sugestões dadas.

Ao Dr. Daniel Pereira pela sua ajuda inestimável no recrutamento dos pacientes na Pneumologia.

Ao Dr. Pedro de Marchi do Hospital de Amor de Barretos pela grande parceria que foi fundamental para a execução deste trabalho, e pela excelente acolhida no período em que estive em Barretos. Também agradeço à eficiente equipe da pesquisa clínica, biobanco e pós-graduação que me auxiliaram em todos os momentos.

Ao Dr. Rubens Chojniak por todas as conversas, análises dos resultados, reuniões, conselhos e ensinamentos.

À Dra. Vera Capelozzi pela ajuda na avaliação dos resultados e atenção prestada na fase mais crítica do desenvolvimento deste trabalho.

À toda equipe médica da oncologia clínica do A.C.Camargo Cancer Center por toda atenção e ajuda que me foi dada ao longo da realização das coletas.

Ao time do laboratório de genômica e biologia molecular do CIPE, pela ótima recepção e pelo excelente convívio durante a execução do meu projeto: Paulo Baldan, Rafael Brianese, Débora Andrade, Giovana Torrezan, Cláudia de Paula, Carolina Berra, Karina Santiago, Isabella Tanus, Julia Salles, Sara Oliveira, Nathalia Angelis, Joselito Sobreira, Ana Miguez e Ana Carolina de Araújo.

À todas as colaboradoras do biobanco do A.C.Camargo Cancer Center pela atenção, organização e eficiência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro.

Aos pacientes, acompanhantes e voluntários que aceitaram de bom grado a participar deste trabalho.

RESUMO

Chinoca JP. **Avaliação da concentração do ácido hialurônico em amostras de escarro em portadores de câncer de pulmão, doença pulmonar obstrutiva crônica e indivíduos normais.** [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2021.

Introdução: O câncer de pulmão (CP) é a causa mais comum de morte por neoplasia em todo o mundo. No Brasil, é estimado pelo INCA cerca de 17.760 novos casos em homens e 12.440 casos em mulheres para o ano de 2020. Muitos grupos de pesquisas estudam e investem em estratégias para desenvolver métodos diagnósticos não invasivos, novos biomarcadores e novas técnicas de auxílio ao diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer de pulmão. Neste cenário, surge o ácido hialurônico como um potencial candidato a predição e detecção precoce do câncer de pulmão devido a sua elevada concentração neste tipo de neoplasia. **Objetivo:** validar os níveis de ácido hialurônico no escarro de pacientes com CP, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e voluntários saudáveis, e avaliar a sua capacidade como marcador prognóstico nas neoplasias respiratórias; e correlacionar os níveis de HA com os dados clínicos dos pacientes. Avaliar se há diferenças nos níveis de ácido hialurônico no escarro de pacientes com CP no momento do diagnóstico e após avaliação de resposta terapêutica, e correlacionar estes dados ao tratamento. **Resultados:** Houve uma elevação significativa nos níveis de ácido hialurônico nos pacientes com CP em relação aos pacientes com DPOC e saudáveis ($p=0.01$), assim como níveis significativamente elevados de HA nos pacientes com carcinoma de células escamosas em relação aos outros tipos histológicos ($p=0.02$). Os níveis de HA no escarro coletado a 7% NaCl foram significativamente maiores em comparação aos obtidos com NaCl 3% nas seguintes correlações: idade >58 anos ($p<0.01$), sexo masculino ($p=0.001$), fumantes ($p=0.002$), carcinoma de células escamosas ($p=0.03$), tumor no estágio T3 ($p=0.05$), mutação KRAS ($p=0.05$) e progressão da doença avaliada por tomografia computadorizada ($p=0.01$). Observamos que houve uma redução significativa dos níveis de HA no escarro a 7% de NaCl nos pacientes após terapia, independentemente do tipo de tratamento ($p=0.003$). O modelo matemático de risco de morte para os pacientes com CP, incluindo o HA como variável co-dependente das variáveis estadiamento clínico (EC), estadiamento TNM, tipo de resposta do tumor ao tratamento, QT e QT + imunoterapia, revelou que pacientes com níveis de HA >29.7 ng/mg (HR:2,4; $p=0.001$), EC III (HR:2,5; $p=0.014$), apresentaram maior risco de morte quando

comparados aos pacientes com níveis de HA < 29.7 ng/mg (HR:2,1; p=0.0001), EC I e II (HR: 0,65, p=0.001), estadio T1 (HR:0,32; p=0,001), resposta completa ao tratamento (HR:4,98, p=0.001) e receberam QT+IM (HR:0,98; p=0.02). Assumindo um ponto de corte de 77.3 ng/mg de HA, através da curva ROC, pudemos diferenciar com 100% de sensibilidade e 86% de especificidade os indivíduos que responderam e não responderam ao tratamento, conferindo ao HA um possível papel na predição de resposta. **Conclusão:** Constatamos níveis decrescentes de HA em pacientes com CP, DPOC e voluntários saudáveis, respectivamente, despontando a dosagem do HA como promissora no rastreamento de indivíduos com risco para câncer de pulmão. A solução de NaCl 7% revelou-se a mais adequada no processo de indução do escarro. O efeito da terapia impactou significativamente na diminuição dos níveis de HA, independentemente do tipo de tratamento. Por fim, o estabelecimento da divisão entre os pacientes respondedores e não respondedores, dados pela curva ROC, apresentou elevada sensibilidade e especificidade entre os dois grupos e conferiu ao ácido hialurônico uma possível capacidade em predizer respostas terapêuticas.

Descritores. Ácido Hialurônico. Glicosaminoglicanos. Neoplasias Pulmonares. Biomarcadores.

ABSTRACT

Chinoca JP. [Evaluation of hyaluronan concentration in sputum samples in patients with lung cancer, chronic obstructive pulmonary disease and normal individuals]. [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2021.

Introduction: Lung cancer (LC) is the most common cause of death from cancer worldwide, and in Brazil, the INCA estimates an estimated 17,760 new cases in men and 12,440 cases in women by the year 2020. Many researches groups study and invest in strategies to develop non-invasive diagnostic methods, new biomarkers, and new techniques to aid in the diagnosis, prognosis, and treatment of lung cancer. In this scenario, hyaluronic acid appears as a potential candidate for the prediction and early detection of lung cancer due to its high concentration in this type of neoplasia. **Objective:** verify the differences in hyaluronic acid levels among patients with LC, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and healthy volunteers, and to evaluate its capacity as a prognostic marker in respiratory neoplasms, and correlate HA levels with patients' clinical data. To assess whether there are differences in the levels of HA in the sputum of patients with LC at the time of diagnosis and after assessment of therapeutic response and correlate these data with treatment. **Results:** There was a significant increase in HA levels in patients with LC compared to COPD and healthy patients ($p=0.01$), as well as significantly elevated levels of HA in patients with squamous cell carcinoma compared to other histological types ($p=0.02$). The levels of HA in sputum collected at 7% NaCl were significantly higher compared to those obtained with 3% NaCl in the following correlations: age >58 years ($p<0.01$), male ($p=0.001$), smokers ($p=0.002$), squamous cell carcinoma ($p=0.03$), tumor at stage T3 ($p=0.05$), KRAS mutation ($p=0.05$) and disease progression assessed by computed tomography ($p=0.01$). We observed that there was a significant reduction in the levels of HA in sputum to 7% NaCl in patients after therapy, regardless of the type of treatment ($p=0.003$). The mathematical model of risk of death for patients with LC, including HA as a co-dependent variable of the variables clinical staging (CS), TNM staging, type of tumor response to treatment, QT and QT + immunotherapy, revealed that patients with HA levels >29.7 ng/mg (HR:2.4; $p=0.001$), CS III (HR:2.5; $p=0.014$), had a higher risk of death when compared to patients with HA levels < 29.7 ng/mg (HR:2.1; $p=0.0001$), CS I and II (HR:0.65, $p=0.001$), stage T1 (HR:0.32; $p=0.001$), complete response to treatment (HR:4.98, $p=0.001$) and received

QT + IM (HR:0.98; p=0.02). Assuming a cutoff point of 77.3 ng/mg of HA, through the ROC curve, we were able to differentiate with 100% sensitivity and 86% specificity, the individuals who responded and did not respond to treatment. **Conclusion:** We found decreasing levels of HA in patients with LC, COPD, and healthy volunteers, respectively, showing the measurement of HA as promising in the screening of individuals at risk for lung cancer. The 7% NaCl solution proved to be the most suitable in the sputum induction process. The effect of therapy had a significant impact on the decrease in HA levels, regardless of the type of treatment. Finally, the establishment of the division between responders and non-responders, given by the ROC curve, showed high sensitivity and specificity between the two groups and gave hyaluronan a possible ability to predict therapeutic responses.

Keywords: Hyaluronan. Glycosaminoglycans. Lung Cancer. Biomarkers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração da fórmula estrutural da unidade de dissacarídeo do ácido hialurônico e seus constituintes.....	10
Figura 2	Esquema demonstrando os sítios de interação do ácido hialurônico na matriz extracelular, nos receptores de membrana e na região intracelular	11
Figura 3	Esquema demonstrando a atuação dos diferentes fragmentos do ácido hialurônico e a determinação da função molecular conforme peso molecular na progressão tumoral e na resposta imune	13
Figura 4	Análise dos diferentes níveis de concentração de HA presentes nas amostras tumorais e não tumorais.....	27
Figura 5	Análise dos diferentes níveis de concentração de HA presente nas amostras coletadas antes (CPNPC pré tto) e após o tratamento e após (CPNPC pós tto) o tratamento	28
Figura 6	Análise dos diferentes níveis de concentração de HA presente nas amostras de CPNPC (pré tto) e DPOC	29
Figura 7	Análise dos diferentes níveis de concentração de HA presente nas amostras de CPNPC (pré tto) e Controle Saudável	30
Figura 8	Análise dos diferentes níveis de concentração de HA presente nas amostras de CPNPC (pré tto) e tipos histológicos (AD, CEC e CGC)	32
Figura 9	Análise dos diferentes níveis de concentração de HA nas amostras tumorais no momento do diagnóstico (CPNPC - pré tto) e após a primeira avaliação de resposta (CPNPC -pós tto)	34
Figura 10	Análise dos diferentes níveis de concentração de HA presente nas amostras dos pacientes com CPNPC (pré tto) e tipos histológicos	35

Figura 11	Análise dos diferentes níveis de concentração de HA presente nas amostras dos pacientes coletados no Hospital de Amor de Barretos (CPNPC 3% (pré tto) / CPNPC 3% pós tto) e A.C.Camargo Cancer Center (CPNPC 7% (pré tto) / CPNPC 7% (pós tto)).....	37
Figura 12	Análise dos diferentes níveis de concentração de HA presente nas amostras dos pacientes com CPNPC 3% (pré tto) e CPNPC 7% (pré tto), estratificados pelos tipos histológicos.....	38
Figura 13	Avaliação dos níveis de HA e sua relação com o tabagismo em pacientes com CPNPC induzidos com NaCl 7%	41
Figura 14	Avaliação dos níveis de HA e sua relação com o estadiamento clínico em pacientes com CPNPC (pré tto) induzidos com NaCl 7%.....	42
Figura 15	Avaliação dos níveis de HA e sua relação com o estadiamento patológico T em pacientes com CPNPC (pré tto) induzidos com NaCl 7%	43
Figura 16	Avaliação dos níveis de HA e sua relação com as respostas aos tratamentos avaliadas por tomografia computadorizada	43
Figura 17	Pacientes avaliados conforme sobrevida em meses e diferentes concentrações de HA.....	48
Figura 18	Relação dos níveis de HA no escarro e pacientes respondedores e não-respondedores ao tratamento	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas dos pacientes avaliados pelo estudo.....	23
Tabela 2	Características demográficas do grupo controle	25
Tabela 3	Análise descritiva dos valores de HA (ng/mg) em amostras tumorais e não tumorais.....	26
Tabela 4	Análise descritiva dos valores de HA em amostras tumorais estratificadas por tipos histológicos	31
Tabela 5	Análise descritiva dos valores de HA em amostras tumorais coletadas antes e depois do tratamento (ng/mg de escarro).....	33
Tabela 6	Distribuição dos níveis de HA entre os diferentes tipos histológicos dos pacientes com CPNPC (pré tto)	34
Tabela 7	Dosagem do HA nas amostras de escarro obtidas com NaCl 3% e 7%	36
Tabela 8	Características clínico-patológicas e suas relações com o HA.....	40
Tabela 9	Análise univariada e multivariada dos pacientes do A.C.Camargo Cancer Center e HAB pelo modelo matemático de Cox para avaliação do risco relativo de morte sob controle de idade, estágio, tratamento e tipos histológicos.....	45
Tabela 10	Risco relativo de morte controlado por estadiamento, tratamento e resposta terapêutica de acordo com os níveis de HA	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AD	Adenocarcinoma
CD44	Antígeno de superfície celular
CEC	Carcinoma de células escamosas
CGC	Carcinoma de grandes células
CHT	<i>Chemotherapy</i>
CHT+IM	<i>Chemotherapy + Immunotherapy</i>
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
CP	Câncer de pulmão
CPPC	Carcinoma pulmonar pequenas células
CPNPC	Carcinoma de pulmão não pequenas células
CNEPC	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células
CS	<i>Clinical Stage</i>
DMV	Densidade microvascular
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EC	Estadiamento clínico
ed.	Edição
EGF	Fator de crescimento epidermal
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EMT	Transição epitélio-mesenquinal
et al.	e outros
EUA	Estados Unidos da América
Fig.	Figuras
GAG	Glicosaminoglicanos
GLM	Modelo linear generalizado
HA	Ácido hialurônico
HAB	Hospital de Amor de Barretos

Hases	Hialuronidasas
HR	<i>Hazard ratio</i>
HAS	Ácido hialurônico sintase
HDG	Fator de crescimento de hepatócito
IL-6	Interleucina 6
IM	Imunoterapia
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INFAR	Instituto de Farmacologia da UNIFESP
KPS	<i>Karnofsky Performance Status</i>
LC	<i>Lung cancer</i>
MEC	Matriz extra-celular
NaCl	Cloreto de sódio
NEU	Carcinoma neuroendócrino
ng/mg	Nanogramas por miligramas
µl	Microlitro
NNK	4-(metil nitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona
NNN	N-nitrosonornicotina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	Sobrevida global
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PL	Proteína de ligação do HA
PSGL-1	Ligante de proteína P-selectina
QT	Quimioterapia
QT+IM	Quimioterapia + Imunoterapia
RG	Registro Geral
RHAMM	Receptor de ácido hialurônico mediador de motilidade
ROC	Curva característica de operação do receptor
RT	Radioterapia
SIH	Sistema de informações hospitalares

SqCC	<i>Squamous cell carcinoma</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Tomografia computadorizada
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGFβ	Fator transformador de crescimento beta
TLR	Receptor de <i>toll like</i>
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TNM	Estadiamento patológico
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
VEF-1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VEGF	Fator de crescimento endotélio vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer de Pulmão – Incidência e Mortalidade	1
1.2	A relação do tabaco com a carcinogênese pulmonar	1
1.3	Classificação anatomopatológica do câncer de pulmão	2
1.4	Lesão pré-neoplásica	4
1.5	Estadiamento e tratamento do câncer de pulmão.....	5
1.6	Estratégia diagnóstica no câncer de pulmão	5
1.7	Doença pulmonar obstrutiva crônica – Definição e epidemiologia.....	6
1.7.1	Etiologia, fatores de risco e classificação	7
1.7.2	Fisiopatologia da doença pulmonar obstrutiva crônica	8
1.8	Microambiente neoplásico.....	9
1.9	Ácido hialurônico e o câncer	10
2	HIPÓTESE	15
3	OBJETIVO.....	16
3.1	Objetivo Geral	16
3.2	Objetivos Específicos	16
4	METODOLOGIA.....	17
4.1	Casuística.....	17
4.2	Critério de inclusão	17
4.2.1	Coleta de amostras de escarro.....	18
4.2.2	Processamento e armazenamento das amostras de escarro	18
4.3	Extração das cadeias de ácido hialurônico presentes nas amostras de escarro	19
4.4	Quantificação da proteína total de escarro.....	19
4.5	Dosagem do HA por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).....	20
4.6	Tabulação dos dados e análise estatística	21
5	RESULTADOS	22

5.1	Características demográficas dos pacientes com CPNPC	22
5.2	Características demográficas do grupo controle e DPOC	24
5.3	Análise dos níveis de HA no escarro de pacientes com CPNPC, Saudáveis e DPOC.....	25
5.3.1	Análise dos níveis de HA no escarro de pacientes com CPNPC, Saudáveis e DPOC no A.C.Camargo Cancer Center, induzidos com NaCl 7%	26
5.3.2	Análise dos níveis de HA no escarro de pacientes com CPNPC, recrutados no Hospital de Amor de Barretos, induzidos com NaCl 3%	32
5.4	Análise comparativa dos níveis de HA conforme o emprego das diferentes concentrações de NaCl (3% e 7%) na obtenção das amostras de escarro	36
5.5	Avaliação da relação entre HA e as características clínico-patológicas dos pacientes com CPNPC	39
5.6	Análise de sobrevida dos pacientes com CPNPC.....	44
5.7	Avaliação do HA na distinção entre pacientes com CPNPC respondedores e não respondedores	49
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO.....	56
8	REFERÊNCIAS.....	57

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Visita observacional – Hospital de Amor de Barretos

APÊNDICES

Apêndice 1 Submissão de artigo (Revista: Glycoconjugate Journal)

Apêndice 2 Termo de consentimento livre e esclarecido-TCLE

Apêndice 3 Câncer de pulmão – A.C.Camargo Cancer Center

Apêndice 4 Grupo Saudável – A.C.Camargo Cancer Center

Apêndice 5 Grupo DPOC – A.C.Camargo Cancer Center

Apêndice 6 Câncer de Pulmão – Hospital de Amor de Barretos

Apêndice 7 Lista de Soluções

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PULMÃO – INCIDÊNCIA E MORTALIDADE

O câncer de pulmão (CP) é a causa mais comum de morte por neoplasia em todo o mundo, e no Brasil, é estimado pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) cerca de 17.760 novos casos em homens e 12.440 casos em mulheres para o ano de 2020 (Ministério da Saúde 2020). De acordo com dados internacionais, o CP segue como o mais frequente entre homens e o quarto mais frequente em mulheres. A maior incidência em homens ocorre na América do Norte, Ásia Oriental, Europa Central e Oriental e Sul da Europa. Os índices de casos são moderados na Austrália, Nova Zelândia e Europa Ocidental. Nos países menos desenvolvidos, as maiores taxas são observadas na Ásia Ocidental, África do Sul e no Caribe. Em mulheres, as taxas de incidência mundial de CP são menores, representando 8,5% de todos os cânceres. Os maiores índices são observados na América do Norte e no Norte da Europa. Similarmente aos índices masculinos de CP, a Austrália, Nova Zelândia e China, apresentam valores moderados de incidência de CP (Ferlay 2008). Nos EUA, os dados mostram que no período entre 1950 e 2010, o aumento na mortalidade em homens foi de 197% e 612% em mulheres, sendo a maioria dos casos relacionados diretamente com o tabagismo (American Cancer Society 2010).

1.2 A RELAÇÃO DO TABACO COM A CARCINOGENESE PULMONAR

A escala atual da incidência de câncer de pulmão apresenta um aumento de casos em relação ao início do século XX. Em meados dos anos 1930, observou-se a elevação na incidência do câncer de pulmão em decorrência do hábito de fumar cigarros, onde substâncias carcinogênicas como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e compostos N-nitroso estão presentes. A fumaça inalada com essas substâncias é a principal responsável pelo desenvolvimento de CP, no entanto, somente na década de 1960 constatou-se a correlação entre o uso do tabaco e o câncer de pulmão. Desde então, estudos continuam evidenciando essa condição e designando o tabagismo como a principal causa de câncer de pulmão entre 85% a 90% dos casos (Mc Erlen 2011).

O cigarro é composto por múltiplas substâncias mutagênicas, e esses compostos podem agir na iniciação da carcinogênese pulmonar (Travis 2004). A exposição ao tabaco permite que

essas substâncias interajam com o DNA, modificando-o quimicamente. Entre os agentes mutagênicos envolvidos, destacam-se o 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanone (NNK) e o N-nitrosornicotina (NNN), responsáveis pela mutação dos genes que regulam o crescimento e proliferação celular, como o TP53 e o KRas, com consequente iniciação da oncogênese (Travis et al. 2011). Existem linhas de pesquisas que evidenciam a correlação entre o uso do cigarro e o aumento da ocorrência de metástases em câncer de pulmão e em outras neoplasias, como câncer de mama, de pâncreas e de bexiga (Micalizzi et al. 2010). Apesar de o cigarro ter em sua composição mais de 4 mil substâncias, a nicotina é o componente que se encontra em maior quantidade. Há que se observar, contudo, que, embora a nicotina não seja por si só carcinogênica, estudos recentes têm revelado sua capacidade de – além de induzir angiogênese e proliferação celular – conferir, às células neoplásicas, resistência à apoptose (Ettinger et al. 2012). O tabagismo é capaz de ativar a carcinogênese pulmonar de quaisquer tipos histológicos, entretanto se encontra mais intensamente relacionado com o carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC) e carcinoma de células escamosas (CEC) (Micalizzi et al. 2010).

1.3 CLASSIFICAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA DO CÂNCER DE PULMÃO

Existem 2 formas principais de câncer de pulmão: carcinoma pulmonar não pequenas células (85% dos pacientes) e carcinoma pulmonar pequenas células (15% dos pacientes). A OMS classificou o carcinoma pulmonar não pequenas células (CPNPC) em três tipos principais: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e células grandes (Travis, 2015a). O adenocarcinoma é o tipo mais comum de CPNPC e é responsável por aproximadamente 40% dos cânceres de pulmão (Travis et al, 2015b). O adenocarcinoma surge a partir de células alveolares localizadas no epitélio das vias aéreas e tende a expressar marcadores imunohistoquímicos, como TTF-1 e napsina A. Representa o tipo histológico de câncer de pulmão mais comum em mulheres e também em homens, manifestando-se, frequentemente, na forma de massa periférica, como fenótipo resultante da quebra dos mecanismos distais de defesa pulmonar (Travis et al, 2011). Os aspectos microscópicos característicos incluem formação glandular, geralmente com produção de mucina e normalmente se observa uma resposta tecidual desmoplásica adjacente. Pelo fato de apresentar um amplo espectro patológico, molecular e radiológico, foi proposta pela IASLC.ATS.ERS. 2011 uma nova classificação

desses tumores, com o intuito de uniformizar os vários subtipos histológicos, visando maior exatidão no direcionamento do tratamento e prognóstico dos pacientes (Travis et al, 2011). A classificação da OMS de câncer de pulmão também reconhece os estágios iniciais do câncer de pulmão como adenocarcinoma *in situ* (lesão pré-invasiva), adenocarcinoma minimamente invasivo ou adenocarcinoma invasivo com base na extensão de invasividade. O adenocarcinoma *in situ* é definido como um adenocarcinoma que compreende um padrão lepidico com um diâmetro de menos de 3 cm. O adenocarcinoma minimamente invasivo é definido como adenocarcinoma com diâmetro superior a 3 cm; os fatores de exclusão incluem um tamanho de invasão de mais de 5 mm, mesmo se o tamanho do tumor e o tamanho da invasão estiverem de acordo com a definição de adenocarcinoma minimamente invasivo e a presença de invasão linfovascular, invasão perineural ou necrose tumoral (Travis et al, 2015a). Os carcinomas de células escamosas (CEC) representam 25% a 30% dos cânceres de pulmão; eles tendem a surgir de células localizadas no epitélio das vias aéreas. Marcadores imunohistoquímicos, como CK5, CK6, p40 e desmoglein-3 estão geralmente presentes (Takamochi et al, 2016). Os CEC demonstram maior correlação com o tabagismo, e esses carcinomas são detectados, em sua maioria, no hilo pulmonar ou próximo a ele, por quebra dos mecanismos de defesa pulmonar proximais. Microscopicamente, apresentam invasão de estroma fibroso, pérolas córneas, pontes intercelulares e proeminente camada de queratina. Os carcinomas de grandes células (CGC) representam aproximadamente 5% a 10% de todos os cânceres de pulmão, e a sua incidência está diminuindo devido às novas técnicas de imunofenotipagem, permitindo uma melhor classificação de carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas mais fracamente diferenciados. Esses tumores são tipicamente pouco diferenciados e compostos de células grandes com citoplasma abundante e nucléolos grandes. Apresentam-se como lesão periférica, com focos de necrose, cicatriz central e antracose. Histologicamente são caracterizados por células grandes, citoplasma abundante, núcleos grandes, cromatina vesiculosa e nucléolo evidente. São compostos pelas seguintes variantes: carcinoma neuroendócrino de grandes células, carcinoma neuroendócrino de grandes células combinado, carcinoma basaloide, carcinoma linfo-epitelioma “*like*”, carcinoma de células claras e carcinoma de grandes células fenótipo rabdóide. O carcinoma neuroendócrino de pequenas células é definido por mitoses numerosas, estrutura organóide, células densamente agrupadas, escasso citoplasma, cromatina fina granular, ausência de nucléolos e mitoses frequentes. O padrão fusiforme pode ser uma característica proeminente. Entre as variantes, o carcinoma de pequenas células pode vir combinado ao adenocarcinoma ou carcinoma de grandes células (Rekhtman et al, 2010).

De maneira geral, o câncer de pulmão pode ser descrito, então, em dois grandes grupos: os carcinomas pulmonares de não pequenas células (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células), e os carcinomas pulmonares de pequenas células, que compreendem as variantes neuroendócrinas, (tumor carcinoide típico, tumor carcinoide atípico, carcinoma neuroendócrino de grandes células e carcinoma pulmonar de pequenas células) (Inamura 2017).

1.4 LESÃO PRÉ-NEOPLÁSICA

Quando o epitélio brônquico é submetido a agressões sucessivas por meio de diversas substâncias carcinogênicas, notadamente o tabaco, ocorre a formação de lesões pré-neoplásicas. A metaplasia escamosa, alteração histológica que acomete a porção proximal da árvore brônquica em decorrência da ação do carcinógeno, origina uma formação displásica que predisporá ao carcinoma “*in situ*”. Com efeito, essa lesão acarretará o surgimento de dois tipos histológicos de câncer de pulmão: o carcinoma de células escamosas e o carcinoma de pequenas células. Contudo, se a agressão for causada diretamente em nível alveolar, haverá intensa reação inflamatória, mediada por macrófagos, conferindo ao epitélio característica hiperplásica. Continuada a agressão, o epitélio hiperplásico passa a dar origem a estruturas glandulares, adquirindo a conformação de hiperplasia adenomatosa. Com o desenvolvimento da lesão, a hiperplasia adenomatosa torna-se atípica e, posteriormente, forma-se o adenocarcinoma.

Ainda neste contexto, ocorre a formação do carcinoma pulmonar de células grandes, respeitando as mesmas alterações histológicas. As lesões precursoras dos tumores neuroendócrinos são, ainda, pouco conhecidas. Todavia, algumas dessas lesões caracterizadas como hiperplasia de células neuroendócrinas pulmonar idiopática difusa têm sido associadas ao desenvolvimento de outros tipos de tumores neuroendócrinos pulmonares, como os tumores carcinóides típico e atípico. Essa lesão consiste na proliferação de pequenos nódulos e células neuroendócrinas presentes nos epitélios brônquico e bronquiolar (Kerr et al, 2015). Caracterizando as lesões precursoras dos carcinomas neuroendócrinos, estudos observaram grande incidência de mutações genéticas relacionadas a esse tipo de tumor. Sugere-se que o acúmulo de sucessivas mutações seja responsável pelo desenvolvimento de malignidade no epitélio brônquico (de Sá et al, 2013). Considerada uma patologia genética, o câncer de pulmão encontra-se fortemente relacionado a alterações moleculares que influem em sua patogênese, como as mutações de genes responsáveis pelo crescimento, pela proliferação e pela sobrevivência celular (de Sá et al. 2012; Christiansen et al. 2006). Muitos eventos influenciam

o comportamento dessas células, e a disseminação do tumor encontra-se intimamente relacionada à mudança fenotípica que ocorre nas células neoplásicas. Recidivas e metástases são os principais fatores responsáveis pela morte dos pacientes, representando 90% dos casos. Neste contexto, se faz necessário o conhecimento das múltiplas vias sinalizadoras envolvidas em sua patogênese e progressão.

1.5 ESTADIAMENTO E TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO

Para a grande maioria dos autores, as excepcionais taxas de morbidade e mortalidade associadas ao CP se devem aos seguintes fatores prognósticos: *Karnofsky Performance Status* (KPS), estadiamento, tipo histológico, sexo, etnia, idade e estado nutricional. Entretanto, mesmo sob o controle de tais fatores prognósticos, aproximadamente 40% dos pacientes com CPNPC apresentam-se com doença estabelecida e avançada e com taxa de sobrevida global entre 8-10% (Schrump 2005). Uma vez a doença estabelecida, os pacientes com CPNPC podem ser divididos em três grupos que refletem a extensão da doença e subsequente abordagem de tratamento: o primeiro grupo compreende os tumores cirurgicamente ressecáveis, em geral estágio IA1, IA2, IA3, IB, IIA e IIB, pertencendo ao grupo de melhor prognóstico, com taxas de 92 % de sobrevida em cinco anos para o estágio IA1, 83% para o estágio IA2, 77% para o estágio IA3, 68% para o estágio IB, 60% para o estágio IIA e 53% para o estágio IIB (Goldstraw 2016). O segundo grupo de pacientes com CPNPC inclui tumores avançados local ou regionalmente, e compreendido pelos estádios IIIA, IIIB e IIIC. O estágio IIIA apresenta taxa de 36% de sobrevida no período de 5 anos, e os grupos IIIB e IIIC, apenas 26% e 13% respectivamente. O último grupo de pacientes é constituído pelos indivíduos com metástases ao diagnóstico e são representados pelos estadiamentos IVA e IVB. O grupo IVA apresenta 10% de sobrevida no período de 5 anos e o grupo IVB apenas 10% no período de 24 meses (Goldstraw 2016).

1.6 ESTRATÉGIAS DIAGNÓSTICAS NO CÂNCER DE PULMÃO

No auxílio ao diagnóstico, os clínicos dispõem de três ferramentas: radiografias, citologias do escarro e as tomografias computadorizadas (TC). A literatura nos mostra que a utilização das radiografias (associadas ou não a citologia do escarro) tem alguma efetividade quando são realizadas em pacientes de grupos de risco (tabagistas, portadores de doença

pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e etc.). Todavia, têm demonstrado baixa efetividade quando são realizadas em grupos randomizados (Pirker 2009). Os avanços na técnica de TC, que consegue obter imagens em alta definição com níveis aceitáveis de radiação, têm tornado possível a detecção de nódulos não visíveis nas radiografias de tórax, tornando essa uma ferramenta importante no *screening* do CP. Um estudo realizado pelo *The National Lung Screening Trial Research Team* (NLSTRT 2011) demonstrou que o *screening* realizado através da TC ocasionou uma melhora na sobrevida dos pacientes acometidos pela doença quando comparados aos casos em que o rastreamento foi realizado por radiografia (NLSTRT 2011). Sobre os métodos diagnósticos para a detecção do CP, podemos destacar o emprego da toracocentese, biópsia de linfonodos, a broncoscopia e biópsia por agulha transcutânea. Há urgência no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos não invasivos para diminuir a mortalidade por este tipo de neoplasia. Em meio a este cenário, diversos grupos de pesquisas têm trabalhado incessantemente na procura e entendimento de marcadores moleculares e imuno-histoquímicos, e no desenvolvimento de novas técnicas que possam auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento dos diversos tipos de cânceres e principalmente do CP (Ichinose 1995). Atualmente, os pesquisadores estão focados na descoberta de marcadores moleculares em biópsias líquidas, seja no sangue, no escarro ou nos lavados brônquicos para a detecção precoce do CP. Porém, até o momento, nenhum grupo de pesquisa obteve sucesso na padronização desses marcadores em larga escala na prática clínica.

1.7 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA - DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é definida, pelo *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease – GOLD* - (2007), como uma doença evitável e tratável, com alguns efeitos extrapulmonares importantes que podem contribuir para o agravamento em alguns pacientes. Seu componente pulmonar é caracterizado por limitação do fluxo aéreo que não é totalmente reversível. A limitação ao fluxo aéreo geralmente é progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal do pulmão a partículas ou gases nocivos. A DPOC é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em países de todos os níveis de desenvolvimento econômico e resulta em um impacto social e econômico substancial e crescente (Rabe et al. 2007; Buist et al. 2008). Segundo Lopez e colaboradores (2006) a DPOC

foi a quinta principal causa de morte no mundo em 2001 e estima-se que seja a terceira em 2020.

Na América Latina, dados indicam que a DPOC é um problema de saúde pública muito maior do que descrito previamente (Menezes et al. 2005), com prevalência de 14,3% (18,9% em homens e 11,3% em mulheres) variando de 5,6% na Cidade do México, México, a 27,2% em Montevideu, Uruguai. No Brasil, estima-se que cerca de sete milhões de adultos com mais de 40 anos (15,8%) sejam portadores da DPOC (Menezes et al. 2008). Ao analisar os dados de mortalidade no Brasil, verifica-se que a DPOC assume o primeiro lugar como causa de morte por doenças respiratórias em adultos com taxa de mortalidade de 5,28% no período de setembro de 2009 a agosto de 2010 (Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS)).

O impacto da DPOC não se limita às taxas de mortalidade, já crescentes mundialmente, mas também a outros fatores relacionados à morbidade desta doença avaliada através do número de visitas ao médico, visitas ao pronto socorro, internações hospitalares, dias de trabalho perdidos e o número de anos vividos com a disfunção. Entretanto, a DPOC nos seus estágios iniciais (Estágio I: DPOC Leve e Estágio II: DPOC Moderada) geralmente não é reconhecida, diagnosticada ou tratada, e, portanto, pode não ser incluída como diagnóstico no registro médico do paciente (Rabe et al. 2007). O estudo Platino (2008) demonstrou que apenas 2% dos pacientes com DPOC no Brasil têm diagnóstico formal e somente 18% dos casos recebem tratamento para problemas respiratórios. Os autores acreditam que esses índices sejam ainda menores, uma vez que, tal estudo foi realizado nas maiores cidades de cinco países latino-americanos, portanto, locais onde há maior acesso às redes de saúde, e que tal estimativa não possa ser estendida à totalidade das populações estudadas (Menezes et al. 2008).

1.7.1 Etiologia, Fatores de Risco e Classificação

A etiologia da DPOC é atribuída ao tabagismo como fonte primária de partículas tóxicas e de longe o mais comum dos fatores de risco encontrados na DPOC. Nos Estados Unidos, cerca de 80 a 90% dos casos de DPOC são atribuídos ao hábito de fumar cigarros (Shapiro 2005). Fumantes de cigarros têm uma prevalência maior de sintomas respiratórios e de anormalidade da função pulmonar, com uma maior diminuição anual do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) e maior índice de mortalidade que os não fumantes (Rabe et al. 2007). Além disso, inúmeros estudos demonstraram que indivíduos expostos involuntariamente à fumaça de cigarro, ou seja, exposição passiva e/ou intra-uterina, têm maior

prevalência de desenvolver DPOC na fase adulta do que indivíduos não expostos (Yoshida e Tudor 2007).

