

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Identificação de potenciais marcadores glicosídicos associados a alterações
malignas em pulmão.

Andreia Sofia Mendes

Dissertação
Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2012

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Identificação de potenciais marcadores glicosídicos associados a alterações
malignas em pulmão.

Andreia Sofia Mendes

Dissertação
Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Orientadores: Prof^ª. Doutora Paula Videira (FCM/UNL)

Prof^ª. Doutora Rita Zilhão (FC/UL)

2012

AGRADECIMENTOS

Uma dissertação, apesar do processo solitário a que qualquer investigador está destinado, reúne contributos de várias pessoas. É a solidão no meio de multidão!

Felizmente, contei com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas e sem o seu contributo esta investigação não teria sido possível.

Por isso, não posso deixar de expressar o meu agradecimento não só ao Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas, em geral por me receber no seu laboratório, mas em particular e em especial à Professora Doutora Paula Videira, pela oportunidade oferecida, por acreditar no meu potencial, pela amizade e pelo apoio no âmbito desta dissertação.

À Doutora Guadalupe Cabral, à Doutora Zélia Silva, à Mestre Mariana Silva, ao Mestre Paulo Severino e ao Dr. Hélio Crespo pela disponibilidade, amizade e ajuda prestadas no decorrer deste trabalho. À Mestre Mylène Carrascal pelas conversas e passeios de fim de dia que muito ajudaram a relaxar.

Aos restantes membros do Departamento de Imunologia, em especial à Dra. Manuela Correia pela amizade e ajuda prestada, à Dra. Catarina Martins pelo auxílio na Citometria de Fluxo, à D. Glória, D. Luísa, D. Idalina e D. Amélia, pela simpatia e disponibilidade. À D. Elisabete e D. Filomena, pela boa disposição e companhia.

Quero dar um agradecimento especial ao Dr. Dário Ligeiro. Não foi só um precioso auxílio a nível profissional disposto a receber-me no laboratório de Genética Molecular do Centro de Histocompatibilidade do Sul longas horas mas também pessoal. É nas alturas difíceis que as pessoas revelam o seu bom carácter e humanidade.

Não posso deixar um agradecimento especial também ao Doutor António Bugalho, responsável pela colheita das amostras mas também um grande apoio profissional e pessoal. Incansável no esclarecimento de dúvidas clínicas que tudo fez para que o desenvolvimento e concretização deste projeto fosse conseguido.

Agradeço ao Professor Pi-Wan Cheng, *University of Nebraska Medical Center*, Estados Unidos da América, pela cedência das linhas celulares imprescindíveis à elaboração deste trabalho.

Agradeço ao Doutor Jörg Becker por me ter recebido no Instituto Gulbenkian da Ciência e pelas preciosas explicações sobre análise de dados e uso do software de microarrays.

Agradeço ao Professor Pedro Baptista por me ter recebido incondicionalmente no Departamento de Ciências da Vida de Universidade Nova de Lisboa para uso do *speed vacuum*.

Agradeço à Doutora Sara Dias pela disponibilidade e valiosas informações sobre estatística e uso de software para análise de dados.

Quero agradecer em especial e do fundo do coração ao meu adorado pai, Carlos Mendes. Sem o seu auxílio e apoio teria sido impossível prosseguir nos bons e maus momentos, que foram muitos e tortuosos. É preciso um amor incondicional para suportar os maus humores e as más disposições que surgem ao longo do tempo.

Aos meus amigos, especialmente ao Fausto que mesmo à distância teve sempre palavras sábias e motivadoras nas horas de maior *stress*, à Ana, à Andrea e à Carla que também ajudaram a tornar mais leve o pesado fardo do humor que resulta do cansaço, ao Pedro que é possuidor da 'arte mágica' de me fazer rir em todas as horas.

RESUMO

O Cancro de Pulmão (CP) está entre as principais causas de morte no mundo representando 15% de todos os cancros.

Há quatro tipos mais comuns de CP e sabe-se que apresentam comportamento e agressividade distintos. A expressão de glicosilação aberrante por parte das células de CP tem sido descrita. Contudo a sua correlação com o prognóstico clínico e agressividade da doença ainda não está esclarecida.

Este estudo teve como objetivo geral contribuir para a identificação de novos marcadores de prognóstico de CP. Em particular, neste trabalho pretendeu-se:

Estabelecer um biobanco de vários tipos de amostras de tecido provenientes de doentes com CP,

Estabelecer ensaios piloto com vista à validação do biobanco e à otimização de protocolos de estudo da expressão genética no tipo de amostras, que compõem o biobanco,

Analisar modelos celulares para estabelecer uma correlação entre a expressão de determinados genes e a expressão de estruturas glicosídicas.

O biobanco estabelecido consistiu em 58 amostras de aspirados ganglionares, 105 amostras de líquido pleural e amostras de tecido de tumor e tecido sem tumor de 43 doentes submetidos a biopsia.

Em termos de expressão genética, verificou-se significativas alterações da expressão de genes envolvidos na expressão de estruturas glicosídicas, nomeadamente estruturas contendo o açúcar fucose e de genes envolvidos na resposta inflamatória.

Presume-se que quando for possível reunir a totalidade dos dados clínicos, tais como estadiamento e tempo de vida, em conjunto com as análises dos diversos tipos de amostras seja possível encontrar diferenças significativas na expressão dos genes e que estas diferenças contribuam para estabelecer um valor prognóstico em doentes com cancro de pulmão.

Palavras-Chave

Glicosilação

Antígenos associados a tumores

Cancro de pulmão

Adenocarcinoma

ABSTRACT

Lung cancer (LC) is among the leading causes of death in the world representing 15% of all cancers.

There are four common types of LC and it is known that exhibit different behavior and aggressiveness. The aberrant glycosylation expression on the part of LC cells has been described. However its correlation with clinical prognosis and aggressiveness of the disease is not yet clarified.

This study had as general goal to contribute for the identification of new prognostic markers of LC, in particular, this study was intended to:

Establish a biobank of various types of tissue samples from patients with LC,

Establish pilot studies for the biobank validation and optimization study protocols of gene expression in type of samples, which make up the biobank,

Analyze cellular models to establish a correlation between the expression of certain genes and expression of glycosidic linkages.

The biobank established consisted of 58 samples of lymph nodes aspirates, 105 pleural effusion samples and tumor tissue samples and tumor free tissue of 43 patients undergoing biopsy.

In terms of gene expression, there have been significant changes in the expression of genes involved in the expression of glycosidic structures, including structures containing sugar fucose and genes involved in the inflammatory response.

It is assumed that when possible to gather all of the clinical data, such as staging and lifetime, together with analyses of various types of samples, is possible to find significant differences in gene expression.

These differences will contribute to establish a prognostic value in patients with lung cancer.

Keywords

Glycosylation

tumour-associated carbohydrate antigens

Lung cancer

Adenocarcinome

ABREVIATURAS

Alguns dos termos técnicos e nomes com origem na língua inglesa são utilizados no decorrer do texto, não tendo sido traduzidos por fazerem parte do glossário científico estabelecido na literatura científica universal. São também usados excepcionalmente alguns estrangeirismos, como por exemplo mantendo-se o termo RNA.

Português		Inglês	
Abreviatura	Nome Completo	Abreviatura	Nome Completo
-	Carcinoma epidermóide	SCC	Squamous cell lung cancer
AD	Adenocarcinoma	AD	Adenocarcinoma
CEA	Antigénio carcinoembrionário	CEA	Carcinoembryonic antigen
CP	Cancro de pulmão	LC	Lung cancer
CPNPC	Cancro pulmão de não-pequenas células	NSCLC	Non-small cell lung cancer
CPPC	Cancro pulmão de pequenas células	SCLC	Small cell lung cancer
DC	Células dendríticas	DC	Dendritic cells
EpCAM	Molécula epitelial de adesão celular	EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
IL-6	Interleucina 6	IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleucina 10	IL-10	Interleukin 10
LPM	Líquido pleural maligno	MPE	Malignant pleural effusion
IFM	Intensidade de fluorescência média	MFI	Mean fluorescence intensity
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa	qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
sLe ^a	sialil Lewis a	sLe ^a	sialyl Lewis a
sLe ^x	sialil Lewis x	sLe ^x	sialyl Lewis x
TACA	Antigénios carboidratos associados a tumores	TACA	Tumor-associated carbohydrate antigens
TGF- β	-	TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	-	TNF- α	Tumour Necrose Factor alpha

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Glicosilação & Glicoproteínas	1
1.1.1. <i>N</i> -Glicanos	1
1.1.2. <i>O</i> -Glicanos	2
1.2. Glicosilação Tumoral	3
1.2.1. Antígenos de Lewis	4
1.3. O Cancro de Pulmão	5
1.3.1. Epidemiologia.....	5
1.3.2. Tipos Histológicos	5
1.4. Amostras de Origem Biológica	6
1.4.1. Aspirados Ganglionares	6
1.4.2. Líquido Pleural	7
1.4.3. Tecidos	7
1.5. Âmbito da Tese	7
2. Materiais & Métodos	9
2.1. Microarrays	9
2.2. Cultura Celulares	9
2.3. Amostras Biológicas	10
2.3.1. Amostras de Aspirados Ganglionares	10
2.3.2. Amostras de Líquido Pleural.....	11
2.3.3. Amostras de Tecidos.....	11
2.4. Técnicas	12
2.4.1. Citometria de Fluxo	12
2.4.2. Extração de RNA Total.....	12
2.4.3. DNA complementar	13
2.4.4. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa	13
2.5. Estatística.....	17

3. Resultados	18
3.1. Construção de biobancos	18
3.2. Modelo teórico de expressão genética no cancro de pulmão.....	18
3.3. Análise do fenótipo e dos perfis de expressão genética no modelo celular	20
3.3.1. A análise do fenótipo às células das linhas celulares	20
3.3.2. A análise da expressão genética das linhas celulares	21
3.4. O estudo piloto	22
3.4.1. Caracterização da população que constituiu as amostras de aspirados ganglionares	22
3.4.2. A citometria de fluxo às amostras de aspirados ganglionares	23
3.4.3. A expressão genética das amostras de aspirados ganglionares	24
4. Discussão	28
4.1. Os genes responsáveis pela expressão de marcadores tumorais exibem expressão aumentada nas amostras tumorais relativamente ao grupo controlo	28
4.2. Os genes envolvidos na resposta imune são citocinas e apresentam correlação estatística no grupo controlo e no grupo adenocarcinoma	30
4.3. A expressão genética dos antígenos de Lewis mostrou haver correlação entre FUT3 e FUT6 mas não com FUT4.....	31
4.4. O recetor de células dendríticas, DC209	33
5. Conclusão e perspectivas futuras	34
6. Bibliografia	35

Anexos

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das vias de biossíntese dos O-glicanos do tipo mucina	3
Figura 2. Representação esquemática da biossíntese dos antígenos Lewis	4
Figura 3. Representação gráfica dos valores de expressão genética de em microarrays ...	19
Figura 4. Representação gráfica dos valores de intensidade de fluorescência média obtidos por citometria de fluxo das linhas celulares	20
Figura 5. Representação gráfica e quantitativa dos valores de expressão genética de linhas celulares.....	22
Figura 6. Representação gráfica e quantitativa da distribuição dos casos de amostras clínicas de carcinoma pulmonar e de controlo com referência ao número de casos e percentagem no grupo..	23
Figura 7. Representação gráfica da distribuição das idades dos doentes por grupos de doença e controlo.....	23
Figura 8. Representação gráfica da expressão genética em adenocarcinoma de pulmão e nos controlos, para cada um dos genes analisados	25

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Designação dos 4 tipos mais comuns de tumores.....	5
Tabela 2. Lista de genes analisados nas amostras biológicas de aspirados ganglionares por qPCR para determinação de expressão genética; estudo piloto.....	14
Tabela 3. Lista de genes para estudo em larga escala	15
Tabela 4. Tabela representativa dos resultados obtidos de expressão de genes por <i>microarrays</i>	19
Tabela 5. Tabela representativa dos resultados obtidos pelo teste Mann-Whitney U para a expressão de genes das amostras de aspirados ganglionares.....	24
Tabela 6. Tabela representativa dos resultados obtidos pelo teste Mann-Whitney U, para a expressão de genes das amostras de aspirados ganglionares com subdivisão entre homens e mulheres	27

1. INTRODUÇÃO

1.1. Glicosilação & Glicoproteínas

Os glicanos são tão importantes na vida de um organismo, que todas as espécies até hoje estudadas apresentam as suas superfícies decoradas pelo glicocálice, o qual é constituído por uma densa camada de glicanos e glicoconjugados. Os glicanos, em conjunto com os ácidos nucleicos, proteínas e lípidos, integram o conjunto de macromoléculas fundamentais das células ¹.

Praticamente todas as proteínas de membrana e secretadas são glicosiladas e a presença destas cadeias de carboidratos (designando-se também estas cadeias por glicanos), melhora a sua solubilidade em água, contribuí para a correta orientação da molécula, protege das protéases e participa no transporte intracelular. Por outro lado, os glicanos afetam a forma como as proteínas são reconhecidas por recetores específicos ou podem por si mesmo, ser reconhecidos por proteínas ligantes de glicanos, as lectinas. Assim será natural que a glicosilação constitua uma das modificações mais importantes nas proteínas recém-formadas ¹⁻³.

Os locais de glicosilação de uma determinada proteína, a quantidade e as estruturas glicosídicas, variam fortemente ao longo do curso de vida do organismo, da célula onde se encontram e da fase do ciclo celular ^{1,4-6}.

Uma glicoproteína define-se como uma proteína com um ou mais glicanos ligados covalentemente por ligações glicosídicas, a maioria das vezes do tipo *N*- ou *O*- ligação e na mesma proteína podem coexistir diferentes tipos de glicosilação ^{1,7}.

A biossíntese das glicoproteínas é catalisada pelas glicosiltransferases (GTs; EC 2.4.x.y), família de enzimas capazes de transferir um monossacárido a partir dos seus intermediários açúcar-nucleótidos (*substrato dador*) para uma proteína, glicano ou lípido (*substrato aceitador*) ⁵.

Devido ao elevado número e diversidade de estruturas que podem ser encontradas em células eucariotas, neste trabalho são focadas apenas os tipos de glicanos que são tema desta tese.

1.1.1. N-Glicanos

A *N*-glicosilação é das modificações pós-traducionais mais proeminentes nas células tendo um papel importante na formação de tecidos e órgãos de um organismo. Envolve muitas funções celulares, incluindo um papel funcional na adesão e mobilidade, assim como na regulação intercelular, ligação recetor-ligando, resposta imune, apoptose e patogénese de

muitas doenças. A sua expressão é essencial para as numerosas fases da progressão tumoral, modificação celular, estando associados à invasão e metastização^{1,7}.

A *N*-glicosilação inicia-se na face citosólica do Reticulo Endoplasmático (RE). São adicionados monossacarídeos ao dolicol fosfato, lípido integrante da membrana do RE, até se formar o glicano precursor, constituído geralmente por glucose (Glc), manose (Man) e *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), nomeadamente $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, que é transferido em bloco para a proteína em formação no lúmen do RE. Ocorre a ligação covalente entre o azoto do grupo amida (NH_2) da asparagina e o grupo hidroxilo (-OH) da GlcNAc.

O glicano recém-formado ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -*N*- β -Asn-X-Ser/Thr) é designado como *high-mannose type*, tal como todos os glicanos contendo pelo menos cinco resíduos de Man^{1,5,7-9}. É modificado pela adição/ remoção de monossacarídeos à medida que progridem da face *cis* para a face *trans* do complexo de Golgi para exportação. Podem ainda ser adicionados resíduos de galactose (Gal), fucose (Fuc) e ácidos siálicos (SA)^{1,2,6,10}. Para detalhes sobre a formação dos *N*-glicanos pode-se consultar Varki *et al.*, 2009¹.

1.1.2. O-Glicanos

Conhecem-se diferentes classes de *O*-glicanos, mas em organismos eucariotas superiores, a forma de glicosilação mais comum é a *O*-GalNAc, também conhecida como *O*-glicano do tipo mucina¹. Estas são glicoproteínas de elevada densidade devido ao teor rico em resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr) e sobre expressas em células tumorais.

Uma grande parte dos biomarcadores tumorais são *O*-glicanos do tipo mucina e encontram-se na maioria das secreções e na superfície das células epiteliais⁷.