A observação do clássico estudo de Fletcher e Peto (1977) de que uma minoria de fumantes desenvolve a DPOC clinicamente (cerca de 15 a 20%, chegando a 40% no seguimento populacional de 25 anos de Løkke et al. 2006) indicou claramente a existência da interação de outros fatores de risco, como fatores genéticos e ambientais, no desenvolvimento da DPOC.

O fator genético mais evidente é a deficiência hereditária grave de alfa-1 antitripsina, um importante inibidor da elastase dos neutrófilos. Tal deficiência causa o desenvolvimento precoce e acelerado de enfisema panlobular associado à diminuição da função pulmonar tanto em fumantes quanto em não fumantes com deficiência grave, embora o tabagismo aumente muito o risco (Rabe et al. 2007). Além da bem estabelecida deficiência genética de alfa-1 antitripsina, estudos recentes compararam a distribuição de variantes genéticas de pacientes com DPOC e controles, sugerindo outros fatores de risco genéticos que predisõem a DPOC.

As exposições ocupacionais, a poluição doméstica decorrente da queima de biomassa e a poluição do ar ambiental resultante, principalmente, da combustão de combustíveis fósseis também representam importantes fatores de risco para o desenvolvimento da DPOC (Rabe et al. 2007). Embora a cessação do tabagismo seja a medida mais eficaz para melhorar os sintomas respiratórios (Rabe et al. 2007), a DPOC é geralmente progressiva e, uma vez desenvolvida, o processo inflamatório é persistente mesmo após a interrupção do hábito de fumar (Willemse et al. 2005 e Laperre et al. 2006).

1.7.2 Fisiopatologia da doença pulmonar obstrutiva crônica

A DPOC compreende a bronquite crônica, a bronquiolite obstrutiva com obstrução e fibrose das pequenas vias aéreas e o enfisema pulmonar, caracterizado pelo aumento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal com destruição do parênquima alveolar, perda da elasticidade pulmonar e fechamento precoce das vias aéreas (Barnes et al. 2003). A bronquite crônica é caracterizada por hipersecreção de muco associada à falência do aparelho mucociliar, evidenciada por expectoração excessiva, cuja principal fonte é o aumento e hipertrofia das glândulas submucosas presentes nas grandes vias aéreas. A bronquiolite obstrutiva crônica afeta principalmente as pequenas vias aéreas (2 mm de diâmetro ou menores) e resulta de alterações inflamatórias e estruturais (denominadas remodelamento) que incluem o aumento e metaplasia do epitélio brônquico, espessamento da lamina própria, do músculo liso e da camada adventícia.

As pequenas vias aéreas são consideradas o principal local anatômico responsável pela limitação ao fluxo aéreo presente na DPOC (Hogg 2004; Molino e Jeffery 2007). O aumento

dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal é o resultado da destruição centrilobular do parênquima pulmonar que ocorre em muitos, porém não em todos, casos de DPOC. O enfisema pulmonar contribui para a obstrução ao fluxo aéreo através da diminuição da tração radial do parênquima exercido sobre as vias aéreas e da perda da força de recolhimento elástico do pulmão (Molfino e Jeffery 2007). A patogênese do enfisema pulmonar permanece obscura, embora a teoria do desequilíbrio entre proteases e anti-proteases seja amplamente reconhecida. A elastase liberada pelos neutrófilos parece ser a enzima mais fortemente implicada neste processo, porém há evidências de que outras células inflamatórias e enzimas, como os macrófagos, proteinase 3 e metaloproteinases, estejam envolvidas nesse processo (Hogg 2004b). Entretanto, uma vez que muitos fumantes ou pacientes com doenças pulmonares inflamatórias não desenvolvem um enfisema significativo, esta hipótese não explica completamente a perda de tecido pulmonar evidenciada no enfisema induzido pelo tabagismo. Recentes estudos propuseram que a destruição alveolar presente em pacientes enfisematosos poderia ser causada por um processo acelerado de apoptose das células epiteliais e endoteliais induzido, principalmente, pelos linfócitos T CD8⁺ (Kasahara et al. 2000; Majo et al. 2001).

1.8 MICROAMBIENTE NEOPLÁSICO

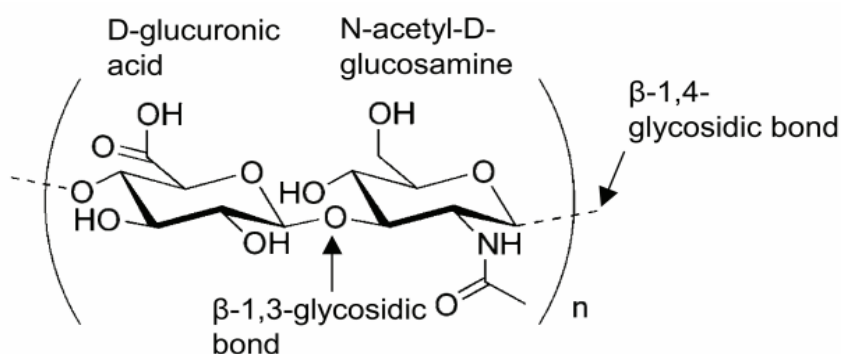
As proteínas intracelulares e da matriz extracelular (MEC) têm se mostrado como potenciais marcadores diagnósticos presentes em secreções, principalmente no sangue, na saliva, no escarro e na urina (Passerotti 2006; Rangel 2015; Franzmann 2012; Fraser 1997). O espaço extracelular dos tecidos é preenchido com um material semelhante a gel que mantém as células unidas e provê um meio poroso para a difusão de nutrientes e oxigênio para cada célula. A (MEC) ocupa um volume significativo no tecido e não representa uma massa inerte que somente proporciona suporte estrutural, visto que existem informações que orientam a migração, ligação, diferenciação e organização das células neoplásicas, modulando uma série de processos. Os fibroblastos e outras células do tecido conectivo são circundados pela MEC e uma rede entrelaçada de polissacarídeos e proteínas fibrosas (colágenos, elastinas e fibronectinas fibrilares). As células do tecido epitelial encontram-se assentadas em uma MEC especializada chamada membrana basal. Essa membrana é constituída por colágenos especializados, lamininas e heteropolissacarídeos. Estes heteropolissacarídeos, os glicosaminoglicanos (GAGs), compõem uma família de polímeros lineares compostos por unidades de dissacarídeo repetidas. Um dos dois monossacarídeos apresenta-se obrigatoriamente na forma de N-acetilglicosamina ou N- acetilgalactosamina. O outro, na

maioria dos casos é um ácido urônico, geralmente ácido D-glicurônico ou ácido L-idurônico. Os GAGs sulfatados são ligados as proteínas extracelulares para formarem proteoglicanos. O ácido hialurônico contém resíduos alternados de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina e é susceptível a interação entre as células tumorais e o microambiente neoplásico, participando das atividades invasivas e metastáticas.

Após a transformação neoplásica, as proteínas da MEC são secretadas localmente pelas próprias células neoplásicas ou por células da matriz (fibroblastos), organizando-se em uma rede nos espaços adjacentes às células neoplásicas. Três grupos de macromoléculas se associam fisicamente para formar e regular a MEC: as proteínas estruturais fibrosas (sistema colágeno/elástica); as glicoproteínas adesivas e integrinas; e os glicosaminoglicanos e proteoglicanos. Dentre todas essas atividades que ocorrem na MEC, o ácido hialurônico apresenta uma grande posição de destaque (Nelson 2014).

1.9 ÁCIDO HIALURÔNICO E O CÂNCER

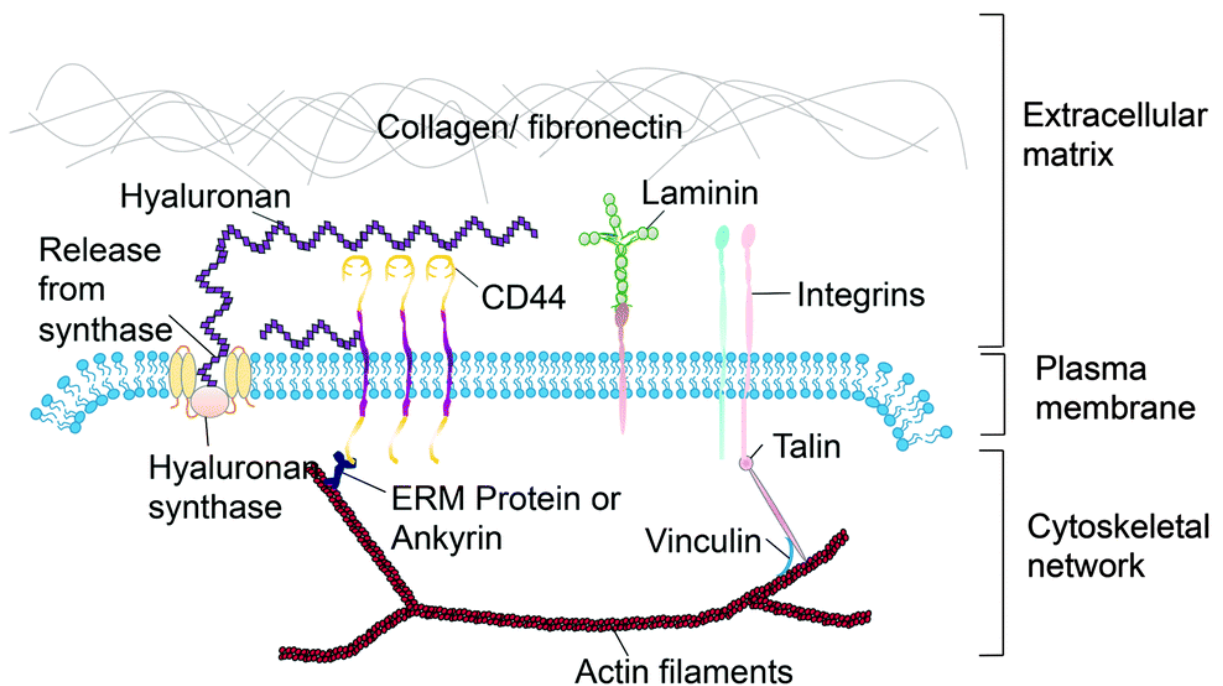
O ácido hialurônico (HA) é um polímero linear longo de dissacarídeos repetidos, constituído por unidades alternadas de ácido β -D-N-acetilglucosamina, unidos por ligações glicosídicas do tipo (1-3) e (1-4), respectivamente (Knudson 2014). Contém até 50.000 repetições de unidades dissacarídicas básicas, formando soluções claras, altamente viscosas, que funcionam como lubrificantes no líquido sinovial das articulações e envolvidos na geração da consistência gelatinosa do humor vítreo nos olhos.



Fonte: Adaptado de Karbownik (2013)

Figura 1 – Esquema ilustrando a fórmula estrutural da unidade de dissacarídeo do ácido hialurônico e seus constituintes.

Estão presentes também na matriz extracelular de cartilagens e tendões, onde auxiliam na resistência à tensão e elasticidade, devido à sua forte interação não covalente com outros componentes da matriz (Knudson 2002). As interações do HA com as proteínas de matriz e com os receptores na superfície celular regulam muitos aspectos do comportamento das células, tais como a migração, a adesão célula-célula e a diferenciação celular (Tammi 2002; Delpech 1997).



Fonte: Adaptado de Rankina e Rankel (2016)

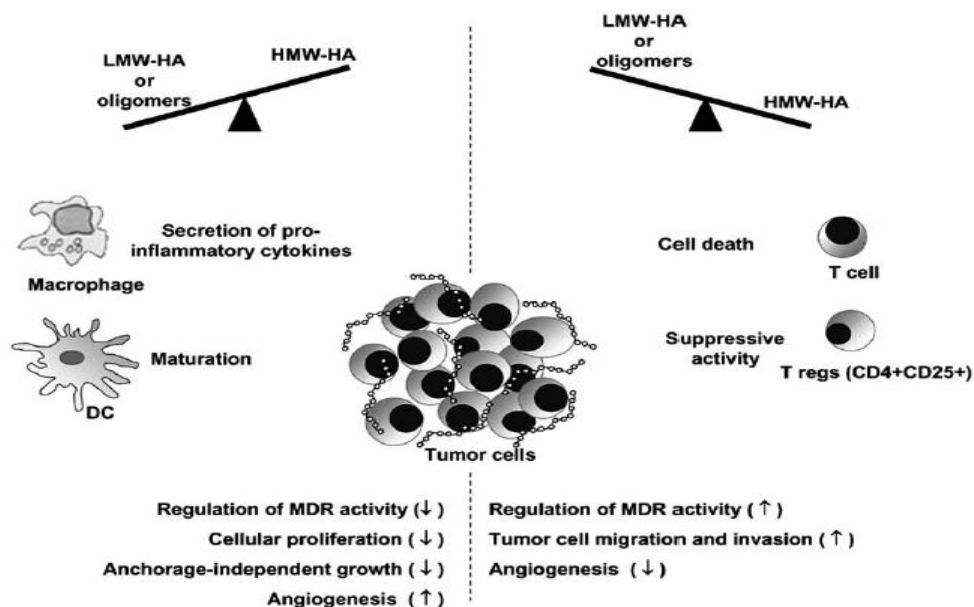
Figura 2 – O esquema demonstra os sítios de interação do ácido hialurônico na matriz extracelular nos receptores de membrana e na região intracelular.

A síntese do HA ocorre na membrana plasmática pela enzima transmembrânica ácido hialurônico sintase (HAS). Existem três isoformas das ácido hialurônico sintases: HAS1, HAS2 e HAS3, as quais sintetizam o HA em diferentes tamanhos (Golshani 2008). Foi demonstrado que o aumento da expressão de HAS1 e HAS2 está envolvido com o crescimento tumoral devido ao bloqueio do ciclo celular e a inibição da migração pelo silenciamento do gene HAS2 (Stern 2003). As hialuronidases (HAases) compõem uma família de enzimas que clivam o HA em pequenos fragmentos, capazes de estimular a proliferação endotelial e ativar a via das proteínas-quinases mitogênicas (Delpech 1997; Turley 2002; Herrlich 2000). Em humanos, foram identificados 6 genes HAase (HYAL1, HYAL2, e HYAL3) localizados nos cromossomos 3p21.3 e PH20, HYAL4 e HYALP1 localizados no cromossomo 7q31.3.

O HA pode promover o crescimento tumoral e metástase por migração celular ativa e proteção contra a vigília imunológica (Ropponen 1998). Além disso, HAases geram de 10 a 15 pequenos fragmentos de dissacarídeos de HA que estimulam a angiogênese (Hobarth,1992), iniciando a proliferação celular endotelial via receptor de ácido hialurônico mediador de motilidade (RHAMM) (Rein 2003). O HA também exerce importante papel na progressão tumoral devido a sua capacidade de lubrificação da matriz extracelular. Tal característica facilita o deslocamento das células tumorais, proporcionando o desenvolvimento das metástases (Ichikawa 1999; Herrlich 2000; Turley 2002). A formação metastática é um processo complexo e ocorre através de uma sequência de diferentes eventos resultantes da interação entre as células tumorais e o microambiente tecidual. Em cada uma dessas etapas, as células neoplásicas têm de superar as barreiras impostas pelos sistemas de controle do organismo, alterar o seu comportamento e características fenotípicas principais, e se adaptar aos novos ambientes para desenvolver tumores em sítios distantes da neoplasia original. A primeira ação para a metastização envolve a capacidade de invasividade local. No entanto, isso se torna um desafio devido à organização dos epitélios e a incompatibilidade com a motilidade e invasividade gerada pela disposição das células teciduais. Ao longo do processo de progressão tumoral, as células epiteliais neoplásicas, frequentemente induzidas por sinais do estroma reativo, deixam suas características epiteliais, como a polaridade, a adesão célula-célula e a ausência de motilidade para expressar genes específicos das células mesenquimais, adquirindo, assim, as propriedades e o fenótipo das células mesenquimatosas em um processo chamado transição epitélio-mesenquimal (EMT). Nesse novo contexto, com a transformação epitelial-mesenquimal, essas células adquirem motilidade e passam a produzir componentes da MEC, por meio da alteração do seu perfil genético, que podem contribuir para a ativação da EMT, aumentando seu grau de malignidade.

Essa característica é também detectada em situações fisiológicas nos estágios de embriogênese e regeneração epitelial (Thierry 2002). As células mesenquimais geralmente não apresentam estrutura com alto nível de organização e também não possuem compacta adesão intracelular, formam estruturas irregulares e não uniformes em composição e densidade. Possuem formação ligeiramente alongada em relação às células epiteliais e a menor adesão entre as células, favorecendo a característica migratória. Diferentemente do epitélio, a estrutura irregular do mesênquima não permite uma rígida função especializada. Além disso, a migração mesenquimal é mecanicamente diferente do movimento epitelial, uma vez que as células epiteliais se movem como uma camada em bloco, e as células mesenquimais apresentam maior dinâmica no deslocamento, podendo movimentar-se individualmente.

O entendimento da transição epitélio-mesenquimal elucidou a diferença fundamental de tais movimentos na embriogênese (sutil/controlado) e tumorigênese (agressivo/descontrolado) definindo os mecanismos distintos na EMT. A transformação de uma célula epitelial em uma célula mesenquimal requer alteração na morfologia, arquitetura celular, aderência e capacidade de migração. A aquisição dessas propriedades não é dependente da formação de novas mutações, baseia-se na ativação de um programa atuante na não-embriogênese ou na regeneração tecidual (Lee 2005). Alguns autores defendem a idéia de que o aumento na migração das células neoplásicas também é induzido por pequenos fragmentos de HA (2-25 dissacarídeos) depois da ação das hialuronidases (HAases). Esses pequenos fragmentos têm a capacidade de aumentar a angiogênese (processo fundamental na progressão dos tumores) através do estímulo à proliferação das células endoteliais. Por outro lado, o HA na sua forma de alto peso molecular pode funcionar como uma barreira contra a vascularização, impedindo o crescimento e a progressão do tumor (Jacobson 2002; Nedvetzki 2004). Os fibroblastos pulmonares atuam na síntese e degradação do HA e é controlado pelo fator transformador de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (Li 2000). Esse fator (TGF- β) possui importantes efeitos supressores do crescimento em células epiteliais normais, porém contribui para a formação de metástases em muitos tipos tumorais.



Fonte: Adaptado de Karbownik (2013)

Figura 3 – O equilíbrio entre os fragmentos de alto e baixo peso molecular do ácido hialurônico determinam a função da atuação dessas moléculas na progressão tumoral e na resposta imune.

Em oposição à função da HAase, TGF- β é um potente estimulador da síntese protéica da MEC (Border 1994). As E-caderinas são moléculas importantes na manutenção da integridade e adesão epitelial célula-célula. Pertencem às famílias das caderinas, apresentam-se como receptores transmembranares Ca^{2+} -dependentes, e atuam na adesão célula-célula das junções via ligação hidrofóbica (Nawrocki-Raby 2003). Majoritariamente, se não em todos os cânceres de origem epitelial, a mediação da adesão célula-célula pela E-caderina é perdida concomitantemente com a progressão do tumor à malignidade (Markovic-Housley 2000). Apesar de todo o conhecimento adquirido sobre a atividade e importância envolvendo o HA em alguns tipos de neoplasias, ainda se faz necessária a elucidação do papel desse importante componente matricial no desenvolvimento e progressão dos carcinomas de pulmão, especialmente quanto ao potencial diagnóstico, prognóstico e preditivo de resposta terapêutica relacionado à doença.

2 HIPÓTESE

Ao considerar as evidências que envolvem o HA como componente importante no desenvolvimento e progressão de algumas neoplasias como o câncer de prostata, bexiga, mama e elevada concentração em câncer de pulmão, o ácido hialurônico desponta como um importante candidato a biomarcador presente no escarro de pacientes com cancer de pulmão. Esta dissertação de mestrado levanta como hipótese a afirmação de que o HA pode ter um papel relevante nas neoplasias pulmonares como marcador prognóstico e/ou diagnóstico.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do estudo é avaliar os níveis de HA no escarro de pacientes com CPNPC, no momento da investigação diagnóstica e após avaliação de resposta terapêutica, e correlacionar com os dados de resposta ao tratamento nas seguintes condições:

- Cirurgicamente ressecáveis (estadio IA1, IA2, IA3, IB, IIA e IIB)
- Localmente avançados (IIIA, IIIB e IIIC)
- Metastáticos (IVA e IVB)

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a diferença entre os níveis de HA no escarro entre amostras de pacientes com câncer de pulmão, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e pacientes saudáveis do ponto de vista pulmonar.

- Avaliar a capacidade do HA como marcador prognóstico nas neoplasias respiratórias.
- Correlacionar os níveis de HA com os dados clínicos dos pacientes.

4 METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA

Foram incluídos neste estudo espécimes de escarro de 86 pacientes (grupo CPNPC) com câncer de pulmão recém diagnosticados e independente do estadiamento clínico e patológico, oriundos dos departamentos de cirurgia torácica e oncologia clínica do A.C.Camargo Cancer Center e departamento de oncologia clínica do Hospital de Amor de Barretos (HAB). Foram coletados 56 espécimes de escarro dos pacientes em seguimento após avaliação de resposta ao tratamento com exames de imagem (TC ou PET-CT). Incluímos no estudo 62 espécimes de escarro de indivíduos saudáveis (grupo controle saudável) e 18 amostras de escarro de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (grupo DPOC).

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Para os pacientes com CP, a primeira coleta de escarro foi realizada na ocasião do diagnóstico histológico e a coleta da segunda amostra de escarro foi realizada no período de, aproximadamente, 90 dias após o início do ciclo de QT/RT (conforme avaliação de resposta avaliada por TC ou PET-CT), ou no momento da recidiva tumoral indicada pelo oncologista clínico. Os pacientes com possibilidade de tratamento cirurgico foram recrutados no departamento de cirurgia torácica.

Os participantes que compuseram o grupo controle saudável foram recrutados e submetidos a coleta das amostras no ambulatório da oncologia clínica do A.C.Camargo Cancer Center desde que apresentassem pulmões livres de doença, idade igual ou superior a 30 anos e sexo masculino e feminino. Já os pacientes pertencentes ao grupo DPOC foram recrutados e submetidos a coleta do escarro no departamento de Pneumologia do A.C.Camargo Cancer Center desde que não apresentassem processos inflamatórios pulmonares no momento da coleta.

4.2.1 Coleta das amostras de escarro

Os indivíduos selecionados para a coleta de amostra de escarro foram previamente informados sobre os objetivos do estudo e os procedimentos aos quais seriam submetidos para

a obtenção da amostra. Após a anuência, leitura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – resolução 466/2012) (**Apêndice 2**) e assinatura, os participantes foram encaminhados ao ambulatório, acomodados em cadeiras e submetidos a 3 etapas de inalação com solução salina hipertônica 7% com duração máxima de 7 minutos cada.

No Hospital de Amor de Barretos as coletas foram realizadas com o emprego do mesmo método na abordagem, aplicação de TCLE, e indução de escarro. No entanto, a instituição colaboradora realizou todas as coletas de escarro com solução salina hipertônica 3%.

Os procedimentos de indução foram realizados com o inalador ultrassônico de micropartículas (Ultra-neb 2000 ultrasonic nebulizer, Devilbiss, sunrise Medical, EUA) capaz de alcançar o espaço alveolar na indução do escarro. Durante todos os procedimentos de indução, rigorosamente, houve a retaguarda de um médico e corpo de enfermagem para eventuais intercorrências. Ao término de cada inalação, solicitamos aos participantes a enxaguar a boca e a assoar o nariz. As amostras de escarro foram coletadas em recipientes contendo solução preservante (Cell Preserve, Kolplast ci LTDA, Itupeva, São Paulo).

4.2.2 Processamento e Armazenamento das Amostras de Escarro

Ao término do procedimento de coleta, as amostras foram identificadas com o nome e registro hospitalar do participante (ou documento de registro geral (RG) dos indivíduos saudáveis) e imediatamente encaminhadas ao biobanco, onde foram registradas sequencialmente, checadas juntamente com TCLE. As amostras de escarro foram separadas da solução preservante por centrifugação leve (1.500 rpm x 10 minutos) e o material sedimentado foi transferido para tubos eppendorf de 2 ml, identificado conforme o número sequencial gerado pelo biobanco e armazenado em *freezer* -80°C.

4.3 EXTRAÇÃO DAS CADEIAS DE HA PRESENTES NAS AMOSTRAS DE ESCARRO

As dosagens do HA foram realizadas pela técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) no laboratório de bioquímica e biologia molecular no INFAR (Instituto de Farmacologia) da Universidade Federal de São Paulo sob a supervisão do Prof. Dr. João Roberto Maciel Martins e Dra. Aline Mendes.

As amostras de escarro foram descongeladas em temperatura ambiente e incubadas após adição de 4ml de solução de uréia 7M (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) diluída em

solução TRIS-HCL 0,05M em tubos eppendorf no banho-maria a 60°C *overnight*, objetivando a ruptura completa das associações hidrofóbicas das proteínas do escarro. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas a agitação de 15 segundos no homogeneizador (Vortex-Genie 2, modelo G250, Scientific Industries, Bohemia, NY, EUA) para a dissolução de possíveis agregados protéicos.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL DO ESCARRO

Realizamos a dosagem da proteína total do escarro pelo método de detecção colorimétrica (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Inicialmente, preparamos os reagentes A e B do kit conforme orientações do fabricante, identificamos uma placa de ELISA de acordo com a numeração das amostras de escarro, adicionamos 10 µl (microlitros) de cada amostra de escarro tratada com uréia 7M em 2 poços da placa (duplicatas) e a seguir, adicionamos 200 µl da solução A+B do kit *BCA Protein* em cada poço.

Concomitantemente, realizamos uma curva-padrão com as seguintes diluições de albumina bovina (Amersham, Cleveland, Ohio, EUA): (2000 µg/ml 1500 µg/ml 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml 250 µg/ml 125 µg/ml e 0) onde 10 µl de cada diluição foi adicionada aos respectivos poços da placa de ELISA, seguido da adição de 200 µl da solução A+B. Incubamos a placa por 30 minutos a 37°C no equipamento (Versa Max Tunable Microtemplate Reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, California, EUA) e prosseguimos com a leitura da absorbância (560 nm) das amostras, onde os resultados são informados através de relatório impresso imediatamente após a obtenção dos valores de proteínas totais. Após a verificação dos resultados de absorbância das duplicatas e a confirmação da oscilação de até 10% de diferença entre os valores, iniciamos a etapa de proteólise.

Adicionamos 100 µl das amostras de escarro tratado com uréia 7M em um novo tubo eppendorf e 200 µl da enzima proteolítica (Maxatan 4mg/ml pH 8,0, NaCl 0,15M, TRIS/HCl 50mM) por 18h a 60°C em banho-maria. Encerrado o período de incubação, as amostras foram fervidas por 30 minutos a 95°C para inativação total da enzima proteolítica residual.

4.5 DOSAGEM DO HA POR ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Inicialmente, realizamos o *coat* da placa adicionando 100 µl de proteína de ligação na concentração de 1mg/ml (PL) diluída em tampão carbonato 10X (pH 9,6/0,06M) e incubamos overnight a 4°C. Ao término da incubação, as placas foram lavadas 3 vezes e decantadas na última lavagem. Essa etapa tem por finalidade promover a adesão da PL ao material que compõe a placa de ELISA, para posteriormente, fornecer o substrato para a formação do sanduíche dos compostos das subseqüentes reações químicas do experimento.

Após a realização do *coat* da placa, iniciamos o bloqueio dos espaços não preenchidos pela PL na etapa anterior. Para tal, adicionamos 200 µl de albumina 1% diluída em tampão TRIS/BSA 1% em cada poço e incubamos as placas durante 4 horas em TA (temperatura ambiente). Ao término da incubação, lavamos as placas de ELISA 3 vezes com solução de lavagem (Tris-HCl 0,05M pH 7,75) e decantamos após a última lavagem.

Uma vez executadas as etapas anteriores, realizamos uma curva padrão utilizando 24 poços da placa, onde são aplicadas amostras de HA (extraído de cordão umbilical) em triplicata e em concentrações que variam de 0 a 1000 ng/ml diluídas em solução tampão TRIS/BSA 1% (solução de albumina). Os outros 72 poços restantes foram utilizados para as amostras teste. As amostras foram preparadas em solução de albumina (100 µl da amostra do escarro tratado com uréia 7M + 300 µl de solução de albumina) e 100 µl das amostras teste foram aplicadas, em triplicatas, nos respectivos poços da placa de ELISA, seguido de incubação *overnight* a 4°C.

Após a incubação, as placas foram novamente lavadas 3 vezes com solução de lavagem (Tris-HCl 0,05M pH 7,75) e decantadas. Adicionamos 100 µl da proteína de ligação biotinilada (1mg/ml) diluída em tampão de albumina (1:5000) e mantidas sob agitação em temperatura ambiente por 2 horas. Essa fase do experimento propicia a ligação da PL biotinilada ao HA e a biotina atuará como substrato para a ligação da estreptavidina na próxima etapa do ensaio. Ao término do período de incubação, as placas foram lavadas 6 vezes com solução de lavagem e decantadas. Adicionamos 100 µl de solução de estreptavidina marcada com európio-streptavidina (Europium-streptavidina, Delfia, Perkin-Elmer, Boston, USA), diluída 1:5000 em solução de albumina. As placas foram mantidas sob agitação por 30 minutos em temperatura ambiente e lavadas 6 vezes com solução de lavagem e decantadas. Finalmente, adicionamos 200 µl de solução de revelação (Enhancement Solution, Wallac Oy, Turku, Suécia) em cada poço da placa e incubamos por 10 minutos sob agitação constante. A solução de revelação tem como propriedade química excitar os compostos de európio e liberar a emissão de luminescência que são captadas pelo leitor (Victor 2, da Wallac Oy, Turku, Suécia). Uma vez captada a fluorescência pelo equipamento, os dados são disponibilizados por relatório, expressos

em “counts/s”, registrados e calculados automaticamente pelo programa MultiCalc (Pharmacia, Suécia).

4.6 TABULAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados gerados foram organizados em planilhas no programa Excel e divididos de acordo com as características clínicas, grupos estudados e resultados da dosagem do HA. Os dados foram tabulados considerando as estatísticas descritivas (média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo, variação e quartis) para os dados quantitativos e tabelas de frequência para os qualitativos. As variáveis foram analisadas pelo teste de Komogorov-Smirnov para a verificação do padrão de normalidade. Constatando a distribuição não normal dos valores de HA, aplicamos o teste de Kruskal-Wallis por se tratar de mais de 2 grupos independentes, e na comparação entre 2 grupos independentes utilizamos o teste de Dunn com correção de Bonferroni.

O teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher foi usado para comparar variáveis categóricas, e o teste de Wilcoxon rank-sum e, novamente, o teste de Kruskal-Wallis foram usados para detectar diferenças em variáveis contínuas entre grupos de pacientes. Além disso, o modelo linear generalizado (GLM) foi usado para testar a associação entre variáveis contínuas e outras variáveis, e os resíduos foram examinados para assegurar que estavam distribuídos normalmente. A análise de variância unidirecional foi realizada pelo teste ANOVA para comparar a concentração de HA no escarro dos pacientes, pacientes livres de câncer e voluntários saudáveis. As curvas de sobrevida global (OS) foram estimadas usando o método de Kaplan-Meier. O teste de log-rank foi usado para comparar a sobrevivência entre diferentes grupos de interesse. O modelo de risco proporcional de Cox foi empregado na avaliação da associação entre o tempo de sobrevida e as variáveis estudadas. Essas variáveis mostradas como significativamente associadas à sobrevivência em análise univariada foram inseridas em um modelo de regressão de riscos proporcionais Cox multivariado. As curvas ROC (curva característica de operação do receptor, ou do inglês, *receiver operating characteristic curve*) foram desenvolvidas para determinar os melhores pontos de cortes da concentração de HA do escarro. Os pacotes estatísticos IBM SPSS (versão 22; Armonk, NY) e S-Plus (versão 8.04; TIBCO, Palo Alto, CA) foram usados para realizar todas as análises. Os valores de p menores do que 5% ($p < 0,05$) foram considerados significantes.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES COM CPNPC

Na Tabela 1 estão descritas as características demográficas dos 86 pacientes, relacionadas à idade, sexo, localização do tumor, estadiamento, tabagismo, tempo de seguimento e a sobrevida.

Tabela 1 - Características demográficas dos pacientes avaliados pelo estudo

Características Demográficas		
	Total	Frequência (%)
Total de Pacientes	86	100
Média de Idade = 60,5 anos (variação 32-88)	-	-
Sexo		
Homens	51	59.3
Mulheres	35	40.7
Estadiamento Clínico*		
I	07	8.1
II	04	4.6
III	23	26.7
IV	48	55.8
Estadiamento Patológico TNM**		
Tumor (T)		
1	18	20.9
2	12	13.9
3	21	24.4
4	26	30.2
Linfonodos (N)		
0	25	29.0
1	10	11.6
2	32	37.2
3	10	11.6
Metástase (M)		
0	36	41.8
1	41	58.1
Tipo Histológico***		
Carcinoma de Células Escamosas	19	22.0
Adenocarcinomas	51	59.3
Carcinoma de Grandes Células	11	12.7
Tabagismo		
Fumantes	40	46.5
Ex-fumantes	16	18.6
Não fumantes	30	34.8
Tempo de Seguimento		
Meses (média)	09	-
Pacientes em seguimento	56	65.1
Pacientes censurados	18	20.9

Dados demográficos obtidos através de prontuário eletrônico e prontuário convencional. *Não obtivemos acesso aos dados de estadiamento clínico de 04 pacientes (4.8% dos casos) devido a óbito ou realização do tratamento em outra instituição; ** 09 pacientes sem dados de estadiamento TNM (10,6 dos casos) devido a óbito ou realização do tratamento em outra instituição; *** 02 casos excluídos (6%) por não se tratar de CPNPC (01 carcinomas neuroendócrino e 01 carcinoma pequenas células).

Foram recrutados 86 pacientes (51 homens e 35 mulheres), todos portadores de CPNPC, com idade média de 60,5 anos (variação: 32 a 88 anos). Quanto ao estadiamento clínico, os pacientes foram classificados como: estágio I (n= 07), estágio II (n=04), III (n=23) e estágio IV (n=48) e em 4 pacientes os dados não estavam disponíveis nos prontuários. O estadiamento patológico (TNM) apresentou-se da seguinte maneira: T1 (n=18), T2 (n=12), T3 (n= 21), T4 (n=26). Comprometimento linfonodal (N): N0 (n=25), N1 (n=10), N2 (n=32) e N3 (n=10) e metástases (M): M0 (n=36) e M1 (n=41). De acordo com a classificação preconizada (WHO 2015 e IALSC 2011) os tipos histológicos distribuíram-se da seguinte forma: 51 adenocarcinomas 19 carcinomas de células escamosas, e 11 carcinomas de grandes células. A respeito do histórico de tabagismo, consta que 40 pacientes eram fumantes (carga tabágica média de 60 anos/maço), 30 não fumantes e 16 ex-fumantes (carga tabágica 48 anos/maço). A média de tempo de seguimento foi de 9 meses com 18 pacientes censurados, 35 mortos e 51 vivos.

5.2 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS GRUPOS CONTROLE E DPOC

Na composição do grupo controle, foram recrutados 62 indivíduos saudáveis do ponto de vista pulmonar, dos quais 35 homens e 27 mulheres com média de idade de 51 anos e variação de 25 a 86 anos. Quanto ao histórico de tabagismo 21 indivíduos declararam-se fumantes (carga tabágica média de 48 anos/maço), 08 ex-fumantes (carga tabágica média de 25 anos/maço) e 33 não eram fumantes.

Foram recrutados 18 pacientes do grupo DPOC (07 homens e 11 mulheres) com média de idade de 67 anos (variação: 47 a 80 anos). Quanto ao tabagismo, 02 indivíduos declararam-se fumantes (carga tabágica média de 60 anos/maço) 15 ex-fumantes (carga tabágica de 48 anos/maço) e 01 não fumante.

Tabela 2 - Características demográficas do grupo controle

Características Demográficas		
Grupo Controle	Total de Indivíduos	Porcentagem (%)
	62	100
Média de Idade = 51 anos (25-86 anos)	-	-
Sexo		
Homens	35	56.4
Mulheres	27	43.6
Tabagismo		
Fumantes	21	33.8
Ex-fumantes	08	12.9
Não Fumantes	33	53.2
Grupo DPOC		
Total de Indivíduos	18	100
Média de Idade = 67 anos (47-80 anos)	-	-
Sexo		
Homens	07	38.8
Mulheres	11	61.2
Tabagismo		
Fumantes	02	11.2
Ex-fumantes	15	83.3
Não Fumantes	01	5.5

Dados demográficos obtidos através de prontuário eletrônico.

5.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE HA NO ESCARRO DE PACIENTES COM CPNPC, SAUDÁVEIS E DPOC

Realizamos a dosagem do HA dos 86 pacientes com CPNPC, 62 pacientes do grupo controle e 18 pacientes pertencentes ao grupo DPOC. O processo de indução do escarro para obtenção das amostras dos pacientes com CPNPC foi diferente entre as duas instituições participantes. No A.C.Camargo Cancer Center, a indução foi realizada com 7% de NaCl e HCB com NaCl 3%. A diferença nas concentrações, impactou na qualidade de obtenção das amostras, influenciando significativamente os resultados. Com isso, os dados obtidos estão apresentados de forma separada nos itens 5.3.1 e 5.4 e de forma comparativa no item 5.5.

5.3.1 Análise dos níveis de HA no escarro de pacientes com CPNPC, Saudáveis e DPOC no A.C.Camargo Cancer Center, induzidos com NaCl 7%

Os resultados das dosagens referem-se aos 58 pacientes com CPNPC (pré tto), dos quais 20 pacientes foram coletados após a primeira avaliação de resposta após tratamento sistêmico (CPNPC - pós tto), 52 controles e 18 pacientes com DPOC, submetidos a indução de escarro com NaCl 7%. Na Tabela 3, os níveis de HA no escarro são demonstrados em ng/mg (nanograma/miligramma). Todos os grupos foram submetidos à análise descritiva e apresentaram os seguintes resultados: CPNPC (pré tto) (n=58), mediana de HA (29.7 ng/mg), média de HA (162.6 ng/mg) e variação (0.0001 – 2092.9 ng/mg); CPNPC (pós tto) (n=20), mediana de HA (5.9 ng/mg), média de HA (11.9 ng/mg) e variação (0.17 – 83.5 ng/mg); Controle (n=62), mediana de HA (0.3 ng/mg), média de HA (22.4 ng/mg) e variação (0.001 – 563.1 ng/mg); DPOC (n=18), mediana de HA (4.2 ng/mg), média de HA (16.7 ng/mg) e variação (0.001 – 104.0 ng/mg).

Tabela 3 - Análise descritiva dos valores de HA (ng/mg) nas amostras tumorais e não tumorais

Grupos	Amostras (N)	Mediana (ng/mg)	Média (ng/mg)	Variação (ng/mg)
CPNPC (pré tto)	58	29.7	162.6	0.0001-2092.9
CPNPC (pós tto)	20	5.9	11.9	0.17– 83.5
Controle	52	0.3	22.4	0.0001 – 563.1
DPOC	18	4.2	16.7	0.001 – 104.0

CPNPC (pré tto): pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células sem tratamento; CPNPC (pós tto): pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células coletados após a 1ª avaliação de resposta (pós tto); Controle: indivíduos livres de doenças pulmonares; DPOC: pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica
*Amostras de escarro obtidas através de indução com NaCl 7%.

Após a análise descritiva, os grupos com CPNPC (pré tto), CPNPC (pós tto), DPOC e Controle foram comparados e observamos um padrão de concentração de HA diferente entre eles (p=0.01) (Figura 4).

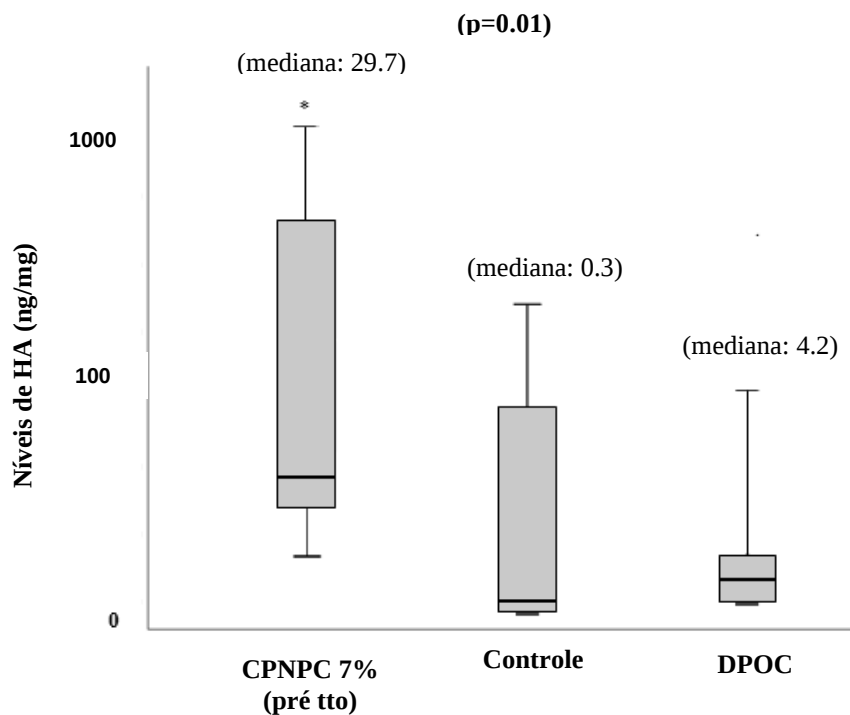


Figura 4 – Concentração de HA presente nas amostras tumorais e não tumorais ($p < 0.01$). Teste de Kruskal-Wallis. * *outliers*.

A concentração de HA (ng/mg de proteína) foi significativamente maior nas amostras coletadas dos pacientes com CPNPC (pré-tto) em relação as amostras coletadas após a primeira avaliação de resposta (CPNPC pós-tto) (mediana 29,7 vs 5,9 ng/mg de proteína, respectivamente, $p=0.004$) (Figura 5).

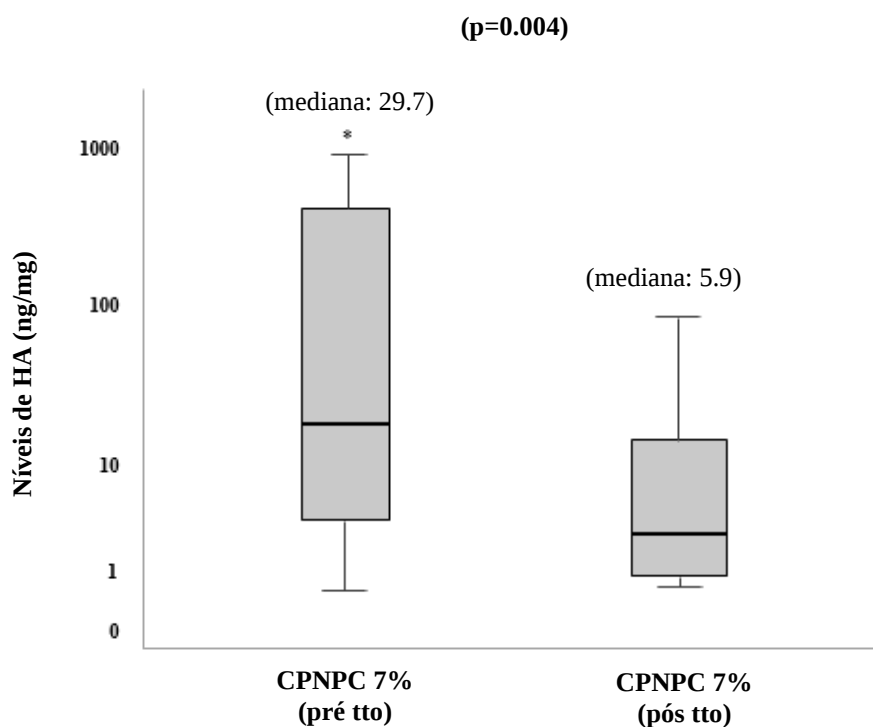


Figura 5 – Concentração de HA presente nas amostras coletadas antes (CPNPC pré tto) e após o tratamento e após (CPNPC pós tto) o tratamento (p=0.004). Teste de Dunn com correção de Bonferoni. * outliers

Ao realizar o teste pareado somente nos grupos CPNPC (pré tto) e DPOC, foi observado que a concentração de HA (ng/mg) foi significativamente maior nos pacientes com CPNPC (pré tto) do que nos pacientes com DPOC (mediana 29,7 vs 4,2 ng/mg de proteína, respectivamente, p=0.014) (Figura 6).

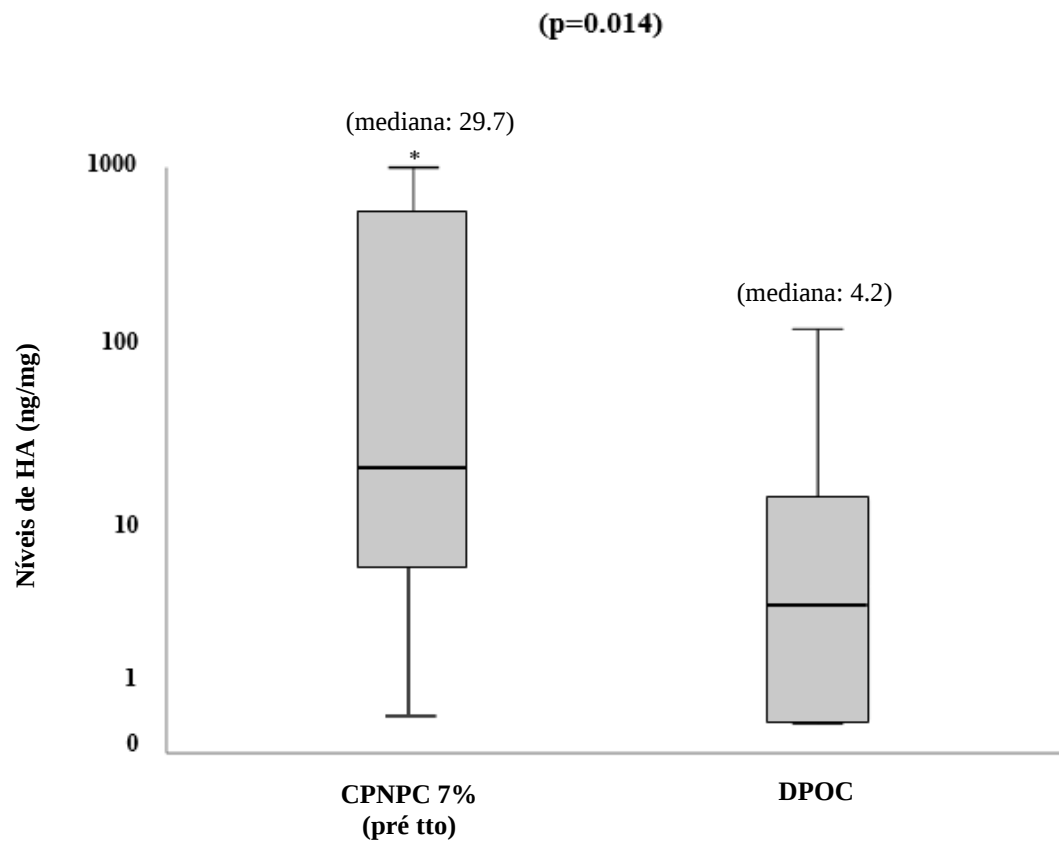


Figura 6 – Concentração de HA presente nas amostras de CPNPC (pré tto) e DPOC, (p=0,014).
Teste de Dunn com correção de Bonferoni. *outliers

Houve ainda uma significância estatística maior quando comparamos o grupo de pacientes com CPNPC (pré tto) com o grupo Controle (mediana 29,7 vs 0,3 ng/mg de proteína; $p=0.0005$) (Figura 7).

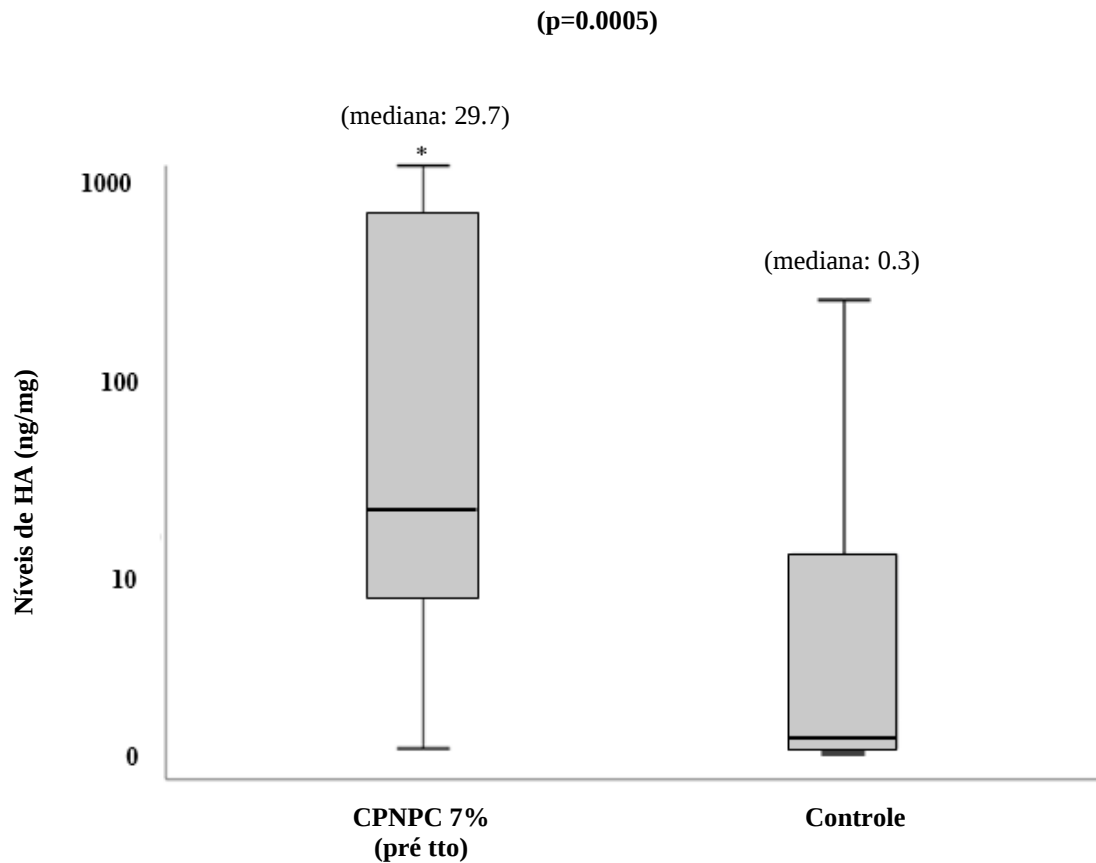


Figura 7 - Concentração de HA presente nas amostras de CPNPC (pré tto) e Controle ($p=0,0005$). Teste de Dunn com correção de Bonferroni. *outliers

A Tabela 4 apresenta a análise descritiva dos níveis de HA e os tipos histológicos onde o grupo AD (n=40) apresentou mediana (7.6 ng/mg), média (90.4 ng/mg) e variação (0.0001 a 964.9). O grupo CEC (n=8) apresentou mediana (109.8 ng/mg), média (428.8 ng/mg) e variação (0.015 a 2092.9 ng/mg) enquanto CGC (n=8) apresentou mediana (77.9 ng/mg), média (224.2 ng/mg) e variação (13.5 a 663.5 ng/mg).

Tabela 4 – Análise descritiva dos valores de HA em amostras tumorais estratificadas por tipos histológicos

Tipos Histológicos	Amostras	Mediana	Média	Variação
AD	40	7.6	90.4	0.0001 – 964.9
CEC	08	109.8	428.8	0.015 – 2092.9
CGC	08	77.9	222.4	13.3 – 663.5

AD: adenocarcinomas, CEC: carcinoma de células escamosas e CGC: carcinoma de grandes células.

As concentrações de HA encontradas no grupo CPNPC (pré tto) foram correlacionadas com os diferentes tipos histológicos e foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0.029) (Figura 8)

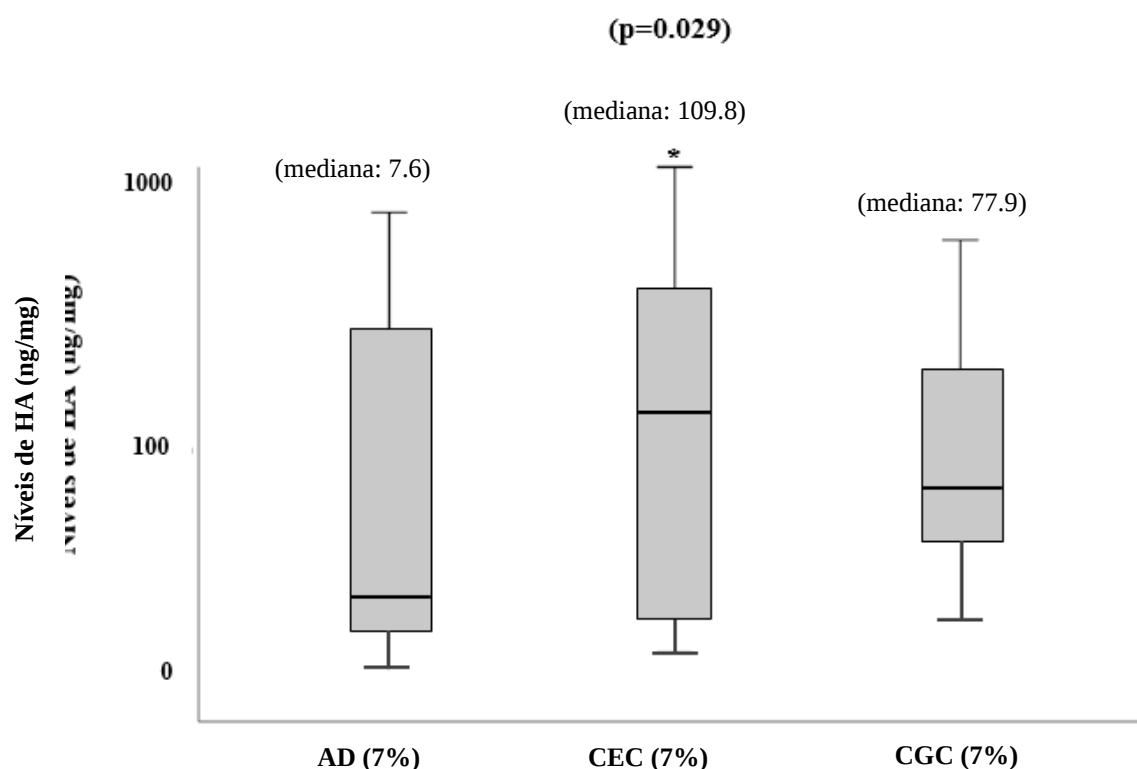


Figura 8 – Concentração de HA presente nas amostras de CPNPC (pré tto) induzidos com solução salina 7%, estratificados pelos tipos histológicos. AD: adenocarcinomas; CEC: carcinoma de células escamosas; CGC: carcinoma de grandes células. Kurskal-Wallis; (p=0.029). * outliers

5.3.2 Análise dos níveis de HA no escarro de pacientes com CPNPC, recrutados no Hospital de Amor de Barretos, induzidos com NaCl 3%

Foram recrutados 28 pacientes com CPNPC (pré tto) no momento do diagnóstico. Somente 15 pacientes coletaram a segunda amostra após a primeira avaliação de resposta ao tratamento momento do diagnóstico (CPNPC pós tto). A análise descritiva foi realizada e foram obtidos os seguintes resultados: CPNPC (pré tto) (n=28), mediana (13.9 ng/mg), média (55.0 ng/mg) e variação (0.0004 – 735.0 ng/mg); CPNPC (pós tto) (n=15), mediana (8.5 ng/mg), média (15.7 ng/mg) e variação (1.9 – 64.3 ng/mg) (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise descritiva dos valores de HA em amostras tumorais coletadas antes e depois do tratamento (ng/mg de escarro).

Paciente	Amostras	Mediana	Média	Variação
CPNPC (pré tto)	28	13.9	55.0	0.0004-735.0
CPNPC (pós tto)	15	8.5	15.9	1.9 – 64.3

CPNPC (pré tto): pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células sem tratamento; CPNPC (pós tto): pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células coletados após a primeira avaliação de resposta.

Após a análise descritiva, os grupos com CPNPC (pré tto) e CPNPC (pós tto) foram comparados e não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p=0.15$) (Figura 9).

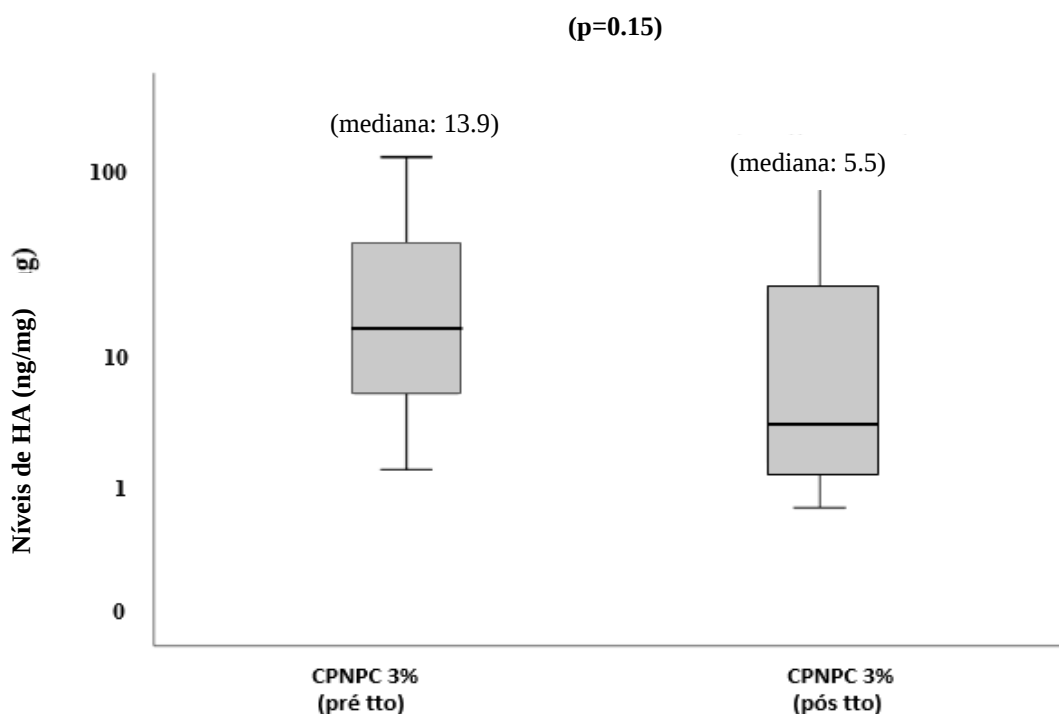


Figura 9 – Concentração de CPNPC 3% nas amostras tumorais CPNPC 3% no do diagnóstico (CPNPC - pré tto) e após a primeira avaliação de resposta (CPNPC - pós tto), $p=0,15$. Teste de Dunn com correção de Bonferoni.

A Tabela 6 apresenta a análise descritiva dos níveis de HA nas amostras de escarro dentre os diferentes tipos histológicos dos pacientes do HAB. Os valores se apresentaram da seguinte forma: AD (n=12), mediana (6.8 ng/mg), média (9.4 ng/mg) e variação (2.6 a 24.4 ng/mg); CEC (n=12), mediana (18.4 ng/mg), média (24.1 ng/mg) e variação (0.0004 a 87.1 ng/mg); CGC (n=04), mediana (47.6 ng/mg), média (118.6 ng/ug) e variação (12.1 a 367.2 ng/mg).

Tabela 6 - Distribuição dos níveis do HA entre os diferentes tipos histológicos dos pacientes com CPNPC (pré tto) recrutados no HAB

Grupo	Amostras	Mediana	Média	Variação
AD	12	6.8	9.4	2.6 – 24.4
CEC	12	18.4	24.1	0.0004 – 87.1
CGC	04	47.6	118.6	12.1 – 367.2

AD: adenocarcinomas; CEC: carcinoma de células escamosas; CGC: carcinoma grandes células

Após a análise descritiva, as concentrações de HA encontradas no grupo CPNPC (pré tto) foram correlacionadas com os diferentes tipos histológicos dos indivíduos e não foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0.21$) (Figura 10).

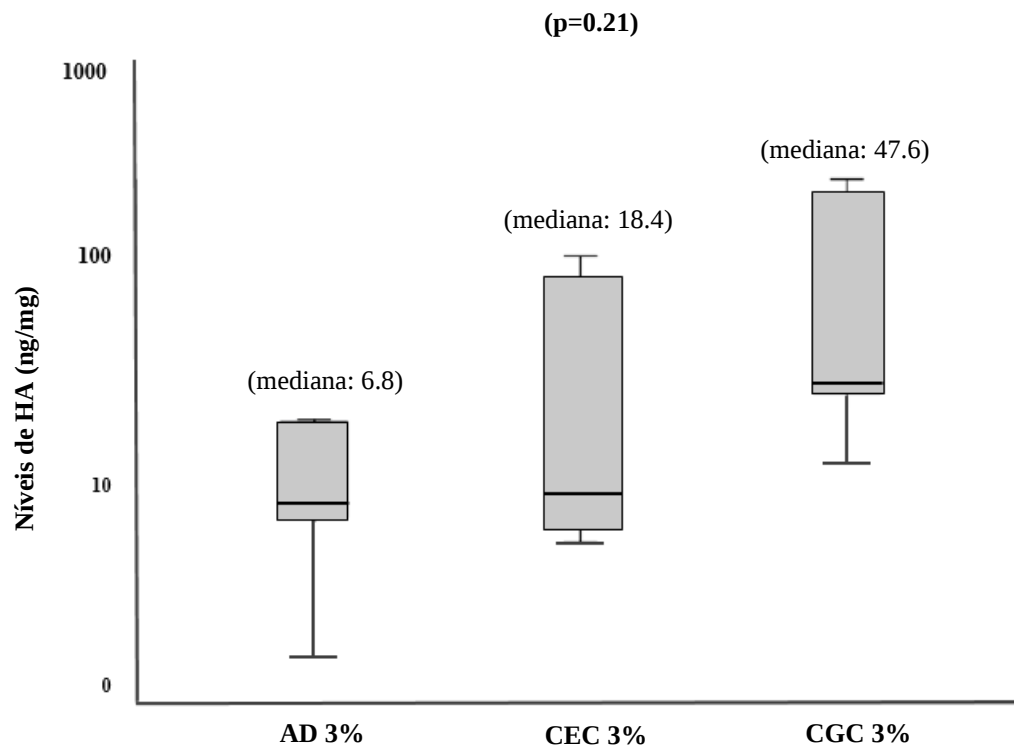


Figura 10 – Concentração de HA presente nas amostras de CPNPC (pré tto) dos pacientes do HAB coletados com *NaCl* 3%, estratificados pelos tipos histológicos. AD: adencarcinomas; CEC: carcinoma de células escamosas; CGC: carcinoma de grandes células, $p=0,21$. Teste Kruskal-Wallis.

5.4 ANÁLISE COMPARATIVA DOS NÍVEIS DE HA CONFORME O EMPREGO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl (3% E 7%) NA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE ESCARRO

A Tabela 7 apresenta a análise descritiva referente aos níveis de HA e as diferentes concentrações de solução salina de NaCl (3% e 7 %) empregadas nas coletas. Os valores se apresentaram da seguinte forma : CNPNPC (pré tto) (7%), mediana (29,7 ng/mg), média (162,6 ng/mg), variação (0.0001-2092.9); CPNPC (pós tto) (7%), mediana (5,9 ng/mg), média (11.9 ng/mg), variação (0.17– 83.5); CPNPC (pré tto) (3%), mediana (13.9 ng/mg), média (55.0 ng/mg)), variação (0.0004 – 735.0); CPNPC (pós tto) (3% ng/mg), mediana (5,5 ng/mg), média (15,7ng/mg), variação (1,9 - 64,3).

Tabela 7 - Dosagem do HA nas amostras de escarro obtidas com NaCl 3% e 7%

Pacientes	Amostras (N)	Mediana (ng/mg)	Média (ng/mg)	Variação (ng/mg)
(AC Camargo Cancer Center) CPNPC 7% (pré tto)	58	29.7	162.6	0.0001-2092.9
CPNPC 7% (pós tto)	20	5.9	11.9	0.17– 83.5
(Hospital de Amor de Barretos) CPNPC 3% (pré tto)	28	13.9	55.0	0.0004 – 735.0
CPNPC 3% (pós tto)	15	5,5	15,7	1,9 - 64,3

CPNPC 7% (pré tto): pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células sem tratamento, submetidos a coleta de escarro com solução NaCl (7%); CPNPC 7%(pós tto) pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células tratados, submetidos a coleta de escarro com solução NaCl (7%) após a 1ª avaliação de resposta; CPNPC 3%(pré tto): pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células sem tratamento submetidos a coleta de escarro com solução NaCl (3%); CPNPC 3% (pós tto): pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células tratados, submetidos a coleta de escarro com solução NaCl (3%), após a 1ª avaliação de resposta.

Após a análise descritiva, os grupos com CPNPC 7% (pré tto), CPNPC 7% (pós tto), CPNPC 3% (pré tto) e CPNPC 3% (pós tto) foram comparados e a diferença entre as concentrações de HA aproximou-se do limiar de significância ($p=0.06$) (Figura 11).

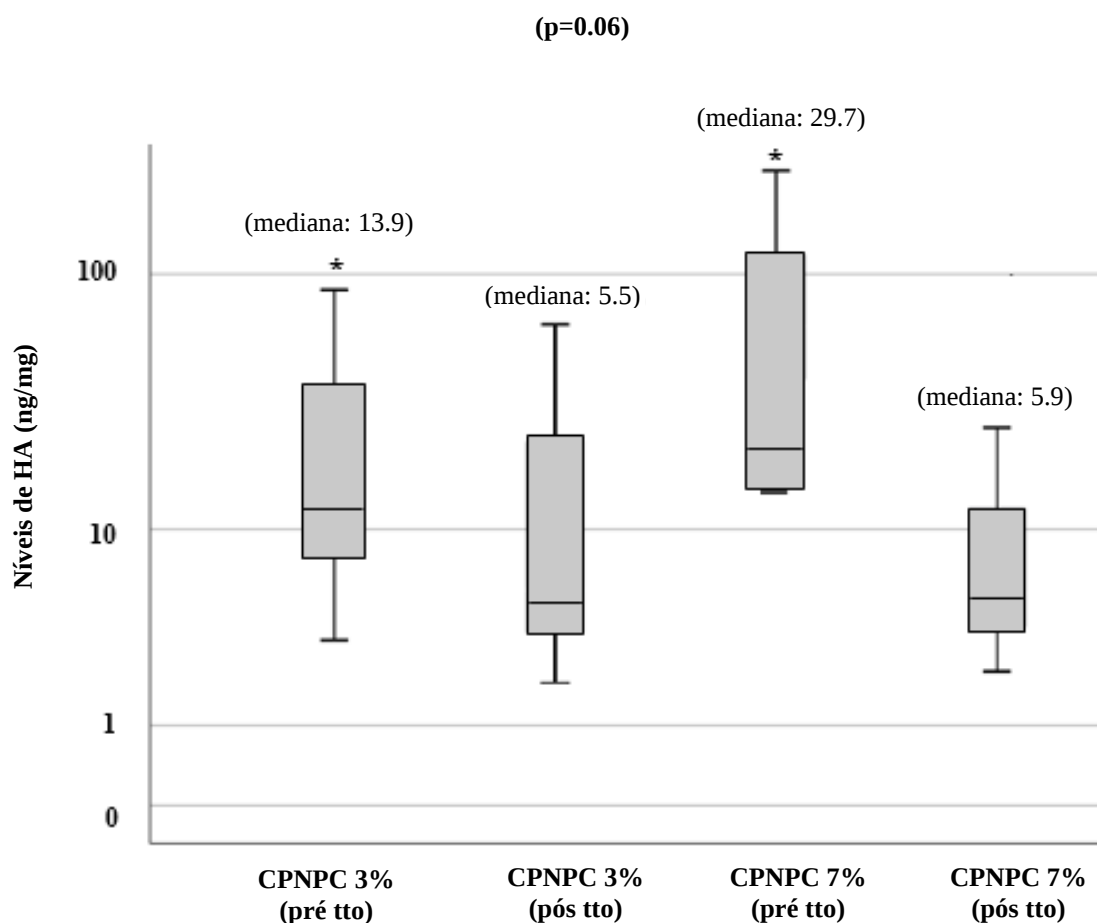


Figura 11 – Concentração de HA presente nas amostras de pacientes coletados no Hospital de Amor de Barretos (CPNPC 3% (pré tto) / CPNPC 3% pós tto) e A.C.Camargo Cancer Center (CPNPC 7% (pré tto) / CPNPC 7% (pós tto) $p=0,06$. Teste Kruskal-Wallis. *outliers. Indução com NaCl 3% e 7%.