As mucinas sobressaem pelo seu papel na adesão intercelular, na extravasão de leucócitos e na metástase tumoral¹¹.

A *O*-glicosilação inicia-se na face *cis* do complexo de Golgi e a adição dos monossacarídeos ao peptídeo crescente é feita de modo sequencial, mediada por glicosiltransferases específicas para cada tipo de ligação, resultando na produção de diversas estruturas principais⁶.

A primeira estrutura a ser formada é o antígeno Tn (Figura 1). A reação ocorre por intermédio do polipéptido α -*N*-acetilgalactosaminiltransferase (ppGalNAcT), que catalisa a ligação covalente do tipo α entre o grupo hidroxilo (-OH) do carbono anomérico da *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) e o grupo álcool da Ser ou da Thr, dando origem à cadeia GalNAc- α -O-Ser/Thr².

O antígeno Tn pode ser alongado de modos distintos, dependendo do resíduo que é adicionado à GalNAc e as estruturas resultantes podem ser alongadas pela adição de outros

resíduos e terminadas com resíduos de Fuc e SA, formando várias estruturas centrais (*core 1 a core 8*)^{2,6,12}.

As estruturas mais comuns *in vivo* são os O-glicanos *core 1 a core 4*, e dentro destes, a maioria são O-glicanos de *core 2*¹.

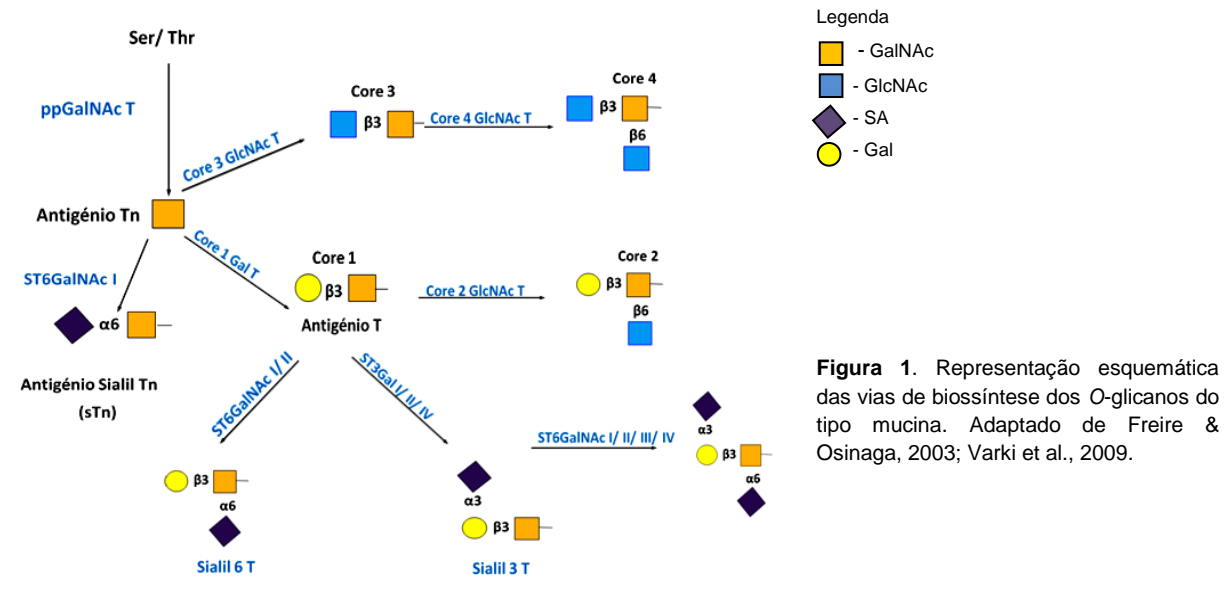


Figura 1. Representação esquemática das vias de biossíntese dos O-glicanos do tipo mucina. Adaptado de Freire & Osinaga, 2003; Varki et al., 2009.

1.2. Glicosilação Tumoral

Uma vez que os glicanos estão envolvidos em diversos processos biológicos, a sua expressão aberrante é determinante e constitui uma das primeiras etapas no processo de progressão, invasão e metastização. É por isso considerada uma alteração comum nas células tumorais^{7,11,13-17}, resultando na exposição à superfície de estruturas de antígenos carboidratos associados a tumores (*tumor-associated carbohydrate antigens; TACAs*)^{14,18,19}. Geralmente, as alterações do padrão de glicosilação mais frequentemente associadas ao desenvolvimento tumoral, consistem na síntese de glicanos altamente ramificados, fortemente sialilados (terminados por SA), terminações prematuras da biossíntese que resultam da expressão de formas incompletas (truncadas) e a expressão *de novo* de antígenos do tipo fetal ou outros.

A assinatura dos glicanos na superfície celular é instável, ao contrário do que acontece com as outras alterações associadas a tumores de origem genética, onde a expressão é clonal. A glicosilação apresenta alterações do tipo mosaico, com variação da expressão dos glicanos em secções de tecidos, refletindo variações na diferenciação ao longo da progressão do tumor.

Em muitos casos, a formação destas estruturas aberrantes, depende da alteração da regulação e expressão de uma ou mais glicosiltransferases intervenientes^{2,7}.

Contudo outros mecanismos epigenéticos estão também associados à regulação aberrante de glicogenes (genes cujos produtos estão envolvidos na biossíntese, degradação ou

reconhecimento dos glicanos) incluindo enzimas envolvidas na biossíntese de intermediários de açúcar-nucleótidos e transportadores ¹⁹.

Este trabalho centra-se numa das famílias mais importante de antígenos tumorais os antígenos de Lewis.

1.2.1. Antígenos de Lewis

Foi demonstrado em estudos imunohistoquímicos de amostras de adenocarcinoma (AD), que as estruturas de Lewis x (Le^x) e Lewis a (Le^a) se encontravam sobreexpressas, tanto em O-glicanos como em N-glicanos ¹.

Os antígenos do tipo Lewis, podem também ser sialilados originando as estruturas sialil Lewis x (sLe^x) e sialil Lewis a (sLe^a). Estes são expressos em células malignas, mimetizando a sua expressão normal nas células do tecido sanguíneo como em monócitos, células dendríticas (DC) e em neutrófilos, assim como o seu potencial de migração através da ligação às selectinas endoteliais ^{7,20-22}.

Os antígenos, sLe^x e sLe^a , são conhecidos por serem ligandos das selectinas, moléculas de adesão, presentes por exemplo em células do endotélio ativadas por citocinas ²³.

São expressos em glicanos do tipo 1 e 2, conforme a ligação do resíduo de Gal ao resíduo de GlcNAc tenha conformação $\beta 1,3$ ou $\beta 1,4$ respetivamente ⁷.

Esta família de antígenos constitui um exemplo de glicanos intervenientes nas alterações que ocorrem nas células tumorais e em particular na metastização ¹.

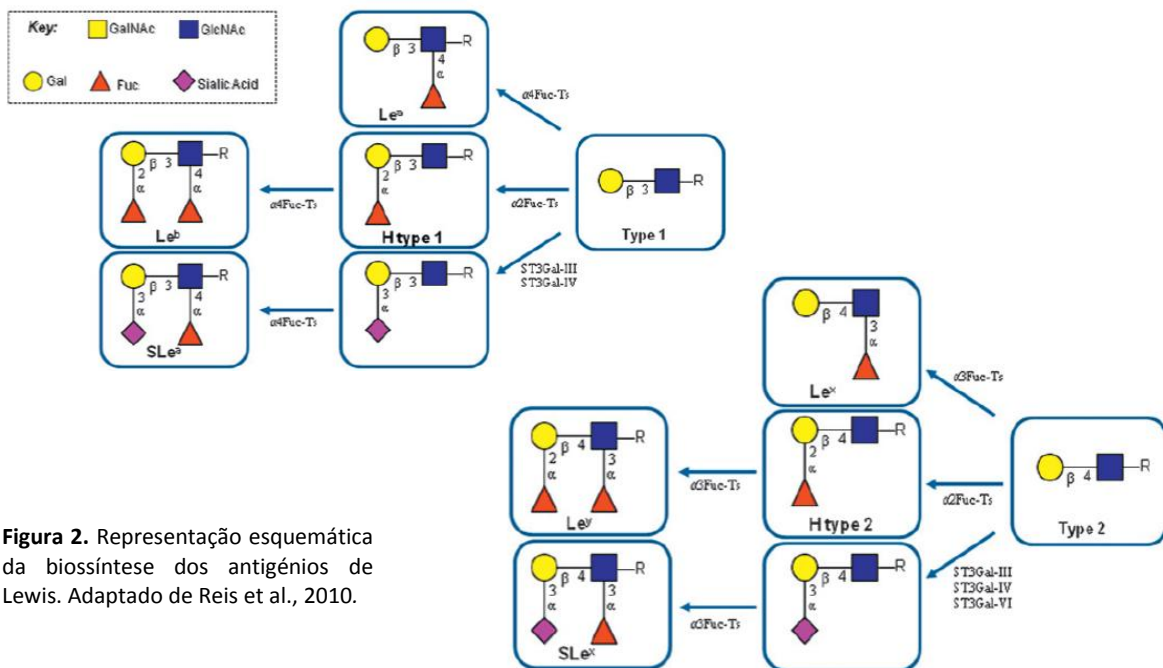


Figura 2. Representação esquemática da biossíntese dos antígenos de Lewis. Adaptado de Reis et al., 2010.

1.3. O Cancro de Pulmão

1.3.1. Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), com a sua última atualização a 04 de Abril de 2011, o cancro está entre as principais causas de morte no mundo, estando subjacentes fatores de risco como o consumo de tabaco, consumo abusivo de bebidas alcoólicas entre outros fatores (estes e outros dados da OMS podem ser encontrados em www.who.int).

A nível mundial, o cancro de pulmão (CP) é a causa mais frequente de mortalidade devido a cancro no mundo, representando 15% de todos os cancros. Com o aumento da incidência estimado em 0,5% por ano, a taxa de sobrevivência a 5 anos para estes doentes é de apenas 14%²⁴⁻²⁷. Estima-se que por ano ocorram mais de 1.300.000 mortes no mundo, devido a CP, segundo dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC, disponível em www.iarc.fr/).

Embora o CP tenha sido considerado uma doença rara no início do século XX^{27,28}, a partir dos anos 40 verificou-se um aumento da mortalidade devido a esta doença. Este aumento acompanha o padrão dos hábitos tabágicos, que apresentam um período de latência na relação causa-efeito de cerca de 20 anos^{24,27-29}.

Apesar da maioria dos doentes ser sintomático, o diagnóstico continua a ser feito em fase tardia, onde apenas 20% dos doentes são diagnosticados em fases iniciais^{30,31}.

No entanto nem todos os fumadores desenvolvem CP, sugerindo haver fatores genéticos que predispõem ao risco de aparecimentos da patologia^{25,27}.

1.3.2. Tipos Histológicos

O CP divide-se em quatro tipos histológicos principais^{25,27,28,31} indicados na tabela 1:

Tabela 1 – Designação dos quatro tipos mais comuns de tumores. Adaptada de Alberg & Samet, 2003; Minna et al., 2002; Novaes et al., 2008; Zamboni, 2002.

Tipo histológico		Nome em Inglês	
CPPC - Cancro de pequenas células		SCLC - <i>Small cell lung cancer</i>	
CPNPC - Cancro de não-pequenas células	Cancro epidermóide	NSCLC – <i>non small cell lung cancer</i>	SCC - <i>Squamous cell lung cancer</i>
	AD - Adenocarcinoma		AD - <i>Adenocarcinoma</i>
	Cancro de grandes células		LCLC - <i>large cell lung cancer</i>

Nas mulheres, em não fumadores e em jovens predomina o AD e a sua frequência continua a aumentar rapidamente sendo a forma mais comum de CP no mundo de hoje, após ter ultrapassado cancro epidermóide (SCC) ^{25,28,32,33}.

O AD tem uma localização mais periférica, podendo revelar-se como um achado radiológico num doente assintomático. O SCC e o cancro de pulmão de pequenas células (SCLC) surgem principalmente nas vias aéreas centrais localizando-se num brônquio principal, lobar ou segmentar, pelo que devido à sobreposição das estruturas mediastínicas que os ocultam são mais difíceis de serem detetados em exames de despiste de rotina ^{30,33,34}.

O SCLC distingue-se dos outros tipos de CP uma vez que quando diagnosticado as metástases já estão presentes em 90% dos casos e contribui para cerca de 110.000 dos casos de cancros diagnosticados anualmente ^{25,35}.

Os doentes com estádios iniciais de cancro de pulmão de não-pequenas células (NSCLC), mesmo depois de submetidos a intervenção cirúrgica, continuam a apresentar elevado risco de desenvolvimento de metáteses. Sendo que os doentes com estágio IA e IB têm apenas 67% e 57% respetivamente, de taxa de sobrevivência a 5 anos ³⁵.

A classificação de estadiamento TMN é feita com base na distinção entre tumores primários (T); envolvimento dos nódulos linfáticos (N) e distância na qual se encontram as metástases (M). Para consulta detalhada sobre a subdivisão destes parâmetros aconselha-se a consulta do *International Staging System for Lung Cancer* (pode ser encontrado em www.asco.org) ou o *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (disponível para consulta em www.cancerstaging.org/).

1.4. Amostras de Origem Biológica

1.4.1. Aspirados Ganglionares

Os vasos linfáticos transportam o fluido intersticial e as células dos tecidos até aos nódulos linfáticos. Foi demonstrado que as células do tumor primário com capacidade para metastizar, invadem os nódulos linfáticos mais próximos, disseminando-se através dos vasos linfáticos para outros locais ³⁶.

Por ser um ambiente com características próprias (local onde se encontra elevada quantidade de células do sistema imune), nos nódulos linfáticos há expressão de elevados níveis de ligandos glicosilados e sulfatados. Estes são ligandos com capacidade de ligação à L-selectina e são sintetizados por enzimas como a fucosiltransferase VII (FucT-VII) e que atuam na entrada dos linfócitos neste órgão ³⁷.

Os gânglios linfáticos mediastinais são pequenos nódulos linfáticos alojados na cavidade extrapulmonar, onde em caso de CP não limitado ao local primário, é possível encontrar células tumorais. Pode ser efetuada a colheita de células presente nesse local, por punção

aspirativa transbronquial por ecoendoscopia brônquica (*Ultrasound-guided transbronchial needle aspiration*; EBUS-TNBA) ³⁸.

1.4.2. Líquido Pleural

A acumulação de líquido na cavidade pleural é indicador da presença de doença sistémica ou local, mas as doenças originárias da pleura são raras, sendo a sua origem predominantemente de processos patológicos extrapleurais ^{39,40}. Como presumivelmente qualquer tipo de CP pode envolver a pleura, o derrame pleural é uma forma frequente de apresentação ^{25,33}.

As amostras biológicas provenientes de líquido pleural maligno (LPM), revestem-se de uma valiosa importância a nível de investigação, visto que no caso de AD e SCC, estes têm elevada tendência para causar efusões pulmonares malignas, aparentando uma especial capacidade de disseminar células tumorais para o líquido pleural ⁴¹.

A esperança de vida de um doente com NSCLC e com LPM é significativamente menor que a um doente igualmente com NSCLC mas sem LPM, quando comparados no mesmo estadiamento. É referido, inclusive que um doente com LPM em estadiamento IIIB se assemelha, na esperança de vida, a um doente com grau IV ^{41,42}.

1.4.3. Tecidos

Apenas os estádios precoces são subtidos a cirurgia, constituindo pouco mais de 20% dos casos ^{26,30,31}, sendo este tipo de amostra representativa dos estádios iniciais da doença.

1.5. Âmbito da Tese

No presente trabalho, pretende-se contribuir para identificação de novos biomarcadores de diagnóstico e/ou prognóstico em CP. Na literatura encontra-se reportada a expressão de glicanos associados a tumores em diferentes tipos de amostras humanas (aspirados ganglionares, biópsias e líquido pleural).

Parece existir uma correlação entre o padrão específico de glicosilação e a progressão dos tumores, em cada um dos seus estádios: proliferação, invasão, angiogénese e metastização. Determinados tumores por exemplo expressam glicanos específicos (antígenos de Lewis), que são reconhecidos por selectinas, expressas por células endoteliais (E-selectina), facilitando assim a sua transmigração entre tecidos.