As concentrações de HA encontradas nos grupos CPNPC 3% (pré tto) e CPNPC 7% (pré tto) foram correlacionadas com os diferentes tipos histológicos (AD, CEC e CGC) dos indivíduos e foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0.029$) (Figura 12)

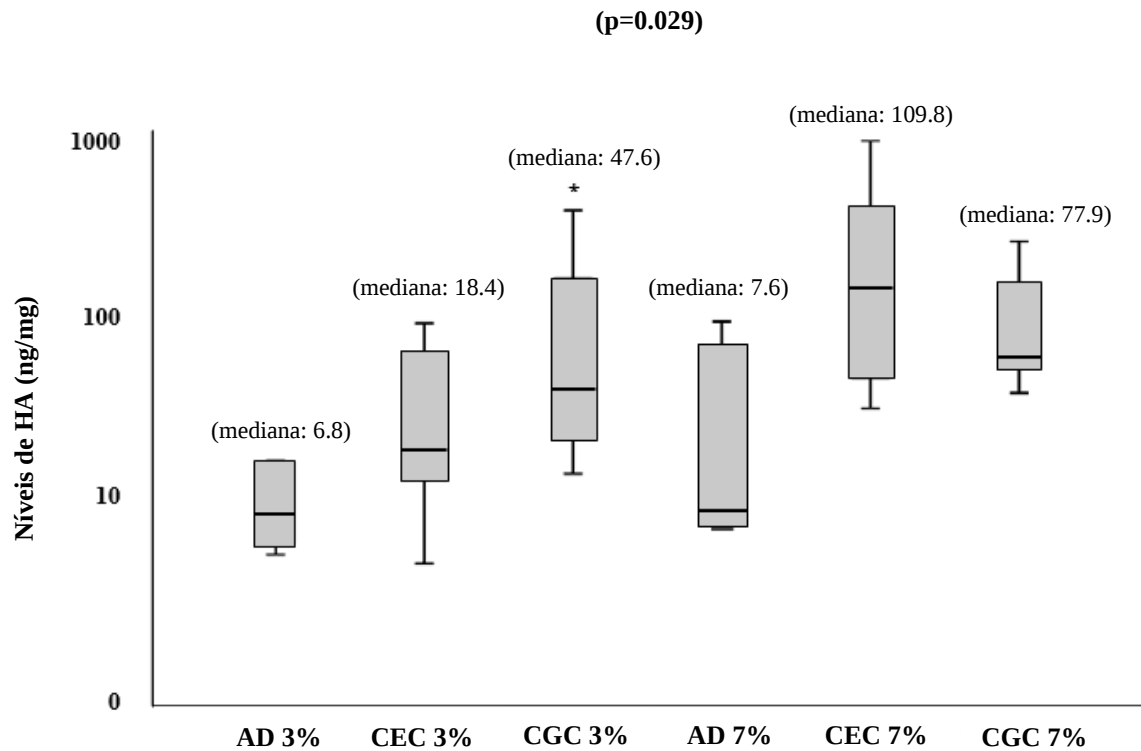


Figura 12 – Concentração de HA presente nas amostras de CPNPC NaCl 3% . (pré tto) e CPNPC NaCl 7% (pré tto), estratificados pelos tipos histológicos. AD: adencarcinomas; CEC: carcinoma de células escamosas; CGC: carcinoma de grandes células, $p=0,029$. Teste Kruskal-Wallis. *outliers

5.5 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE HA E AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES COM CPNPC

As características clínico-patológicas dos pacientes com CPNPC (pré tto) da nossa coorte estão resumidas na Tabela 08. Utilizamos o modelo linear generalizado (GLM) para determinar a associação simultânea entre 3 variáveis, sendo: amostras coletadas com emprego de duas concentrações de solução salina na indução do escarro (NaCl 3% e 7%) e as variáveis clínicas.

Foi observado que os pacientes do sexo masculino com mais de 58 anos de idade apresentaram uma concentração de HA (NaCl 7%) significativamente maior na expectoração em comparação ao escarro coletado a 3% de NaCl ($p=0.001$). Da mesma forma, pacientes fumantes ($p=0.002$), portadores de CEC ($p=0.03$), doença progressiva após tratamento sistêmico avaliado por tomografia computadorizada ($p=0.01$). Em amostras obtidas de tumores carreadores de mutação em KRAS, o aumento da concentração de HA a NaCl 7% em relação a NaCl 3% foi marginalmente significante ($p=0.05$).

Verificamos ainda que todas as associações permaneceram significativas após análise estatística multivariada. Na análise univariada, a concentração de HA no escarro (NaCl 7%) foi marginalmente associada com a carga tabágica ($p=0.08$) e status vital ($p=0.07$). Com relação à concentração de HA no escarro (NaCl 7%) e o histórico de tabaco, houve significância estatística entre os pacientes fumantes comparados aos não fumantes ($p=0.002$) (figura 13). No entanto, a associação entre os níveis de HA e o estadiamento clínico apresentaram significância estatística entre maiores níveis de HA e estádios III e IV (Kruskal-Wallis, $p=0.01$) (figura 14). O estadiamento T foi marginalmente associado aos níveis de HA nos tumores T1 em relação aos tumores $> T2$ (Kruskal-Wallis; $p=0.05$) (figura 15). Os níveis de HA foram mais baixos nos pacientes com resposta completa e parcial do tumor, conforme avaliado pela TC, quando comparados aos níveis de HA nos pacientes com doença estável e progressão (Kruskal-Wallis; $p=0.02$) (figura 16).

Tabela 8 – Características clínico-patológicas e suas relações com o há

Variáveis Clínicas	Concentração de HA (ng/mg) a 7%	Concentração de HA (ng/mg) a 3%	Valor de P*
Idade (anos)			0.001
≤58	190.87	33.26	
>58	192.12	122.47	
Sexo			0.001
Mulheres	157.14	15.19	
Homens	215.48	108.73	
Tabagismo			0.002
Não Fumantes	187.31	18.28	
Ex-fumantes	169.03	46.05	
Fumantes	206.41	93.41	
Carga Tabágica			0.08
2 anos/maço	185.63	39.60	
60 anos/maço	199.37	90.96	
Tipo Histológico			0.03
Adenocarcinoma	159.41	42.62	
Carcinoma de Células Escamosas	432.54	93.89	
Estadiamento Tumoral†			0.05
T1	83.50	14.95	
T2	187.01	42.90	
T3	281.14	145.28	
T4	202.32	43.95	
Status Linfonodal†			0.16
N ₀	174.21	133.39	
N ₁	242.94	34.00	
N ₂	193.43	53.46	
Status			0.07
Vivo	133,20	81.68	
Morto	314.64	61.30	
Sobrevida Global			0.19
≤26 meses	140.58	80.41	
>26 meses	222.08	50.75	
Avaliação de Resposta por TC			0.01
Resposta Parcial	118.97		
Resposta Completa	117.38		
Doença Estável	211.00	81.68	
Progressão da Doença	292.78	61.30	
Mutações			0.05
Wild type	240.13	75.57	
ALK	219.00	2.62	
EGFR	34.11		
KRAS	228.00		
RET	15.89		
EGFR + T790M	122.60		
Tratamento			0.01
QT	146.65		
QT+IM	101.11		

Aplicação do modelo linear generalizado univariado (GLM) para três variáveis simultâneas (nível de HA; grupo: NaCl 7% e 3%, e características dos pacientes). Significância para valor $p \leq 0.05$. † (IASLC) Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão [Goldstraw P, Chansky K, Crowley J et al. O Projeto de Estadiamento do Câncer de Pulmão da IASLC: Propostas para Revisão dos Agrupamentos de Estágios TNM na 8ª Ed. da Classificação TNM para Câncer de Pulmão. J Thorac Oncol. 2016; 11 (1): 39-51]. Tomografia computadorizada (TC), Quimioterapia (QT); Imunoterapia (IM).

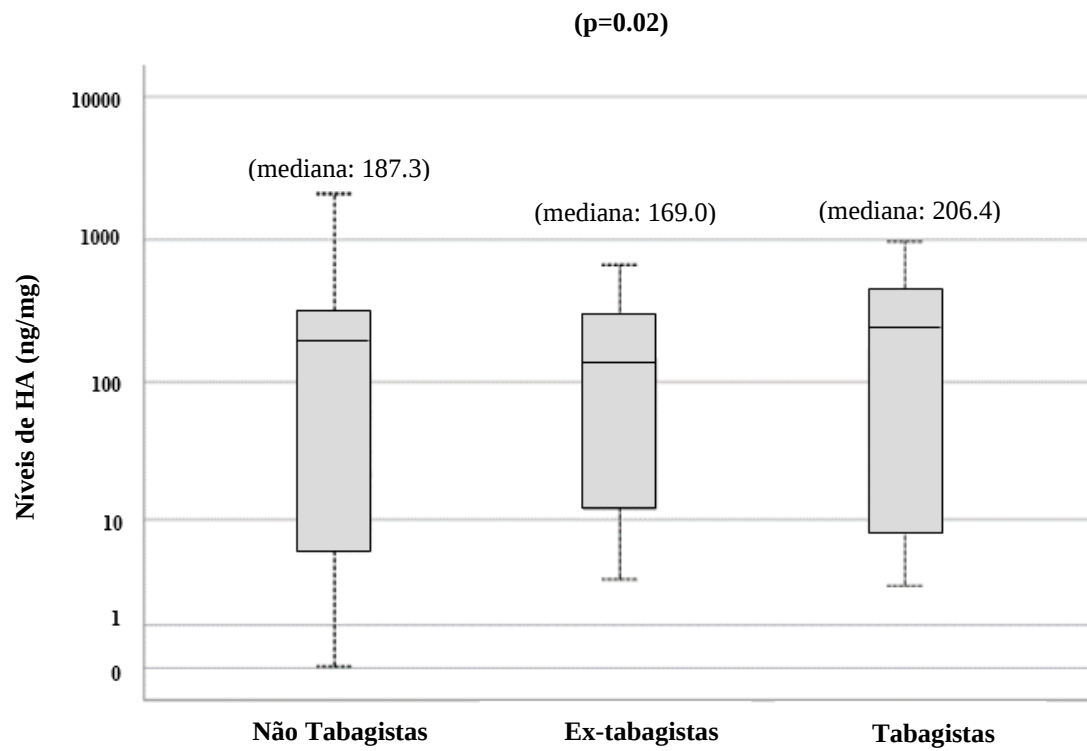


Figura 13 – Níveis de HA e sua relação com o tabagismo em pacientes com CPNPC induzidos com NaCl 7%.

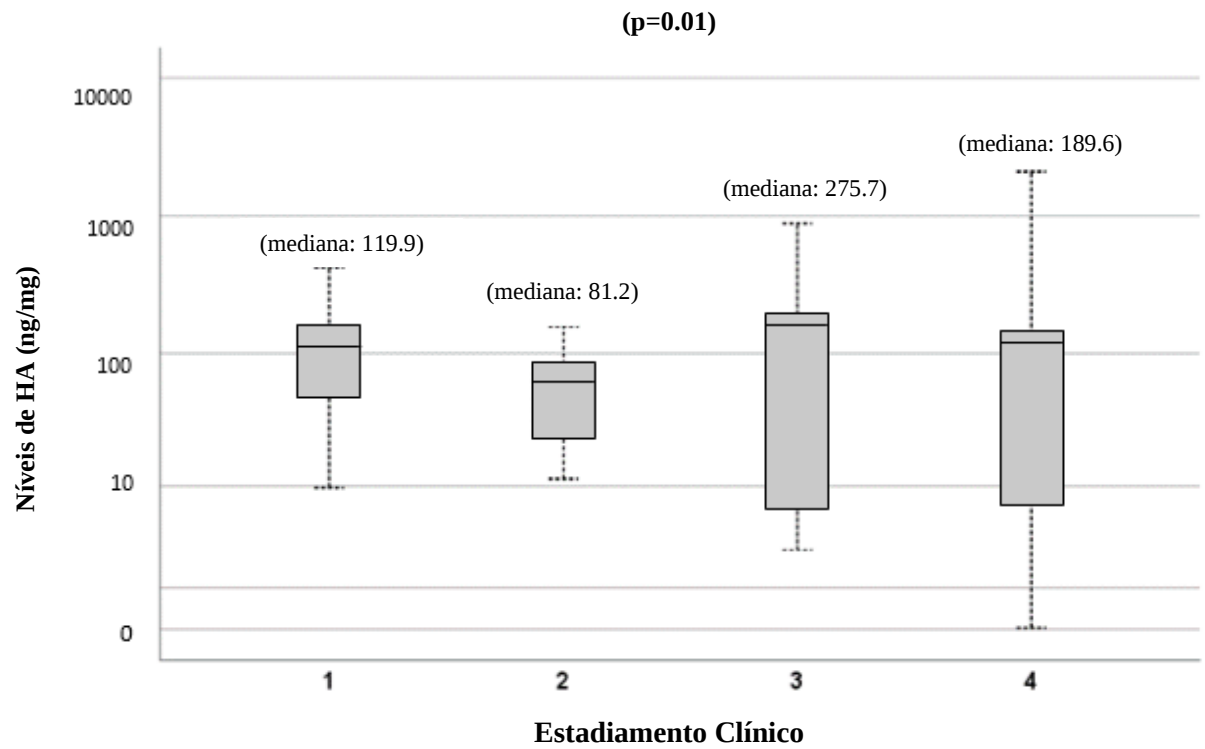


Figura 14 - Níveis de HA e sua relação com o estadiamento clínico em pacientes com CPNPC (pré tto) induzidos com NaCl 7%

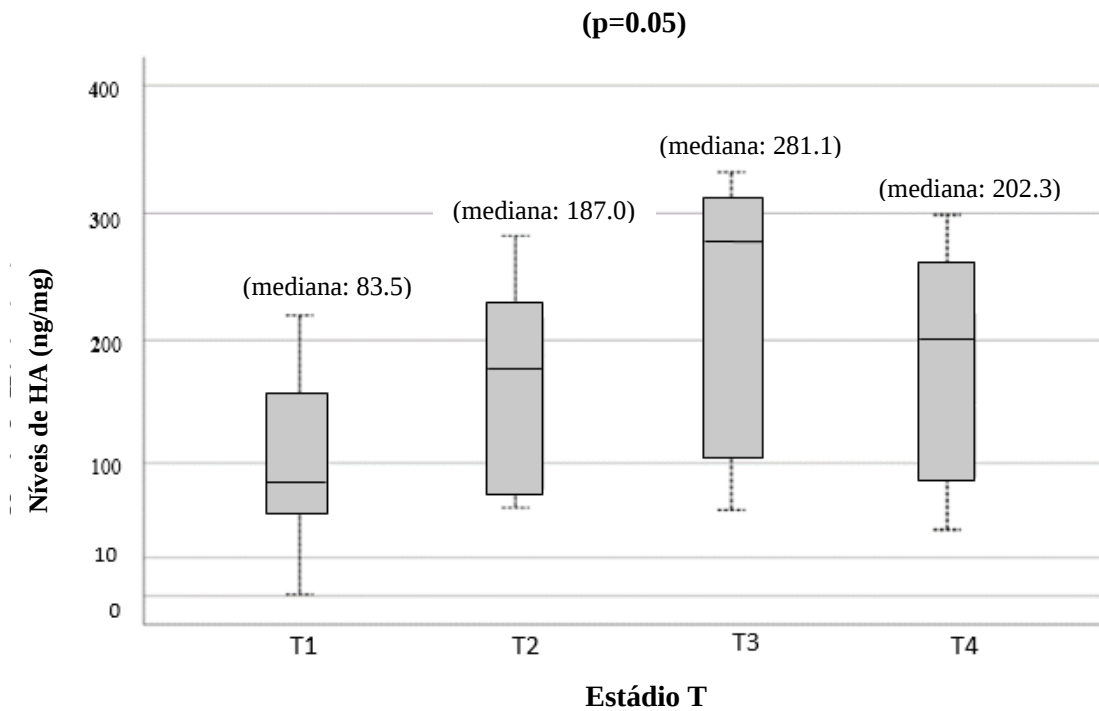


Figura 15 - Níveis de HA e sua relação com o estadiamento patológico T em pacientes com CPNPC (pré tto) induzidos com NaCl 7%.

Respostas Avaliadas por TC

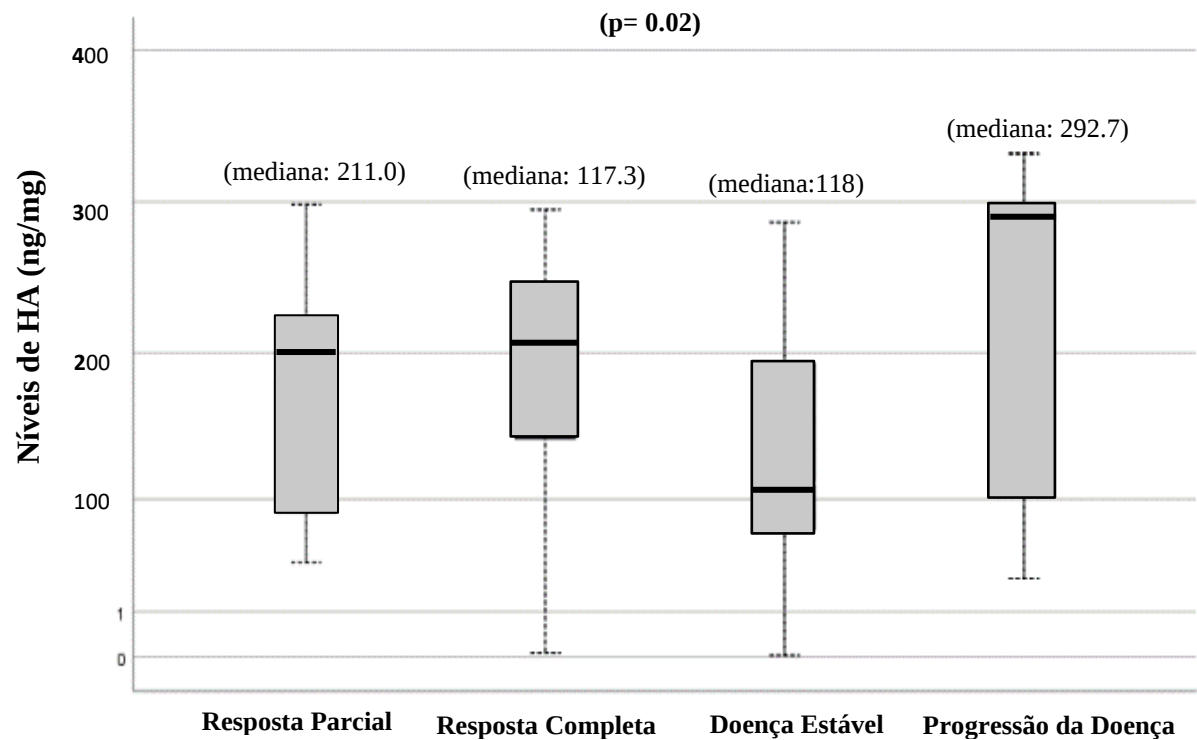


Figura 16 - Níveis de HA e sua relação com as respostas ao tratamento avaliadas por tomografia computadorizada.

5.6 ANÁLISE DE SOBREVIDA DOS PACIENTES COM CPNPC

Selecionamos e estratificamos todos os pacientes com CPNPC conforme a totalidade dos dados clínicos e dos tratamentos disponíveis nos prontuários convencionais/eletrônicos e considerando também o estadiamento clínico: 06 pacientes no estadio I (7,1%), 5 pacientes no estadio II (6%) 22 pacientes no estágio IIIA (26,2%) e 51 pacientes com doença metastática (60,7%). A média de tempo de seguimento dos pacientes foi de 9 meses (variação de 03 a 71 meses). As curvas de sobrevida global (OS) demonstraram que, nesta coorte, pacientes com estádios patológicos I e II tiveram sobrevida similar, com um tempo médio de 30 meses. Assim, agrupamos os pacientes nos estágios I e II e realizamos a análise de regressão de Cox conforme a Tabela 9.

Tabela 9 - Análise univariada e multivariada dos pacientes do A.C.Camargo Cancer Center e HB pelo modelo matemático de Cox para avaliação do risco relativo de morte sob controle de idade, estágio, tratamento e tipos histológicos (log-likelihood 99,96 p=0,01)

Variáveis	Valor de qui-quadrado	Análise Univariada ^a			Valor de qui-quadrado	Análise Multivariada ^b		
		Coeficiente β	HR	Valor de P		Coeficiente β	HR	Valor de P
Idade (anos)	0.540			0.45				
≤58 (referência)		0.270						
>58								
Sexo	0.748			0.386				
Feminino		0.336						
Masculino (referência)								
Tabagismo	0.599			0.744				
Não Fumantes		0.130						
Ex-fumantes		0.287						
Fumantes (referência)								
Carga Tabágica	0.359			0.549				
2 anos/maço		0.221						
60 anos/maço (referência)								
Tipos Histológicos	3.724			0.155				
AD		0.349						
CEC (referência)								
Estadiamento Clínico (IALSC)	11.962		1,3	0.01	17.5			0.014
I+II		-13.479				-8.350	0,6	
III		0.992				0.023	2,5	
IV (referência)								
Estadiamento Tumoral	9.133		2,12	0.02				0.014
T1		-1.825			17.5	0.816		
T2		0.806				0.725	0.8	
T3		0.311				0.682		
T4 (referência)								

Cont/ Tabela 9

Variáveis	<u>Análise Univariada^a</u>				<u>Análise Multivariada^b</u>			
	Valor de qui-quadrado	Coefficiente β	HR	Valor de P	Valor de qui-quadrado	Coefficiente β	HR	Valor de P
Status Linfonodal	1.156			0.76				
N0		0.349						
N1		0.212						
N2		0.011						
N3(referência)								
Mutações	6.740			0.24				
Tipo Selvagem								
ALK		10.454						
EGFR		10.439						
KRAS		9.570						
RET		9.941						
EGFR + T790M		0.178						
Níveis de HA pré-tratamento (ng/mg)	0.472		0,65	0.06			2,4	0.0001
≤ 29.7 (referência)					93.3	0.623		
>29.7		0.299						
Avaliação de Resposta após tratamento por TC	78.853		4,8	0.0001			1,6	0.0001
Resposta Completa		- 13.583				1.380		
Resposta parcial		- 2.981			93.3	18.196		
Doença Estável		-3.550				21.345		
Progressão da Doença (referência)								
Tratamento (pacientes com CP metastáticos)			1,45					
QT+IM	14.665	-1.746		0.013				
QT (referência)								

^a A análise univariada foi realizada sem nenhum ajuste para gerar o valor do qui-quadrado, o coeficiente β (risco) e o valor P para o risco individual para cada um dos parâmetros de sobrevivência. ^b A análise multivariada foi realizada para analisar os efeitos de vários parâmetros de risco na sobrevivência. Coeficiente β = risco. Valor de $p \leq 0,05$. Quimioterapia (QT); Imunoterapia (IM); CP (câncer de pulmão)

A análise univariada de Cox demonstrou que pacientes EC I e II (HR:1,3; $p=0.01$), estadio T1 (HR= 2,12; $p=0.02$), resposta completa ao tratamento avaliada por TC (HR= -4,8; $p=0.0001$), QT+ IM (HR:1,45; $p=0.01$), apresentaram menor risco de morte quando comparados aos pacientes com EC IV estadio T4 e progressão de doença. Em relação ao HA, não houve significância estatística quando esta variável foi avaliada isoladamente.

Foi construído um modelo matemático de risco de morte para os pacientes com CPNPC, incluindo o HA como variável codependente das variáveis estadiamento clínico (EC), estadiamento TNM, tipo de resposta do tumor ao tratamento, QT e QT + imunoterapia.

O modelo resultante revelou que pacientes com níveis de HA >29.7 ng/mg (HR:2,4; $p=0.001$, EC III (HR:2,5; $p=0.014$), apresentaram maior risco de morte quando comparados aos pacientes com níveis de HA < 29.7 ng/mg (HR:2,1; $p=0.0001$), EC I e II (HR:0,65, $p=0.001$), estadio T1 (HR:0,32; $p=0.001$), resposta completa ao tratamento (HR:4,98, $p=0.001$) e receberam QT+IM (HR:0,98; $p=0.02$) (tabela 10).

Tabela 10 - Risco relativo de morte controlado por estadiamento, tratamento e resposta terapêutica de acordo com os níveis de HA (log-likelihood 109,749; $p = 0,0001$).

Variáveis	Coefficiente β	HR	Erro padrao	Valor de P
<29.7 HA (ng/mg) NaCl 7%	0.130	2,1	0.055	0.02
QT+IM	0.048	0,98	0.190	0.01
Resposta completa ao tratamento avaliada por TC	0.543	4,98	0.207	0.001

^b A análise multivariada foi realizada para analisar os efeitos de vários parâmetros de risco na sobrevida. Coeficiente β = risco. Valor de $p \leq 0,05$. Quimioterapia (QT); Imunoterapia (IM); Tomografia computadorizada (TC), QT+ IM (quimioterapia + imunoterapia), HA = ácido hialurônico.

O ponto de corte estabelecido pela mediana de 29.7 ng/mg revelou-se como um valor adequado o qual apresentou uma boa associação com a resposta do tumor à TC e o resultado do tratamento sistêmico. Os grupos de pacientes avaliados pela resposta ao tumor por TC após o tratamento com diferentes tempos médios de sobrevida são ilustrados na figura 17A. Os grupos com resposta completa avaliados por TC e doença estável aparecem na curva superior, e sua mediana do tempo de sobrevida não foi alcançada durante o acompanhamento. O tempo médio de sobrevida, entretanto, foi bastante longo (30 meses). Em contraste, os pacientes com doença progressiva (curva inferior) tiveram um tempo médio de sobrevida de apenas 11 meses após a terapia ($p=0.0001$) (log-rank). Os pacientes tratados com QT e QT+IM apresentaram

diferentes medianas de sobrevida e estão representados pelos gráficos de Kaplan-Meier na Figura 17B.

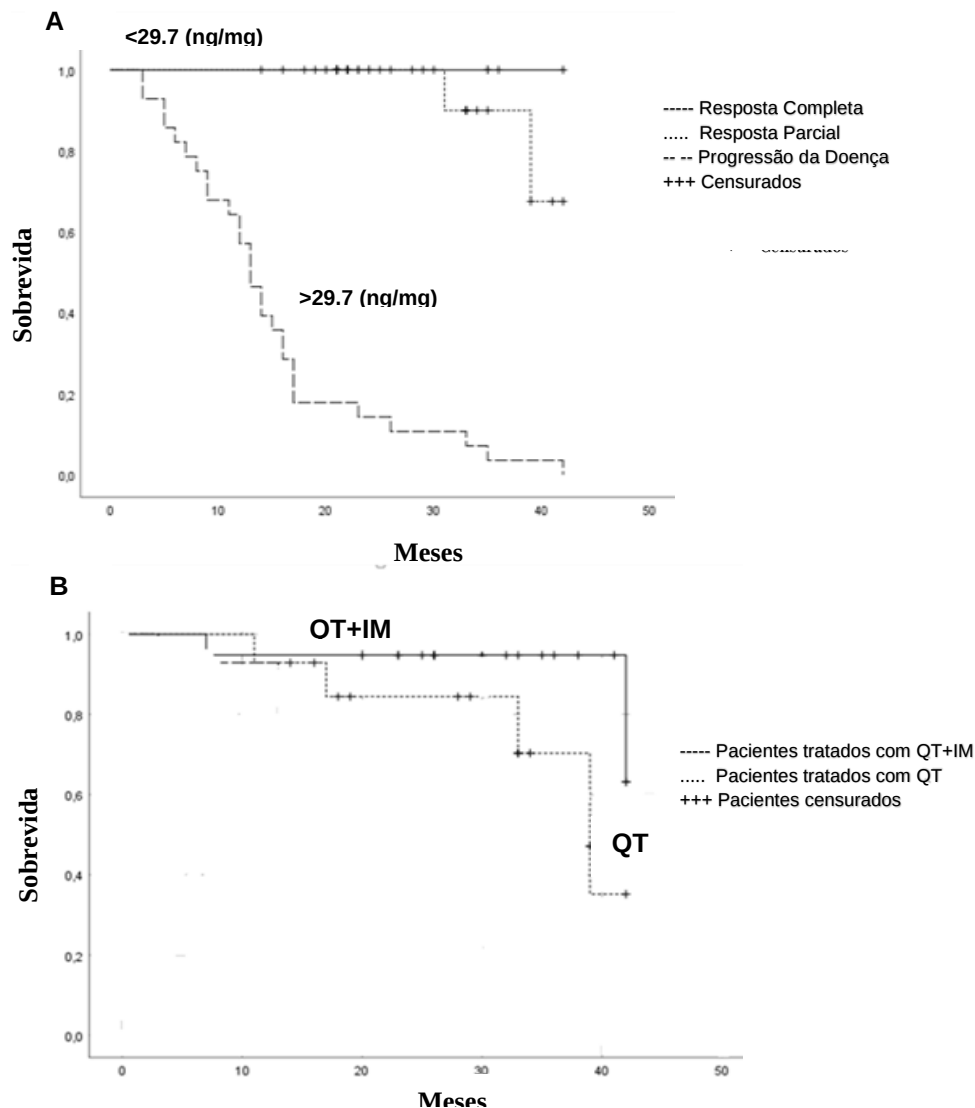


Figura 17 –Avaliação da sobrevida em meses após tratamento e diferentes concentrações de HA. A) Pacientes avaliados pela resposta ao tumor por TC após o tratamento com diferentes tempos médios de sobrevida. B) Pacientes tratados com QT ou QT+Imunoterapia e as diferentes medianas de tempo de sobrevida. QT: quimioterapia; IM: imunoterapia

O grupo tratado com quimioterapia e imunoterapia (QT+IM) aparece na curva superior, e a mediana do tempo de sobrevida foi de 40 meses. Em contraste, os pacientes tratados somente pela QT (curva inferior) tiveram uma mediana de sobrevida de 17 meses ($p=0.03$; teste de log-rank). Examinamos também os níveis de HA no escarro e os tipos de resposta ao tratamento avaliados por TC em relação ao risco de morte dos pacientes com doença metastática que foram tratados com QT+IM. O modelo de risco proporcional de COX revelou menor risco de morte

para pacientes com níveis de HA < 29.7 tratados com QT+ IM e com resposta completa do tumor ao tratamento ($p=0.001$).

5.7 AVALIAÇÃO DO HA NA DISTINÇÃO ENTRE PACIENTES COM CPNPC RESPONDEDORES E NÃO RESPONDEDORES

A curva ROC (*receiver operating characteristic*) foi construída para demonstrar a habilidade diagnóstica do HA presente no escarro em discriminar pacientes respondedores dos não respondedores. Os níveis de HA encontrados no escarro dos indivíduos do grupo respondedor do grupo não respondedor foram analisados usando a sensibilidade e especificidade. A escolha do ponto de corte para a situação apresentada na curva ROC foi baseada no ponto em que a sensibilidade e a especificidade demonstrassem maiores valores, respectivamente. A curva ROC construída com esses dados apresentou uma área abaixo da curva de 0.995 (0.881–1.000; $p=0.0001$) e, ao assumir um valor de corte de 77.30 ng/mg de HA para os pacientes NaCl 7%, a especificidade foi de 86% e a sensibilidade foi de 100% (Figura 18).

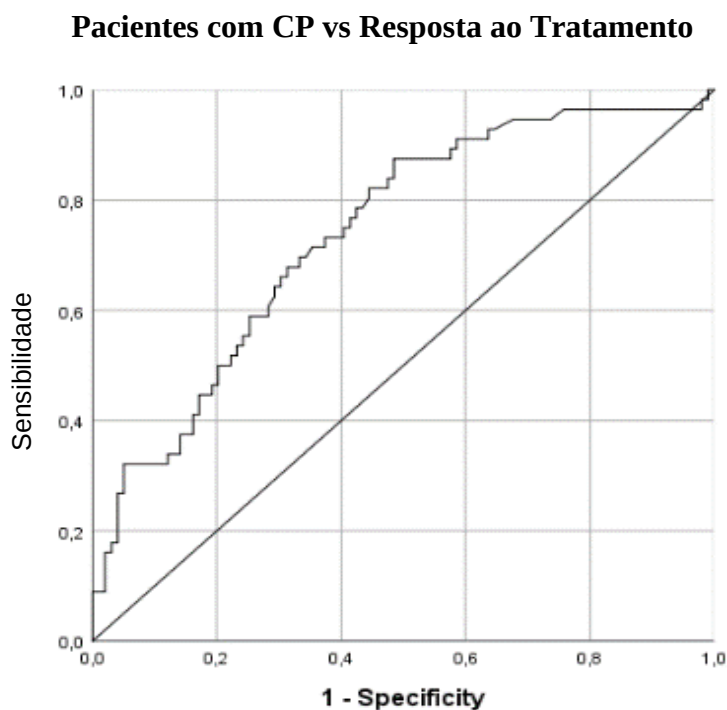


Figura 18 – Relação dos níveis de HA no escarro e pacientes respondedores e não-respondedores ao tratamento

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, após considerarmos as evidências que envolvem o HA como importante componente no desenvolvimento e progressão de algumas neoplasias como o câncer de próstata, bexiga, mama e pulmão, levantamos a hipótese de que esse componente da MEC poderia ter um papel relevante como um biomarcador para as neoplasias pulmonares e na predição de resposta terapêutica. Verificamos a relação entre a concentração do ácido hialurônico presente no escarro de pacientes com câncer de pulmão, DPOC e voluntários saudáveis.

De acordo com os nossos resultados, o escarro de pacientes com câncer de pulmão contém maior concentração de HA, do que o observado em voluntários saudáveis e pacientes com DPOC. Esse fenômeno é de extrema relevância, pois trata-se de uma possível constatação de um potencial biomarcador em câncer de pulmão através de amostras obtidas por técnica não-invasiva. A significância estatística manteve-se elevada mesmo quando as concentrações do HA no escarro foram comparadas entre pacientes com câncer versus voluntários saudáveis e pacientes com câncer versus DPOC. Achados semelhantes demonstraram uma elevação significativa na concentração do HA em tecido e em escarro dos pacientes com CPNPC em relação ao escarro de voluntários saudáveis e DPOC (Rangel 2015). Vislumbra-se que essas oscilações dos níveis de HA podem acontecer em decorrência de surtos de inflamação e reparação a que também são susceptíveis os pacientes portadores de DPOC, levando ao remodelamento da MEC pulmonar (Dentener 2005). Como o HA também se faz presente na superfície das vias aéreas, sendo um componente importante das secreções, ele certamente desempenha um papel central na homeostase do aparelho respiratório, especialmente nas vias aéreas superiores (Wolny 2010). Particularmente, na mucosa nasal, o HA está envolvido principalmente na regulação do tônus vasomotor e da secreção glandular na mucosa, contribuindo significativamente no mecanismo de defesa do hospedeiro, estimulando a liberação de corpos estranhos pela movimentação ciliar, ao mesmo tempo em que retém as enzimas que são importantes para a homeostase na superfície apical.

Considerando os tipos histológicos de câncer de pulmão, constatamos diferenças significativas na produção do HA. Conforme esperado, o escarro de pacientes com carcinoma de células escamosas apresentou valores mais elevados de HA em relação aos outros tipos histológicos, provavelmente, por serem tumores centrais na árvore respiratória. É sabido que a

produção do HA pode ocorrer através de células normais e/ou tumorais, assim sendo, a íntima relação entre o tumor e a árvore respiratória interfere na composição e produção elevada do escarro, possivelmente favorecendo uma maior quantidade do composto nas amostras. Estudos recentes demonstraram que as lesões pré-neoplásicas dos carcinomas de células escamosas: metaplasia escamosa e as displasias do epitélio brônquico já possuem um aumento de expressão de HA e HAase nos tecidos, quando avaliados por imunohistoquímica (de Sá 2015; Wang 2011). Além disso, outros exames realizados no escarro como a citologia, por exemplo, tem mais rentabilidade nos casos de CEC pelo fato da sua localização mais central favorecer o acesso ao tumor, além de influenciar na produção do escarro (Fernandez 2002).