Presume-se que para diferentes características, comportamento e capacidades das células tumorais há também diferentes padrões de expressão de glicógenes.

Algumas das porções terminais mais comuns encontradas em tecidos de CP são os antígenos de Lewis ^{43,44}.

Este estudo teve como objetivo geral contribuir para identificação de novos marcadores de prognóstico de CP. Em particular, neste trabalho pretendeu-se:

Estabelecer um biobanco de vários tipos de amostras de tecido provenientes de doentes com CP,

Estabelecer ensaios piloto com vista à validação do biobanco e à otimização de protocolos de estudo da expressão genética, para cada tipo de amostra que compõe o biobanco.

Analisar modelos celulares para estabelecer uma correlação entre a expressão de determinados genes e a expressão de estruturas glicosídicas.

Tecnicamente este estudo inclui:

Otimização dos métodos de armazenamento e tratamento das amostras biológicas.

Estudo piloto com doze genes, que irá validar a integridade das amostras guardadas, e permitir a implementação do estudo da expressão genética em larga escala.

Analisar a expressão dos vários genes envolvidos na biossíntese de glicanos (glicogenes) nas diversas amostras obtidas de doentes com CP e em modelos celulares de CP. Vai ser dada particular relevância aos glicanos já descritos como alterados em CP (antigénios de Lewis)

Contribuir para o esclarecimento de relações entre a expressão genética dos glicogenes e fenótipo, através da análise da expressão fenotípica de glicanos específicos em modelos celulares de CP.

Estabelecer diferenças entre a expressão dos glicogenes, recorrendo a uma amostragem representativa, na qual os grupos são formados por estadiamento.

O trabalho pretende também demonstrar a aplicabilidade de análise genotípica na pesquisa de novos biomarcadores em amostras patológicas.

2. MATERIAIS & MÉTODOS

2.1. Microarrays

Efetou-se uma seleção prévia dos genes relevantes para o trabalho prático que se iria seguir, através de pesquisas em bancos de dados públicos disponíveis na *world wide web*, usando como palavras-chave: *lung adenocarcinoma*, *NSCLC*, *pleural effusion*, *lung cancer*, *lung biopsy*.

Relativamente à análise dos dados públicos obtidos por *microarray*, estabeleceu-se como objetivo apurar esses mesmos genes e verificar níveis de expressão alterados relativamente aos níveis esperados no pulmão na ausência de tumores.

As pesquisas foram realizadas nas seguintes bases de dados de *microarrays*: *European Bioinformatics Institute* (www.ebi.ac.uk/), em *Gene Expression Omnibus* (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) e em *CFG Funcional Glycomics Gateway* (www.functionalglycomics.org). Os dados disponíveis em *open source (raw data)* com extensão *.cel* foram analisados no Instituto Gulbenkian da Ciência tendo-se usado o software *Partek® Genomics Suite™*.

2.2. Cultura celulares

Para validar os resultados obtidos com as amostras biológicas, foram efetuados ensaios com linhas celulares derivadas de CP humano, A549 (CCL-185TM), H1299 (CRL-5803TM) e H358 (CRL-5807TM), gentilmente cedidas pelo Professor Pi-Wan Cheng, *University of Nebraska Medical Center*, Estados Unidos da América. As linhas celulares A549 e H358 derivam de células de tecido com AD. A linha H1299 é derivada de células que metastizaram nos gânglios sendo o tumor primário NSCLC.

Foi feito o despiste de contaminação por micoplasma a cada *vial*, usando-se a coloração por *4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride* (DAPI, blue fluorescente counterstain, Invitrogen) e VECTASHIELD[®] Mounting Medi (Vector) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

As células cresceram em frascos de cultura simples T25 ou T75 (*Tissue Culture Flasks*; Nunc Brand Products) e mantidas em estufa com atmosfera humedecida a 37°C e a 5% de CO₂. Foram cultivadas nos meios de cultura aconselhados pelo *American Type Culture Collection* (ATCC): *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) para a linha A548 e *Roswell Park Memorial Institute medium-1640* (RPMI-1640), para as linhas H1299 e H358. Os meios basais foram suplementados com 10% soro fetal bovino (*foetal calf serum*), 2 mM (0,1%) de L-glutamina (Gibco/Invitrogen) e 100 µg/mL (0,1%) de Penicilina/Estreptomicina. No caso do RPMI-1640 foi ainda suplementado com 1 mM (0,1%) de Piruvato de Sódio e 0,1 mM (0,1%) de aminoácidos não-essenciais.

Exceto quando indicado, os reagentes foram adquiridos à casa comercial Sigma-Aldrich. Os meios foram renovados após 24h de cultura e culturas celulares subdivididas, sensivelmente a cada 48h, tendo-se adotado o seguinte protocolo:

As células foram lavadas com solução-tampão de fosfatos (*Phosphate buffered saline*; PBS) e soltas do fundo do frasco de cultura com sensivelmente 0,05 ml/cm² de solução de Tripsina/ ácido etilenodiaminotetracético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*; EDTA) (tripsina-EDTA solution) deixando atuar por 5 min sobre a monocamada celular.

O *pellet* foi obtido por centrifugação a 300g por 5 minutos e ressuspendeu-se em novo meio completo. Contou-se o número de células no contador hematológico (Coulter MicroDiff 18) e as células foram divididas para novos frascos de cultura, normalmente de 1:3.

Foram congeladas células em fase exponencial de crescimento nas primeiras passagens de subcultura, tendo sido usado entre 2-4 x10⁶ células/ml. A congelação foi efetuada em criotubos com 1,5 ml de meio suplementado e com 10% de dimetilsulfóxido (*Dimethyl sulfoxide*; DMSO).

Após a expansão, as células foram usadas para análise por citometria de fluxo e reação em cadeia da polimerase em tempo real (ou quantitativo) (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*, qPCR) tal como descrito posteriormente.

As células destinadas a qPCR foram removidas do fundo do frasco por ação de tripsina como anteriormente descrito. Depois de contadas reservou-se entre 5-10 x 10⁶ células a -80°C numa solução de 500 µl de Solução de Lise com 5 µl de 2-Mercaptoetanol (2-ME) (reagentes incluídos no sistema comercial GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit) até se proceder à extração de ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*; RNA).

As células destinadas à citometria de fluxo foram removidas (última remoção antes da técnica) através da ação de EDTA sem tripsina. Após a remoção das células, estas foram centrifugadas, usando-se o para separação celular com poros de 40 µm (BD Falcon).

2.3. Amostras Biológicas

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar Lisboa Norte, Hospital Pulido Valente em Lisboa. Todos os indivíduos que participaram do estudo assinaram um consentimento informado. A colheita das amostras foi efetuada na Unidade de Técnicas Invasivas Pneumológicas do Hospital Pulido Valente, Lisboa, sob coordenação do Doutor António Bugalho desta unidade.

2.3.1. Amostras de Aspirados Ganglionares

A colheita das 58 amostras foi efetuada no período compreendido entre Janeiro de 2010 e Fevereiro de 2011. Na maioria das amostras metade do volume foi analisado por citometria

de fluxo no mesmo dia da recolha pela Doutora Catarina Martins (Dep. Imunologia, FCM-UNL). As células restantes foram reservadas como descritos para posterior análise de expressão genética por qPCR.

2.3.2. Amostras de Líquido Pleural

A colheita de amostras foi efetuada no período compreendido entre Março de 2011 e 31 de Dezembro de 2011, a 105 doentes através de toracentese, num volume de cerca de 30 ml, em frascos de colheita. Devido às amostras apresentarem frequentemente fibrinogénio e produtos da sua degradação, usou-se 50 U/ml de heparina para evitar a coagulação³⁹.

Devido à natureza heterogénea e complexa das amostras, foi necessária a otimização da técnica. Contudo o rendimento variou entre amostras tendo-se optado por apenas preservar o RNA. Estabeleceu-se o seguinte protocolo, que provou ser eficiente e com bons rendimentos na extração de RNA, quando possível já que nem todas as amostras continham número suficiente de células para extração de material genético.

As amostras foram tratadas sempre num período inferior a 6h após a colheita, centrifugadas a 1200g por 15 minutos a 16° C e descartado o sobrenadante. Nos casos em que a amostra apresentou sinais de contaminação por eritrócitos (de aparência avermelhada e não translúcida), foi adicionado ao *pellet* o volume de 7,5 ml de solução tampão de lise de eritrócitos (*Red cell blood lysis buffer*; RCBL) por 15 minutos.

Ressuspendeu-se o *pellet* em 7,5 ml de PBS e procedeu-se à lavagem celular por centrifugação a 1200g por 5 min a 16°C repetida três vezes, com vista a retirar vestígios de heparina uma vez que a esta inibe a posterior ação da Taq Polimerase⁴⁵.

O *pellet* celular final foi armazenado a -80 C° em 2 condições diferentes: Em solução de lise/ 2-ME e em *pellet* seco. Verificou-se que o melhor rendimento após a extração do RNA foi obtido para as células congeladas na presença de solução de lise/ 2-ME (estes dados não são apresentados).

2.3.3. Amostras de Tecidos

Foi criado e organizado um biobanco composto por amostras de 43 doentes submetidos a intervenção cirúrgica torácica referenciados por suspeita de CP. Para cada indivíduo foi efetuada a aquisição de fragmentos de tecido tumoral e de tecido pulmonar são (em local o mais afastado possível do tumor e sempre que possível em lobo pulmonar diferente) com uma dimensão superior a 0,5 cm³. Estes foram colhidos sempre em duplicado para criotubos estéreis tendo sido imediatamente colocados em azoto líquido. Para a análise de expressão genética, estas amostras foram divididas em peças com sensivelmente 40 mg e foi

adicionada solução de lise/ 2-ME. A homogeneização foi efetuada com Tissue Ruptor (Qiagen).

2.4. Técnicas

2.4.1. Citometria de Fluxo

O citómetro de fluxo utilizado foi o FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson), capaz de detetar até quatro fluorescências diferentes – FL-1 (fluorescência verde), FL-2 (amarela), FL-3 (laranja) e FL-4 (vermelha) e foram adquiridas pelo menos 10.000 células por análise. O software de análise foi o CellQuest™ version 3.3.

Estudou-se a intensidade de fluorescência média (*Mean fluorescence intensity*; MFI) a qual corresponde à estimativa da quantidade de anticorpo que se liga especificamente na superfície celular após se retirar a autofluorescência celular ⁴⁶.

As marcações para citometria de fluxo foram efetuadas com os seguintes anticorpos monoclonais de ratinho contra antígenos humanos;

Antígeno carcinoembrionário (*Carcinembryonic Antigen*; CEA) (Clone CI-P83-1, Abcam) marcado com FITC, CD44 (Clone BJ18, BioLegend) marcado com APC, Citoqueratina (Dako), CD15s (Clone CSLEX1, BD Pharmingen™).

O anticorpo secundário usado foi o anticorpo policlonal anti imunoglobulina de ratinho, [Immunoglobulins/FITC Goat F(ab')₂ (Dako)] marcado com FITC.

A marcação intracelular com anti-citoqueratina foi realizada com o sistema comercial BD Cytotfix/ Cytoperm™ plus Fixation/ Permeabilization Kit (BD Biosciences). Foram seguidos os protocolos de acordo as instruções fornecidas pelos fabricantes.

2.4.2. Extração de RNA Total

Para a extração do RNA total foram seguidas as instruções do fabricante do sistema comercial GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit e efetuou-se o tratamento em coluna com DNase com o sistema comercial RNase-Free DNase Set (Qiagen) como descrito previamente pelo grupo ⁴⁷⁻⁴⁹.

O RNA foi quantificado por espectrofotometria no Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific) e o estado de pureza das amostras foi analisado através da razão das leituras a 260 nm e 280 nm. As concentrações das amostras foram determinadas recorrendo à seguinte relação: uma unidade de absorvância (Abs) a 260 nm corresponde a 40 µg de RNA/ ml de solução.

As amostras de aspirados ganglionares foram processadas no laboratório para um estudo em pequena escala (designado estudo piloto) com doze genes, que serviu para verificação preliminar de genes envolvidos na expressão de sLe^x, mas também para validação das

amostras. As amostras de líquido pleural e de biópsias foram enviadas para a Universidade da Geórgia, parceiro do projeto e que procede à análise por qPCR de uma bateria de setenta glicogenes. Por ser um estudo de maiores dimensões tanto a nível de quantidade de amostras como de número de genes estudados, é designado por estudo em larga escala. Para o envio, o RNA foi eluído da coluna de ligação com água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonato (*Diethyl pyrocarbonate*; DEPC) e desidratado no RNASTable tube kit (Biomatrica) por 90 min em *speed vacuum* (SpeedVac Concentrator with refrigerated vapor trap RTV100, Savant).

2.4.3. DNA complementar

A conversão de RNA em ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) para ensaios de otimização no tratamento das amostras de líquido pleural, tecidos de biópsias e toda a análise de RNA de aspirados ganglionares foi efetuado com o sistema comercial, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante.

Efetuu-se a seguinte mistura-mãe: 10 µL de oligonucleótidos iniciadores aleatórios, 4 µL de nucleótidos livres (desoxirribonucleotídeos trifosfatos; dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 5 µL de transcriptase reversa, 10 µL de solução tampão e 21 µL de água ultra pura. Esta mistura foi adicionada às amostras de RNA numa proporção de 1:1 para um volume final de 100 µl, tendo a reação ocorrido num PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research) com os seguintes ciclos: 10 min a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 min a 85°C.

2.4.4. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

As sondas *TaqMan*® utilizadas neste trabalho, são sondas de hidrólise conjugadas que possuem na extremidade 5' com o fluoróforo *reporter* (FAM™), e na extremidade 3' o *quencher* (TAMRA™).

Para este trabalho foi usado o 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e os dados analisados com Sequence Detection Software, Version 1.3.

Para a análise foram calculados os níveis de expressão relativa, que se baseia na comparação dos valores do *cycle threshold* da β-actina e dos genes de interesse aplicados na seguinte fórmula (significa que por cada molécula do gene de interesse há a formação de 1000 moléculas de β-actina) ^{50,51}:

$$\text{Nível expressão relativa} = 2^{-\text{Ct}(\text{expressão gene interesse} - \text{expressão gene endógeno})} \times 1000 = 2^{-\Delta\text{Ct}} \times 1000$$

Cada amostra foi analisada num volume final de 10 µl, nas proporções sugeridas pelo fornecedor, com cDNA de interesse, *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG*, (Applied Biosystems), contendo a enzima *AmpliTaq Gold® DNA polymerase*, os desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), tampão de enzima otimizado, contendo MgCl₂ e a referência passiva de fluorescência *ROX®* e os ensaios comerciais específicos para os genes a analisar (*TaqMan® Gene Expression Assays*, Applied Biosystems) estão indicados na tabela 2:

Tabela 2. Lista de genes analisados nas amostras biológicas de aspirados ganglionares por qPCR para determinação de expressão genética; estudo piloto.

Símbolo Gene	Descrição	Cromossoma	RefSeq	Entrez Gene ID	Identificação Sonda
<i>EpCAM</i>	Epithelial cell adhesion molecule	2p21	NM_002354.2	4072	Hs00158980_m1
<i>KRT19</i>	Keratin, type I cytoskeletal 19	17q21.2	NM_002276.4	3880	Hs00761767_s1
<i>CEA</i>	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	19q13.1-q13.2	NM_004363.2	1048	Hs00944025_m1
<i>FUT3</i>	Fucosyltransferase 3 (galactoside 3(4)-L-fucosyltransferase, Lewis blood group)	19p13.3	NM_000149.3 NM_001097639.1 NM_001097640.1	2525	Hs00356857_m1
<i>FUT4</i>	Fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific)	11q21	NM_002033.3	2526	Hs01106466_s1
<i>FUT6</i>	Fucosyltransferase 6 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	19p13.3	NM_000150.2	2528	Hs00173404_m1
<i>IL6</i>	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	7	NM_000600.3	3569	Hs00174131_m1
<i>IL10</i>	Interleukin 10	1	NM_000572.2	3586	Hs00174086_m1
<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor	6	NM_000594.2	7124	Hs00174128_m1
<i>TGF-β1</i>	Transforming growth factor, beta 1	19	NM_000660.4	7040	Hs00171257_m1
<i>FOXP3</i>	forkhead box P3	X	NM_001114377.1 NM_014009.3	50943	Hs00203958_m1
<i>CD209</i>	CD 209 molecule	19p13	NM_001144893.1 NM_001144894.1 NM_001144895.1 NM_001144896.1 NM_001144897.1 NM_001144899.1 NM_021155.3	30835	Hs01588349_m1
<i>β-actin</i>	Controlo Endógeno				Hs99999903_m1

A leitura foi efetuada nas seguintes condições: Início de 20 segundos a 95° C seguido de 40 ciclos de 3 segundos a 95° C e 30 segundos a 60° C.

Cada reação foi efetuada em duplicado e a normalização do valor de sinal resultante da fluorescência de cada amostra foi efetuada por um controlo endógeno, o gene constitutivo *β-actina*, pois só assim garantimos que as variações entre amostras resultam em exclusivo de variações biológicas.

Foram reunidas informações com base na literatura e de bases de dados públicas de microarrays para a construção de um ensaio em larga escala, na qual serão analisadas as amostras de biópsias e de líquido pleural no *Complex Carbohydrate Research Center and the Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Georgia*, Estados Unidos da América, parceiros do projeto, tal como referido no ponto 2.4.2.

A tabela 3 apresenta a lista de genes selecionados a serem estudados.

Tabela 3. Lista de genes constantes do estudo em larga escala selecionados pela análise de *microarrays* e com base na literatura. Estes genes serão analisados nas amostras biológicas de líquido pleural e de biópsias por qPCR para determinação de expressão genética.

Símbolo Gene	Descrição	Cromossoma	RefSeq	Entrez Gene ID
<i>B3GALT1</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 1	2q24.3	NM_020981	8708
<i>B3GALT2</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2	1q31	NM_003783	8707
<i>B3GALT3 (B3GALNT1)</i>	Beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (globoside blood group)	3q25	NM_003781	8706
<i>B3GALT5</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 5	21q22.3	NM_006057	10317
<i>B3GAT1</i>	Beta-1,3-glucuronyltransferase 1 (glucuronosyltransferase P)	11q25	NM_018644	27087
<i>B3GNT1</i>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1	11q13.2	NM_006876	11041
<i>B3GNT2</i>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2	2p15	NM_006577	10678
<i>B3GNT3</i>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3	19p13.1	NM_014256	10331
<i>B3GNT5</i>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5	3q28	NM_032047	84002
<i>B3GNT6</i>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 6 (core 3 synthase)	11q13.4	NM_138706	192134
<i>B3GNT7</i>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 7	2q37.1	NM_145236	93010
<i>B4GALNT3</i>	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 3	12p13.33	NM_173593	283358
<i>B4GALT1</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1	9p13	NM_001497	2683
<i>B4GALT2</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 2	1p34-p33	NM_003780	8704
<i>B4GALT3</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 3	1q21-q23	NM_003779	8703
<i>B4GALT4</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 4	3q13.3	NM_003778	8702
<i>B4GALT5</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5	20q13.1-q13.2	NM_004776	9334
<i>CD209</i>	CD209 molecule	19p13	NM_021155	30835
<i>CD44</i>	CD44 molecule (Indian blood group)	11p13	NM_000610	960
<i>CD83</i>	CD83 molecule	6p23	NM_004233	9308
<i>CHST9</i>	Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-0) sulfotransferase 9	18q11.2	NM_031422	83539
<i>ER ManI (MAN1B1)</i>	Mannosidase, alpha, class 1B, member 1	9q34	NM_016219	11253
<i>FUT1</i>	Fucosyltransferase 1 (galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase, H blood group)	19q13.3	NM_000148	2523
<i>FUT2</i>	Fucosyltransferase 2 (secretor status included)	19q13.3	NM_000511	2524
<i>FUT3</i>	Fucosyltransferase 3 (galactoside 3(4)-L-fucosyltransferase, Lewis blood group)	19p13.3	NM_000149	2525
<i>FUT4</i>	Fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific)	11q21	NM_002033	2526
<i>FUT6</i>	Fucosyltransferase 6 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	19p13.3	NM_000150	2528
<i>FUT7</i>	Fucosyltransferase 7 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	9q34.3	NM_004479	2529
<i>FUT8</i>	Fucosyltransferase 8 (alpha (1,6) fucosyltransferase)	14q24.3	NM_178154	2530
<i>FUT9</i>	Fucosyltransferase 9 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	6q16	NM_006581	10690
<i>FUT10</i>	Fucosyltransferase 10 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	8p12	NM_032664	84750
<i>FUT11</i>	Fucosyltransferase 11 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	10q22.2	NM_173540	170384
<i>GAL3ST1</i>	Galactose-3-O-sulfotransferase 1	22q12.2	NM_004861	9514
<i>GALNT13</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide	2q24.1	NM_052917	114805
<i>GALNT14</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide	2p23.1	NM_024572	79623
<i>GALNT7</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide	4q31.1	NM_017423	51809
<i>GCNT1</i>	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2 (beta-	9q13	NM_001490	2650

	1,6-N-acetylglucosaminyltran			
<i>GCNT2</i>	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme (I blood group)	6p24.2	NM_001491	2651
<i>GCNT3</i>	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type	15q21.3	NM_004751	9245
<i>Golgi MAN1A (Man1A1)</i>	Mannosidase, alpha, class 1A, member 1	6q22	NM_005907	4121
<i>Golgi Man1B(MAN1A2)</i>	Mannosidase, alpha, class 1A, member 2	1p13	NM_006699	10905
<i>Golgi MAN1C (Man1C1)</i>	Mannosidase, alpha, class 1C, member 1	1p35	NM_020379	57134
<i>ICAM1</i>	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	19p13.3-p13.2	NM_000201	3383
<i>ICAM2</i>	Intercellular adhesion molecule 2	17q23.3	NM_000873	3384
<i>MAN2A1</i>	Mannosidase, alpha, class 2A, member 1	5q21-q22	NM_002372	4124
<i>MAN2A2</i>	Mannosidase, alpha, class 2A, member 2	15q26.1	NM_006122	4122
<i>MANEA</i>	Mannosidase, endo-alpha	6q16.1	NM_024641	79694
<i>MGAT1</i>	Mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	5q35	NM_002406	4245
<i>MGAT2</i>	Mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	14q21	NM_002408	4247
<i>MGAT4A</i>	Mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, iso	2q12	NM_012214	11320
<i>MGAT4B</i>	Mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, iso	5q35	NM_014275	11282
<i>MGAT4C</i>	Mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, iso	12q21	NM_013244	25834
<i>PECAM1</i>	Platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	17q23.3	NM_000442	18613
<i>ST3GAL1</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	8q24.22	NM_003033	6482
<i>ST3GAL2</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2	16q22.1	NM_006927	6483
<i>ST3GAL3</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 3	1p34.1	NM_006279	6487
<i>ST3GAL4</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4	11q24.2	NM_006278	6484
<i>ST3GAL5</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	2p11.2	NM_003896	8869
<i>ST3GAL6</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6	3q12.1	NM_006100	10402
<i>ST6GAL1</i>	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1	3q27-q28	NM_003032	6480
<i>ST6GALNAC1</i>	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide	17q25.1	NM_018414	55808
<i>ST6GALNAC2</i>	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide	17q25.1	NM_006456	10610
<i>ST6GALNAC3</i>	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide	1p31.1	NM_152996	256435
<i>ST6GALNAC4</i>	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide	9q34	NM_014403	27090
<i>ST6GALNAC5</i>	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide	1p31.1	NM_030965	81849
<i>ST6GALNAC6</i>	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide	9q34.11	NM_033309	30815
<i>ST8SIA1</i>	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1	12p12.1-p11.2	NM_003034	6489
<i>ST8SIA4</i>	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4	5q21	NM_005668	7903
<i>UGGL1</i>	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1	2q14.3	NM_020120	56886
<i>UGGL2</i>	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 2	13q32.1	NM_020121	55757

2.5. Estatística

A análise estatística dos resultados obtidos experimentalmente foi realizada com o software IBM SPSS 19 (Windows). Os dados foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk e de Mann-Whitney. Foi efetuada a correlação de Spearman para dados não-paramétricos. Os dados são apresentados, quando aplicável, como média \pm desvio padrão. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados $p < 0,05$.

(* significa que o valor p é inferior a 0,05; ** que o p é inferior a 0,01 *** que o p é inferior a 0,0001).

3. RESULTADOS

Foi colocada a hipótese para este trabalho que as modificações glicosídicas associadas à transformação neoplásica em CP estão correlacionadas com o tipo e estágio do tumor, sendo possível determiná-las em diferentes amostras biológica.

Estas modificações são frequentemente devido a alterações na expressão das glicosiltransferases, enzimas chave na sua biossíntese.

O principal objetivo deste trabalho consistiu na recolha de amostras biológicas e na realização de um estudo piloto para validação da análise de expressão genética nas diferentes amostras de doentes com CP.

3.1. Construção de biobancos

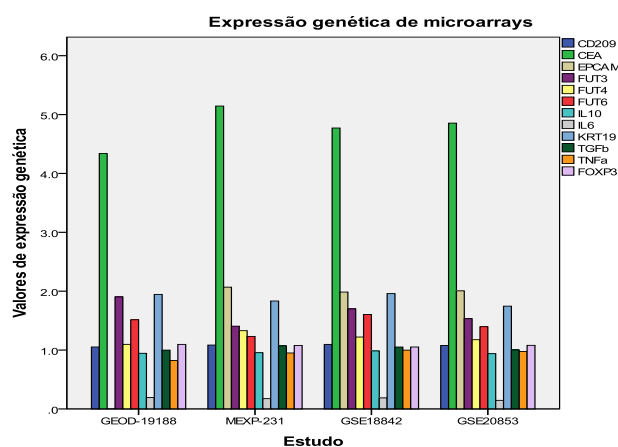
Este trabalho contribuiu para o estabelecimento de três biobancos com amostras de doentes com CP. Os detalhes encontram-se em anexo. Apesar destes biobancos terem envolvido uma equipa multidisciplinar, esta tese foi determinante para o transporte das amostras para o laboratório, processamento, armazenamento, catalogação e validação das amostras através de ensaios em pequena escala.

3.2. Modelo teórico de expressão genética no cancro de pulmão

Foi efetuada uma primeira abordagem na qual foram usadas bases de dados públicas de *microarrays* para selecionar um conjunto de genes já identificados com tendo expressão aberrante em CP.

Das bases de dados provenientes de *microarrays*, selecionaram-se as séries GSE20853⁵², GEOD-19188⁵³, GSE18842⁵⁴ e E-MEXP-231⁵⁵, por compararem a expressão genética de amostras de tecido pulmonar normal e tumoral, nomeadamente AD.

Na figura 3, verifica-se que o maior aumento dos níveis de expressão genética em tecido tumoral relativamente a tecido não tumoral diz respeito ao gene *CEA*, seguido do *EpCAM*.



Estudo	Genes											
	CD209	CEACAM5	EPCAM	FOXP3	FUT3	FUT4	FUT6	IL10	IL6	KRT19	TGFB1	TNF
GEOD-19188	1,052	4,338	-	1,096	1,903	1,097	1,515	0,945	0,194	1,945	0,999	0,822
MEXP-231	1,085	5,145	2,069	1,078	1,406	1,329	1,232	0,955	0,175	1,833	1,072	0,951
GSE18842	1,096	4,772	1,985	1,052	1,699	1,221	1,603	0,985	0,188	1,959	1,052	0,999
GSE20853	1,077	4,855	2,006	1,080	1,534	1,176	1,397	0,939	0,146	1,746	1,002	0,975

Figura 3. Representação gráfica dos valores de expressão genética de em *microarrays*.

Foi verificado se estes valores correspondiam a um aumento ou diminuição dos valores de expressão genética, visto que para todos os genes as variações encontradas entre os estudos era muito pequenas. Como tal foi feita a média dos valores obtidos para os quatro estudos analisados. Os resultados encontram-se na tabela 4. Pretendeu-se fazer uma comparação entre estes valores e os obtidos por qPCR para aspirados ganglionares.

Tabela 4. Tabela representativa dos resultados obtidos de expressão de genes por *microarrays*. Na primeira coluna estão indicados os genes analisados, na coluna seguinte é indicado de forma quantitativa as variações encontradas entre os níveis de expressão. A terceira coluna indica se as alterações encontradas significam uma subexpressão (↓) ou sobreexpressão (↑) do gene de interesse relativamente ao controlo de modo qualitativo.

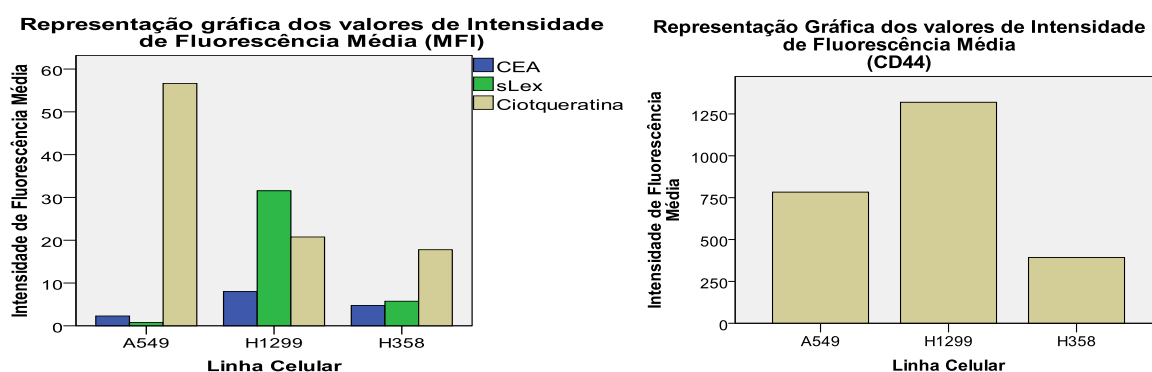
Genes	Variação da Expressão	Tendência
CD209	1,078	↑
CEA	4,778	↑
EpCAM	2,020	↑
FOXP3	1,077	↑
FUT3	1,636	↑
FUT4	1,206	↑
FUT6	1,437	↑
IL10	0,956	↓
IL6	0,176	↓
KRT19	1,871	↑
TGF-β	1,031	↑
TNF-α	0,937	↓

3.3. Análise do fenótipo e dos perfis de expressão genética no modelo celular

Os estudos efetuados com culturas de linhas celulares imortalizadas, tem-se revelado um método rotineiro em biologia celular e de extrema utilidade, mas amostras biológicas frescas têm uma variabilidade e heterogeneidade intrínseca. As culturas celulares assumem uma constituição próxima da homogênea à medida que vai atuando a pressão seletiva sobre as células. As mais vigorosas vão ganhando espaço e sofrendo expansão clonal sobre as restantes ⁵⁶. Apesar disso, para o estudo de expressão de genes envolvidos na glicosilação, as culturas celulares constituem um bom modelo para validação das técnicas e acima de tudo, para correlação entre a expressão de determinados genes e a expressão fenotípica de determinada estrutura glicosídicas.

3.3.1. A análise do fenótipo às células das linhas celulares

A análise por citometria de fluxo das linhas celulares A549, H1299 e H358 teve como finalidade confirmar a expressão na sua superfície de sLe^x, uma estrutura glicosídica bastante referida na literatura como associada a CP. Teve ainda como finalidade verificar a expressão de proteínas como o CD44 e o CEA, que se sabe poderem ser decoradas com sLe^x em CP, servindo assim como *carriers* deste antigénio glicosídicas. Como referência analisou-se a expressão de citoqueratina, que se sabe estar sobreexpressa em CP e é frequentemente usada na prática clínica como marcador tumoral. Os resultados apresentados na figura 4 correspondem aos valores de MFI.



Linhas Celulares	MFI			
	CD44	CEA	sLe ^x	Citoqueratina
A549	783,11	2,30	0,80	56,64
H1299	1319,52	7,99	31,55	20,76
H358	393,00	4,76	5,75	17,78

Figura 4. Representação gráfica dos valores de MFI obtidos por citometria de fluxo das linhas celulares para os anticorpos contra CEA, sLe^x e citoqueratina (à esquerda) e CD44 (à direita). Em baixo, a tabela representativa dos valores de MFI.