O HA possui um papel importante no desenvolvimento e progressão do câncer de pulmão, uma vez que esse componente da MEC ao interagir com as células tumorais e com as células do estroma pode atuar na adesão, divisão, proliferação e metástases das células neoplásicas. Durante muito tempo acreditou-se que o envolvimento do HA nas neoplasias estivesse atribuído somente à sua capacidade de atrair água facilitando a movimentação das células. Entretanto, atualmente sabe-se que esta molécula tem a capacidade de ativar vias de sinalização intracelulares que estimulam a migração e invasão celular. Essa capacidade do HA de influenciar tantos comportamentos celulares está intimamente relacionada com os seus principais receptores: CD44 e o RHAMM, onde tais interações, conferem a esse componente, capacidade de ativar diversas vias de sinalização intracelulares, diferenciação e proliferação celular (Bourguignon 2006). O CD44 é o mais importante receptor de HA na superfície de células epiteliais e responsável pela interação com os fatores de crescimento celular, como por exemplo: EGF (*Epidermal growth factor*) e TGF β (*Transforming growth factor- β 1*) (Bourguignon 2014). A interação entre o HA e CD44 desencadeia o desenvolvimento tumoral pela via de ativação dos receptores de tirosina quinases, como: HDG (*Hepatocyte growth factor*), PDGF (*Platelet-derived growth factor*) e VEGF (*Vascular endotelial growth fator*) (Orian-Rousseau 2008). Por conta dessa ampla capacidade de interagir com diferentes tipos de receptores celulares, o HA desempenha um papel fundamental no desenvolvimento dos tumores, possibilitando seu crescimento e dispersão em outros tecidos. Esse resultado reforça ainda a necessidade de mais estudos envolvendo essa molécula e o câncer de pulmão, como já demonstrado para outros componentes da MEC, sabidamente envolvidos na carcinogênese de diversos tecidos (Theoharis 2010). Embora a associação entre os níveis de HA e os tecidos tumorais já tenha sido descrita em uma série de tumores (Bernert 2011; Bharadwaj 2007; Kramer 2011; Pelosi 2007), as informações relacionadas sobre a contribuição desse composto na tumorigênese de pulmão são extremamente limitadas. De fato, Pirinen et al. (2001)

demonstraram maior expressão de HA por células tumorais e estromais de CP, evento este associado ao menor grau de diferenciação e a maior taxa de recidiva tumoral. Em outros estudos, Ohashi et al. (2007) e Auvinen et al. (2000) mostraram, *in vitro*, que a adição exógena de HA à linhagens celulares de CP promoveram quimio-resistência e também foram capazes de aumentar a invasibilidade por aumento da produção de metaloproteinases.

Neste estudo, comparamos os níveis de HA no escarro de pacientes com CP no momento do diagnóstico e após avaliação de resposta terapêutica. Nossa coorte nos proporcionou observar uma queda significativa dos níveis de HA dosados após o início da terapia, independentemente do tipo de tratamento, tipo histológico e concentração da solução de NaCl (3% e 7%). Embora não haja nenhum estudo *in vitro* que tenha avaliado o comportamento do HA após o uso de quimioterápicos, esses dados sugerem que o processo de síntese e degradação do HA presente na MEC tumoral é susceptível ao efeito citotóxico dos agentes quimioterápicos.

Após realizarmos uma associação simultânea entre os resultados das amostras coletadas com emprego de duas concentrações de solução salina na indução do escarro (NaCl 3% e 7%) com as variáveis clínicas, foi observado que os pacientes do sexo masculino com mais de 58 anos de idade apresentaram uma concentração de HA (NaCl 7%) significativamente maior na expectoração em comparação ao escarro coletado a 3% de NaCl. O mesmo evento ocorreu em fumantes, tipo histológico CEC e doença progressiva após tratamento sistêmico avaliado por tomografia computadorizada. Em amostras obtidas de tumores carreadores de mutação em KRAS, a diferença da concentração de HA NaCl 7% em relação a NaCl 3% foi marginalmente significativa.

Após a análise das 3 variáveis, as concentrações de HA estabelecidas neste modelo, foram correlacionadas de forma independente com as características clínicas. A concentração de HA no escarro (NaCl 7%) foi maior em fumantes em comparação aos não fumantes, com uma correlação marginalmente significativa com a carga tabágica. Esse dado torna-se relevante, pois os fumantes constituem o principal grupo de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão, e a detecção precoce e tratamento da doença impactam significativamente na diminuição da mortalidade.

O teste univariado de Cox para avaliação do risco relativo de morte sob controle de idade, estágio, tratamento e tipos histológicos, demonstrou que pacientes EC I e II, estadio T1, resposta completa ao tratamento, QT+IM, apresentaram menor risco de morte quando comparados a pacientes com EC IV, T4 e progressão de doença. Em relação ao HA, não houve significância estatística quando esta variável foi avaliada isoladamente.

Adicionalmente, foi construído um modelo matemático de risco de morte para os

pacientes com CPNPC, incluindo o HA como variável codependente das variáveis estadiamento clínico (EC), estadiamento patológico, tipo de resposta do tumor ao tratamento, QT e QT+IM.

O modelo resultante revelou que pacientes com níveis de HA > 29.7 ng/, apresentaram maior risco de morte quando comparados aos pacientes com níveis de HA < 29.7 ng/mg, EC I e II, estágio, resposta completa ao tratamento e que receberam QT+IM. Esses resultados nos proporcionaram determinar a associação entre os níveis abaixo ou acima da mediana de HA (29,7 ng/mg), dosados no momento do diagnóstico, e o tipo de resposta do tumor durante o tratamento, conforme avaliado pela tomografia computadorizada. De acordo com o valor de corte de 29.7 ng/mg de HA, avaliamos os pacientes quanto aos dados de respostas ao tratamento, obtidos por TC e verificamos que os respondedores apresentaram sobrevida mais longa (30 meses) em relação aos pacientes que tiveram progressão da doença (11 meses). Os pacientes com resposta parcial e completa, evidenciaram que as concentrações de HA se mantiveram abaixo do valor de corte estabelecido pelo modelo estatístico, diferentemente dos pacientes com avaliação de doença estável e progressão da doença, onde os resultados de HA mostraram-se acima do valor de corte, sugerindo que a presença de menores concentrações de HA podem estar relacionadas com uma maior eficiência do tratamento. Esses resultados, nos levam a crer que o HA possui algum potencial em prever resposta ao tratamento de maneira precoce e merece ser investigado em uma casuística maior. Alguns estudos mostraram que uma resposta inicial pode ser detectada somente três semanas após o tratamento sistêmico, representando o momento em que uma diminuição no tamanho poderia ser difícil de medir com os critérios RECIST (Zhao 2014; Tacelli 2013; Louise 2016). De acordo com RECIST, a frequência da reavaliação do tumor a cada 6-8 semanas reflete uma periodicidade razoável no acompanhamento da doença. Essa estratégia de avaliação pode ser complementada aliando-se o potencial da tomografia com um marcador biológico avaliado por procedimento não-invasivo, na verificação da resposta ao tratamento em um momento inicial, podendo gerar a possibilidade de identificação precoce de pacientes não respondedores, agregando benefícios terapêuticos e diminuição do custo com tratamentos ineficazes aos pacientes.

Os dados da literatura sobre os efeitos da imunoterapia nos níveis de HA presentes na matriz extracelular ainda são escassos, no entanto, uma recente comunicação de Hickey et al. demonstrou em um estudo em murinos baseado na expansão de células T *ex vivo* em hidrogel à base de ácido hialurônico uma eficaz sinalização celular e rápida e robusta expansão de células T. A transferência adotiva dessas células tumorais suprimiu significativamente o crescimento do tumor e significativa melhora na sobrevivência do animal em comparação com as células T

estimuladas por métodos tradicionais. Sobre o papel dos glicosaminoglicanos na resposta imunoterápica, Wight et al. relatou que o glicosaminoglicano versican interage com células inflamatórias indiretamente via HA ou diretamente através de receptores como CD44, ligante da glicoproteína P-selectina (PSGL-1), e receptores de *toll-like* (TLRs) presentes na superfície de células imunes e não imunes. Segundo os autores, essas interações ativam vias de sinalização que promovem a síntese e a secreção de citocinas inflamatórias, como TNF α , IL-6. (Gomez-Casal 2013). Enquanto o versican produzido por células estromais tende a ser pró-inflamatório, o versican expresso por células mielóides pode criar microambientes anti-inflamatórios e imunossupressores. A inflamação no microambiente tumoral frequentemente contém níveis elevados de versican e a alteração desses níveis nos tumores podem inibir a inflamação e a progressão tumoral em alguns tipos de câncer.

O emprego das diferentes concentrações de NaCl (3% e 7%) na obtenção das amostras de escarro nas diferentes instituições evidenciaram a importância de realizar uma padronização adequada da concentração de cloreto de sódio para obtenção de amostras de escarro que sejam representativas. Como vimos, as amostras coletadas com NaCl a 3%, repercutiram na diminuição dos níveis de HA dos pacientes do Hospital de Amor de Barretos em relação às amostras obtidas com solução salina a 7% no AC Camargo Cancer Center. A técnica de indução de escarro e processamento é um método não-invasivo reconhecido, permitindo a coleta e a análise das células das vias aéreas, o que é interessante em várias doenças respiratórias como a asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), tosse crônica ou fibrose pulmonar idiopática e câncer. (Gibson 1992, Djukanovic 2002). (Scheicher 2003). Análises adicionais podem ser efetuadas no sobrenadante e as células presentes no escarro, que podem permitir a investigação sobre processos inflamatórios e mecanismos imunes através de citometria de fluxo, proteômica e biologia molecular. Assim, por todas essas razões, não devemos nos surpreender ao saber que a avaliação do HA no escarro pode fornecer informações importantes sobre a neoplasia pulmonar.

Nossos resultados sugerem que o nível de HA no escarro, usado como uma variável contínua, pode fornecer informações prognósticas juntamente com o estadiamento clínico ou patológico de rotina. Embora não tenhamos sido capazes de identificar um ponto de corte binário no nível de HA no escarro, um ponto de divisão natural baseado na mediana de 29.7 ng/mg nos forneceu um parâmetro para realizarmos a separação de dois grupos: pacientes com uma curta sobrevida esperada versus pacientes com uma longa sobrevida esperada.

Tais relações, possivelmente, se devem ao fato de que o HA, assim como outros glicosaminoglicanos, são componentes responsáveis pelo enriquecimento das matrizes

provisórias que se formam durante os primeiros estágios do desenvolvimento da doença. Esses componentes interagem para criar revestimentos pericelulares e abertura de espaços que facilitam a proliferação, migração e sobrevivência das células neoplásicas (Wight 2016). A ocorrência de perturbações no equilíbrio desses componentes recriam uma nova arquitetura do tecido afetado e geram impacto nas funções teciduais. Na verdade, esses distúrbios da MEC podem determinar ou ditar o curso da patogênese da doença, e por conta dessa importância, os componentes da MEC tumoral estão se tornando alvo de diversas estratégias terapêuticas (Järveläinen 2006; Merrilees 2012; Venning 2015).

Em última análise, aventamos a possibilidade do HA em distinguir pacientes respondedores e não respondedores à terapia empregada, através da curva ROC como instrumento de avaliação. Assumimos o valor de 77.3 ng/mg de HA como melhor ponto de corte na detecção dos indivíduos que obtiveram ou não benefício do tratamento clínico. Verificamos a sensibilidade de 100% e especificidade de 86% na dicotomia dos grupos, e evidenciamos que os respondedores ao tratamento apresentaram níveis de HA nas amostras de escarro igual ou menor que 77.3 ng/mg. Esses resultados levantam indícios da viabilidade da introdução da análise dos níveis do HA como indicador de boa ou má resposta ao tratamento.

Nossos achados demonstraram que as alterações malignas podem ser identificadas através de fluidos presentes em seu meio e podem nos ajudar a identificar fatores relacionados ao comportamento da neoplasia, usando um procedimento não-invasivo como a expectoração e um experimento consagrado como ELISA. Nossos resultados trouxeram à tona, a importância do papel do HA no câncer de pulmão, como um potencial biomarcador para detecção de CP e preditor de resposta terapêutica. Para validar nossos resultados, a continuação desse estudo prospectivo deverá ser realizado em grande escala, preferencialmente, acompanhando os pacientes de risco até o desenvolvimento da neoplasia.

O desenvolvimento de estratégias de detecção tumoral e a avaliação precoce de resposta ao tratamento em pacientes com câncer de pulmão por procedimentos não-invasivos é crucial para as chances de sobrevivência.

7 CONCLUSÃO

Níveis decrescentes de HA foram detectados no escarro de pacientes com câncer de pulmão, pacientes com DPOC e voluntários saudáveis. Os valores quantificados foram independentes da idade, sexo, carga tabágica, e foram mais proeminentes no escarro de pacientes com carcinoma de células escamosas em relação aos outros tipos histológicos. A dosagem do HA no escarro desponta com perfil promissor no rastreamento de indivíduos com risco para câncer de pulmão. Os resultados das avaliações pré e pós-terapia, mostraram-se relevantes, uma vez que observamos uma queda significativa dos níveis de HA nos pacientes tratados em relação aos tratados. Alterações mais significativas nos níveis de HA foram identificadas nas amostras de escarro coletadas com solução salina de 7%, demonstrando que a metodologia para obtenção das amostras possui grande relevância no resultado final das análises.

Os níveis de HA foram significativamente maiores em pacientes com CPNPC em relação aos controles e pacientes com DPOC, despontando como um potencial rastreador de neoplasia pulmonar.

Os níveis de HA diminuíram significativamente após a terapia, independentemente do tipo de tratamento.

As concentrações significativas avaliadas, foram independentes da idade, sexo, carga tabágica, e foram mais proeminentes no escarro de pacientes com carcinoma de células escamosas em relação aos outros tipos histológicos.

O ponto de corte de 77.3 ng/mg para HA em amostras virgens de tratamento, pode diferenciar pacientes respondedores dos não respondedores com 100% de sensibilidade e 86% de especificidade, conferindo ao HA um potencial em predizer resposta ao tratamento.

8 REFERÊNCIAS

American Cancer Society: Cancer Facts and Figures. American Cancer Society. 2010 Atlanta.

Auvinen P, Tammi R, Parkkinen J, Tammi M, Agren U, Johansson R et al. Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *Am J Pathol*. 2000 Feb;156(2):529-36.

Bai KJ, Spicer AP, Mascarenhas MM, Yu L, Ochoa CD, Garg HG, et al. The role of hyaluronan synthase 3 in ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jul 1;172(1):92-8. doi: 10.1164/rccm.200405-652OC.

Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003 Oct;22(4):672-88.

Bernert B, Porsch H, Heldin P. Hyaluronan synthase 2 (HAS2) promotes breast cancer cell invasion by suppression of tissue metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP-1). *J Biol Chem*. 2011 Dec 9;286(49):42349-59.

Bharadwaj AG, Rector K, Simpson MA. Inducible hyaluronan production reveals differential effects on prostate tumor cell growth and tumor angiogenesis. *J Biol Chem*. 2007 Jul 13;282(28):20561-72.

Bourguignon LY, Gilad E, Brightman A, Diedrich F, Singleton P. Hyaluronan-CD44 interaction with leukemia-associated RhoGEF and epidermal growth factor receptor promotes Rho/Ras co-activation, phospholipase C epsilon-Ca²⁺ signaling, and cytoskeleton modification in head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2006 May 19;281(20):14026-40.

Bourguignon LY, Shiina M, Li JJ. Hyaluronan-CD44 interaction promotes oncogenic signaling, microRNA functions, chemoresistance, and radiation resistance in cancer stem cells leading to tumor progression. *Adv Cancer Res*. Sep 2014; 123:255-75.

Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. 1994 Nov 10;331(19):1286-92.

Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest*. 2002 Sep;122(3):1037-57.

Buist AS, Vollmer WM, McBurnie MA. Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part I. The burden of obstructive lung disease (BOLD) initiative. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008 Jul;12(7):703-8.

Casale M, Moffa A, Sabatino L, Pace A, Oliveto G, Vitali M et al. Hyaluronic acid: perspectives in upper aero-digestive tract. a systematic review. *PLoS One*. 2015 Jun 29;10(6): e0130637.

Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2006 Sep 1;66(17):8319-26.

Conde MB, Soares SL, Mello FC, Rezende VM, Almeida LL, Reingold AL, et al. Comparison of sputum induction with fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis: experience at an acquired immune deficiency syndrome reference center in Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Dec;162(6):2238-40.

de Sá VK, Carvalho L, Gomes A, Alarcão A, Silva MR, Couceiro P, Sousa V et al. Role of the extracellular matrix in variations of invasive pathways in lung cancers. *Braz J Med Biol Res*. 2013 Jan;46(1):21-31.

de Sá VK, Olivieri E, Parra ER, Ab'Saber AM, Takagaki T, Soares FA, et al. Hyaluronidase splice variants are associated with histology and outcome in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol*. 2012 May;43(5):675-83.

de Sá VK, Rocha TP, Moreira A, Soares FA, Takagaki T, Carvalho L, et al. Hyaluronidases and hyaluronan synthases expression is inversely correlated with malignancy in lung/bronchial pre-neoplastic and neoplastic lesions, affecting prognosis. *Braz J Med Biol Res*. 2015 Nov;48(11):1039-47.

Deeb G, Wang J, Ramnath N, Slocum HK, Wiseman S, Beck A, et al. Altered E-cadherin and epidermal growth factor receptor expressions are associated with patient survival in lung cancer: a study utilizing high-density tissue microarray and immunohistochemistry. *Mod Pathol*. 2004 Apr;17(4):430-9.

Delpech B, Girard N, Bertrand P, Courel MN, Chauzy C, Delpech A. Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. *J Intern Med*. 1997 Jul;242(1):41-8.

Delpech B, Bertrand P, Maingonnat C. Immunoenzymoassay of the hyaluronic acid-hyaluronectin interaction: application to the detection of hyaluronic acid in serum of normal subjects and cancer patients. *Anal Biochem*. 1985 Sep;149(2):555-65.

Dentener MA, Vernooij JH, Hendriks S, Wouters EF. Enhanced levels of hyaluronan in lungs of patients with COPD: relationship with lung function and local inflammation. *Thorax*. 2005 Feb;60(2):114-9.

Djukanović R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep; 37:1s-2s.

Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2019 Aug;94(8):1623-40.

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009 Jan;45(2):228-47.

Ettinger DS, Akerley W, Borghaei H, Chang AC, Cheney RT, Chirieac LR, et al. NCCN (National Comprehensive Cancer Network). Non-small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012 Oct 1;10(10):1236-71.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917.

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

Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J.* 1977 Jun 25;1(6077):1645-8.

Fontanini G, Bigini D, Vignati S, Basolo F, Mussi A, Lucchi M, et al. Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J Pathol.* 1995 Sep;177(1):57-63.

Franzmann EJ, Reategui EP, Pereira LH, Pedroso F, Joseph D, Allen GO, et al. Salivary protein and solCD44 levels as a potential screening tool for early detection of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2012 May;34(5):687-95.

Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* 1997 Jul;242(1):27-33.

Garantziotis S, Li Z, Potts EN, Kimata K, Zhuo L, Morgan DL, et al. Hyaluronan mediates ozone-induced airway hyperresponsiveness in mice. *J Biol Chem.* 2009 Apr 24;284(17):11309-17.

Gibson PG, Pin I, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax.* 1992 Jan;47(1):25-9.

Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, et al. International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, Advisory Boards, and Participating Institutions; International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee Advisory Boards and Participating Institutions. 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 Jan;11(1):39-51.

Golshani R, Lopez L, Estrella V, Kramer M, Iida N, Lokeshwar VB. Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44. *Cancer Res.* 2008 Jan 15;68(2):483-91.

Gomez-Casal R, Bhattacharya C, Ganesh N, Bailey L, Basse P, Gibson M, et al. Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes. *Mol Cancer.* 2013 Aug 16;12(1):94.

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

Harpole DH, Herndon JE, Wolfe WG, Iglehart JD, Marks JR. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. *Cancer Res.* 1995 Jan 1;55(1):51-6.

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

Hickey JW, Dong Y, Chung JW, Salathe SF, Pruitt HC, Li X, Chang C, et al. Engineering an Artificial T-Cell Stimulating Matrix for Immunotherapy. *Adv Mater.* 2019 Jun;31(23):e1807359.

Höbarth K, Maier U, Marberger M. Topical chemoprophylaxis of superficial bladder cancer with mitomycin C and adjuvant hyaluronidase. *Eur Urol.* 1992 Sep;21(3):206-10.

Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004 Jun 24;350(26):2645-53.

Hollingsworth JW, Chen BJ, Brass DM, Berman K, Gunn MD, Cook DN, et al. The critical role of hematopoietic cells in lipopolysaccharide-induced airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Apr 15;171(8):806-13.

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

Ichinose Y, Yano T, Asoh H, Yokoyama H, Yoshino I, Katsuda Y. Prognostic factors obtained by a pathologic examination in completely resected non-small-cell lung cancer. An analysis in each pathologic stage. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 Sep;110(3):601-5.

Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol.* 2017 Aug 28; 7:193.

Jacobson A, Rahmanian M, Rubin K, Heldin P. Expression of hyaluronan synthase 2 or hyaluronidase 1 differentially affect the growth rate of transplantable colon carcinoma cell tumors. *Int J Cancer.* 2002 Nov 20;102(3):212-9.

Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 2009; 61:198–223.

Kasahara Y, Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest.* 2000 Dec;106(11):1311-9.

Karbownik M. Hyaluronan: towards novel anti-cancer therapeutics, *Pharmacol Rep.* 2013;65:1056-74.

Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG, Yatabe Y, Wistuba II, Hirsch FR. IASLC Pathology Committee. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? *J Thorac Oncol.* 2015 Jul;10(7):985-9.

Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism. *Clin Orthop Relat Res.* 2004 Oct;(427 Suppl): S152-62.

Knudson W, Chow G, Knudson CB. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biol.* 2002 Jan;21(1):15-23.

Kramer MW, Escudero DO, Lokeshwar SD, Golshani R, Ekwenna OO, Acosta K, et al. Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis. *Cancer*. 2011 Mar 15;117(6):1197-209.

Lapperre TS, Postma DS, Gosman MM, Snoeck-Stroband JB, ten Hacken NH, Hiemstra PS, et al. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. *Thorax*. 2006 Feb;61(2):115-21.

Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 Oct;12(5):581-6.

Li Y, Rahmanian M, Widström C, Lepperdinger G, Frost GI, Heldin P. Irradiation-induced expression of hyaluronan (HA) synthase 2 and hyaluronidase 2 genes in rat lung tissue accompanies active turnover of HA and induction of types I and III collagen gene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Sep;23(3):411-8.

Løkke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax*. 2006 Nov;61(11):935-9.

Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J*. 2006 Feb;27(2):397-412.

Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Chuanchieh H, Bigini D, Vignati S, et al. Blood vessel invasion by tumor cells predicts recurrence in completely resected T1 N0 M0 non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1993 Jul;106(1):80-9.

Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J*. 2001 May;17(5):946-53.

Manzanares D, Monzon ME, Savani RC, Salathe M. Apical oxidative hyaluronan degradation stimulates airway ciliary beating via RHAMM and RON. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Aug;37(2):160-8.

Marković-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Müller U, Schirmer T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure*. 2000 Oct 15;8(10):1025-35.

Martins, J. R., Passerotti, C. C., Maciel, R. M., Sampaio, L. O., Dietrich, C. P., & Nader, H. B. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Analytical biochemistry*, 2003;319(1),65–72.

McErlean A, Ginsberg MS. Epidemiology of lung cancer. *Semin Roentgenol*. 2011 Jul;46(3):173-7.

Menezes AM, Perez-Padilla R, Hallal PC, Jardim JR, Muiño A, Lopez MV, et al. Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part II. Burden of chronic obstructive lung disease in Latin America: the PLATINO study. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008 Jul;12(7):709-12.

Menezes AM, Perez-Padilla R, Jardim JR, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*. 2005 Nov 26;366(9500):1875-81.

Merrilees, MJ., Wight, TN. Targeting the matrix: potential benefits for versican therapeutics. 2012. Disponível em: www.elsevierblogs.com/currentcomments/?p=519. [2020 dez 12].

Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010 Jun;15(2):117-34.

Miles KA, Griffiths MR, Keith CJ. Blood flow-metabolic relationships are dependent on tumour size in non-small cell lung cancer: a study using quantitative contrast-enhanced computer tomography and positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006 Jan;33(1):22-8.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa/2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA 2020.

Molfino NA, Jeffery PK. Chronic obstructive pulmonary disease: histopathology, inflammation and potential therapies. *Pulm Pharmacol Ther.* 2007;20(5):462-72.

Moyer VA; U.S. Preventive Services Task Force. Screening for lung cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2014 Mar 4;160(5):330-8.

National Cancer Institute (NCI). Non-small cell lung cancer treatment (Physician Data Query). 2015. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lunghealthprofessional/page1>. [2020 dez 12]

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

Nawrocki-Raby B, Gilles C, Polette M, Bruyneel E, Laronze JY, Bonnet N, et al. Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. *Int J Cancer.* 2003 Jul 20;105(6):790-5.

Nedvetzki S, Gonen E, Assayag N, Reich R, Williams RO, Thurmond RL, et al. RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: a different interpretation of redundancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec 28;101(52):18081-6.

Nelson, DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica de Lehninger [recurso eletrônico- tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga et al.; revisão técnica: Carlos Termignoni et al. Dados eletrônicos. 6ª Edição. Porto Alegre, Artmed 2014. 260-3.

Ohashi R, Takahashi F, Cui R, Yoshioka M, Gu T, Sasaki S, et al. Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell. *Cancer Lett.* 2007 Jul 18;252(2):225-34.

Orian-Rousseau V, Ponta H. Adhesion proteins meet receptors: a common theme? *Adv Cancer Res.* 2008 Oct; 101:63-92.

Passerotti CC, Bonfim A, Martins JR, Dall'Oglio MF, Sampaio LO, Mendes A, et al. Urinary hyaluronan as a marker for the presence of residual transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol*. 2006 Jan;49(1):71-5.

Pelosi P, Severgnini P, Rocco PR. The Extracellular Matrix of the Lung: The Forgotten Friend! In: Vincent JL. *Intensive Care Medicine*. Springer, Ed. Springer, New York 2007,320-34.

Pirinen R, Tammi R, Tammi M, Hirvikoski P, Parkkinen JJ, Johansson R ,et al. Prognostic value of hyaluronan expression in non-small-cell lung cancer: Increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2001 Jan 20;95(1):12-7.

Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet*. 2009 May 2;373(9674):1525-31.

Pitchenik AE, Ganjei P, Torres A, Evans DA, Rubin E, Baier H. Sputum examination for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1986 Feb;133(2):226-9.

Pujol JL, Molinier O, Ebert W, Daurès JP, Barlesi F, Buccheri G, et al. CYFRA 21-1 is a prognostic determinant in non-small-cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients. *Br J Cancer*. 2004 Jun 1;90(11):2097-105.

Quan YH, Lim JY, Choi BH, Choi Y, Choi YH, Park JH, et al. Self-targeted knockdown of CD44 improves cisplatin sensitivity of chemoresistant non-small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019 Mar;83(3):399-410.

Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Sep 15;176(6):532-55.

Rangel MP, de Sá VK, Martins V, Martins JR, Parra ER, Mendes A, et al. Tissue hyaluronan expression, as reflected in the sputum of lung cancer patients, is an indicator of malignancy. *Braz J Med Biol Res.* 2015 Jun;48(6):557-67.

Rankina KS, Frankel D. Hyaluronan in cancer –from de naked mole rat to nanoparticle therapy. *J Soft Matter.* 2016; May 7;12(17):3841-8.

Reich JM. A critical appraisal of overdiagnosis: estimates of its magnitude and implications for lung cancer screening. *Thorax.* 2008 Apr;63(4):377-83.

Rein DT, Roehrig K, Schöndorf T, Lazar A, Fleisch M, Niederacher D, et al. Expression of the hyaluronan receptor RHAMM in endometrial carcinomas suggests a role in tumour progression and metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003 Mar;129(3):161-4.

Rekhtman N. Neuroendocrine tumors of the lung: an update. *Arch Pathol Lab Med.* 2010 Nov;134(11):1628-38.

Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM. Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2013 May;143(5 Suppl):e142S-e165S.

Ropponen K, Tammi M, Parkkinen J, Eskelinen M, Tammi R, Lipponen P, et al. Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 Jan 15;58(2):342-7.

Shapiro SD. COPD unwound. *N Engl J Med.* 2005 May 12;352(19):2016-9.

Sawabata N, Maeda H, Yokota S, Takeda S, Koma M, Tokunaga T, et al. Postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with pathologic stage IA nonsmall cell lung carcinoma: subnormal levels as an indicator of favorable prognosis. *Cancer.* 2004 Aug 15;101(4):803-9.

Scheicher ME, Terra Filho J, Vianna EO. Sputum induction: review of literature and proposal for a protocol. *Sao Paulo Med J.* 2003 Sep 1;121(5):213-9.

Schmut O, Ansari AN, Faulborn J. Degradation of hyaluronate by the concerted action of ozone and sunlight. *Ophthalmic Res.* 1994 Nov;26(6):340-3.

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

Skerrett SJ, Liggitt HD, Hajjar AM, Ernst RK, Miller SI, Wilson CB. Respiratory epithelial cells regulate lung inflammation in response to inhaled endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 Jul;287(1): L143-52.

Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med.* 1990 Aug 30;323(9):561-5.

Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology.* 2003 Dec;13(12):105R-115.

Strauch LS, Eriksen RØ, Sandgaard M, Kristensen TS, Nielsen MB, Lauridsen CA. Assessing Tumor Response to Treatment in Patients with Lung Cancer Using Dynamic Contrast-Enhanced CT. *Diagnostics (Basel).* 2016 Jul 21;6(3):28.

Strauss GM, Kwiatkowski DJ, Harpole DH, Lynch TJ, Skarin AT, Sugarbaker DJ. Molecular and pathologic markers in stage I non-small-cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol.* 1995 May;13(5):1265-79.

Tacelli N, Santangelo T, Scherpereel A, Duhamel A, Deken V, Klotz E, et al. Perfusion CT allows prediction of therapy response in non-small cell lung cancer treated with conventional and anti-angiogenic chemotherapy. *Eur Radiol.* 2013 Aug;23(8):2127-36.

Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem.* 2002 Feb 15;277(7):4581-4.

Takamochi K, Ohmiya H, Itoh M, et al. Novel biomarkers that assist in accurate discrimination of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung. *BMC Cancer*. 2016 Sep;16(1):760

Teder P, Vandivier RW, Jiang D, Liang J, Cohn L, Puré E, et al. Resolution of lung inflammation by CD44. *Science*. 2002 Apr 5;296(5565):155-8.

Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J*. 2010 Oct;277(19):3904-23.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun;2(6):442-54.

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

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011 Feb;6(2):244-85.

Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, 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 Sep;10(9):1243-1260 (a).

Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. *J Thorac Oncol*. 2015 Sep;10(9):1240-1242 (b).

Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem*. 2002 Feb 15;277(7):4589-92.

van Elmpt W, Zegers CML, Reymen B, Even AJG, Dingemans AC, Oellers M, et al. Multiparametric imaging of patient and tumour heterogeneity in non-small-cell lung cancer: quantification of tumour hypoxia, metabolism and perfusion. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2016 Feb;43(2):240-248.

van Rensburg A, Neethling GS, Schubert PT, Koegelenberg CF, Wright CA, Bolliger CT, et al. Impact of routine sputum cytology in a population at high risk for bronchial carcinoma. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014 May;18(5):607-12.

Venning FA, Wullkopf L, Erler JT. Targeting ECM disrupts cancer progression. *Front Oncol*. 2015; 5:224.

Walter JE, Heuvelmans MA, de Jong PA, Vliegenthart R, van Ooijen PMA, Peters RB, et al. Occurrence and lung cancer probability of new solid nodules at incidence screening with low-dose CT: analysis of data from the randomised, controlled NELSON trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jul;17(7):907-916.

Walter JE, Heuvelmans MA, Yousaf-Khan U, Dorrius MD, Thunnissen E, Schermann A, et al. New Subsolid Pulmonary Nodules in Lung Cancer Screening: The NELSON Trial. *J Thorac Oncol*. 2018 Sep;13(9):1410-4.

Wang SJ, Bourguignon LY. Role of hyaluronan-mediated CD44 signaling in head and neck squamous cell carcinoma progression and chemoresistance. *Am J Pathol*. 2011 Mar;178(3):956-63.

Weng CC, Hsieh MJ, Wu CC, Lin YC, Shan YS, Hung WC, et al. Loss of the transcriptional repressor TGIF1 results in enhanced Kras-driven development of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2019 May 2018(1):96.

Wight TN, Kang I, Evanko SP, Harten IA, Chang MY, Pearce OMT, et al. Versican-A Critical Extracellular Matrix Regulator of Immunity and Inflammation. *Front Immunol*. 2020 Mar 24;11: 512.

Wight TN. Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan. *Matrix Biol.* 2017 Jul;60-61:38-56.

Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Postma DS, Timens W. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J.* 2005 Nov;26(5):835-45.

Wolny PM, Banerji S, Gounou C, Brisson AR, Day AJ, Jackson DG, et al. Analysis of CD44-hyaluronan interactions in an artificial membrane system: insights into the distinct binding properties of high and low molecular weight hyaluronan. *J Biol Chem.* 2010 Sep 24;285(39):30170-80.

Yoshida T, Tudor RM. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol Rev.* 2007 Jul;87(3):1047-82.

Yousaf-Khan U, van der Aalst C, de Jong PA, Heuvelmans M, Scholten E, Lammers JW, et al. Final screening round of the NELSON lung cancer screening trial: the effect of a 2.5-year screening interval. *Thorax.* 2017 Jan;72(1):48-56.

Zhao L, Guan W, Han Y, Zhao Y. Comparative study on CT perfusion parameters of different types of lung cancer before and after chemoradiotherapy. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2014 Oct-Dec;28(4):675-81.

Zhao P, Damerow MS, Stern P, Liu AH, Sweet-Cordero A, Siziopikou K, et al. CD44 promotes Kras-dependent lung adenocarcinoma. *Oncogene.* 2013 October; 32(43): 5186–5190.

Zhuo L, Kanamori A, Kannagi R, Itano N, Wu J, Hamaguchi M, et al. SHAP potentiates the CD44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum. *J Biol Chem.* 2006 Jul 21;281(29):20303-14.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **06/09/2016**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 23/08/2016, aprovaram a realização do projeto nº 2237/16 intitulado: **“Detecção de ácido hialurônico, cofilina-1 e mutações em biópsia líquida de escarro como rastreamento de pacientes com câncer de pulmão”**.

Pesquisador responsável: Pesquisador responsável: Dirce Maria Carraro.
Co-pesquisador: Vanessa Karen de Sá.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 26 de setembro de 2016.

Atenciosamente,

Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1



CERTIFICADO

Certificamos que **JULIANO PRUDÊNCIO CHINOCA**, CPF N° 181.665.998-30 realizou visita observacional no departamento de **BIOLOGIA** desta instituição, hospital de câncer de Barretos – Fundação Pio XII, na data de 18 a 29 de março de 2019, com carga horária de 80 horas.

Barretos, 19 de março de 2019.

Dr. Mario José Aguiar de Paula
Coordenador do Departamento de Ensino
Fundação Pio XII – Hospital de Amor de Barretos

Hyaluronic Level in Sputum is Associated with the Chemotherapy Response to Systemic Treatment of Patients with Lung Cancer and has an Impact on the Outcome

Juliano Chinoca¹, Débora Andrade¹, Aline Mendes⁵, Helano C. Freitas², Pedro de Marchi³, Vladimir Cordeiro de Lima², Tabatha Gutierrez Prieto³, Camila Machado Baldavira³, Cecília Farhat³, Helena Nader⁵, Dirce Maria Carraro¹, João Roberto Martins⁵, Vera Luiza Capelozzi³, Vanessa Karen de Sá¹.

¹Genomic and Molecular Biology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil. ²Department of Medical Oncology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil. ³Department of Pathology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. ⁴Department of Medical Oncology, Hospital de Amor de Barretos, São Paulo, SP, Brazil. ⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

The data supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request due to ethical restrictions from local legislation.

Correspondence to: vanessa.karen@accamargo.org.br

Running title: Lung cancer, sputum, hyaluronan, CT scan, survival.

Conflicts of Interest: The authors have disclosed that they have no significant relationships with, or financial interest in, any commercial companies pertaining to this article.

Word count: 7543

Acknowledgments: We thank the team of the Biobank (Eloisa Olivieri and Ana Paula Suenaga), Anatomic Pathology Department, A.C.Camargo Cancer Center.