Verificou-se que o marcador com maior expressão foi o CD44 que apresentou valores bastante superiores aos restantes para todas as amostras. A expressão deste marcador nas linhas celulares A549, H1299, H358 e em amostras de NSCLC foi demonstrado em outros estudos ⁵⁷⁻⁵⁹.

Os antígenos CEA e sLe^x apresentaram níveis de expressão mais baixos indiciando a decoreação do CEA que poderá um dos principais carriers de sLe^x, como referido anteriormente.

A expressão de citoqueratina variou entre o nível de expressão moderado da linha A549 e o nível de expressão baixo das linhas H1299 e H358.

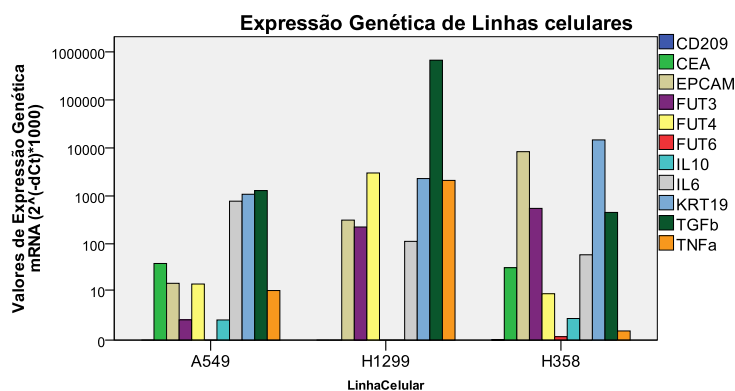
3.3.2. A análise da expressão genética das linhas celulares

A análise da expressão genética nos modelos celulares incidiu sobre: genes descritos como relevantes para a expressão do antígeno sLe^x (*FUT3*, *FUT4* e *FUT6*), genes que codificam biomarcadores tumorais de referência [*EpCAM* e *KRT19* (*citoqueratina*)] e genes que codificam para citocinas (*IL10*, *IL6*, *TGF-β* e *TNF-α*).

Curiosamente, verificou-se que o *CEA* não é expresso na linha H1299 (figura 5), apesar de se ter detetado a sua expressão fenotípica. É provável que se trate de um problema experimental, como por exemplo o facto da linha celular apresentar polimorfismo que inviabilizem o reconhecimento deste gene pelo ensaio genético estabelecido. Está previsto de futuro ensaios com sondas e *primers* diferentes para confirmação deste pressuposto.

A análise da expressão genética envolveu ainda genes que codificam proteínas envolvidas na resposta inflamatória como as citocinas IL-10, IL-6, TGF-β e TNF-α e marcadores de DC. A inclusão destes genes deveu-se ao facto de se ter identificado a sobreexpressão destes genes em amostras ganglionares de doentes com CP e com metástases ganglionares (ponto 3.3 desta dissertação).

Tornou-se portanto essencial perceber até que ponto o aumento da expressão destes genes envolvidos na resposta imune se devia à resposta dos leucócitos dos gânglios ou às células tumorais infiltradas. Dos resultados obtidos podemos inferir que expressão de *CD209*, um marcador de DC não é expresso por nenhuma linha celular analisada e provavelmente não é expresso por células tumorais. Pelo contrário, verificou-se que todas as linhas celulares apresentavam expressão de citocinas, sendo portanto difícil discernir a contribuição de células tumorais para a expressão destas citocinas em amostra complexas como os aspirados ganglionares.



Linha Celular	Genes										
	CD209	CEA	EpCAM	FUT3	FUT4	FUT6	IL10	IL6	KRT19	TGF-β	TNF-α
A549	0	38,37	14,22	1,64	13,71	0,00	1,63	778,62	1085,23	1294,15	9,76
H1299	0	0,00	313,82	225,31	3012,58	0,00	0,00	112,66	2303,78	671386,63	2109,64
H358	0	31,16	8357,09	550,95	8,24	0,18	1,82	58,68	14702,61	454,07	0,55

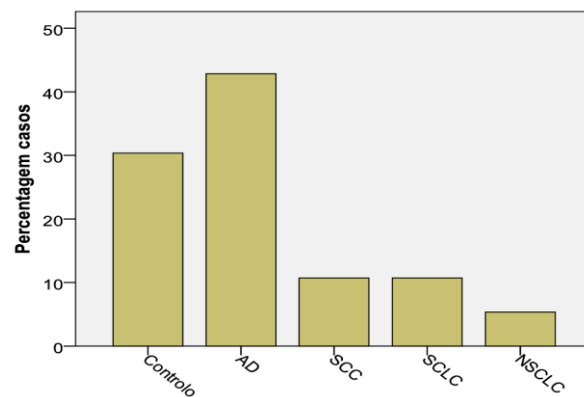
Figura 5. Representação gráfica e quantitativa dos valores de expressão genética de linhas celulares

3.4. O estudo piloto

3.4.1. Caracterização da população que constituiu as amostras de aspirados ganglionares

Neste estudo foram incluídos doentes confirmados ou com fortes suspeitas de CP que foram submetidos a EBUS-TBNA como técnica de colheitas das amostras. Nenhum dos doentes tinha sido submetido anteriormente a outro procedimento médico invasivo ou recebeu qualquer tratamento antes da intervenção, nomeadamente quimioterapia e/ou radioterapia. A determinação do tipo histológico foi efetuada pela Anatomia Patológica do Hospital Pulido Valente em Lisboa. Com base nestes critérios, os doentes que constituem o grupo controlo, sofrem de doenças não tumorais, como sarcoidose, tuberculose ou linfadenopatia reativa. De acordo com o descrito, foram recebidos no laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Médias da Universidade Nova de Lisboa, 58 amostras de aspirados ganglionares. Duas das amostras foram excluídas; uma por não preencher os critérios de doença tumoral maligna cujo órgão primário era o pulmão e outra por não ter sido possível extrair RNA de qualidade. O número e percentagem de casos estão apresentados na Figura 6.

Representação gráfica da percentagem de casos por amostra biológica de Aspirados Ganglionares



Tipo de amostra	Número de casos	Percentagem
AD	24	42,86
Controlo	17	33,36
SCC	6	10,71
SCLC	6	10,71
NSCLC	3	5,36
Total	56	100,0

Figura 6. Representação gráfica e quantitativa da distribuição dos casos de amostras clínicas de CP e de controlo com referência ao número de casos e percentagem no grupo.

Com vista a se perceber a existência (ou não) de predominância de determinado tipo de CP num dado grupo etário, foi efetuada a análise estatística cujos resultados estão representados graficamente na figura 7. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas idades entre os grupos nem entre o grupo controlo e AD pelo que se considerou tratar-se de grupos homogêneos. A informação detalhada sobre a caracterização das amostras, nomeadamente doença e respetivas idades com distribuição por sexo, são apresentados no Anexo II.

Representação gráfica da distribuição das idades por grupos

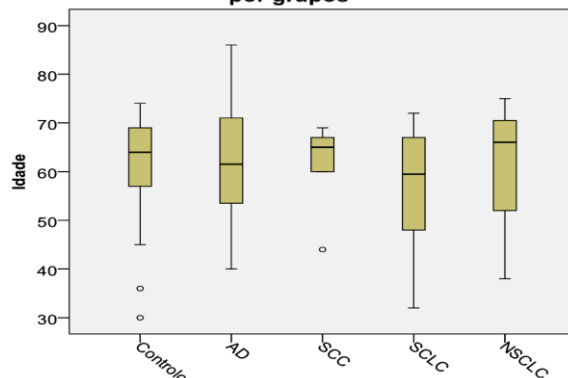


Figura 7. Representação gráfica da distribuição das idades dos doentes por grupos de doença e controlo.

3.4.2. A citometria de fluxo das amostras de aspirados ganglionares

Todas as amostras de aspirados ganglionares foram analisadas por citometria de fluxo por outro elemento do grupo, com o objetivo de caracterizar a sua população celular e confirmar

a metastização ganglionar. Deste estudo confirmou-se a presença de células tumorais e confirmou-se também que as células tumorais infiltradas nos gânglios eram positivas para CD44 em 11,1% dos casos, positivas para CEA em 35,0% e sLe^x pos em 28,6% dos casos [Bugalho, *et al*, (dados ainda não publicados)].

3.4.3. A expressão genética das amostras de aspirados ganglionares

Para as amostras de aspirados ganglionares, foi efetuada a análise de expressão genética tendo incidido este trabalho na população de doentes com AD devido à melhor representação desta (24 casos) A comparação dos valores de expressão genética entre controlos e doentes para cada um dos genes está representada graficamente na figura 8.

Seguidamente foi efetuado o teste de normalidade verificando-se não haver uma distribuição normal, pelo que se optou pelo teste de Mann-Whitney U, para determinar quantitativamente a diminuição/ aumento de expressão. Indica-se a tendência dessa variação quantitativamente na segunda coluna da tabela 5 e qualitativamente na coluna seguinte, usando-se o símbolo ↓ para subexpressão e ↑ para sobreexpressão).

Os resultados obtidos pela *ranks table* permite-nos saber para os dois grupos comparados, qual apresenta um valor (médio) mais elevado de expressão. Para um nível de significância de 5% existem diferenças estatisticamente significativas entre o grupo AD e o grupo controlo nas seguintes variáveis: *EpCAM*, *FUT3*, *FUT6* e *TNF-α*.

Tabela 5. Tabela representativa dos resultados obtidos pelo teste Mann-Whitney U para a expressão de genes das amostras de aspirados ganglionares. Na primeira coluna estão indicados os genes analisados, na coluna seguinte é indicado de forma quantitativa as variações encontradas entre os níveis de expressão. Foi efetuado o rácio AD/ Controlo. A terceira coluna indica se as alterações encontradas significam uma subexpressão (↓) ou sobreexpressão (↑) do gene de interesse relativamente ao controlo de modo qualitativo. (Grouping Variable: Patologia; Asymp. Sig. (2-tailed)).

Genes	Varição da Expressão	Tendência	<i>p</i>
<i>CD209</i>	0,824	↓	0,291
<i>CEA</i>	1,430	↑	0,073
<i>EpCAM</i>	2,205	↑	0,000146 **
<i>FOXP3</i>	0,761	↓	0,139
<i>FUT3</i>	1,594	↑	0,018 *
<i>FUT4</i>	1,067	↑	0,745
<i>FUT6</i>	1,510	↑	0,035 *
<i>IL10</i>	1,248	↑	0,234
<i>IL6</i>	1,440	↑	0,060
<i>KRT19</i>	1,359	↑	0,101
<i>TGF-β</i>	0,886	↓	0,511
<i>TNF-α</i>	0,678	↓	0,028 *

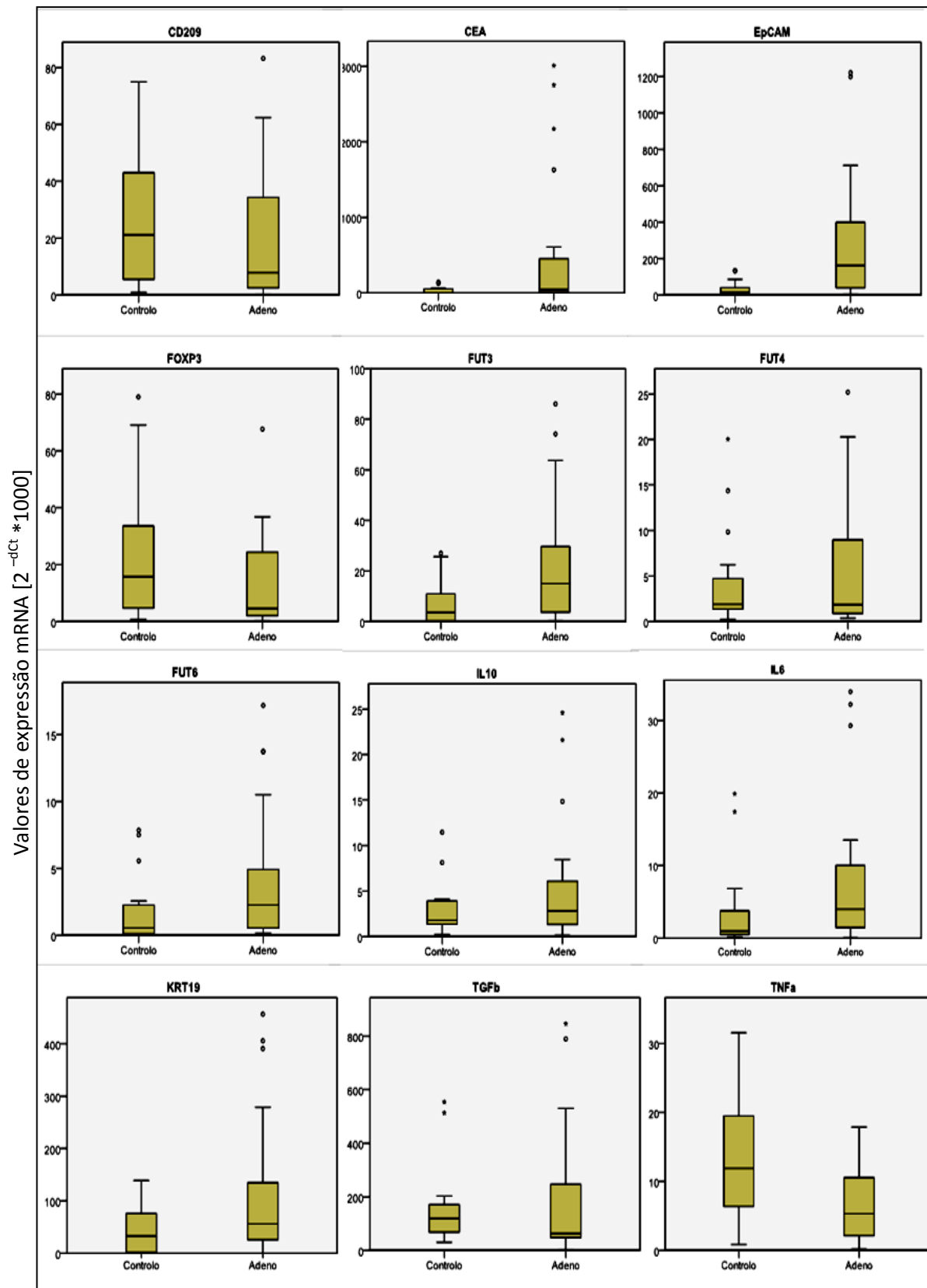


Figura 8. Representação gráfica da expressão genética em AD de pulmão e nos controlos, para cada um dos genes analisados.

Após se verificar que existem alterações no grupo AD relativamente ao grupo controlo e que parte destas alterações são estatisticamente significativas, foi verificado se havia alguma correlação entre os genes analisados. Efetuou-se a análise pela Correlação de Spearman para dados não-paramétricos (Anexo IV).

A análise aos resultados da correlação, mostra-nos que tanto nos controlos como para os AD há 36,36% de correlação entre os genes (66 resultados dos quais 24 têm um nível de significância inferior a 5%).

Como se pode verificar na tabela do Anexo IV para o grupo controlo, o gene *CD209* apresenta correlações moderadas com os genes *IL10* e *TNF- α* ($p < 0,05$) assim como com os genes *FOXP3*, *IL6* e *TGF- β* ($p < 0,01$).

Para o gene *CEA* verifica-se uma correlação moderada com o gene *IL6* ($p < 0,05$), mas correlações fortes com os genes *EpCAM*, *FUT3* e *FUT6* ($p < 0,0001$). Estes últimos três genes correlacionam-se fortemente entre si ($p < 0,0001$).

O gene *FUT3* apresenta também uma correlação moderada com o gene da *IL6* ($p < 0,05$).

O gene para a *IL10* mantém uma correlação moderada com os genes *IL6*, *TGF- β* ($p < 0,01$) e *TNF- α* ($p < 0,5$).

O *IL6* apresenta uma correlação forte com o *TGF- β* ($p < 0,0001$) e moderada com o *TNF- α* ($p < 0,01$),

A única correlação negativa com significado estatístico, verifica-se entre os genes *KRT19* e *TNF- α* ($p < 0,05$).

No caso dos AD não se verificam correlações fortes entre as expressões genéticas dos doze genes analisados, exceto no caso do *EpCAM* com o *FUT3* ($p < 0,0001$) e entre o *FUT4* com o gene *IL6* ($p < 0,0001$). Todas as restantes correlações são moderadas e verificaram-se entre o *CD209* e o *CEA*, *FOXP3*, *IL10*, *TGF- β* e *TNF- α* ($p < 0,01$), assim como com a *IL6* ($p < 0,5$).

Para o *FOXP3* as correlações foram encontradas com o *CEA*, *FUT4*, *IL10*, *IL6* para um nível de significância de 5%, e também com *TGF- β* ($p < 0,01$) e com o *TNF- α* ($p < 0,0001$)

Para os genes que codificam para as fucosiltransferases as correlações encontradas são entre *FUT3* e *FUT6* ($p < 0,01$). Já o *FUT4* apresenta correlações com os genes *IL10* ($p < 0,01$) e *TGF- β* ($p < 0,05$).

No caso dos genes que codificam para as citocinas, verifica-se a correlação entre *IL6* com o gene *IL10*, *TNF- α* ($p < 0,01$) e *TGF- β* ($p < 0,0001$), verificando-se uma correlação moderada também entre estes dois últimos ($p < 0,01$) e de ambos com o gene *IL10*.

Efetuuou-se também a análise descrita mas com subdivisão dos grupos controlo e AD em Homens (Controlo versus AD) e Mulheres (Controlo versus AD) (Tabela 6).

Como se pode verificar, não há grandes alterações em relação à análise efetuado sem esta divisão nos resultados do teste de Mann-Whitney U, exceto para o gene *FUT4*, que

apresenta uma alteração de sobreexpresso para subexpresso, mas sem qualquer significado estatístico ($p = 0,922$), pelo que não é considerado uma alteração relevante.

Não são apresentados os resultados da correlação de Spearman já que se verificou a mesma tendência de falta de significado estatístico o que impossibilita conclusões sólidas.

O baixo número de amostras após a subdivisão entre homens e mulheres e o desequilíbrio introduzido pelo baixo número de amostras de controlo em mulheres (apenas $n = 4$) será o fator responsável.

Quando se analisa a expressão, assim como a correlação dos genes expressos em SCC (Anexo V), conclui-se que apenas existe uma correlação entre FUT4 e IL6, no entanto existiam apenas 6 amostras de SCC, o que pode retirar robustez à análise.

Tabela 6 - Tabela representativa dos resultados obtidos pelo teste Mann-Whitney U, para a expressão de genes das amostras de aspirados ganglionares com subdivisão entre homens e mulheres. Na primeira coluna estão indicados os genes analisados, na coluna seguinte é indicado de forma quantitativa as variações encontradas entre os níveis de expressão. Foi efetuado o rácio AD/ controlo. A terceira coluna indica se as alterações encontradas significam uma subexpressão (↓) ou sobreexpressão (↑) do gene de interesse relativamente ao controlo de modo qualitativo. (Sexo = F; Sexo = M, Grouping Variable: Patologia; Asymp. Sig. (2-tailed)).

Genes	Mulheres			Homens		
	Varição da expressão	Tendência	p	Varição da expressão	Tendência	p
<i>CD209</i>	0,824	↓	0,620	0,880	↓	0,560
<i>CEA</i>	1,430	↑	0,258	1,336	↑	0,110
<i>EpCAM</i>	2,205	↑	0,048 *	1,879	↑	0,001 *
<i>FOXP3</i>	0,761	↓	0,620	0,704	↓	0,174
<i>FUT3</i>	1,594	↑	0,048 *	1,265	↑	0,144
<i>FUT4</i>	1,067	↑	0,670	0,959	↓	0,922
<i>FUT6</i>	1,510	↑	1,000*	1,671	↑	0,040*
<i>IL10</i>	1,248	↑	0,888	1,252	↑	0,158
<i>IL6</i>	1,440	↑	0,777	1,343	↑	0,142
<i>KRT19</i>	1,359	↑	0,572	1,543	↑	0,052
<i>TGF-β</i>	0,886	↓	0,157	0,066	↓	0,959
<i>TNF-α</i>	0,678	↓	0,090	0,689	↓	0,089

4. DISCUSSÃO

As células tumorais frequentemente exibem estruturas aberrantes de glicanos na sua superfície, o que contribui para alterar de modo dramático as propriedades de adesão, progressão e reconhecimento pelo sistema imunológico⁶⁰⁻⁶². Por exemplo, existem padrões específicos de glicosilação que regulam diversos processos, como o tráfego e migração de leucócitos^{63,64}.

O aumento de estruturas sialiladas é uma das mais frequentes alterações de glicosilação em células tumorais⁶¹. A presença de TACA sialilados, como é o caso do sLe^x, em CP influencia a adesão celular, migração, proliferação e crescimento do tumor^{7,14,61}.

Este trabalho prático teve como principal objetivo elaborar um estudo preliminar com base em literatura disponível, bases de dados públicas de *microarrays*, linhas celulares e amostras de aspirados ganglionares, nos quais seriam estudados um número representativo de genes. Em paralelo foi otimizado o armazenamento e protocolo para o tratamento de amostras de biópsias e de líquido pleural destinadas ao estudo a expressão de glicogenes em larga escala.

O estudo piloto serviu para se perceber quais as dificuldades técnicas e pontos de melhoria a serem implementados para o sucesso do estudo em larga escala.

Foi otimizado o processo de extração de RNA e estabelecida a quantidade mínima necessária ao estudo de glicogenes em larga escala.

Foi elaborada uma lista de 70 genes (tabela 3) que se pensa serem relevantes no desenvolvimento de CP e principalmente onde se pensa ser possível encontrar diferenças significativas entre a expressão genética dos dois tipos de amostras já que representam estádios diferentes da doença (as biópsias representam o estágio inicial e o líquido pleural o estágio avançado).

4.1. Os genes responsáveis pela expressão de marcadores tumorais exibem expressão aumentada nas amostras tumorais relativamente ao grupo controlo

Os TACA podem ser expressos em exclusivo por tumores estando completamente ausentes num indivíduo adulto saudável, como o CEA ou podem ter expressão residual em indivíduos saudáveis estando aumentada no caso de um doente oncológico como no caso da citoqueratina 19, produto do gene *KRT19*. No caso da EpCAM esta é uma molécula epitelial de adesão celular e um antigénio de diferenciação pan-epitelial, expresso em quase todos os cancros assim como em situações de inflamação⁶⁵ e na ausência de doença, a expressão é limitada a tecidos epiteliais^{66,67}.

Neste contexto, foi analisada por qPCR a expressão destes três genes que codificam para moléculas consideradas como marcadores tumorais, concretamente o *EpCAM*, o *CEA* e o *KRT19*.

A sobreexpressão de *EpCAM* parece ser um mecanismo importante para romper com o contato célula-célula e permitir a migração necessária às metástases, pelo que o *EpCAM* pode ser considerada uma molécula pró-metástica, havendo evidências de que a expressão elevada em tumores está ligada ao aumento de metástases nos nódulos linfáticos ⁶⁸.

A expressão aumentada do gene *EpCAM* está relacionada com a diminuição do tempo de vida em câncros do ovário ^{67,69} e de mama ^{67,70}. O inverso acontece no cancro renal ^{67,71}.

Tal pode eventualmente ser explicado, devido ao padrão de glicosilação do *EpCAM* diferir não só entre o epitélio normal e o epitélio tumoral, mas também entre diferentes tipos de tumores ^{67,72}, explicando os seus efeitos na sobrevivência de diferentes doentes tumorais, uma vez que o padrão de glicosilação influencia a sinalização, migração celular e adesão celular ⁶⁷.

Os resultados obtidos mostraram haver uma expressão aumentada dos três genes relativamente ao grupo controlo embora apenas o *EpCAM* tenha apresentado um resultado estatisticamente significativo ($p < 0,01$) (tabela 5).

No presente trabalho, verificou-se que o *EpCAM* foi o gene com nível de expressão mais aumentada relativamente ao grupo controlo, não só do geral (Tabela 5), como também nos subgrupos de mulheres e homens com AD (tabela 6).

Os resultados encontrados para o *EpCAM* no que diz respeito aos aspirados ganglionares difere dos resultados encontrados nos *microarrays* onde o gene com expressão mais aumentada foi o *CEA*. Esta diferença é explicada por se tratar de diferentes tipos de amostras, já que dizem respeito a estadiamentos diferentes.

Gires *et al*, em 2001, afirmaram ter estabelecido uma relação negativa entre a expressão de *TNF- α* e o *EpCAM* em SCC ⁶⁶. Neste trabalho foi também verificada uma correlação negativa entre a expressão de ambos, contudo sem significado estatístico. Isto poderá ser devido ao baixo número de amostras, pelo que de futuro pretende-se avaliar esta tendência para um maior número de amostras.

O *CEA* é uma glicoproteína de superfície membranar, cuja glicofoma sialofucosilada, nomeadamente quando decorada com sLe^x, pode servir como ligando à L-selectina e E-selectina. Em cancro do colon parece ser crítica na disseminação metástica destas células ⁷³⁻⁷⁵. Em CP apesar de descrito como marcador tumoral pouco se sabe sobre o seu papel fisiopatológico.

Neste trabalho, verificou-se que os níveis de expressão de *CEA* são muito baixos no grupo controlo e que a expressão aumentou no grupo de AD (figura 8).

Tanto nos aspirados ganglionares, como nos estudos de *microarrays* (tabelas 4 e 5, respetivamente), verificamos aumento da expressão genética dos marcadores tumorais, com valores semelhantes, exceção para o *CEA*, como referido anteriormente.

As conclusões do estudo estão de acordo com o previsto na literatura também para a Citoqueratina 19, a qual pertence a uma família de pelo menos 29 proteínas diferentes dos filamentos intermédios do citoesqueleto.

Cada célula expressa diferentes tipos de citoqueratinas relacionadas com o crescimento e diferenciação, mas em contexto tumoral a citoqueratina 19 é considerada um excelente marcador para CP devido à sua correlação com a massa tumoral, recidivas pós-cirúrgicas e pior valor prognóstico ⁷⁶.

4.2. Os genes envolvidos na resposta imune são citocinas e apresentam correlação estatística no grupo controlo e no grupo AD

Para que as células tumorais saiam do seu local primário e invadam outros órgãos, ocorre um processo muito semelhante ao da migração leucocitária em resposta à infeção que pode ser encontrada em condições fisiológicas normais ⁷⁷. Este processo inicia-se com a circulação de leucócitos, que expressam ligandos de L-Selectina, ligando-se a outros leucócitos ou a células endoteliais por ligação à E-Selectina, a qual é expressa em células endoteliais ativadas por citocinas ⁷⁸.

Um processo semelhante acontece nas células tumorais que necessitam entrar na corrente sanguínea para se disseminarem pelo organismo. Para isso acontecer é fundamental que haja expressão de citocinas, que ativam as células do endotélio, e que podem ser produzidas pelas próprias células tumorais ⁷⁹. É neste enquadramento que se analisa a expressão dos genes *FOXP3*, *IL10*, *IL6*, *TNF- α* e *TFG- β* .

O *FOXP3* é altamente expresso em linfócitos T reguladores (Treg) e está envolvido nas respostas do sistema imune, funcionando como o 'regulador supremo' no desenvolvimento e função dos Treg. Em modelos animais os Treg que expressam *FOXP3*, têm papéis fundamentais especialmente na auto-tolerância, sabendo-se também que em humanos, os doentes oncológicos apresentam um excesso de linfócitos T *FOXP3* positivos, inibindo a capacidade do organismo de eliminar células tumorais ⁸⁰.

Em 2007, Hinz *et al*, mostraram que em células de cancro pancreático humano a baixa regulação de *FOXP3* resultava na sobreexpressão de *IL6* ⁸¹. No entanto, apesar de no presente trabalho, e de acordo com a análise estatística de Mann-Whitney, a expressão de *FOXP3* estar diminuída no grupo AD em simultâneo com o a expressão de *IL6* estar aumentada, não se pode considerar os resultados dos dois estudos como semelhantes, até

porque no presente trabalho, a correlação entre a expressão genética dos dois genes foi positiva, o que significa que a expressão de ambos os genes aumenta/ diminui em conjunto. O TGF- β é uma citocina multifuncional que regula a proliferação celular, diferenciação e sobrevivência ou apoptose celular ^{82,83}.

O TGF- β está implicado em muitas doenças humanas podendo contribuir para a patogénese tumoral ao dirigir o seu crescimento e influenciando o microambiente local o que resulta em imunossupressão e indução de angiogénese para promover a neovascularização tumoral ^{84,85}.

Há evidências de que em estádios mais avançados do desenvolvimento tumoral, o TGF- β é ativamente secretado pelas células tumorais contribuindo para o crescimento, invasão e metastização e em simultâneo, diminuindo a resposta imune do hospedeiro ⁸².

Em termos de resposta, a citocina TNF- α , apresenta tanto propriedades apoptóticas como anti-apoptóticas dependendo da natureza do estímulo e estado de ativação das vias de sinalização ⁸⁶, tornando o seu papel ambíguo. No caso de tecidos de NSCLC, foi verificado por Kataki *et al* ⁸⁷ que a expressão deste estaria diminuída, assim como no estudo realizado por Lopez-Gonzalez a líquido pleural ⁸⁸.

Um ponto interessante da pesquisa diz respeito precisamente às citocinas. Com exceção para o gene *IL6*, os restantes genes (*FOXP3*, *IL10*, *TGF- β* , e *TNF- α*) não apresentam quaisquer tendências de variação (tabelas 4 e 5).

Os resultados poderão sugerir que haja uma mudança nos padrões de expressão das citocinas quando as células tumorais adquirem capacidade metástica. Esta hipótese vai ser confirmada com os resultados de expressão genética de biópsias e de líquido pleural.

Foi encontrada correlação positiva entre a expressão dos genes *FOXP3*, *TNF- α* e *TGF- β* assim como com a *IL10* e *IL6* (Tabela do Anexo IV). No entanto a citocina IL-10 tem como função inibir tanto o TNF- α como a IL-6 pelo que seria de esperar encontrarmos uma correlação negativa ⁸⁹.

Esta correlação não se verificou para o SCC muito provavelmente devido ao baixo número de amostras (n=6).

4.3. A expressão genética dos antígenos de Lewis mostrou haver correlação entre FUT3 e FUT6 mas não com FUT4

A regulação da expressão das selectinas ajuda a iniciar e a terminar a resposta inflamatória, e de modo semelhante, as interações entre as células tumorais e as células endoteliais, uma vez que a ligação entre as selectinas e os seus ligandos pode ser um passo vital para a disseminação das células tumorais ⁷⁸.

A expressão aberrante de antígenos do tipo Lewis são um fenómeno geralmente associado a tumores inclusive de pulmão ⁹⁰ e o aumento da expressão de antígenos sialilados, incluindo sLe^a e sLe^x na superfície das células tumorais é necessário para a ligação e disseminação tumoral ⁹¹⁻⁹³. Isto acontece porque a exposição dos antígenos na superfície celular resulta no aumento da adesão das células tumorais às células endoteliais ativadas, por intermédio da E-selectina (especificamente a *endothelial leukocyte adhesion molecule-1*; ELAM-1) ^{19,94}.

Os antígenos de Lewis dividem-se em grupos por tipo de cadeia; cadeia de tipo 1 e cadeia de tipo 2, como descrito na seção 1.2.2 e são formados por cadeias polilactosaminicas α 2,3-sialiladas ¹⁹.

Enquanto os antígenos de tipo 1, ou seja, Le^a, Le^b e sLe^a são expressos em exclusivo pela enzima fucosiltransferase III, a qual é o produto do gene *FUT3*, os antígenos de tipo 2 ou seja, Le^y, Le^x e sLe^x, podem ser expressos pelas enzimas fucosiltransferases III, IV ou VI, produtos dos genes *FUT3*, *FUT4* e *FUT6* ⁹⁵.

Verificou-se neste trabalho que qualquer um dos genes que codificam para as fucosiltransferases III, IV ou VI estavam aumentados, embora apenas os genes *FUT3* e *FUT6* tenham significado estatístico e estejam correlacionados tanto no grupo AD como no grupo controlo. Mais uma vez, para o SCC essa correlação não se verificou provavelmente devido ao baixo número de amostras obtido.