Funding sources: The research reported in this publication was supported in part by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (2015/26642-4).

Contributions of all authors:

J. C.: data collection, data analysis, data interpretation, and manuscript draft

D. A.: data collection and manuscript review

V. C. L.: data interpretation and manuscript review

H. C. F.: data collection, data interpretation, and manuscript review

P. M.: data collection

J. R. M.: experimental support for ELISA

A. M.: experimental support for ELISA

T. G. P.: data analysis, design of tables and graphics, and manuscript review

C. M. B.: data analysis, design of tables and graphics, and manuscript review

H. N.: experimental support and ELISA reagent donation

D. M. C.: manuscript review

V. L. C.: data analysis, data interpretation supervision, and manuscript draft

V. K. S.: study design, statistical analysis, data analysis, data interpretation, manuscript draft, and case review

Abstract

Background. Chemotherapy (CT) and radiotherapy combined with immunotherapy (IO) have shown great potential for treating patients with lung cancer. Computerized tomography (CT-scan) is the standard technique used to evaluate the treatment response in lung cancer. However, the early detection and early assessment of the treatment response, preferably by noninvasive techniques in patients, is crucial to better guide treatment and improve patient survival. In this context, hyaluronan (HA) has emerged as an attractive biomarker for lung cancer due to its non-invasive character in obtaining sputum samples is synthesized by the respiratory epithelium and alveolar parenchyma, activates immune cells, and is potentially targetable. The aim of this study was to explore the relationship between the sputum HA concentration and the imaging-based tumor treatment response evaluation by CT-scan as well as its association with clinicopathological characteristics, treatment combinations, and patient outcomes.

Methods. The study cohort included 84 patients with lung cancer (57 with adenocarcinoma and 27 with squamous cell carcinoma). The case series had a clinical stage ranging between T1 and 4N0M0, including 6 patients at stage I (7.1%), 5 at stage II (6%) 22 at stage IIIA (26.2%), and 51 at stage IV (60.7%) and presenting with metastatic disease. Of the 84 patients 12 (10.08%) underwent surgery for initial disease followed by adjuvant CT, 40 (33.6 %) received CT, and 11 (9.24%) received CT+IO for metastatic disease. Tumor evaluation was performed with CT-scans, and the first response post-treatment was classified as partial response, complete response, stable disease, or progressive disease, according to the RECIST criteria. Before treatment, sputum was collected following inhalation of aerosolized saline at 7% and 3%, and the HA concentration was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results. General linear model analysis revealed that HA level in sputum collected with 7% NaCl was significantly associated with a patient age >58 years old ($P < 0.01$), the male sex ($P < 0.01$), smoking history ($P < 0.01$), squamous cell carcinoma histology ($P = 0.03$), initial clinical stage ($P = 0.05$), *KRAS* mutation ($P = 0.05$), systemic therapy ($P = 0.02$), and the tumor response as evaluated by CT-scan ($P = 0.01$). The median HA concentration in the sputum (30.70 $\mu\text{g}/\text{mg}$) was used to the patients into two groups, which had distinctive survival times after systemic treatment and tumor response evaluation. The groups with a complete response and stable disease had an HA concentration <30.70 ng/mg, and their median survival time was not reached during follow-up. Their mean survival time, however, was quite long (30 months) after systemic treatment. In contrast, those with progressive disease had an HA concentration >30.70 ng/mg, with a median survival time of only 11 months after systemic treatment ($P = 0.0001$) by the log-rank test. Finally, we examined the behavior of the sputum HA concentration on the CT-scan tumor response and its impact on the survival of the 51 patients with metastatic disease who received CT alone or CT+IO. Once again, the sputum HA level, CT-scan tumor response, and CT+IO treatment were significantly related to the survival time by the Cox model ($P = 0.01$).

Conclusion. The sputum HA concentration in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients may be a promising biomarker for the early assessment of tumor response to systemic therapy and patient outcome, helping to guide treatment. To confirm these results, a prospective randomized trial is needed. We believe that it is important to validate our quantitative assessment of HA in additional patients.

Introduction

Lung cancer belongs to the group of diseases that cause the most deaths among men and the second main among women, behind only breast cancer [1-2]. In congruence with most countries, lung cancer is one of the main causes of mortality in Brazil, with an 18% survival rate in the 5-year period, also in congruence with other countries [3]. Non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC) represent the major histologic types of lung cancer. The prognosis of patients diagnosed with lung cancer is highly dependent on the tumor, node, metastasis stage, and as the level of disease increases, survival is reduced dramatically [4]. Stage I and II can be treated with a surgical procedure, as well as some cases of the disease in stage IIIA with the chance of complete resection of the tumor, even with the performance of the surgical procedure, the overall survival in the period of 5 years remains close to 50 %. The

adjuvant chemotherapy approach using cisplatin before the surgical procedure brought a 5-10% increase in survival rates, but significant therapeutic innovation has been established with the ADAURA trial for patients with the *EGFR* mutation. Over the past few years, targeted therapies with immune checkpoint inhibitors (ICIs), combined or not with chemotherapy, have greatly improved the survival of patients with advanced lung cancer [5]. According to the ICIs, the Solid Tumor Response Assessment Criteria (RECIST) may be inadequate to assess response to treatment. Patients are classified by RECIST as non-responders or responders, based on tumor morphological changes [6]. However, some patients treated with ICIs have durable disease control, regardless of attain an objective response. Therefore, techniques that are able to better predict response and the probability of disease progression are required. Computed tomography (CT), magnetic resonance and ultrasound are non-invasive tools applied in the detection of tumor alterations [7]. In particular, CT-scan is able to assess temporal changes in blood vessel density and permeability by the attenuation coefficient of tissues [8]. Furthermore, computed tomography has benefits such as accessibility, low cost and, high capacity for spatial resolution. Hyaluronic acid (HA) or hyaluronan, is distributed in connective, epithelial, and neural tissues. Unlike other glycosaminoglycans, it is nonsulfated and has a high molecular weight and its production occurs in the Golgi apparatus [9]. HA is involved in the processes of proliferation, cell migration and in many cases acts in the progression of malignant tumors [10]. HA is detected in the airways (bronchoalveolar lavage fluid and sputum) [11-12] and mainly in the perivascular space of the parenchyma [13]. It is also abundant in the subepithelial layer of the airways, acting on the development of airway hyper-reactivity, inflammation, remodeling, and malignant transformation [14]. Short fragments of HA have been found in experimental models with mice with chronic and acute pulmonary inflammation and it was found that during the inflammatory process these fragments are located in the alveolar walls and around the airway smooth muscle cells and alveolar macrophages [15]. The short fragments of HA interact in the signaling of the CD44 receptor, acting in the recruitment of immune cells in the inflammatory sites [16]. Furthermore, the short HA fragment triggers the release of pro-inflammatory cytokines and metalloelastases in the immune cells, as well as inhibition of plasminogen activation [17]. The relationship between HA and CD44 overexpression in solid tumors results in the formation of a mesh of these compounds that are potentially targeted by hyaluronidase, which is an enzyme widely abundant in tumor regions that is responsible for the degradation of HA and is involved in drug release responsive to the tumor [18].

However, based on the data obtained, we hypothesized that early detection and early assessment of the treatment response in patients with lung cancer are crucial for improving patient survival.

In this context, sputum is an attractive potential source of biomarkers for lung cancer because it can be obtained noninvasively and may represent the tumor microenvironment. The aim of this work was to evaluate the tumor response to treatment in patients with lung cancer as assessed by CT-scan and to correlate it with the HA concentration in the sputum. We first evaluated the HA concentration by collecting sputum with different saline concentrations (3% and 7% NaCl) and explored the quantitative relationship between the HA concentration and the clinicopathological characteristics of the patients. Secondly, we explored the relationship between the sputum HA concentration and the tumor response, as evaluated by CT-scan, as well as its association with the type of treatment and with patient outcomes. We also assessed the potential of the HA concentration to be used to differentiate lung cancer patients from healthy individuals (controls) and cancer-free patients.

Study Population and Methods

Cancer Cohort

The sputum samples were collected from a cohort of 84 patients with suspected lung cancer according to the CT-scan prior to diagnostic confirmation by histology and immunohistochemistry evaluation in surgically resected specimens (N = 12) and transbronchial or core biopsies from 55 patients from the A. C. Camargo Cancer Center and 29 patients from Hospital de Amor. The case series had a clinical stage ranging between T1 and T4N0M0, including 6 patients at stage I (7.1%), 5 at stage II (6%) 22 at stage IIIA (26.2%), and 51 at stage IV (60.7%) and presenting with metastatic disease. Of the 84 patients 12 (10.08%) undergoing surgery for initial disease followed by adjuvant chemotherapy (CT), 40 (33.6 %) received CT only, and 11 (9.24%) received CT and immunotherapy (IO) for metastatic disease. The histologic diagnosis and immunohistochemistry results were reviewed and confirmed by two experienced lung pathologists who judged their accuracy based on the WHO 2015 classification [19]. The NSCLC cohort included 55 patients diagnosed with adenocarcinoma and 29 with squamous cell carcinoma. The demographic data and clinicopathological characteristics of the patients were obtained from medical records and included age, gender, smoking history, clinical stage (according to the International Association for the Study of Lung Cancer classification system, 7th edition), and follow-up information for the overall survival calculation [20].

Cancer-free Cohort

Among the 103 patients with suspected lung cancer, the diagnosis of NSCLC was confirmed in 84 patients. Of these 19 patients (7 men and 12 women, median age of 64 years old 17 nonsmokers and 2 former smokers) were determined to be cancer-free, so they formed the cancer-free cohort.

Healthy Volunteer Cohort

The healthy volunteers included 52 individuals (31 men and 21 women, median age of 64 years old, 32 nonsmokers, 6 ex-smokers, and 14 former smokers) seen at the Outpatient Unit of the AC Camargo Cancer Center, in follow-up after gastric cancer treatment, without pulmonary disease, as demonstrated by a recent CT-scan.

Ethics Approval

This study was approved by the ethics committees from both participating institutions (process number 2237/16). An informed consent was obtained from all patients included in this study.

Sputum Collection

Sputum induction was first performed by the inhalation of two different concentrations of hypertonic saline solution (3% and 7%) for efficiency comparison, using an ultrasonic nebulizer (2000 Ultra-neb 2000, Devilbiss, Sunrise Medical, USA) for 7 min at the AC Camargo Cancer Center Hospital and Barretos Hospital de Amor, for a maximum of 3 inhalations. The sputum samples were separated from the saliva by centrifugation (1500 rpm×1min). After separation, the sputum samples were stored at -80°C until determination of the HA concentration.

Hyaluronic Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (HA ELISA)

We thawed the sputum samples and treated them all with 7 molar urea followed by incubation at 60°C until all hydrophobic bonds were broken. The protein concentration of the individual samples was measured by a BCA protein assay (Thermo Scientific, Pierce), which consists of the use of a detergent based on bicinconinic acid (BCA). The measurement of the HA concentration in the sputum was performed after proteolysis with enzyme (4 mg/mL Maxatan, pH 8.0, 0.15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl) by overnight incubation at 60 °C. In short, a HA-specific binding protein extracted from bovine cartilage was used both as a coating on the ELISA plate as well as a biotinylated probe. Standard HA solutions (0–1000 ng/mL) and patient samples were diluted in working buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 7.75 + 1% bovine albumin),

placed in triplicate in ELISA plates previously coated with the binding protein, and left to rest for 8 h at 4 °C. Next, the plate was incubated with the biotin-labeled binding protein for 2 h. After 12 washes of the plate with washing buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 7.75), the plate was incubated with europium-labeled streptavidin for 30 min. After washing the plate with washing buffer, an enhancement solution (Wallac Oy, Turku, Sweden) was added, and the plate was shaken gently for 10 min. Finally, the plate was placed in a fluorimeter (Victor 2, from Wallac Oy, Turku, Sweden) to determine the emitted fluorescence. A calculation program (MultiCalc software program, Perkin-Elmer Life Sciences-Wallac Oy, Turku, Sweden) interpreted the data (counts/s) and provided the results of the HA concentration in ng/mg.

Statistical Analysis

The chi-squared test or Fisher's test was used to compare categorical variables, and the Wilcoxon rank-sum test and Kruskal–Wallis test were used to detect differences in continuous variables between groups of patients. In addition, the general regression linear model was used to determine the association between continuous variables and several other variables, and the residuals were examined to ensure that they were approximately normally distributed. Unidirectional variance analysis was performed by the analysis of variance test to compare the HA concentration in the sputum of lung cancer patients, cancer-free patients, and healthy volunteers. Overall survival (OS) curves were estimated using the Kaplan–Meier method. The log-rank test was used to compare the survival between distinct groups of interest. The OS was defined as the interval from surgical resection combined with adjuvant CT or CT+IO for metastatic disease to death. OS regression analysis was performed using the Cox proportional hazards model. Variables shown to be significantly associated with survival by univariate analysis were entered in a multivariate Cox proportional hazards regression model. Receiver operating characteristic (ROC) curves were drawn to determine the optimal cutoff of the sputum HA concentration that yielded the best possible differentiation among cancer patients, cancer-free individuals, and healthy volunteers. The statistical packages IBM SPSS (version 22; Armonk, NY) and S-Plus (version 8.04; TIBCO, Palo Alto, CA) were used to perform all analyses. All tests with a P-value ≤ 0.05 were deemed statistically significant.

Results

Sputum HA and Cancer Patient Cohort

The clinical characteristics of the patients in our cancer cohort are summarized in Table 1, with the data separated according to the concentration of saline used to collect the sputum. Male

patients older than 58 years old had a significantly higher HA concentration in the sputum collected with 7% saline ($P < 0.01$). Similarly, smokers ($P = 0.002$) and patients with squamous cell carcinoma ($P = 0.03$) had a significantly higher HA concentration in the sputum collected with 7% saline. There was a marginally different HA concentration in the sputum collected with 7% saline according to the cancer stage ($P = 0.06$). Interestingly, a higher HA concentration in the sputum collected with 7% saline was significantly associated with progressive disease after systemic treatment, as evaluated by CT-scan ($P = 0.01$). In *KRAS*-mutant tumors, the HA concentration collected with 7% saline was also significantly higher ($P = 0.05$). The sputum levels of HA decreased progressively according to the treatment response (**Figure 1**). All associations remained significant following multivariate analysis. In addition, by univariate analyses, the HA concentration in the sputum collected with 7% NaCl had a borderline association with tobacco consumption ($P = 0.08$) and the vital status ($P = 0.07$). **Figure 2** depicts four plots to demonstrate the associations between the sputum HA concentration collected with 7% NaCl and tobacco history (top left), pathological stage (top right), T stage (bottom left), and CT-scan tumor response (bottom right). We also found a significant association between the sputum HA level collected with 7% NaCl in patients who received treatment with CT+IO ($P = 0.003$), as verified by comparing the CT-scan tumor size and the complete tumor CT-scan response ($P = 0.01$).

Survival Analysis

Overall, 6 patients had stage I cancer (7.1%), 5 patients had stage II cancer (6%) 22 patients had stage IIIA cancer (26.2%), and 51 patients had metastatic disease (60.7%). Of the 55 patients from the AC Camargo Cancer Center, 36 (38.1%) underwent surgery for initial disease followed by adjuvant CT, and 15 (22.6%) had CT+IO for metastatic disease. Of the 84 patients, 30 (35.7%) died due to disease progression. The median follow-up of the patients was 9 months (range, 3 to 71 months). In this cohort, the OS curves (data not shown) demonstrated that the patients with pathological stage I or II cancer had approximately the same survival, with a median survival time of 30 months for both groups. Thus, we grouped the stage I and stage II patients together. The results of the Cox regression analysis are shown in **Table 2**. Univariate Cox analysis demonstrated that an early overall stage was significantly related to the survival time. However, by multivariate analysis, when the pretreatment sputum HA concentration collected with 7% NaCl, CT-scan tumor response, and CT were introduced as covariates, their relationship with survival was much stronger ($P < 0.01$). The median HA concentration in the sputum (30.70 $\mu\text{g}/\text{mg}$) was used to divide the patients into two groups with distinctive survival

times after adjuvant CT and complete tumor CT-scan response. We also found that the prognostic information provided by the sputum HA concentration collected with 7% NaCl was maximized when this variable was used as a continuous variable. For example, the Cox model chi-squared value was only 24.87 when a cutoff value of 30.7 ng/mg for the sputum HA concentration in 7% NaCl was used, whereas it was 29.54 when it was used as a continuous variable. This continuous relationship is also illustrated in **Fig. 3**. Although there is no biologically distinctive cutoff for the sputum HA concentration in 7% NaCl, ROC curves showed that an HA concentration of 30.70 ng/mg was an adequate value that showed a good association with the CT-scan tumor response and the systemic treatment outcome. The plot of the groups of patients evaluated by the CT-scan tumor response after treatment with different median survival times is illustrated in **Fig. 4A**. The groups with a tumor CT-scan complete response and stable disease appear as the top curve, and their median survival time was not reached during follow-up. Their mean survival time, however, was quite long (30 months). In contrast, those with progressive disease (bottom curve) had a median survival time of only 11 months after surgery ($P = 0.0001$) by the log-rank test. Patients treated with CT vs. CT+IO presented different median survival times, which are illustrated by the Kaplan–Meier plots shown in **Fig. 4B**. The group treated with CT+IO appears as the top curve, and its median survival time was 17.78 months. In contrast, those treated with CT only (bottom curve) had a median survival time of 40.16 months ($P = 0.03$; log-rank test). Finally, we examined the importance of the sputum HA concentration and the CT-scan tumor response to survival in the 51 patients who developed metastatic disease and received CT+IO. Once again, the sputum HA concentration, CT-scan tumor response, and CT+IO treatment were significantly related to the survival time by the Cox model ($P = 0.01$; Table 3).

HA sputum level in the cancer-free and healthy volunteer cohorts

The concentrations of HA in the sputum collected with 7% and 3% NaCl from patients with lung cancer, healthy volunteers, and cancer-free patients are shown in **Table 4**. The HA concentration in the sputum collected with 7% NaCl was significantly higher than that collected with 3% NaCl ($P = 0.03$). In addition, the HA level in the sputum collected with 7% NaCl from lung cancer patients was also significantly higher than that from healthy volunteers ($P = 0.001$) and marginally higher than that from cancer-free patients ($P = 0.08$). The HA concentration in sputum collected with 3% NaCl was also significantly higher in cancer patients than in healthy volunteers ($P = 0.04$). No difference was found for the HA level collected with 3% NaCl between the cancer patients and the cancer-free patients. In addition, the HA concentration

collected with 7% NaCl was significantly higher in the sputum from patients with squamous cell carcinoma than from patients diagnosed with adenocarcinoma ($P = 0.03$) (Table 1; **Fig. 5**).

The diagnostic power of HA sputum level at 3% and 7% NaCl

The sputum HA analysis capacity to distinguish CT-scan complete response and progressive disease, as well as CT and CT+IO was analyzed using a ROC curve. The area under the curve for sputum HA 7% NaCl was 0.995 (0.881–1.000; $P=0.0001$) whereas HA 3% NaCl was 0.688 (0.487 – 0.890; $P=0.139$). Assuming a cut-off value of 77.30 ng/mg for HA 7% NaCl specificity was 86% and the sensitivity was 100%, (Fig. 6-A curve). The area under the curve for sputum HA 7% NaCl was 0.911 (0.800–1.000; $P=0.01$) whereas HA 3% NaCl was 0.655 (0.424 – 0.885; $P=0.205$). Assuming a cut-off value of 44.70 ng/mg for HA 7%, NaCl the specificity was 87% and the sensitivity was 85% to discriminate CT and CT+IO treatment with 85% sensitivity and 87% of specificity. The diagnostic accuracy was 91%. (Fig. 6-B).

Discussion

In the present study, we assessed the association between the HA concentration in the sputum and the tumor response to treatment in patients with lung cancer. We first evaluated the importance of the sputum HA concentration and explored the quantitative relationship between this factor and the clinicopathological characteristics of the patients. Secondly, we explored the relationships between the sputum HA concentration as well as the treatment (CT vs. CT+IO) and the tumor response on the patient outcome. Under these conditions, we found a variety of associated effects of the sputum HA level, including (1) differences between the HA level collected with 7% NaCl and 3% NaCl and its association with age, gender, tobacco history, histologic type, T stage, mutation profile, and tumor CT-scan response; (2) a significant reduction in the sputum HA level collected with 7% NaCl post treatment with CT+IO; (3) a complete tumor CT-scan response; (4) a longer median survival (62.5 months) in the group treated with CT, sputum HA level <30.7 ng/mg, and a complete tumor CT response compared to a median survival of 11 months in the group treated only with CT, progressive disease at CT-scan, and sputum HA level >30.7 ng/mg. These results support our hypothesis that early detection and early assessment of the treatment response in patients with lung cancer by noninvasive procedures is crucial to increase the chance of patient survival. Furthermore, sputum samples have emerged as an attractive potential source of biomarkers for lung cancer, since it is synthesized by respiratory epithelial cells and the alveolar parenchyma, both of which become malignant in lung cancer. More notably, due to the specific binding of HA to neoplastic

cell receptors, its overexpression in solid tumors, such as lung cancer, provides an HA coating with an active targeting capability affecting tumor-responsive drug release, thus impacting patient outcomes.

HA is a high molecular weight molecule present in the extracellular matrix with a mass greater than 1000 kDa. Tissue damage can lead to the release of low molecular weight HA, which acts as a pro-inflammatory mediator after lung injury [21] or ventilator-associated lung injury [22]. The main HA receptor molecules on the cell surface are called CD44 and are involved in the regulation of the inflammatory response in the lungs, airway epithelial cells [23], and alveolar macrophages [24]. In vitro studies support that tobacco and ozone cause HA fragmentation [25]. In addition, Garantziotis and colleagues demonstrated that the biological effects of HA in regulating airway damage are dependent on its molecular weight [26-28]. These authors suggest that fragments of different sizes can compete for binding to the receptor, resulting in opposite physiological responses. Since HA oligomers of only six disaccharide molecules can be recognized by CD44 and extracellular HA can have a mass of more than 1000 kDa, there are a variety of sizes of potential HA fragments that can compete for CD44 binding [28]. HA is a molecule unchanged by glycosylation or sulfation after its synthesis; consequently, the size, location, and concentration of HA may be the most important modifiers of its activity. In terms of HA concentration, Delpech and colleagues [29] found a good recovery of HA, and the coefficients of variation within and between assays are reported as $6 \pm 2.2\%$ and 12% , respectively. In addition, in 103 serum samples from blood donors, the HA concentration was $22.4 \pm 16.7 \mu\text{g/L}$ and was elevated in most of the serum samples from cancer patients tested. Regarding size and location, low molecular weight HA ($<300 \text{ kD}$) stimulates cell proliferation, initiates pathways that involve the inflammatory process, and changes the frequency of the ciliary beat through the HA-mediated motility receptor (RHAMM); in contrast, HA of high molecular weight ($1,000 \text{ kD}$) has no effect on the frequency of ciliary beat [30]. The airway epithelium synthesizes high molecular weight HA, which can be degraded by oxidative stress (for example, reactive oxygen species) induced by the allergen stimulation in the airway lumen in order to signal via RHAMM. The low molecular weight fragments of HA thus generated trigger the RHAMM pathways and increase the frequency of ciliary beating [31]. However, the data mentioned above we should not be surprised to note that different concentrations of a specific biotinylated probe for HA provide important data on changes in tumor tissues, and our results now confirm the prognostic importance of HA in lung cancer. Using a general linear model analysis, we demonstrated that sputum with a high concentration of HA collected in $7\% \text{ NaCl}$ was significantly associated with age, sex, smoking, histology, stage T, and KRAS

mutation status. Due to the presence of HA on the surface of the airways as an important component of airway secretions, it certainly plays a central role in the homeostasis of the respiratory system, especially in the upper airways [32] and in particular, in the nasal mucosa. HA acts mainly in the regulation of vasomotor tone and secretion of the gland, significantly contributing to the defense of the host mucosa, inciting the elimination of foreign bodies by ciliary clearance, while enzymes are retained and used in the regulation of homeostasis in the apical surface region [33]. In addition, squamous metaplasia or dysplasia of the bronchial epithelium is associated with high regulation of HA expression, and squamous cell carcinomas generally express high levels of HA [34]. Regarding the stage of the tumor, some studies indicate that tumor expression of the CD44 isoform by HA-mediated may be an accurate predictor of overall survival (for example, nodal status, tumor size, and grade) [35]. It is likely that the interactions of HA-mediated CD44 isoforms on epithelial cells may act as surface receptors mediating the unwanted growth factor receptor-growth factor [36] and subsequent tumor formation. It is also possible that these CD44 isoforms can interact with components of the extracellular matrix so that epithelial cells do abnormal mitogenesis and migration. This can be one of the most important stages of tumor invasion and metastasis [37]. Interestingly, the data by Weng and colleagues [37] revealed the role of transforming growth factor- β ¹⁴(TGF β) being induced by homeobox factor 1 (TGIF1) in the activity of the enzyme that degrades HA (HAS2-hyaluronan synthase 2) induced by TGF β , profound effect on the tumor - Associated macrophage polarization. Because of this, TGIF1 has great potential in antitumor immunity by reducing the expression of the programmed death-ligand 1. This *in vivo* study provides information on the role of TGIF1 in signaling TGF β / Smad in the development of pancreatic cancer and its therapeutic potential.

In the current study, we also demonstrated that a high HA concentration (collected with 7% saline) in the sputum was associated with the type of response in patients treated with CT+IO. Data from Ohashi and colleagues using the NSCLC cell line H322 transfected with the CD44s gene (H322 / CD44s) and cultured on HA-coated plates verified the presence of cisplatin resistance when compared to cells cultured on plates coated with bovine serum albumin. H322 / CD44 cells were cultured with HA and induced with multiple drug resistance protein 2 (MRP2) and tested with the MRP2 inhibitor MK571. The results presented were not only the suppression of the expression MRP2, but there was also a reversal of resistance to cisplatin. Suggesting that the interaction between CD44s and HA plays an important role in the acquired resistance to cisplatin in NSCLC and that MRP2 may be involved in this important mechanism [38]. Recently, Quan and colleagues demonstrated that the CD44 knockdown using siRNA

reinforces that CD44 expression is related to the chemosensitivity of resistant cells. These authors also observed a significant reduction in CD44 expression and increased sensitivity to cisplatin in chemoresistant NSCLC cells when HA liposome-mediated siRNA release prior to chemotherapy [39]. Regarding the role of HA in the response to immunotherapy, a recent review by Wight and colleagues reported that indirectly, through HA, versican and inflammatory cells interact or directly through CD44 receptors, P-selectin glycoprotein ligand-1 and toll-like receptors present in both immune and non-immune cells. Thus, the signaling pathways are activated and interact through the signaling pathways where the synthesis and secretion of inflammatory cytokines is performed, as well as tumor necrosis factor- α and interleukin-6. [40]. While the versican produced in stromal cells shows pro-inflammatory behavior, the versican expressed by myeloid cells acts in the formation of anti-inflammatory and immunosuppressive microenvironments. The tumor microenvironment often contains high levels of versican. Changing levels of versican in tumors can lead to an inflammatory process and tumor progression in some types of cancer [41].

Importantly, we have demonstrated that a high sputum HA concentration (collected with 7% NaCl) at pretreatment was associated with the CT-scan tumor response. These findings emphasized the potential of CT-scan and the possibility of prematurely detection of perfusion changes corresponding to an early response [42]. According to data from Zhao and colleagues as well as Tacelli and colleagues, the initial response was detected at three weeks after treatment with charybdotoxin, what would happen if the decrease in tumor size could be difficult to measure with the RECIST criteria [43-45]. Recurrence of tumor reevaluation every 6–8 weeks is reasonable according to RECIST [46]. Clearly, the efficiency in assessing the response to treatment in the initial stage of diagnosis would make it possible to change the treatment strategy for patients who did not respond, bringing benefits to patients and saving on unnecessary treatments [46]. Positron emission tomography / computed tomography (PET / CT) is an imaging tool used alternatively in the evaluation of the tumor response. While dynamic contrast computed tomography (DCE-CT) quantifies tumor vascularization, PET / CT can be used to assess tumor metabolism and tumor hypoxia using fluodeoxyglucose (FDG) - PET and hypoxia PET. Since PET and computed tomography seem to measure different aspects of the tumors, still few studies have investigated the correlation between both. In patients with NSCLC, Miles et al. verified the existence of a significant correlation between metabolism and blood flow from ^{18}F -FDG PET / CT and DCE-CT, respectively, but only for tumors smaller than 4.5 cm² [47]. In contrast, Van Elmpt et al. studying patients diagnosed with NSCLC did not verify the correlation between tumor metabolism and tumor vascularization [48]. In this

context of a comparison of PET / CT, DCE-CT has more advantages due to the greater availability of use in imaging tests. In addition, it is a faster and cheaper exam.

Thus, for all of these reasons, we should not be admired to learn that sputum HA evaluation provides crucial prognostic information about lung cancer, and our results now confirm the prognostic importance of sputum HA in lung cancer. Our results suggest that the level of HA in sputum, used as a continuous variable, can provide prognostic information together with the routine clinical or pathological stage. Although we were unable to identify a binary cutoff point for the sputum HA level, a natural dividing point of 30.7 ng/mg allowing that a practical way to separate the patients into two groups: patients with a shorter expected survival time versus patients with a longer expected survival time. To conclude, will require further study in a randomized and prospective trial. We also believe that it is important to validate our quantitative assessment of sputum HA in other histological types of lung cancer by studying the sputum HA concentration in additional patients. The final query of interest was whether the malignant alterations gathered from the tumor tissue or its milieu could help us to identify patients with lung cancer using a noninvasive procedure such as sputum collection. The HA concentration in sputum collected with 7% NaCl from lung cancer patients was significantly increased compared to that from healthy volunteers and marginally significantly increased compared to that from cancer-free patients. Similar findings have been reported by Rangel et al, who have found that tissue HA expression reflected in the sputum of lung cancer patients is an indicator of malignancy [12]. Making use of a simple, fast, and low-cost collection method that can be performed routinely in the laboratory, we also showed that the concentration of sputum HA (collected with 7% NaCl) differentiating tumor patients from those without tumors with a sensitivity of 80% and a specificity of 66%. As we can see in the literature, the sensitivity variation of sputum cytology ranges from 42% to 97% and the specificity varies from 68% to 100% [49]. Our findings differ from Van Rensburg and colleagues [50] where sputum cytology in a high-risk population showed a sensitivity of 38.9% for detecting malignant cells and an accuracy of 100%. Comparing our findings with other studies, we believe that the sensitivity found between 60% and 66% is in line with the acceptable limits of sputum cytology variation. However, the assessment of HA in sputum samples approaches or even exceeds the current gold standard of sputum cytology, eventually corroborating the possibility of the combined determination of HA in sputum and cytology can considerably increase the diagnostic arsenal applied in the clinic for the diagnosis of lung cancer. We conclude that the sputum HA level was associated with the presence of cancer in the lungs, reflecting the patient clinicopathological characteristics, post-treatment tumor response, and outcome. Thus, HA

concentration determination has emerged as an important diagnostic procedure for patients with lung cancer. Our results suggest that high levels of sputum HA in lung cancer patients may interfere with its active targeting capability and affect the tumor-responsive drug release, thus impacting the patient outcome. To confirm these results, more studies in a randomized and prospective trial are needed. In addition, we believe that it is important to validate our quantitative assessment by studying HA in additional patients.

References

1. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer (IARC) [homepage on the Internet]. Lyon: IARC; c2016 [cited 2016 Mar 1].
2. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide; 2013. Available from: [http:// globocan.iarc.fr](http://globocan.iarc.fr).
3. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*. 2015;385(9972):977-1010.
4. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2016;11(1):39-51.
5. Darrason M, Chatelain E, Ranchon F, Gervaise C, Duruisseaux M, Couraud S. Do systemic treatments delivered after Nivolumab result in better outcomes? A bicentric case-control study. *Respir Med Res*. 2020 Mar; 77:100-105.
6. Eisenhauer E.A., Therasse P., Bogaerts J., Schwartz L.H., Sargent D., Ford R., Dancey J., Arbuck S., Gwyther S., Mooney M. et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised recist guideline (version 1.1) *Eur. J. Cancer*. 2009; 45:228–247.
7. O'Connor J.P., Tofts P.S., Miles K.A., Parkes L.M., Thompson G., Jackson A. Dynamic contrast-enhanced imaging techniques: Ct and mri. *Br. J. Radiol*. 2011;84: S112–S120.

8. Garcia-Figueiras R., Goh V.J., Padhani A.R., Baleato-Gonzalez S., Garrido M., Leon L., Gomez-Caamano A. CT perfusion in oncologic imaging: A useful tool? *AJR Am. J. Roentgenol.* 2013; 200:8–19. doi: 10.2214/AJR.11.8476.
9. Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB (1997). "Hyaluronic: its nature, distribution, functions and turnover". *J. Intern. Med.* 242 (1): 27–33.
10. Stern, edited by Robert (2009). *Hyaluronic in cancer biology* (1st ed.). San Diego, CA: Academic Press/Elsevier. ISBN 978-0-12-374178-3.
11. Lennon FE, Singleton PA. Role of hyaluronan and hyaluronan-binding proteins in lung pathobiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301: L137–L147,2011.
12. Rangel, M.P., de Sá, V.K., Martins, J.R.M., Parra, E.R., Mendes, A., Andrade, P.C., Reis, R.M., Longatto-Filho, A., Oliveira C.Z., Takagaki, T., Carraro, D.M., Nader, H.B. and Capelozzi, V.L. Tissue hyaluronan expression, as reflected in the sputum of lung cancer patients, is an indicator of malignancy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2015) 48(6): 557-567.
13. Singleton PA, Mirzapoiazova T, Guo Y, Sammani S, Mambetsariev N, Lennon FE, Moreno-Vinasco L, Garcia JG. High-molecular-weight hyaluronan is a novel inhibitor of pulmonary vascular leakiness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299: L639 –L651 2010.
14. Liang J, Jiang D, Jung Y, Xie T, Ingram J, Church T, Degan S, Leonard M, Kraft M, Noble PW. Role of hyaluronan and hyaluronanbinding proteins in human asthma. *J Allergy Clin Immunol* 128: 403–411 2011.
15. Bracke KR, Dentener MA, Papakonstantinou E, Vernooij JH, Demoor T, Pauwels NS, Cleutjens J, van Suylen RJ, Joos GF, Brusselle GG, Wouters EF. Enhanced deposition of low-molecular-weight hyaluronan in lungs of cigarette smoke-exposed mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42: 753–761 2010.

16. Savani RC, Hou G, Liu P, Wang C, Simons E, Grimm PC, Stern R, Greenberg AH, DeLisser HM, Khalil N. A role for hyaluronan in macrophage accumulation and collagen deposition after bleomycin-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 475–484 2000.
17. Horton MR, Olman MA, Bao C, White KE, Choi AM, Chin BY, Noble PW, Lowenstein CJ. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L707–L715 2000.
18. Huang, G.; Huang, H. Hyaluronic acid-based biopharmaceutical delivery and tumor-targeted drug delivery system. *J. Control. Release* 2018 278 122–126.
19. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB et al (2015) The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 10(9):1243–1260.
20. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, et al (2016) 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* 11(1): 39-51.
21. Priit Teder 1, R William Vandivier, Dianhua Jiang, Jiurong Liang, Lauren Cohn, Ellen Puré, Peter M Henson, Paul W Noble. Resolution of lung inflammation by CD44. *Science*. 2002 Apr 5;296(5565):155-8.
22. Kuan-Jen Bai, Andrew P. Spicer, Marcella M. Mascarenhas, Lunyin Yu, Cristhian D. Ochoa, Hari G. Garg, and Deborah A. Quinn. The Role of Hyaluronic Synthase 3 in Ventilator-induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jul 1; 172(1): 92–98.
23. Shawn J Skerrett 1, H Denny Liggitt, Adeline M Hajjar, Robert K Ernst, Samuel I Miller, Christopher B Wilson. Respiratory epithelial cells regulate lung inflammation in response to inhaled endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Jul;287(1): L143-52.