Já foi referido anteriormente que a estrutura dos glicanos varia de acordo com o ambiente em que se encontram, mas neste caso verifica-se um aumento da expressão de *EpCAM*, que induz a alteração do formato da célula tumoral, e está correlacionado com a expressão de *FUT3* e de *FUT6*. Poder-se-ia especular que configuração celular e a configuração dos glicanos expressos na superfície celular estão intimamente relacionados, no sentido em que as cadeias de glicanos são carregadas negativamente. Alterações à conformação afeta o modo como se estabelece a relação eletrostática entre as cadeias e que a alteração no ambiente da superfície celular poderia influenciar de algum modo os mecanismos intracelulares, mas tal necessitaria de mais investigação.

Relativamente ao *FUT4*, este é constitutivamente expresso em todas as células, embora varie o nível de expressão de acordo com os tecidos ^{58,95,96}. A fucosiltransferase IV catalisa a síntese do antígeno de Lewis não sialilados ^{95,97} e está relacionado com a ligação à molécula ELAM-1, presente no endotélio. Verifica-se neste trabalho que a sua expressão não está correlacionada com as outras duas fucosiltransferases mas sim com os genes *IL6* e *IL10*.

No caso dos genes que codificam para as fucosiltransferases não há diferenças relevantes entre os níveis de expressão nos aspirados ganglionares e nos *microarrays*, como se suspeitava já que em ambos os casos haverá já uma expressão aumentada da fucosilação.

4.4. O recetor de células dendríticas, DC209

A expressão genética do modelo celular revelou que, como seria de esperar, o gene *CD209* não tem qualquer expressão visto tratar-se de um gene que codifica para um recetor transmembranar expresso na superfície de DC e macrófagos também conhecido por *DC-SIGN* (derivado de *dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin*)

O antígeno CD209 é expresso em DC ligando-se fortemente ao ICAM-3 expresso em linfócitos T, mas está também envolvido no sistema imune inato ao reconhecer uma vasta gama de vírus e parasitas⁹⁸.

Verificou-se não haver qualquer expressão genética nas linhas celulares, mas como descrito trata-se de uma amostra de células homogéneas pelo que na ausência de DC não há qualquer expressão de CD209.

Nas amostras de aspirados ganglionares, apesar das células serem maioritariamente tumorais como verificado pela análise de citometria de fluxo (ponto 3.2.2), não representam uma amostra pura no sentido de serem 100% células tumorais mas são bastante mais representativas do que sucede num microambiente tumoral como um gânglio do que uma cultura de células.

Neste sentido, verifica-se que a expressão de *CD209* existe indiciando a presença de DC ou macrófagos. Este facto é relevante pois a expressão de *CD209* diminuída no grupo AD relativamente ao grupo controlo e devido à sua atividade relacionada com o sistema imunitário, indica um decréscimo de DC e conseqüentemente um decréscimo na ação do sistema imunitário.

O indicio um imunossupressão generalizada é apoiado pela correlação estatisticamente significativa com todos os genes que codificam para citocinas, também estas intervenientes no processo imune. Relevante é o fato de nos estudos de *microarrays* se verificar que o *CD209* não tem qualquer variação entre as amostras controlo e AD. Como estes estudos dizem respeito a tecidos obtidos por biópsia e esta só é efetuada nos estádios iniciais de doença podemos assumir que não está a haver qualquer tipo de resposta por parte do sistema imune.

5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Neste trabalho verificou-se que modelos sejam celulares ou teóricos, como o uso de bases de dados públicas de *microarrays* são bons pontos de partida para a identificação de potenciais novos biomarcadores. O recurso aos dados de *microarrays* tornados públicos permite que se façam perguntas biológicas diferentes, devido ao elevado número de genes, podendo ser usados de modo diferencial. Tal permite uma dinamização da informação disponível que se pensa possa estar subaproveitada.

Um número maior de amostras irá permitir obter resultados bastante interessantes no que diz respeito às subcategorias homem e mulher, já que ficou implícito a possibilidade de haver alguma diferença.

Os ensaios apresentados nesta dissertação foram realizados em paralelo com a construção e organização de um biobanco de tecidos de 43 doentes com CP depositados em azoto líquido. Algumas destas amostras foram já utilizadas para otimizar o método de extração de RNA de amostras sólidas.

Foram também realizados ensaios de qPCR não só no laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Lisboa mas também no *Complex Carbohydrate Research Center and the Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Georgia*, Estados Unidos da América, parceiros do projeto onde decorre a análise das primeiras amostras, concomitantemente com a escrita desta dissertação.

Em análise, estão também 105 amostras de líquido pleural, para as quais o processo de otimização da técnica de conservação das amostras apresentou mais dificuldades.

De modo geral, tanto o protocolo relacionado com as amostras de aspirados ganglionares como com os protocolos para líquido pleural e biópsias foram implementados com sucesso.

Presume-se que quando for possível reunir a totalidade dos dados clínicos, ainda em falta, tais como estadiamento e tempo de vida, que os resultados finais vão permitir encontrar, pela primeira vez na população portuguesa, diferenças importantes nos padrões de glicosilação para diferentes estádios da doença, contribuindo para o estabelecimento de um valor prognóstico em doentes com CP.

Infelizmente, não foi possível obter os resultados antes da escrita desta dissertação.

A grande vantagem do uso desta técnica é a obtenção rápida de resultados permitindo definir um estádio da doença e também diminuir ao máximo as intervenções invasivas para diagnóstico.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Varki A, Cummings R, Esko J, et al. Essentials of Glycobiology. NY; 2009.
2. Dall'olio F. Protein glycosylation in cancer biology: an overview. *ClinMolPathol.* 1996;49(3):M126-M135.
3. Yarema KJ, Bertozzi CR. Characterizing glycosylation pathways. *Genome Biol.* 2001;2(5):REVIEWS0004.
4. Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science.* 2001;291(5512):2364-2369.
5. Buxbaum E. Fundamentals of Protein Structure and Function (ed 1 st). NY: Springer; 2007.
6. Taylor CM. Glycopeptides and glycoproteins: Focus on the glycosidic linkage. *Tetrahedron.* 2008;54(38):11317-11362.
7. Reis CA, Osorio H, Silva L, Gomes C, David L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol.* 2010;63(4):322-329.
8. Jones J, Krag SS, Betenbaugh MJ. Controlling N-linked glycan site occupancy. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1726(2):121-137.
9. Ungar D. Golgi linked protein glycosylation and associated diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(7):762-769.
10. Taniguchi N, Suzuki A, Narimatsu Y, Narimatsu H, Kawasaki T, Hase S. Experimental Glycoscience. NY; 2008.
11. Mandel U, Hassan H, Therkildsen MH, et al. Expression of polypeptide GalNAc-transferases in stratified epithelia and squamous cell carcinomas: immunohistological evaluation using monoclonal antibodies to three members of the GalNAc-transferase family. *Glycobiology.* Vol. 9. England; 1999:43-52.
12. Freire T, Osinaga E. Immunological and biomedical relevance of the Tn antigen. *Inmunología.* 2003;22(1):27-38.
13. Hakomori S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res.* 1989;52:257-331.
14. Yu LG. The oncofetal Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression. *Glycoconj J.* 2007;24(8):411-420.
15. Ono M, Hakomori S. Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness. *Glycoconj J.* 2004;20(1):71-78.
16. Kim YJ, Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J.* 1997;14(5):569-576.
17. Kim YS, Gum J, Jr., Brockhausen I. Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconj J.* 1996;13(5):693-707.
18. Springer GF. Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J Mol Med (Berl).* 1997;75(8):594-602.
19. Dall'olio F, Malagolini N, Chiricolo M. Chapter 2 Glycosylation in Cancer. *Carbohydrate Chemistry: The Royal Society of Chemistry;* 2012.
20. Silva Z, Konstantopoulos K, Videira PA. The role of sugars in dendritic cell trafficking. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(4):777-789.
21. Silva Z, Tong Z, Cabral MG, et al. Sialyl Lewisx-dependent binding of human monocyte-derived dendritic cells to selectins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;409(3):459-464.
22. Silva Z, Konstantopoulos K, Videira PA. The Role of Sugars in Dendritic Cell Trafficking. *Annals of Biomedical Engineering.* 2011(Journal Article).
23. Takada A, Ohmori K, Yoneda T, et al. Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer research.* 1993;53(2):354-361.

24. F JB, Costa AF. [Small cell lung cancer--state of the art and future perspectives]. *Rev Port Pneumol*. 2007;13(4):587-604.
25. Minna JD, Roth JA, Gazdar AF. Focus on lung cancer. *Cancer Cell*. Vol. 1. United States; 2002:49-52.
26. Macedo JE, Costa AMS, M. BIA, et al. Alterações genéticas no cancro do pulmão: Avaliação das limitações ao seu uso na rotina clínica. *Rev Port Pneumol*. 2007;XIII(1):9-34.
27. Zamboni M. Epidemiologia do câncer de pulmão. *J Pneumol*. 2002;28(1):41-47.
28. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 2003;123(1 Suppl):21S-49S.
29. Sotto-Mayor R. [Lung cancer in women: a different entity?]. *Rev Port Pneumol*. 2006;12(5):545-561.
30. Parente B, Queiroga H, Teixeira E, et al. [Epidemiological study of lung cancer in Portugal (2000/2002)]. *Rev Port Pneumol*. 2007;13(2):255-265.
31. Novaes F, DC C, RL RJ, J D, OC M, AJM C. Câncer de pulmão: histologia, estágio, tratamento e sobrevida. *J Bras Pneumol*. 2008;34(8):595-600.
32. Minami H, Yoshimura M, Matsuoka H, Toshihiko S, Tsubota N. Lung cancer treated surgically in patients <50 years of age. *Chest*. 2001;120(1):32-36.
33. Teixeira E, Conde S, Alves P, Ferreira L, Figueiredo A, Parente B. [Lung cancer and women]. *Rev Port Pneumol*. 2003;9(3):225-247.
34. Kenfield SA, Wei EK, Stampfer MJ, Rosner BA, Colditz GA. Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. *Tob Control*. Vol. 17. England; 2008:198-204.
35. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*. 1997;111(6):1710-1717.
36. Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Ochiai A. Tumor cells in lymph vessels and lymph nodes closely associated with nodal metastasis by invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Sci*. 2003;94(6):508-514.
37. Maly P, Thall A, Petryniak B, et al. The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell*. 1996;86(4):643-653.
38. Bugalho A, Doris MK, Hamacher J, Eberhardt R, Herth FJ. Ecoendoscopia brônquica: Aspectos práticos e aplicabilidade clínica. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 2008;XIV(1):55-58.
39. Antonangelo L, Capelozzi VL. [Collection and preservation of the pleural fluid and pleural biopsy]. *J Bras Pneumol*. Vol. 32 Suppl 4. Brazil; 2006:S163-169.
40. Kroegel C, Antony VB. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. *Eur Respir J*. 1997;10(10):2411-2418.
41. Sugiura S, Ando Y, Minami H, Ando M, Sakai S, Shimokata K. Prognostic value of pleural effusion in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 1997;3(1):47-50.
42. Harley H. Proceedings of the Thoracic Society. *Thorax*. 1976;31(4):485.
43. Wang QY, Wu SL, Chen JH, Liu F, Chen HL. Expressions of Lewis antigens in human non-small cell pulmonary cancer and primary liver cancer with different pathological conditions. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2003;22(3):431-440.
44. Yu CJ, Shih JY, Lee YC, Shun CT, Yuan A, Yang PC. Sialyl Lewis antigens: association with MUC5AC protein and correlation with post-operative recurrence of non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2005;47(1):59-67.
45. Yokota M, Tatsumi N, Nathalang O, Yamada T, Tsuda I. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *J Clin Lab Anal*. Vol. 13. United States; 1999:133-140.
46. Ormerod M. Flow Cytometry – A Basic Introduction.: flowbook.denovosoftware; 2008.
47. Videira PA, Amado IF, Crespo HJ, et al. Surface alpha 2-3- and alpha 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis. *Glycoconjugate journal*. 2008;25(3):259-268.
48. Cabral MG, Piteira AR, Silva Z, Ligeiro D, Brossmer R, Videira PA. Human dendritic cells contain cell surface sialyltransferase activity. *Immunol Lett*. 2010;131(1):89-96.

49. Crespo HJ, Cabral MG, Teixeira AV, Lau JT, Trindade H, Videira PA. Effect of sialic acid loss on dendritic cell maturation. *Immunology*. 2009;128(1 Suppl):e621-631.
50. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
51. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-1108.
52. Fujiwara T, Hiramatsu M, Isagawa T, et al. ASCL1-coexpression profiling but not single gene expression profiling defines lung adenocarcinomas of neuroendocrine nature with poor prognosis. *Lung Cancer*. 2012;75(1):119-125.
53. Hou J, Aerts J, den Hamer B, et al. Gene expression-based classification of non-small cell lung carcinomas and survival prediction. *PLoS One*. 2010;5(4):e10312.
54. Sanchez-Palencia A, Gomez-Morales M, Gomez-Capilla JA, et al. Gene expression profiling reveals novel biomarkers in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2011;129(2):355-364.
55. Yap YL, Lam DC, Luc G, et al. Conserved transcription factor binding sites of cancer markers derived from primary lung adenocarcinoma microarrays. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(1):409-421.
56. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (ed 6th Edition)*: John Wiley & Sons; 2010.
57. Kondo K, Miyoshi T, Hino N, et al. High frequency expressions of CD44 standard and variant forms in non-small cell lung cancers, but not in small cell lung cancers. *J Surg Oncol*. 1998;69(3):128-136.
58. Matsubara Y, Katoh S, Taniguchii H, Oka M, Kadota J, Kohno S. Expression of CD44 variants in lung cancer and its relationship to hyaluronan binding. *J Int Med Res*. 2000;28(2):78-90.
59. Yasuda M, Tanaka Y, Fujii K, Yasumoto K. CD44 stimulation down-regulates Fas expression and Fas-mediated apoptosis of lung cancer cells. *Int Immunol*. 2001;13(10):1309-1319.
60. Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(16):10231-10233.
61. Varki A, Kannagi R, Toole BP. Glycosylation Changes in Cancer. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., eds. *Essentials of Glycobiology*. Vol. 2nd. Cold Spring Harbor (NY): The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California; 2009.
62. Singh SK, Streng-Ouwehand I, Litjens M, et al. Characterization of murine MGL1 and MGL2 C-type lectins: distinct glycan specificities and tumor binding properties. *Molecular immunology*. 2009;46(6):1240-1249.
63. Nonaka M, Ma BY, Murai R, et al. Glycosylation-dependent interactions of C-type lectin DC-SIGN with colorectal tumor-associated Lewis glycans impair the function and differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2008;180(5):3347-3356.
64. Itzkowitz SH, Yuan M, Montgomery CK, et al. Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res*. 1989;49(1):197-204.
65. Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet*. 1979;5(6):957-971.
66. Gires O, Kieu C, Fix P, et al. Tumor necrosis factor alpha negatively regulates the expression of the carcinoma-associated antigen epithelial cell adhesion molecule. *Cancer*. 2001;92(3):620-628.
67. Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol*. 2007;171(2):386-395.
68. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, McGuire WL. Association of the 323/A3 surface glycoprotein with tumor characteristics and behavior in human breast cancer. *Cancer Res*. 1990;50(11):3317-3321.
69. Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2006;103(2):483-488.
70. Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, et al. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;86(3):207-213.