24. John W Hollingsworth 1, Benny J Chen, David M Brass, Katie Berman, M Dee Gunn, Donald N Cook, David A Schwartz. The critical role of hematopoietic cells in lipopolysaccharide-induced airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Apr 15;171(8):806.
25. O Schmut 1, A N Ansari, J Faulborn. Degradation of hyaluronate by the concerted action of ozone and sunlight. *Ophthalmic Res*. 1994;26(6):340-3.
26. Lisheng Zhuo 1, Akiko Kanamori, Reiji Kannagi, Naoki Itano, Jiwen Wu, Michinari Hamaguchi, Naoki Ishiguro, Koji Kimata. SHAP potentiates the CD44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum. *J Biol Chem*. 2006 Jul 21;281(29):20303-14.
27. Stavros Garantziotis, Zhuowei Li, Erin N. Potts, Koji Kimata, Lisheng Zhuo, Daniel L. Morgan, Rashmin C. Savani, Paul W. Noble, W. Michael Foster, David A. Schwartz, and John W. Hollingsworth. Hyaluronic Mediates Ozone-induced Airway).
28. Stavros Garantziotis, Zhuowei Li, Erin N. Potts, Koji Kimata, Lisheng Zhuo, Daniel L. Morgan, Rashmin C. Savani, Paul W. Noble, W. Michael Foster, David A. Schwartz, and John W. Hollingsworth. Hyaluronic Mediates Ozone-induced Airway Hyperresponsiveness in Mice. *J Biol Chem*. 2009 Apr 24; 284(17): 11309–11317.
29. Bertrand Delpech, Philippe Bertrand, Catherine Maingonnat. Immunoassay of the hyaluronic acid-hyaluronectin interaction: Application to the detection of hyaluronic acid in serum of normal subjects and cancer patients. *Analytical Biochemistry* Volume 149, Issue 2, September 1985, Pages 555-565.
30. Manuele Casale, Antonio Moffa, Lorenzo Sabatino, Annalisa Pace, Giuseppe Oliveto, Massimiliano Vitali, Peter Baptista, Fabrizio Salvinelli. Hyaluronic Acid: Perspectives in Upper Aero-Digestive Tract. A Systematic Review. *PLOS ONE* DOI: 10.1371/journal.pone.0130637 June 29; 2015.
31. Manzanares D, Monzon ME, Savani RC, Salathe M. Apical oxidative hyaluronan degradation stimulates airway ciliary beating via RHAMM and RON. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37 (2): 160–8.

32. Wolny PM, Banerji S, Gounou C, Brisson AR, Day AJ, Jackson DG et al. Analysis of CD44-Hyaluronan Interactions in an Artificial Membrane system insights into the distinct binding properties of high and low molecular weight hyaluronan. *J Biol Chem*. 2010 Sep 24; 285(39): 30170–30180.
33. Sá VK, Rocha TP, Moreira A, Soares FA, Takagaki T, Carvalho L, Nicholson AG, Capelozzi VL. Hyaluronidases and hyaluronan synthases expression is inversely correlated with malignancy in lung/bronchial pre-neoplastic and neoplastic lesions, affecting prognosis. *Braz J Med Biol Res*. 2015 Nov;48(11):1039-47.
34. Wang SJ, & Bourguignon LY (2011). Role of hyaluronan-mediated CD44 signaling in head and neck squamous cell carcinoma progression and chemoresistance. *The American Journal of Pathology* 178, 956–963.
35. Bourguignon LY, Gilad E, Brightman A, Diedrich F, & Singleton P (2006). Hyaluronan-CD44 interaction with leukemia-associated RhoGEF and epidermal growth factor receptor promotes Rho/Ras co-activation, phospholipase C epsilon-Ca²⁺ + signaling, and cytoskeleton modification in head and neck squamous cell carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry* 281 14026–14040.
36. Bourguignon LY, Shiina M, Li JJ. Hyaluronan-CD44 interaction promotes oncogenic signaling, microRNA functions, chemoresistance, and radiation resistance in cancer stem cells leading to tumor progression. *Adv Cancer Res*. 2014; 123:255-75.
37. Weng CC, Hsieh MJ, Wu CC, Lin YC, Shan YS, Hung WC, Chen LT, Cheng KH. Loss of the transcriptional repressor TGIF1 results in enhanced Kras-driven development of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2019 May 20;18(1):96.
38. Ohashi R, Takahashi F, Cui R, Yoshioka M, Gu T, Sasaki S, Tominaga S, Nishio K, Tanabe KK, Takahashi K. Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell. *Cancer Lett*. 2007 Jul 18;252(2):225-34.

39. Quan YH, Lim JY, Choi BH, Choi Y, Choi YH, Park JH, Kim HK. Self-targeted knockdown of CD44 improves cisplatin sensitivity of chemoresistant non-small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019 Mar;83(3):399-410.
40. Gomez-Casal R, Bhattacharya C, Ganesh N, Bailey L, Basse P, Gibson M, Epperly M, Levina V. Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes. *Mol Cancer*. 2013 Aug 16;12(1):94.
41. Wight TN, Kang I, Evanko SP, Harten IA, Chang MY, Pearce OMT, Allen CE, Frevert CW. Versican-A Critical Extracellular Matrix Regulator of Immunity and Inflammation. *Front Immunol*. 2020 Mar 24; 11:512.
42. Wight TN, Kang I, Evanko SP, Harten IA, Chang MY, Pearce OMT, Allen CE, Frevert CW. Versican-A Critical Extracellular Matrix Regulator of Immunity and Inflammation. *Front Immunol*. 2020 Mar 24; 11:512.
43. Louise S. Strauch, Rie Ø. Eriksen, Michael Sandgaard, Thomas S. Kristensen, Michael B. Nielsen and Carsten A. Lauridsen. Assessing Tumor Response to Treatment in Patients with Lung Cancer Using Dynamic Contrast-Enhanced CT. *Diagnostics* 2016, 6 28; doi:10.3390/diagnostics6030028 www.mdpi.
44. Zhao, L.; Guan, W; Han, Y.; Zhao, Y. Comparative study on CT perfusion parameters of different types of lung cancer before and after chemoradiotherapy. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 2014 28, 675–681.
45. Tacelli, N.; Santangelo, T.; Scherpereel, A.; Duhamel, A.; Deken, V.; Klotz, E.; Cortot, A.; Lafitte, J.J.; Wallyn, F.; Remy, J.; et al. Perfusion CT allows prediction of therapy response in non-small cell lung cancer treated with conventional and anti-angiogenic chemotherapy. *Eur. Radiol*. 2013 23 2127–2136.
46. Eisenhauer, E.A.; Therasse, P.; Bogaerts, J.; Schwartz, L.H.; Sargent, D.; Ford, R.; Dancey, J.; Arbuck, S.; Gwyther, S.; Mooney, M.; et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised recist guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer* 2009, 45 228–247.

47. Miles, K.A.; Griffiths, M.R.; Keith, C.J. Blood flow-metabolic relationships are dependent on tumour size in non-small cell lung cancer: A study using quantitative contrast-enhanced computer tomography and positron emission tomography. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2006, 33 22–28.
48. Van Elmpt, W.; Zegers, C.M.; Reymen, B.; Even, A.J.; Dingemans, A.M.; Oellers, M.; Wildberger, J.E.; Mottaghy, F.M.; Das, M.; Troost, E.G.; et al. Multiparametric imaging of patient and tumour heterogeneity in non-small-cell lung cancer: Quantification of tumour hypoxia, metabolism and perfusion. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2016, 43 240–248.
49. Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM. Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed.: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013; 143: e142S-e165S, doi: 10.1378/chest.12-2353.
50. Van Rensburg A, Neethling GS, Schubert PT, Koegelenberg CF, Wright CA, Bolliger CT et al. Impact of routine sputum cytology in a population at high risk for bronchial carcinoma. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; 18: 607-612, doi: 10.5588/ijtld.13.0806.).

Legends for Tables

Table 1. Clinicopathological characteristics of the cancer-cohort patients stratified according to the saline concentration used to collect the sputum hyaluronic acid (HA).

*The univariate general linear model controlling three variables at the same time (HA level; group: 7% and 3%, and characteristics of the patients) was used. Significance for P value ≤ 0.05 . † 7th International Association for the Study of Lung Cancer [Goldstraw P, Chansky K, Crowley J 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]. CT-scan, computerized tomography; CT, chemotherapy; IO, immunotherapy.

Table 2. Variables associated with the overall survival (OS). Univariate and multivariate analyses employed the Cox proportional hazards model. a Univariate analysis was carried out without any adjustment in order to generate the chi-squared value, β coefficient (risk), and P value for individual risk for each of the parameters on survival. b Multivariate analysis was carried

out to analyze the effects of several risk parameters on survival. β coefficient = Risk. P value $\leq$ 0.05. CT, =chemotherapy; CT + IO, =chemotherapy + immunotherapy.

Table 3. Cox proportional hazard model analysis of the survival time in a cohort of 51 patients with metastatic disease. CT-scan, computerized tomography; CT+IO, chemotherapy + immunotherapy; HÁ = hyaluronic acid.

Table 4. Sputum hyaluronan (HA) levels stratified among groups. Data are reported as the mean $\pm$ standard errorSE of the HA level in sputum. Determination of HA was performed using an “ELISA-like” fluorometric assay. §The HA concentration collected in 7% NaCl level was significantly different from that collected in HA 3% NaCl level in sputum (P = 0.03). *#The HA concentration collected in 7% NaCl level in sputum of lung cancer patients wasere significantly different from that of healthy volunteers (P = 0.001) and marginally significantly different from that of in cancer-free patients (P = 0.08). **The HA concentration collected in 3% protein levelNaCl in sputum of lung cancer patients was significantly different between cancer patients andfrom that collected in 7% HCl from healthy volunteers (P = 0.04). No significant difference was found for the levels of HA collected in 3% NaCl levels between the cancer patients and the cancer-free patients. ANOVA was used for statistical analyses. HA = hyaluronan; NaCl = sodium chloride.

Legends for Figures

Fig. 1 Plots demonstrate the relationships among sputum HA 7% ng/mg level on vertical axis and IO + CT systemic treatment on horizontal axis, stratified by tumor CT-scans first response post-treatment, classified as partial response, complete response, stable disease, or progressive disease, according to the RECIST criteria.

Fig. 2 Four plots demonstrate the relationships between sputum HA 7% ng/mg level and tobacco history (top left), overall stage (top right), T stage (bottom left), as well as computed tomography evaluation (bottom right). In the box plots, the solid bar represents the values of HA 7% ng/mg level between the 25th and 75th percentiles; the white bar shows the median value; and the top and bottom brackets show the extreme values.

Fig. 3 Plot of natural logarithm of survival time for all those observed to die of recurrent tumor on horizontal axis versus percentage of sputum HA level (ng/mg) on the vertical axis. The trend in the points is given by the line, which comes from the loess line smoothing function of S-PLUS.

Fig. 4 Kaplan-Meier plots of survival probability versus follow-up time in months in those patients with CT-scan response after treatment (A and B). The group with HA 7% NaCl solution $< 30.7 \mu\text{g/mg}$ appears as the top curve, and the group with HA 7% NaCl solution $> 30.7 \mu\text{g/mg}$ appears as the bottom curve. The group of patients treated with systemic CT + IO appears as the top curve and the group treated only with CT-scan appears as the bottom curve. The CT-scan image in a newly diagnosed patient (top left); CT-scan image after the first line of treatment with stable disease (top right); CT-scan image in a newly diagnosed patient (middle left); CT-scan image after the first line of treatment with partial response (middle right); CT-scan image in a newly diagnosed patient (bottom left) and CT-scan image after the first line of treatment with progression disease (bottom right).

Fig. 5 Plots demonstrate the relationships between sputum HA level first response and sputum collected with 7% NaCl and sputum collected with 3% NaCl, stratified by adenocarcinoma and squamous cell carcinoma histotypes. In the box plots, the solid bar represents the values of HA 7% ng/mg and HA 3% ng/mg levels between the 25th and 75th percentiles; the white bar shows the median value; and the top and bottom brackets show the extreme values.

Fig 6. Receiver operating characteristic (ROC) curves for sputum levels of HA. A) The cut-off level of HA 7% NaCl that resulted in the highest diagnostic accuracy was 73.30 ng/mg. This cut-off point discriminated between CT-scan complete response and progressive disease, with 100% sensitivity and 86% of specificity. The diagnostic accuracy was 95%. B) The cut-off level of HA 7% NaCl that resulted in the highest diagnostic accuracy was 44.70 ng/mg. This cut-off point discriminated between CT and CT+ IO treatment, with 85% sensitivity and 87% of specificity. The diagnostic accuracy was 91%.

Table 1. Clinicopathological characteristics of the cancer-cohort patients stratified according to the saline concentration used to collect the sputum hyaluronic acid (HA).

Patient characteristics	HA concentration (ng/ μ g) in 7% saline	HA concentration (ng/ μ g) in 3% saline	P value*
Age (years)			<0.01
≤ 58	190.87	33.26	
> 58	192.12	122.47	
Gender			0.001
<i>Female</i>	157.14	15.19	
<i>Male</i>	215.48	108.73	
Tobacco history			0.002
<i>Nonsmokers</i>	187.31	18.28	
<i>Former smokers</i>	169.03	46.05	
<i>Smokers</i>	206.41	93.41	
Tobacco level			0.08
<i>2 packs/year</i>	185.63	39.60	
<i>60 packs/year</i>	199.37	90.96	
Histologic type			0.03
<i>Adenocarcinoma</i>	159.41	42.62	
<i>Squamous cell carcinoma</i>	432.54	93.89	
IASLC clinical stage[†]			0.06
<i>I</i>	119.17	0.00	
<i>II</i>	81.28	11.40	
<i>III</i>	275.76	39.27	
Tumor stage[†]			0.05
<i>T1</i>	83.50	14.95	
<i>T2</i>	187.01	42.90	
<i>T3</i>	281.14	145.28	
<i>T4</i>	202.32	43.95	
Lymph node status[†]			0.16
<i>N₀</i>	174.21	133.39	
<i>N₁</i>	242.94	34.00	
<i>N₂</i>	193.43	53.46	
Vital status			0.07
<i>Alive</i>	133.20	81.68	
<i>Dead</i>	314.64	61.30	
Overall survival			0.19
<i>≤ 26 months</i>	140.58	80.41	
<i>> 26 months</i>	222.08	50.75	
CT-scan tumor response			0.01
<i>Partial response</i>	118.97		
<i>Complete response</i>	211.00		
<i>Stable disease</i>	117.38	81.68	
<i>Progressive disease</i>	292.78	61.30	
Mutational Status			0.05
<i>Wild type</i>	240.13	75.57	
<i>ALK</i>	219.00	2.62	
<i>EGFR</i>	34.11		
<i>KRAS</i>	228.00		
<i>RET</i>	15.89		
<i>EGRF + T790M</i>	122.60		
Treatment			0.01
<i>CT</i>	146.65		
<i>CT+IO</i>	101.11		

Table 2. Variables associated with the overall survival (OS). Univariate and multivariate analyses employed the Cox proportional hazards model.

	Univariate Analysis ^a			Multivariate Analysis ^b		
	Chi-squared value	β coefficient	P-value	β coefficient	Chi-squared value	P-value
Variable						
Age (years) <i>≤58 (reference)</i> <i>>58</i>	0.540	0.270	0.45			
Gender <i>Female</i> <i>Male (reference)</i>	0.748	0.336	0.386			
Tobacco History <i>Nonsmoker</i> <i>Former smoker</i> <i>Smoker (reference)</i>	0.599	0.130 0.287	0.744			
Tobacco level <i>2 packs/year</i> <i>60 packs/year</i>	0.359	0.221	0.549			
Histologic types <i>Adenocarcinoma</i> <i>Squamous cell carcinoma (reference)</i>	3.724	0.349 0.464	0.155			
IASLC stage <i>I+II</i> <i>III (reference)</i>	11.962	-13.479 0.992	0.01	-8.350 0.023	17.53	0.014
Tumor stage <i>T1</i> <i>T2</i> <i>T3</i> <i>T4 (reference)</i>	9.133	-1.825 0.806 0.311	0.02	0.816 0.725 0.682	17.50	0.014
Lymph node status <i>N0</i> <i>N1</i> <i>N2 (reference)</i>	1.156	0.349 0.212 0.011	0.76			
Mutation status <i>Wild type</i> <i>ALK</i> <i>EGFR</i> <i>KRAS</i> <i>RET</i> <i>EGFR + T790M</i>	6.740	10.454 10.439 9.570 9.941 0.178	0.24			
Hyaluronic acid level pretreatment (ng/mg) <i>≤30.70</i> <i>> 30.70</i>	0.472	0.299	0.05	0.623	93.33	0.0001
Computed Tomography post treatment <i>Partial response</i> <i>Complete response</i> <i>Stable disease</i> <i>Progressive disease (reference)</i>	78.853	-13.583 -2.981 -13.550	0.0001	18.196 1.380 21.345	93.34	0.0001
Adjuvant Treatment <i>CT</i>	14.665	1.746	0.013	1.334	24.846	0.001

Table 3. Cox proportional hazard model analysis of the survival time in a cohort of 51 patients with metastatic disease

Variable	Coefficient	Standard error	P value
CT-scan tumor response	0.543	0.207	0.001
CT+IO	0.448	0.190	0.01
HA (ng/μg) in 7% saline	0.130	0.055	0.02

Table 4. Sputum hyaluronan (HA) levels stratified among groups

	Sputum HA collected in 7% NaCl (ng/mg)	Sputum HA collected in 3% NaCl (ng/mg)
Group		
Cancer patients (N = 84)	191.52 ± 48.26 ^{§*#}	73.25 ± 27.67 ^{**}
Healthy volunteers (only 7% NaCl) (N = 52)	13.85 ± 4.10	
Cancer-free patients (only 7% NaCl) (N = 19)	85.01 ± 42.73	

Figure 1

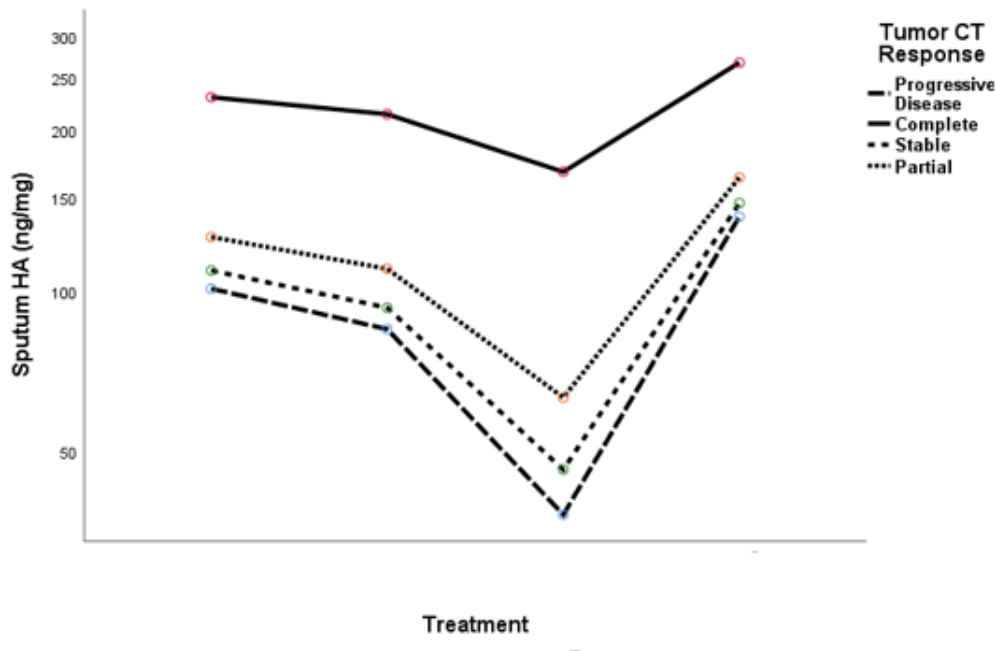


Figure 2

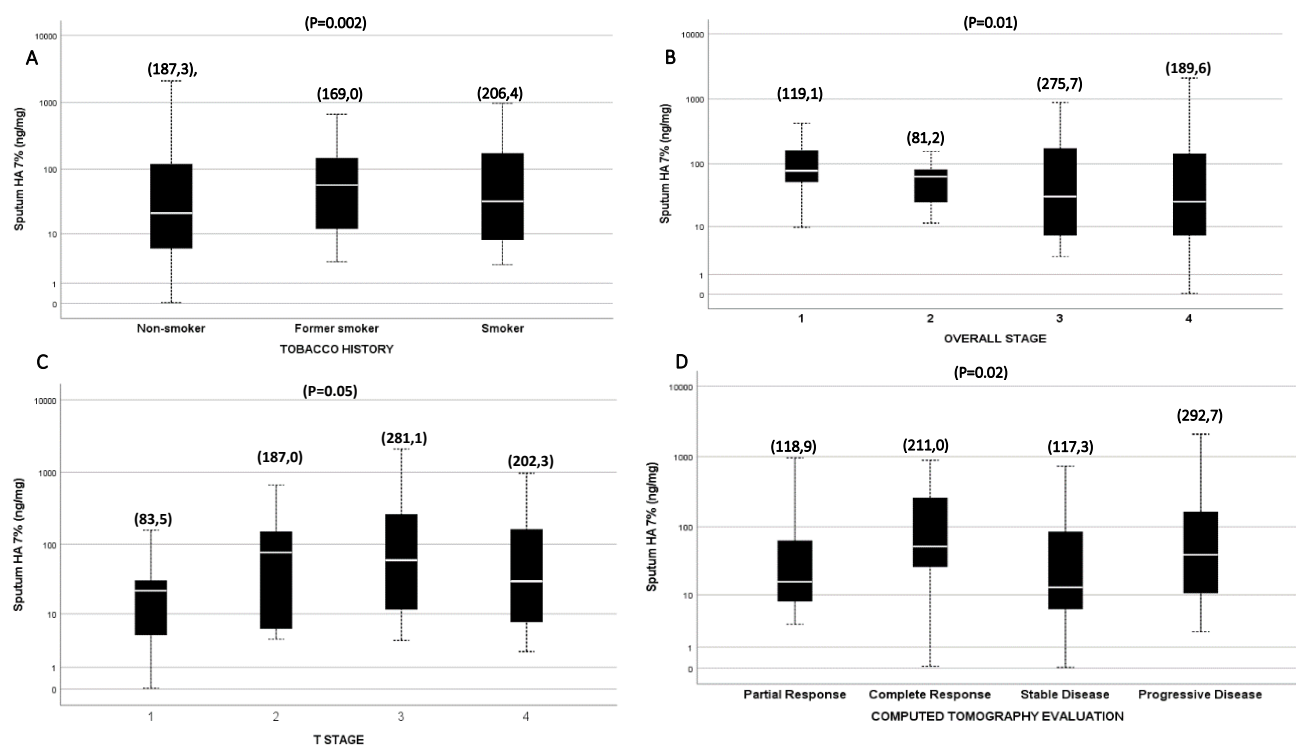


Figure 3

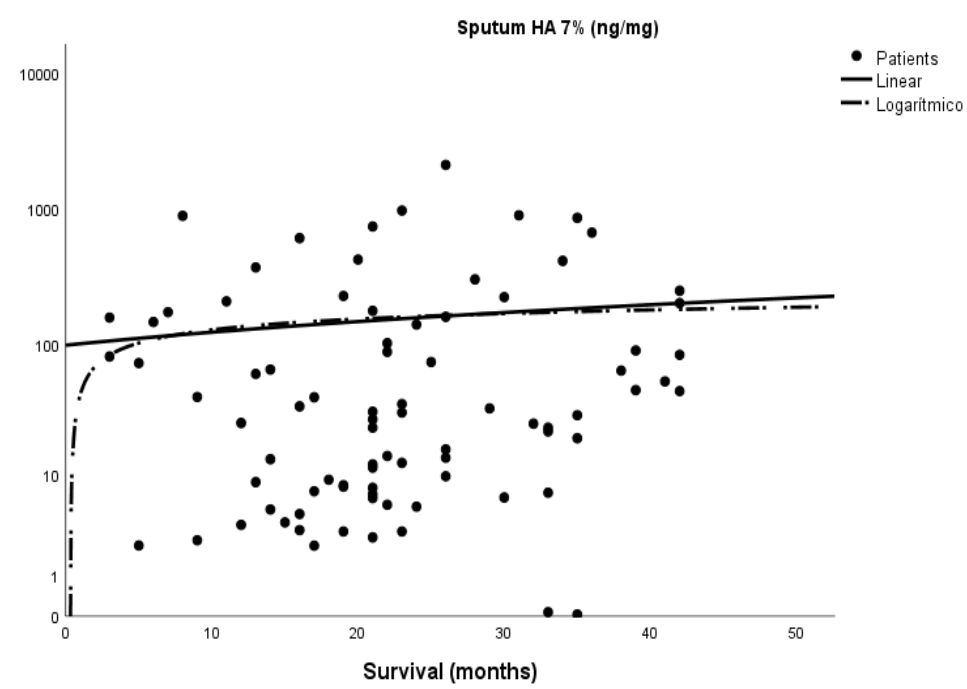


Figure 4

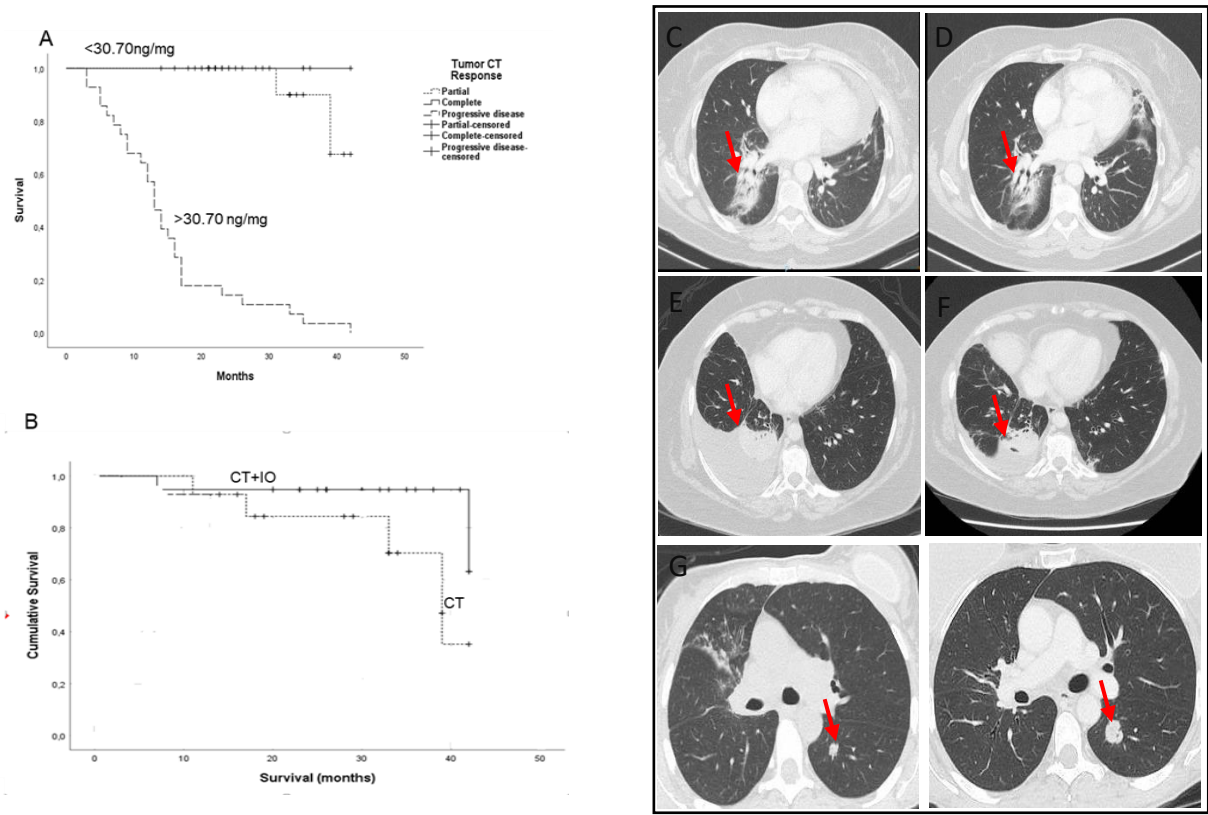


Figure 5

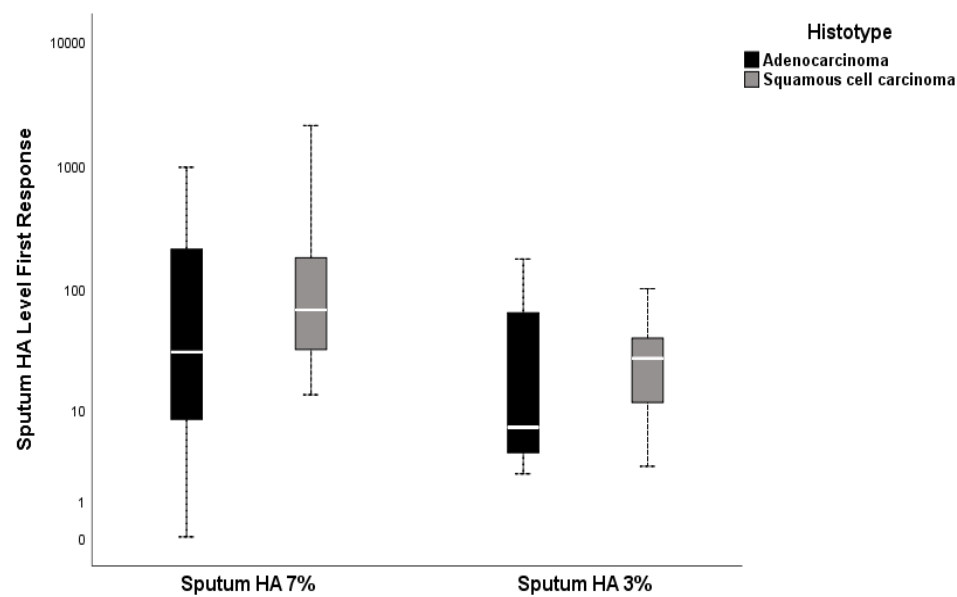
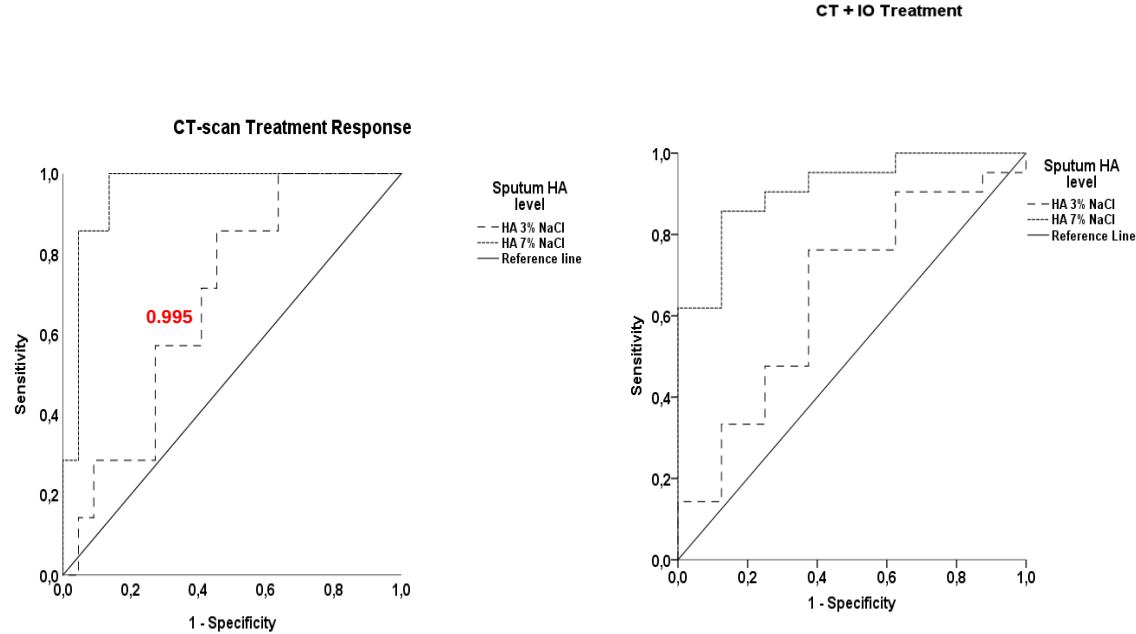


Figure 6



Apêndice 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido-TCLE



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PARTICIPANTE:

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M () F ()

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº

APTO:BAIRRO:CIDADE:

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

.....

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

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M () F ()

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº

APTO:BAIRRO:CIDADE:.....

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

II-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

DETECÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO, COFILINA-1 E MUTAÇÕES EM BIÓPSIA LÍQUIDA DE ESCARRO COMO RASTREAMENTO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Dra. Dirce Maria Carraro

Centro Internacional de pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center (CIPE) - São Paulo.

3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS

- Dra Vanessa Karen de Sá– A.C.Camargo Cancer Center/CIPE
- Dr. Helano Carioca Freitas – A.C.Camargo Cancer Center/Oncologia
- Dr. Vladimir Lima (Hospital-A.C.Camargo Cancer Center/Oncologia
- Dra. Elisa Napolitano, Ferreira-A.C.Camargo Cancer Center/CIPE

4. DURAÇÃO DA PESQUISA:

48 meses

III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa chamado **“Detecção de ácido hialurônico, cofilina-1 e mutações em biópsia líquida de escarro como rastreamento de pacientes com câncer de pulmão”**, no A.C.Camargo Cancer Center.

As coletas de escarro serão feitas nos seguintes momentos: a) após a confirmação do diagnóstico b) 60 dias após o início do primeiro ciclo de quimioterapia ou radioterapia previsto para 4-8 semanas; c) 60 dias após o término da quimioterapia ou radioterapia e d) 180 dias após o término da quimioterapia ou radioterapia, ou no momento da recidiva tumoral (se o tumor voltar a crescer). Todas as coletas serão realizadas em consultório pelo médico ou auxiliar de enfermagem, somente nos dias em que vier ao hospital por procedimentos de rotina (consulta ou retorno), não havendo necessidade de retornar ao hospital apenas para a realização do protocolo de pesquisa.

IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

No mundo todo há um esforço para identificar métodos para o diagnóstico precoce do câncer de pulmão, com isso tentando aumentar as chances de cura dos pacientes. Acredita-se que níveis diferentes de duas substâncias chamadas: ácido hialurônico e cofilina-1, no escarro podem auxiliar no diagnóstico de uma forma mais precoce. Por isso, você está sendo convidado (a) a participar deste estudo. Os pesquisadores envolvidos vão estudar, no seu escarro, a existência e o nível dessas substâncias.

V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

Atualmente, quando o médico vai decidir qual o melhor tratamento para um paciente, ele leva em consideração o estado de saúde do paciente e o tamanho da doença. Entretanto, nos últimos anos, vários estudos vêm mostrando que existem outras características, que podem ser analisadas em pedaços do câncer ou em células provenientes do pulmão, e que podem ajudar a entender melhor o desenvolvimento da doença e detectar o câncer em estágios iniciais. Estas características do tumor são chamadas “características moleculares” porque são modificações que ocorrem em moléculas, dentro das células do câncer.

O objetivo desta pesquisa é investigar se essas “características moleculares” podem ser detectadas no escarro em estágios iniciais do câncer de pulmão e também após a recidiva (retorno) do tumor após o tratamento da doença.

VI – DESENHO DA PESQUISA

- Serão selecionados aproximadamente 100 pacientes com câncer de pulmão provenientes do A.C.Camargo Cancer Center.

Todas as coletas serão realizadas em consultório pelo médico ou auxiliar de enfermagem, somente nos dias em que vier ao hospital por procedimentos de rotina (consulta ou retorno), nos seguintes momentos: a) após a confirmação do diagnóstico b) 60 dias após o início do primeiro ciclo de quimioterapia ou radioterapia previsto para 4-8 semanas; c) 60 dias após o término da quimioterapia ou radioterapia e d) 180 dias após o término da quimioterapia ou radioterapia, ou no momento da recidiva tumoral (se o tumor voltar a crescer).

Não haverá necessidade de retornar ao hospital apenas para a realização do protocolo de pesquisa.

VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Neste estudo, você não receberá nenhum tratamento experimental. Com a sua autorização, será realizado uma coleta de escarro e o material será utilizado para as análises. Após a assinatura do termo, o senhor será submetido a até 3 inalações com soro fisiológico, com duração máxima de 7 minutos cada uma, para a indução do escarro com o auxílio do aparelho de inalação. Durante o procedimento de indução haverá sempre a presença de um médico ou enfermeiro.

Após cada inalação, o senhor será orientado a enxaguar a boca, assoar o nariz e o escarro será colhido em recipiente estéril próprio e armazenado em isopor contendo gelo picado até a separação. Após a coleta, o escarro será separado da saliva e o material será armazenado em tubos a -80°C até o momento de análise.

As amostras coletadas serão processadas e armazenadas pelo Banco de Macromoléculas do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, e o excedente não utilizado por este projeto de pesquisa poderá ser utilizado em outros projetos no futuro, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição. Os pesquisadores do estudo vão procurar, no escarro coletado, a presença de algumas substâncias que podem ter se modificado com o desenvolvimento de sua doença. O material utilizado não comprometerá o andamento de outros exames da rotina realizados para seu tratamento.

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

Durante as inalações, você poderá sentir a boca seca, aumento de produção da saliva (cuspe) e enjôo. Esses sintomas podem ser evitados lavando a boca com água. Pode acontecer tosse, leve falta de ar e chiado no peito, mas geralmente esses efeitos são passageiros.

Os pesquisadores envolvidos se comprometem a preservar seus dados de identificação pessoal. No entanto, não podemos excluir totalmente o risco da perda de sigilo das suas informações.

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Não haverá benefícios aos participantes do estudo. Os benefícios serão indiretos através da contribuição na identificação de novos biomarcadores para detecção precoce e recidiva (retorno) da doença.

X - CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade (sigilo) de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica e do Comitê de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

XI - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que você tem direito. Ao assinar este formulário de consentimento você não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais.

XII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O pesquisador e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. **TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE DÚVIDA SOBRE O ESTUDO:** (011) 2189-5000 – ramal: 5023, entrar em contato com Dra. Vanessa Karen de Sá ou Dra. Dirce Carraro; ramal: 2765, entrar em contato com Dr. Helano Freitas

XIII. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

As amostras coletadas serão processadas pelo Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. O excedente, não utilizado por este projeto de pesquisa, poderá ser descartado ou, se autorizado pelo participante, ser armazenado e utilizado em outros projetos, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, e quando necessário, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Dependendo da escolha do participante, poderá ser ou não necessária a assinatura de novo TCLE. Para isso, pedimos que o (a) senhor (a) escolha uma das seguintes opções quanto ao armazenamento de sua amostra biológica:

- () Autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa.
- () Não autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa. Desta forma, compreendo que o excedente será inutilizado pelo Biobanco da instituição.

Em caso da utilização das suas amostras em outras pesquisas, favor assinalar uma das seguintes opções:

- () Quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa realizada no A.C. Camargo Cancer Center.
- () Não quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa no A.C. Camargo Cancer Center. Portanto, concordo que este TCLE, uma vez assinado, valerá também para os demais protocolos de pesquisa.

Em casos de óbito ou condições incapacitantes, o (a) senhor (a) tem a possibilidade de ceder os direitos sobre sua amostra biológica armazenada aos seus sucessores ou outras pessoas de sua confiança. Para isso, pedimos que expresse a sua vontade com base nas opções abaixo:

() Cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Favor indicar ao menos 1 (um) nome de pessoa autorizada:

Nome:

Grau de Parentesco:

Telefone: ()

() Não cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Os dados fornecidos, coletados e obtidos neste protocolo de pesquisa, poderão ser utilizados em estudos futuros. A partir de seu material biológico armazenado, futuras pesquisas poderão realizar novas abordagens científicas com o intuito de, por exemplo, investigar a ocorrência de outras alterações em seu DNA. Em qualquer ocasião e a qualquer tempo, você terá o direito de acesso às informações e resultados obtidos com a utilização de seu material biológico armazenado, recebendo orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando necessário.

Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa por em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

XIII. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dr(a). Dirce Maria Carraro

Centro Internacional de pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center - São Paulo.

Telefones para contato: (11) 2189-5000 ramal 5023.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente 211 – Liberdade – São Paulo.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação

Antônio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP pelo telefone (11) 2189-5000, ramal 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas.

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O (a) senhor (a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu,.....
declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e **concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida** autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável
legal

_____/_____/_____
Data

Assinatura do responsável pela pesquisa
Dra. Dirce Maria Carraro

_____/_____/_____
Data

Apêndice 3 – Câncer de Pulmão- A.C.Camargo Cancer Center

ID	Tipo histológico	Sexo	Idade (diagnóstico)	Estadiamento Clínico
EP 001.001	Adenocarcinoma Sólido	Masculino	48	IV
EP 002.001	Carcinoma adenoescamoso	Masculino	60	IV
EP 003.001	Adenocarcinoma Sólido	Feminino	60	IIIa
EP 004.001	Tu Carcinoide Típico padrao Fusocelular	Feminino	46	I
EP 005.001	Adenocarcinoma	Feminino	83	IV
EP 006.001	Carcinoma celulas escamosas	Feminino	67	II
EP 007.001	Carcinoma neuroendocrino	Masculino	64	IV
EP 008.001	Adenocarcinoma Acinar	Masculino	65	Ia
EP 009.001	Adenocarcinoma solido	Masculino	66	IV
EP 010.001	Adenocarcinoma acinar	Feminino	68	IV
EP 011.001	Carcinoma de celulas escamosas	Feminino	59	II
EP 012.001	Adenocarcinoma lepidico	Feminino	78	IV
EP 013.001	Carcinoma epidermoide	Masculino	86	IIIB
EP 014.001	Adenocarcinoma Solido	Feminino	54	IIIA
EP 015.001	Doenca granulomatosa?	Masculino	46	?
EP 016.001	Fibrose pulmonar	Feminino	72	?
EP 017.001	Adenocarcinoma solido	Feminino	41	IV
EP 018.001	Carcinoma pequenas celulas	Feminino	72	IV
EP 019.001	Nodulos pulmonares/ segmentectomia	Feminino	68	?
EP 020.001	Adenocarcinoma Sólido	Masculino	52	IV
EP 021.001	Adenocarcinoma	Masculino	72	IV
EP 022.001	Carcinoma de celulas escamosas	Masculino	64	IV
EP 023.001	Adenoca Solido Lepidico	Feminino	62	IIIA
EP 024.001	Adenocarcinoma	Masculino	61	IV
EP 025.001	Adenoca Acinar Lepidico	Masculino	73	IV
EP 026.001	Adenocarcinoma acinar	Masculino	74	IVB
EP 027.001	Carcinoma de celulas escamosas	Masculino	59	IV
EP 028.001	Adenocarcinoma	Masculino	32	IV
EP 029.001	Adenocarcinoma lepidico	Masculino	62	IV
EP 030.001	Adenocarcinoma solido	Masculino	88	III
EP 031.001	Adenocarcinoma lepidico	Feminino	59	III
EP 032.001	Adenocarcinoma Mucinoso	Feminino	78	IV
EP 033.001	Adenoca Acinar Sólido	Masculino	46	IV
EP 034.001	Adenocarcinoma Solido	Feminino	64	IV
EP 035.001	Adenocarcinoma lepidico	Masculino	78	II
EP 036.001	Adenocarcinoma	Masculino	58	IV
EP 037.001	Adenocarcinoma lepidico	Masculino	74	IV
EP 038.001	Adenocarcinoma acinar e solido	Masculino	59	IV
EP 039.001	Adenocarcinoma acinar	Masculino	88	III
EP 040.001	Carcinoma de celulas escamosas	Masculino	48	IV
EP 041.001	Adenocarcinoma solido	Masculino	66	III
EP 042.001	Adenocarcinoma lepidico	Feminino	40	IV
EP 043.001	Adenocarcinoma solido e acinar	Feminino	57	IV
EP 044.001	Adenocarcinoma Sólido	Masculino	76	Ib
EP 045.001	Adenocarcinoma Lepidico	Masculino	88	II
EP 046.001	Adenocarcinoma Sólido	Masculino	78	IV
EP 047.001	Adenocarcinoma Lepidico	Feminino	62	Ia
EP 048.001	Carcinoma de celulas escamosas	Masculino	54	IV
EP 049.001	Carcinoma Adenoescamoso	Feminino	59	IIIa
EP 050.001	Carcinoma de pequenas células	Masculino	75	Ib
EP 051.001	Adenocarcinoma pulmonar pouco diferenciado	Feminino	52	IV
EP 052.001	Adenocarcinoma sólido	Feminino	58	IIIa
EP 053.001	Adenocarcinoma acinar	Masculino	73	IV
EP 054.001	Adenocarcinoma sólido	Masculino	64	IVa
EP 055.001	Adenocarcinoma pulmonar pouco diferenciado	Masculino	52	IV
EP 056.001	Adenocarcinoma a/e	Feminino	66	IB
EP 057.001	Adenocarcinoma acinar	Masculino	54	III
EP 058.001	Adenocarcinoma Sólido	Feminino	55	IV
EP 059.001	Adenocarcinoma acinar	Feminino	68	IV
EP 060.001	Adenocarcinoma Lepidico	Masculino	78	IV
EP 061.001	Adenocarcinoma Papilar	Masculino	73	IV
EP 062.001	Adenocarcinoma Sólido	Feminino	54	IIIB
EP 063.001	Adenocarcinoma sólido	Masculino	71	IVA
EP 066.001	Adenocarcinoma Acinar	Feminino	69	IV

Cont/ Apêndice 3

(TNM)	Metástase	Mutação	Tratamento	Tabagismo + Carga Tabágica	Data do Diagnóstico
nao finalizado	nao	ALK e EGFR	QT, RT e CX	Não	22/11/2016
nao finalizado	nao	EGFR (L861Q)	QT e RT	90 anos/maço	13/12/2016
T3N2M0	nao	Kras (Q61H)	QT e RT	45 anos/maço	13/03/2017
T1aN0M0	nao	nao	Cx	Não	01/08/2016
T4N1M1	osseo	nao	Cx	Ex tabagista (17 anos) 20 anos/maço	22/08/2014
T1N1M1	snc	nao	QT+RT	nao	20/03/2017
T3N1M1	figado	nao	nao	nao	07/04/2017
T1aN0M0	Não	KRas (G12C)	cx 2014	Ex tabagista (22 anos) 20 anos/maço	28/11/2014
T2N0M1	osso,pulmao	nao	QT	nao	14/04/2017
T3N1M1	ossea	EGFR (L858R)	QT	nao	11/05/2016
T3N0M0	nao	nao	QT/RT	Ex tabagista (30 anos) 10 anos/maço	07/07/2017
T4N2M1	linfonodo	EGFR	QT/IM	nao	19/08/2015
T4N0M0	nao	nao	RT	nao	09/06/2017
T2BN2M0	nao	EGFR (G719A)	QT	nao	15/05/2017
?	?	?	?	nao	?
?	?	?	?	nao	15/08/2017
T2BN2M1	pleura	nao	QT	nao	31/07/2017
T3 N1 M1	figado	nao	QT	90 anos/maço	10/05/2007
?	nao	nao	nao	Ex tabagista (7 anos) 37 anos/maço	01/09/2017
T1bN2M1b	snc	nao	RT + QT	nao	19/07/2017
T1N0M0	nao	EGFR	QT	nao	22/09/2017
T4N2M1	pleura, figado, linfonodos e ossos	nao	QT	nao	07/08/2017
T1bN2M0	nao	ALK	QT	40 anos/maço	23/09/2016
T3 N1 M1	pleura	EGFR (T790M)	QT	45 anos/maço	22/08/2014
T4 N2 M1	pleura	EGFR(L858R)	QT+Cx	nao	02/09/2015
T3N3M1b	pulmao	KRAS	QT Rt Cx	nao	15/09/2017
T3N2 M1	pulmao	nao	tratando no lcesp	nao	21/10/2017
T1N2M1	osseo, lfn, pleura	EGFR	QT	nao	10/11/2017
T2N1M1	osseo	KRAS (G12C)	QT/RT?Cx	30 anos/maço	26/02/2014
T1 N1 M0	nao	nao	Cx	22 anos/maço	14/11/2017
T4N2M0	osseo	KRAS	QT,Rt,Cx	52 anos/maço	14/07/2017
T1N2M1	figado	EGFR (L858R)	QT, Rt	nao	30/10/2017
T4N2M1	pulmo,ln,osso	ALK	Qt Rt	nao	05/03/2013
T2N2M1	lfn, pulmao	Alk	qt, rt	nao	06/02/2017
T1N0M0	nao	nao	CX	nao	16/05/2017
T4 N2 M1	pulmao	KRAS	Qt, Cx	30 anos/maço	06/10/2017
T3N1M1	osseo	KRAS	QT	80 anos/maço	04/12/2017
T3N1M1	snc e osseo	nao	QT RT	51 anos/maço	23/01/2018
T2aN3M0	nao	EGFR	RT	nao	06/11/2017
T4N2 M1	cerebro	EGFR + ALK	QT, RT	Ex tabagista (30 anos) 05 anos/maço	26/11/2012
T4N2M0	nao	EGFR	Qt, Rt	Ex tabagista (30 anos) 105 anos/maço	09/06/2016
T4N0M1	ossea/figado	EGFR	QT, RT	nao	07/03/2016
T3N2M1	ossea	nao	QT, RT	nao	20/02/2018
T2aN0M0	nao	EGFR	QT, Cx	nao	14/02/2018
T2N0M0	nao	nao	Cx	Ex tabagista (15 anos) 120 anos/maço	04/05/2018
T4N1M1	pleura	EGFR	QT	nao	28/05/2018
T1a N0 M0	nao	nao	Cx e RT	30 anos/maço	24/04/2018
T1a N3 M1	linfonodos e pleura	nao	QT	nao	30/05/2018
T3 N2 M0	nao	KRAS	QT, RT	28 anos/maço	18/07/2018
T2a N0 M0	-----	nao	-----	90 anos/maço	18/07/2018
T4N2M1	C, adrenal, osso, derrame pleural b	nao	QT	nao	16/07/2018
T1bN2M0	LND Cervicais	ALK	QT+RT	60 anos/maço	24/07/2018
T4N1M1	pulmao, osso	nao	QT	60 anos/maço	01/08/2018
T3N1M1	Pleura	nao	QT	nao	12/06/2018
T4N1M1	sn e ósseo	EGFR (del exon 19)	nao	nao	02/10/2018
T2a N0 M0	nao	nao	Cx, RT	15 anos/maço	27/07/2018
T3N2M0	nao	nao	QT	nao	08/01/2019
T4N1M1	Pleura e Pulmao contralateral	KRAS	QT	42 anos/maço	22/11/2018
T4N1M1	pleura e pulmao	-----	QT	nao	23/01/2019
T4N2M1	pulmao	EGFR	QT	120 anos/maço	10/12/2018
T3N2M1	pleura, lfn	nao	Cx 09/2018	30 anos/maço	05/02/2019
T1cN3M0	nao	nao	QT	nao	09/04/2019
T1N0M1	pleura	nao	QT	46 anos/maço	16/08/2016
T2N0M1	linfo cervical	nao	Cx, RT	75 anos/maço	08/01/2019

Cont/Apêndice 3

Data 1ª Coleta	HA (ng/ug)	Data 2ª Coleta	Resposta Terapêutica	HA (ng/ug)	Situação atual (vivo/morto)	Sobrevida/meses
25/11/2016	não dosado	nao	Não	nao	24/04/2017	05 meses
22/12/2016	71.8	nao	Não	nao	28/04/2017	05 meses
20/03/2017	44.3	18/01/2018	progressao	19.6	vivo	18 meses
29/03/2017	82,8	nao	nao	nao	vivo	26 meses
30/03/2017	247.1	nao	nao	nao	vivo	27 meses
30/03/2017	156.5	nao	nao	nao	30/06/2017	3 meses
13/04/2017	35.4	nao	nao	nao	?	?
18/04/2017	nao dosado	04/02/2019	estavel	4.1	vivo	28 meses
29/05/2017	89.1	nao	nao	nao	vivo	17 meses
31/05/2017	45.1	23/04/2018	progressao	83.5	vivo	16 meses
06/06/2017	63.1	nao	nao	nao	vivo	14 meses
07/03/2017	200.1	15/01/2019	parcial	3.4	vivo	24 meses
03/07/2017	883.1	nao	estavel	nao	26/02/2018	8 meses
24/07/2017	nao dosado	17/10/2018	progressao	nao dosado	vivo	16 meses
03/08/2017	604.3	nao	nao	nao	?	?
15/08/2017	13.3	nao	nao	nao	?	?
21/08/2017	nao dosado	06/04/2018	parcial	25.2	vivo	14 meses
24/08/2017	59.6	nao	nao	nao	?	120 meses
01/09/2017	663.6	nao	nao	nao	?	?
04/09/2017	0.03	nao	nao	nao	vivo	14 meses
22/09/2017	19.4	nao	nao	nao	vivo	12 meses
25/09/2017	29.1	16/01/2019	estavel	2.2	vivo	17 meses
25/09/2017	852.5	27/11/2018	parcial	4.3	vivo	24 meses
26/09/2017	nao dosado	10/10/2018	estavel	9.5	vivo	48 meses
26/09/2017	nao dosado	nao	nao	nao	21/05/2018	32 meses
11/10/2017	410.6	17/12/2018	estavel	5.3	vivo	1 mes
26/10/2017	2092.9	nao	nao	nao	?	?
10/11/2017	0.9	nao	nao	nao	vivo	11 meses
17/11/2017	21.9	10/10/2018	estavel	9.7	?	56 meses
17/11/2017	37.9	25/11/2019	estavel		vivo	28 meses
21/11/2017	7.1	01/03/2019	estavel		vivo	4 meses
21/11/2017	0.07	nao	nao	nao	vivo	12 meses
28/11/2017	0.007	nao	nao	nao	06/05/2019	67 meses
15/12/2017	nao dosado	23/04/2019	estavel		vivo	20 meses
21/12/2017	25	nao	nao	nao	vivo	30 meses
03/01/2018	nao dosado	28/11/2018	estavel	2.6	vivo	12meses
04/01/2018	3.1	10/09/2018	estavel	3.3	vivo	11mese
02/02/2018	221.8	29/11/2018	parcial	15.1	vivo	21 meses
19/02/2018	6.4	nao	nao	nao	vivo	11 meses
22/02/2018	206.4	08/10/2018	parcial	5.7	10/01/2019	71 meses
07/03/2018	0.0001	01/11/2018	progressao	5.1	vivo	28 meses
06/04/2018	nao dosado	18/12/2018	estavel	9.1	vivo	31 meses
23/04/2018	0.001	16/11/2018	progressao	11.1	vivo	9 meses
13/06/2018	158.6	14/05/2019	estável		vivo	8 meses
13/06/2018	80.4	nao	nao	nao	12/08/2018	3 meses
14/06/2018	13.6	nao	nao	nao	vivo	1 mes
29/06/2018	0.009	12/02/2020	estavel		vivo	02 meses
07/06/2018	0.01	13/02/2019	estavel	12.9	vivo	6 meses
18/07/2018	171.6	nao	nao	nao	18/03/2019	0 meses
18/07/2018	73.1	nao	nao	nao	vivo	0 meses
10/09/2018	8.7	nao	nao	nao	vivo	2 meses
11/09/2018	30.5	17/04/2019	progressao		vivo	2 meses
19/09/2018	965.1	08/03/2019	estável		vivo	2 meses
21/09/2018	0.02	08/02/2019	estavel	6.2	vivo	4 meses
12/11/2018	6.9	nao	nao	nao	vivo	1 mes
04/12/2018	419.7	nao	novo primario	nao	vivo	5 meses
08/01/2019	8.2	07/08/2019	parcial	0.1	vivo	0 meses
16/01/2019	226.1	nao	recem diagnosticado	nao	vivo	2 meses
23/01/2019	3.2	03/05/2019	parcial		vivo	5 meses
23/01/2019	0.002	27/01/2020	estavel		vivo	01 mes
15/02/2019	9.1	10/08/2019	completa		vivo	10 dias
16/04/2019	0.005	19/02/2020	parcial		vivo	7 dias
22/04/2019	3.3	30/01/2020	completa		vivo	32 meses
13/06/2019	5.1	13/09/2019	estavel		vivo	5 meses

Apêndice 4 – Grupo Saudável – A.C.Camargo Cancer Center

ID	Data da Coleta	Sexo	Idade	Tabagismo
LDCT 001.001	28/07/2017	Feminino	48	90 anos/maço
LDCT 002.001	28/07/2017	Feminino	58	40 anos/maço
LDCT 003.001	01/02/2018	Feminino	65	125 anos/maço
LDCT 004.001	11/08/2017	Masculino	60	30 anos/maço
LDCT 005.001	16/08/2017	Masculino	71	25 anos/maço
LDCT 006.001	30/08/2017	Feminino	58	45 anos/maço
LDCT 007.001	30/08/2017	Masculino	66	24 anos/maço
LDCT 008.001	12/04/2018	Feminino	57	40 anos/maço
CRTL 002.001	01/09/2017	Feminino	55	60 anos/maço
CRTL 003.001	25/07/2018	Masculino	71	Não
CRTL 004.001	26/07/2018	Masculino	44	Não
CRTL 005.001	03/08/2018	Masculino	25	Não
CRTL 006.001	07/08/2018	Feminino	62	Não
CRTL 007.001	08/08/2018	Masculino	86	Não
CRTL 008.001	22/08/2018	Feminino	58	Não
CRTL 009.001	29/08/2018	Feminino	47	Não
CRTL 010.001	29/08/2018	Feminino	48	Não
CRTL 011.001	31/08/2018	Masculino	32	Não
CRTL 012.001	31/08/2018	Feminino	52	Não
CRTL 013.001	11/09/2018	Masculino	61	Não
CRTL 014.001	18/09/2018	Feminino	39	Não
CRTL 015.001	28/09/2018	Feminino	48	Não
CRTL 016.001	28/09/2018	Feminino	65	Não
CRTL 017.001	30/11/2018	Masculino	38	Não
CRTL 018.001	04/12/2018	Feminino	58	Não
CRTL 019.001	13/12/2018	Masculino	40	Não
CRTL 020.001	13/12/2018	Masculino	64	Não
CRTL 021.001	10/01/2019	Masculino	58	Não
CRTL 022.001	10/01/2019	Masculino	66	Não
CRTL 023.001	18/01/2019	Masculino	77	Ex tabagista (10 anos/maço)
CRTL 024.001	18/01/2019	Masculino	60	Não
CRTL 025.001	18/01/2019	Masculino	61	Ex tabagista (40 anos/maço)
CRTL 026.001	29/01/2019	Masculino	48	14 anos/maço
CRTL 027.001	29/01/2019	Feminino	57	40 anos/maço
CRTL 028.001	13/02/2019	Feminino	71	41 anos/maço
CRTL 029.001	11/03/2019	Masculino	68	Ex tabagista (50 anos/maço)
CRTL 030.001	11/03/2019	Feminino	38	Não
CRTL 031.001	26/04/2019	Feminino	52	Não
CRTL 032.001	30/04/2019	Masculino	44	Não
CRTL 033.001	02/08/2019	Masculino	41	Não
CRTL 034.001	02/08/2019	Feminino	41	Não
CRTL 035.001	02/08/2019	Masculino	35	Não
CRTL 036.001	02/08/2019	Masculino	33	Não
CRTL 037.001	02/08/2019	Masculino	33	Não
CRTL 038.001	02/08/2019	Masculino	41	Ex tabagista (03 anos/maço)
CRTL 039.001	22/08/2019	Feminino	47	45 anos/maço
CRTL 040.001	22/08/2019	Masculino	39	Não
CRTL 041.001	26/08/2019	Masculino	65	Ex tabagista (40 anos/maço)
CRTL 042.001	26/08/2019	Masculino	58	nao
CRTL 043.001	26/08/2019	Masculino	45	20 anos/maço
CRTL 044.001	26/08/2019	Masculino	45	nao
CRTL 045.001	26/08/2019	Masculino	47	Ex tabagista (30 anos/maço)
CRTL 046.001	12/09/2019	Feminino	37	Ex tabagista (02 anos/maço)
CRTL 047.001	12/09/19	Masculino	43	Ex tabagista (25 anos/maço)
CRTL 048.001	09/01/2020	Feminino	23	9 anos/maço
CRTL 049.001	09/01/2020	Feminino	52	105 anos/maço
CRTL 050.001	16/01/2020	Masculino	41	nao
CRTL 051.001	21/01/2020	Feminino	59	25 anos/maço
CRTL 052.001	23/01/2020	Feminino	59	105 anos/maço
CRTL 053.001	23/01/2020	Feminino	25	30 anos/maço
CRTL 054.001	23/01/2020	Masculino	54	82 anos/maço
CRTL 055.001	23/01/2020	Masculino	27	20 anos/maço
CRTL 056.001	08/03/2020	Feminino	44	nao

Apêndice 5 - Grupo DPOC – A.C.Camargo Cancer Center

ID	Data da Coleta	Sexo	IDADE	Tabagismo
DPOC 001.001	12/04/2017	Feminino	72	40 anos/maço
DPOC 002.001	24/04/2017	Feminino	47	6 maços/ano
DPOC 003.001	26/04/2017	Feminino	73	40 anos/maço
DPOC 004.001	28/06/2017	Feminino	62	40 anos/maço
DPOC 005.001	26/07/2017	Feminino	65	Não
DPOC 006.001	07/11/2018	Feminino	65	35 anos/maço
DPOC 007.001	07/11/2018	Masculino	57	90 anos/maço
DPOC 008.001	06/12/2018	Feminino	80	60 anos/maço
DPOC 009.001	06/12/2018	Masculino	64	60 anos/maço
DPOC 010.001	28/02/2019	Feminino	65	30 anos/maço
DPOC 011.001	05/06/2019	Masculino	78	50 anos/maço
DPOC 012.001	06/06/2019	Feminino	67	40 maços/ano
DPOC 013.001	13/06/2019	Masculino	62	60 maços/ano
DPOC 014.001	12/08/2019	Masculino	72	50 maços/ano
DPOC 015.001	14/08/2019	Masculino	62	90 maços/ano
DPOC 016.001	15/08/2019	Feminino	80	66 maços/ano
DPOC 017.001	16/08/2019	Masculino	62	70 maços/ano
DPOC 018.001	21/08/2019	Feminino	68	10 maços/ano

Apêndice 6- Câncer de Pulmao - Hospital de Amor de Barretos

ID tubo	Tipo histológico	Sexo	Idade (diagnóstico)	Estadiamento Clínico	Estadiamento Patológico (TNM)	Metástase	Tipo de mutação
1	adenocarcinoma sólido	Feminino	47	T2aN3M0	IIIB	nao	nao
2	adenocarcinoma a/e	Masculino	49	T2bN2M1a	IIIA	pulmao, derrame pleural e pericardico)	nao
3	adenocarcinoma sólido	Masculino	80	T4N2M1a	IVA	pulmao e pleura	nao
4	carcinoma de células escamosas	Feminino	61	T4N2M1	IVA	pleura	nao
5	carcinoma de células escamosas	Feminino	77	T4N2M0	IIIB	nao	nao
6	adenocarcinoma pouco diferenciado	Feminino	55	T1bN0M1c	IVB	SNC+suprarenal+pleura	nao
7	carcinoma de células escamosas	Masculino	57	T4N2M0	IIIB	nao	nao
8	adenocarcinoma a/e	Masculino	44	T3N2M0	IIIB	nao	KRAS
9	carcinoma de células escamosas	Masculino	54	T4N2M1	IV	pleura	nao
10	carcinoma adenoescamoso	Masculino	68	T3N2M0	IIIB	nao	nao
11	carcinoma de células escamosas	Masculino	38	T4N3M1b	IVB	osso, linfonodo e pleura	nao
12	Neuroendocrino de grandes celulas	Masculino	81	T3N0M1b	IVA	SNC	nao
13	carcinoma de células escamosas	Masculino	69	T4N0M0	IIIB	nao	nao
14	ca adenóide cistico	Feminino	58	?	?	?	nao
15	carcinoma de células escamosas	Masculino	64	T4N0M0	IIIA	nao	nao
16	Tu Carcinóide Típico	Masculino	62	T3N2M0	IV	nao	nao
17	adenocarcinoma a/e	Feminino	77	T2N2M1a	IVA	pulmao	nao
18	carcinoma adenoescamoso	Feminino	66	T1BN3M0	IIIB	nao	nao
19	adenocarcinoma sólido	Masculino	68	T4N3M0	IIIC	nao	nao
20	carcinoma de células escamosas	Masculino	64	T4N2M0	IIIB	nao	nao
21	adenocarcinoma	Feminino	65	T3N0M1b	IVA	pleura+ parede toracica	nao
22	adenocarcinoma a/e	Feminino	61	T2N0M1a	IVa	pleura	nao
23	carcinoma de células escamosas	Feminino	64	T3N0M0	IIB	nao	nao
24	neuroendocrino de grandes celulas	Masculino	63	T4N2M0	IIIC	nao	nao
25	adenocarcinoma a/e	Masculino	66	T4N0M1c	IVB	pulmao +axila	nao
26	adenocarcinoma a/e	Masculino	34	T4N3M1a	IVa	pulmao	alk?
27	carcinoma de células escamosas	Masculino	79	T1cN0M1a	IVA	pulmao	nao
28	carcinoma de célula escamosas	Masculino	75	T3N0M1c	IVB	osso, figado e rim	nao
29	adenocarcinoma acinar	Feminino	67	T4N3M1c	IVB	figado, osseo , pulmao e pleura	EGFR (del19)

Cont/ Apêndice 6

Tratamento	Tabagismo + Maços/Ano	Resposta Terapêutica	Data do Diagnóstico	Data 1° Coleta	Data 2° Coleta	Sobrevida/meses	Situação atual (vivo/morto)
RT+QT	Ex tabagista (18 anos/maço)	parcial	24/04/2018	31/07/2018	24/04/2019	3 meses	vivo
QT+RT	9 anos/maço	parcial	16/07/2018	01/08/2018	09/11/2018	1 mes	morto
QT	Ex tabagista (18 anos/maço)	estavel	29/06/2018	07/08/2018	14/11/2018	2 meses	morto
QT	41 anos/maço	estavel	06/06/2018	15/08/2018	09/02/2019	2 meses	morto
QT+RT	Ex tabagista (50 anos/maço)	progressao	20/06/2018	21/08/2018	01/02/2019	8 meses	morto
QT+RT	17 anos/maço	estavel	14/08/2018	22/08/2018	07/11/2018	8 dias	morto
QT+RT+Cx	42 anos/maço	parcial	04/06/2018	04/09/2018	13/11/2018	3 meses	morto
QT+RT	26 anos/maço	estavel	03/08/2018	18/09/2018	14/12/2018	1 mes	vivo
QT	Ex tabagista (80 anos/maço)	parcial	20/08/2018	20/09/2018	04/12/2018	1 mes	vivo
QT+RT	105 maços/ano	estavel	15/06/2018	09/10/2018	11/02/2018	4 meses	vivo
QT + RT	90 maços/ano	estavel	03/09/2018	10/10/2018	07/02/2019	1 mes	morto
RT+QT	28 maços/ano	progressao	24/08/2018	11/10/2018	progressao	2 meses	vivo
QT+RT	49 maços ano	sem avaliação	08/08/2018	23/10/2018	não	3 meses	morto
Cx+RT	nao	progressao	16/07/2018	31/10/2018	27/02/2019	3 meses	morto
QT+RT	25 anos/maço	óbito	03/09/2018	06/11/2018	não	5 meses	morto
RT	Ex tabagista (20 anos/maço)	não	25/07/2018	29/11/2018	não	4 meses	morto
QT	nao	estavel	29/10/2018	05/12/2018	15/02/2019	2 meses	vivo
QT	144 anos/maço	não	27/08/2018	12/12/2018	não	4 meses	morto
QT+RT	160 anos/maço	parcial	10/10/2018	27/12/2018	14/03/2019	2 meses	vivo
QT+RT	96 anos/maço	não	18/01/2019	05/02/2019	não	1 mes	vivo
QT	02 anos/maço	não	18/01/2019	19/03/2019	não	2 meses	vivo
QT	Ex tabagista (07 anos/maço)	não	27/02/2019	19/03/2019	não	2 meses	morto
QT+RT	47 anosmaço	não	07/01/2019	20/03/2019	não	2 meses	vivo
QT	90 anos/maço	não	30/11/2018	21/03/2019	não	4 meses	vivo
QT	50 anos/maço	não	30/01/2019	26/03/2019	não	2 meses	vivo
QT+RT	nao	não	25/01/2019	26/03/2019	não	2 meses	vivo
QT	32 anos/maço	não	28/01/2019	28/03/2019	não	3 meses	vivo
QT	100 anos/maço	-----	13/02/2019	28/03/2019	não	1 mes	morto
QT	nao	-----	25/01/2019	28/03/2019	não	2 meses	vivo

Apêndice 7 – Lista de Soluções

PBS – *Phosphate buffer saline* 0,1M - (NaCl 137mM; Na₂HPO₄ 15,22mM e KH₂PO₄ 1,5mM e KCL 2,7mM em pH 7,4);

Solução de Coating – (0,06M NaHCO₃, 0,5 g/L azida sódica, pH 9,6);

Solução de Lavagem – (0,05M TRIS-HCL, 0,15M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,0074 g/L EDTA III, 0,5 g/L azida sódica, pH 7,75);

Solução de Revelação – (*enhancement solution*, Perkin-Elmer Life Sciences-Wallac Oy, Turku, Finland);

Solução de Bloqueio – (albumina bovina 1%, 0,05M TRIS-HCL, 0,15M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,0074 g/L azida sódica, pH 7,75);

Solução de Diluição das amostras com PL marcada e da streptavidina conjugada com európio - (albumina bovina 1%, 0,05M TRIS-HCL, 0,15M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,0074 g/L EDTA III, 0,5 g/L azida sódica, pH 7,75).