71. Seligson DB, Pantuck AJ, Liu X, et al. Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(8):2659-2669.
72. Pauli C, Munz M, Kieu C, et al. Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett.* Vol. 193. Ireland; 2003:25-32.
73. Thomas SN, Zhu F, Schnaar RL, Alves CS, Konstantopoulos K. Carcinoembryonic antigen and CD44 variant isoforms cooperate to mediate colon carcinoma cell adhesion to E- and L-selectin in shear flow. *The Journal of biological chemistry.* 2008;283(23):15647-15655.
74. Konstantopoulos K, Thomas SN. Cancer cells in transit: the vascular interactions of tumor cells. *Annual Review of Biomedical Engineering.* 2009;11(Journal Article):177-202.
75. Thomas SN, Tong Z, Stebe KJ, Konstantopoulos K. Identification, characterization and utilization of tumor cell selectin ligands in the design of colon cancer diagnostics. *Biorheology.* 2009;46(3):207-225.
76. Naseem N, Reyaz N, Nagi A, Ashraf M, Sami W. Immunohistochemical Expression of Cytokeratin-19 in Non Small Cell Lung Carcinomas - An Experience from a Tertiary Care Hospital in Lahore. *International Journal of Pathology.* 2010;8(2):54-59.
77. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *The Journal of clinical investigation.* 1997;100(11 Suppl):S97-103.
78. McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem.* 1995;270(19):11025-11028.
79. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001;357(9255):539-545.
80. Tao H, Mimura Y, Aoe K, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer.* 2012;75(1):95-101.
81. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, et al. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res.* 2007;67(17):8344-8350.
82. Jennings MT, Pietenpol JA. The role of transforming growth factor beta in glioma progression. *J Neurooncol.* 1998;36(2):123-140.
83. Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M. TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(2):329-337.
84. Benckert C, Jonas S, Cramer T, et al. Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 2003;63(5):1083-1092.
85. Sugano Y, Matsuzaki K, Tahashi Y, et al. Distortion of autocrine transforming growth factor beta signal accelerates malignant potential by enhancing cell growth as well as PAI-1 and VEGF production in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene.* 2003;22(15):2309-2321.
86. Sanlioglu AD, Aydin C, Bozcuk H, Terzioglu E, Sanlioglu S. Fundamental principals of tumor necrosis factor-alpha gene therapy approach and implications for patients with lung carcinoma. *Lung Cancer.* 2004;44(2):199-211.
87. Katakai A, Scheid P, Piet M, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression. *J Lab Clin Med.* 2002;140(5):320-328.
88. Lopez-Gonzalez JS, Avila-Moreno F, Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Mandoki JJ, Meneses-Flores M. Lung carcinomas decrease the number of monocytes/macrophages (CD14+ cells) that produce TNF-alpha. *Clin Immunol.* 2007;122(3):323-329.
89. Cotran R, Kumar, V., Collins, T. Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1999.
90. Jordon D, Jagirdar J, Kaneko M. Blood group antigens, Lewisx and Lewisy in the diagnostic discrimination of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 1989;135(5):931-937.

91. Kojima N, Shiota M, Sadahira Y, Handa K, Hakomori S. Cell adhesion in a dynamic flow system as compared to static system. Glycosphingolipid-glycosphingolipid interaction in the dynamic system predominates over lectin- or integrin-based mechanisms in adhesion of B16 melanoma cells to non-activated endothelial cells. *J Biol Chem*. 1992;267(24):17264-17270.
92. Kojima N, Handa K, Newman W, Hakomori S. Inhibition of selectin-dependent tumor cell adhesion to endothelial cells and platelets by blocking O-glycosylation of these cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;182(3):1288-1295.
93. Kojima N, Handa K, Newman W, Hakomori S. Multi-recognition capability of E-selectin in a dynamic flow system, as evidenced by differential effects of sialidases and anti-carbohydrate antibodies on selectin-mediated cell adhesion at low vs. high wall shear stress: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;189(3):1686-1694.
94. Shaikh FM, Seales EC, Clem WC, Hennessy KM, Zhuo Y, Bellis SL. Tumor cell migration and invasion are regulated by expression of variant integrin glycoforms. *Exp Cell Res*. 2008;314(16):2941-2950.
95. Taniguchi N, Honke K, Fukuda M. Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes. Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes: Springer; 2002:688.
96. Gersten KM, Natsuka S, Trinchera M, et al. Molecular cloning, expression, chromosomal assignment, and tissue-specific expression of a murine alpha-(1,3)-fucosyltransferase locus corresponding to the human ELAM-1 ligand fucosyl transferase. *J Biol Chem*. 1995;270(42):25047-25056.
97. Lowe JB, Kukowska-Latallo JF, Nair RP, et al. Molecular cloning of a human fucosyltransferase gene that determines expression of the Lewis x and VIM-2 epitopes but not ELAM-1-dependent cell adhesion. *J Biol Chem*. 1991;266(26):17467-17477.
98. Garcia-Vallejo JJ, van Liempt E, da Costa Martins P, et al. DC-SIGN mediates adhesion and rolling of dendritic cells on primary human umbilical vein endothelial cells through LewisY antigen expressed on ICAM-2. *Molecular immunology*. 2008;45(8):2359-2369.

ANEXO I

PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES:

Água DEPC:

Prepara-se uma solução de água com 0,1% DEPC. Agita-se no agitador magnético por 60 minutos e leva-se a autoclave por 30 min a 15 psi (1,05 kg/ cm²).

Tampão Salino Fosfatado (PBS)

Dissolve-se 80,0 g de Cloreto de Sódio (NaCl), 2,0 g de Cloreto de Potássio (KCl), 11,5 g de hidrogenofosfato de sódio heptahidratado (Na₂HPO₄.H₂O) e 2,0 g de hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) em 1000 mL de água destilada. Após a completa dissolução, obtém-se uma solução concentrada 10 x, sendo a sua diluição para uma concentração final 1 x obtida por adição água destilada. O pH da solução concentrada é de cerca de 6,8, ficando a solução final 1 x, com pH de 7,4.

Após a preparação da solução tampão, procede-se à verificação do pH, ajustando-se se necessário, com Ácido Clorídrico (1M HCl) ou com Hidróxido de Sódio (1M NaOH).

Tampão de Lise de Eritrócitos (RCLB)

Dissolver 7,7g de NH₄Cl (144 mM) e 0,084g de NaHCO₃ (1mM) em 800 ml de H₂O_{dde}. Dissolver bem no agitador magnético. Perfazer o volume com H₂O_{dde}.

ANEXO II - Resumo dos Casos de Aspirados Ganglionares analisados

ID Doente	Sexo	Idade	Diagnóstico	ID Doente	Sexo	Idade	Diagnóstico
1	M	50	AD	29	M	64	SCC
2	M	86	AD	30	F	32	SCLC
3	M	69	SCC	31	F	61	AD
4	F	66	NSCLC	32	F	76	AD
5	F	56	SCLC	33	M	30	Controlo
6	M	67	AD	34	F	75	NSCLC
7	F	54	AD	35	M	59	AD
8	M	45	Controlo	36	M	44	SCC
9	F	36	Controlo	37	M	73	AD
10	M	66	SCC	38	F	73	Controlo
11	F	67	Controlo	39	F	72	Controlo
12	F	54	AD	40	M	64	Controlo
13	M	76	AD	41	M	51	AD
14	F	85	AD	42	M	59	Controlo
15	M	70	Controlo	43	F	52	AD
16	M	67	SCLC	44	M	52	Controlo
17	M	67	SCC	45	M	54	AD
18	M	61	Controlo	46	M	48	SCLC
19	M	64	Controlo	47	M	58	AD
20	M	75	AD	48	F	40	AD
21	M	53	AD	49	F	69	AD
22	M	57	Controlo	50	F	64	AD
23	M	69	Controlo	51	M	60	SCC
24	M	68	AD	52	M	72	SCLC
25	M	62	AD	53	M	64	Controlo
26	M	46	AD	54	M	63	SCLC
27	F	38	NSCLC	55	M	67	Controlo
28	F	65	AD	56	M	74	Controlo

Diagnóstico	Sexo	Média	Nr casos	SD da Média	Mínimo	Máximo
Controlo	Mulher	62,00	4	8,765	36	73
	Homem	59,69	13	3,275	30	74
	Total	60,24	17	3,098	30	74
AD	Mulher	62,00	10	4,082	40	85
	Homem	62,71	14	3,151	46	86
	Total	62,42	24	2,449	40	86
SCC	Homem	61,67	6	3,748	44	69
	Total	61,67	6	3,748	44	69
SCLC	Mulher	44,00	2	12,000	32	56
	Homem	62,50	4	5,172	48	72
	Total	56,33	6	5,959	32	72
NSCLC	Mulher	59,67	3	11,141	38	75
	Total	59,67	3	11,141	38	75
Total	Mulher	59,74	19	3,429	32	85
	Homem	61,46	37	1,794	30	86
	Total	60,88	56	1,646	30	86

ANEXO III - Resumo dos Casos de Biópsias em análise

ID Doente	Sexo	Idade	Diagnóstico
1	F	41	Carcinoide atípico
2	M	63	LCC
3	M	84	AD
4	M	48	AD
5	M	49	AD
6	M	45	AD
7	M	72	AD
8	M	64	AD
9	M	79	AD
10	M	61	AD
11	F	55	AD
12	M	69	AD
13	M	81	AD
14	M	65	Tuberculose
15	F	71	AD
16	M	71	Linfoma hodgkin
17	M	52	AD
18	M	67	AD
19	M	80	Pavimento celular
20	M	68	AD
21	F	83	AD

ID Doente	Sexo	Idade	Diagnóstico
22	M	66	AD
23	M	60	AD
24	M	53	AD
25	F	72	AD
26	M	80	Processo inflam. crónico
27	M	76	AD
28	M	77	AD
29	F	67	AD
30	M	72	AD
31	F	59	Pavimento celular
32	M	57	Linfoma não Hodgkin
33	M	78	AD
34	M	66	AD
35	M	49	Pavimento celular
36	M	65	AD
37	M	64	Pavimento celular
38	F	67	AD
39	M	68	AD
40	F	64	AD
41	M	63	AD
42	M	72	Carcinoma pleomórfico
43	M	65	AD

São considerados apenas os casos de AD, por ser o mais representativo.

Diagnóstico	Sexo	Média	Nr casos	SD da Média	Mínimo	Máximo
AD	Mulher	68,42	7	5,91	55	83
	Homem	65,92	25	8,00	45	84
	Total	66,46	32	7,56	45	84

Nota: Não são apresentados os dados das amostras líquido pleural devido de não ter sido possível em tempo útil reunir os dados clínicos de todos os doentes.

ANEXO IV

		CD209	CEA	EpCAM	FOXP3	FUT3	FUT4	FUT6	IL10	IL6	KRT19	TGF-β	TNF-α		
		Controlos													
Coef. Correlação	CD209		0,255	0,255	0,691 **	0,240	0,068	0,213	0,517 *	0,752 **	-0,347	0,750 **	0,527 *	CD209	
		<i>p</i>	0,323	0,323	0,002	0,353	0,803	0,411	0,034	4,92e-04	0,188	0,001	0,030		
Coef. Correlação	CEA	0,544 **		0,819 ***	0,110	0,917 ***	0,344	0,917 ***	0,127	0,529 *	0,168	0,424	0,164	CEA	
		<i>p</i>	0,006	5,88e-05	0,673	2,32e-07	0,192	2,32e-07	0,626	0,029	0,535	0,090	0,529		
Coef. Correlação	EpCAM	0,036	0,186		0,184	0,860 ***	0,126	0,850 ***	0,042	0,319	0,256	0,252	0	EpCAM	
		<i>p</i>	0,869	0,384	0,480	9,43e-06	0,641	1,52e-05	0,874	0,213	0,339	0,328	1		
Coef. Correlação	FOXP3	0,657 **	0,470 *	0,103		0,120	0,032	0,157	0,529 *	0,713 **	-0,400	0,770 **	0,819 ***	FOXP3	
		<i>p</i>	4,82e-04	0,021	0,633	0,646	0,905	0,548	0,029	0,001	0,125	3,03e-04	5,88e-05		
Coef. Correlação	FUT3	0,142	0,190	0,817 ***	0,306		0,294	0,882 ***	0,110	0,515 *	0,203	0,341	0,074	FUT3	
		<i>p</i>	0,509	0,373	1,09e-06	0,146	0,269	2,78e-06	0,673	0,035	0,451	0,181	0,779		
Coef. Correlação	FUT4	0,263	0,128	0,368	0,467 *	0,239		0,118	0,076	0,324	-0,307	0,218	0,365	FUT4	
		<i>p</i>	0,276	0,601	0,121	0,044	0,325	0,664	0,778	0,222	0,265	0,418	0,165		
Coef. Correlação	FUT6	0,091	0,334	0,530 **	0,112	0,560 **	0,289		0,064	0,456	0,347	0,341	0,162	FUT6	
		<i>p</i>	0,671	0,111	0,008	0,602	0,004	0,229	0,808	0,066	0,188	0,181	0,535		
Coef. Correlação	IL10	0,647 **	0,343	0,337	0,428 *	0,201	0,649 **	0,144		0,669 **	-0,453	0,642 **	0,564 *	IL10	
		<i>p</i>	0,001	0,101	0,108	0,037	0,347	0,003	0,501	0,003	0,078	0,005	0,018		
Coef. Correlação	IL6	0,424 *	0,208	0,254	0,428 *	0,053	0,832 ***	0,297	0,644 **		-0,482	0,831 ***	0,706 **	IL6	
		<i>p</i>	0,039	0,330	0,231	0,037	0,806	1,02e-05	0,159	0,001	0,058	3,61e-05	0,002		
Coef. Correlação	KRT19	-0,130	0,208	0,325	-0,217	0,110	0,140	0,046	0,291	0,027		-0,494	-0,541 *	KRT19	
		<i>p</i>	0,544	0,330	0,121	0,308	0,610	0,567	0,831	0,167	0,900	0,052	0,030		
Coef. Correlação	TGF-β	0,610 **	0,334	0,139	0,688 **	0,162	0,535 *	0,055	0,677 **	0,723 ***	0,106		0,828 ***	TGF-β	
		<i>p</i>	0,002	0,111	0,517	2,04e-04	0,450	0,018	0,799	2,84e-04	6,47e-05	0,622	3,99e-05		
Coef. Correlação	TNF-α	0,586 **	0,317	0,030	0,746 ***	0	0,412	-0,070	0,439 *	0,650 **	-0,243	0,643 **		TNF-α	
		<i>p</i>	0,003	0,132	0,888	2,84e-05	1	0,079	0,744	0,032	0,001	0,253	0,001		
		Adenocarcinomas													
		CD209	CEA	EpCAM	FOXP3	FUT3	FUT4	FUT6	IL10	IL6	KRT19	TGF-β	TNF-α		

Tabela representativa dos resultados da análise estatística de correlação de Spearman para o grupo adenocarcinoma e para o grupo controlo. *. Correlation is significant at the 0,05 level (2-tailed).
 . Correlation is significant at the 0,01 level (2-tailed). * Correlation is significant at the 0,0001 level (2-tailed).

ANEXO V

		CD209	CEA	EpCAM	FOXP3	FUT3	FUT4	FUT6	IL10	IL6	KRT19	TGF-β	TNF-α		
		Controlos													
Coef. Correlação	CD209		0,255	0,255	0,691 **	0,240	0,068	0,213	0,517 *	0,752 **	-0,347	0,750 **	0,527 *	CD209	
<i>p</i>			0,323	0,323	0,002	0,353	0,803	0,411	0,034	4,92e-04	0,188	0,001	0,030		
Coef. Correlação	CEA	0,429		0,819 **	0,110	0,917 **	0,344	0,917 **	0,127	0,529 *	0,168	0,424	0,164	CEA	
<i>p</i>		0,397		5,88e-05	0,673	2,32e-07	0,192	2,32e-07	0,626	0,029	0,535	0,090	0,529		
Coef. Correlação	EpCAM	-0,314	0,257		0,184	0,860 **	0,126	0,850 **	0,042	0,319	0,256	0,252	0	EpCAM	
<i>p</i>		0,544	0,623		0,480	9,43e-06	0,641	1,52e-05	0,874	0,213	0,339	0,328	1		
Coef. Correlação	FOXP3	1,000	0,429	-0,314		0,120	0,032	0,157	0,529 *	0,713 **	-0,400	0,770 **	0,819 **	FOXP3	
<i>p</i>		0,000	0,397	0,544		0,646	0,905	0,548	0,029	0,001	0,125	3,03e-04	5,88e-05		
Coef. Correlação	FUT3	0,086	0,486	0,429	0,086		0,294	0,882 **	0,110	0,515 *	0,203	0,341	0,074	FUT3	
<i>p</i>		0,872	0,329	0,397	0,872		0,269	2,78e-06	0,673	0,035	0,451	0,181	0,779		
Coef. Correlação	FUT4	-0,600	-0,100	0,200	-0,600	0,500		0,118	0,076	0,324	-0,307	0,218	0,365	FUT4	
<i>p</i>		0,285	0,873	0,747	0,285	0,391		0,664	0,778	0,222	0,265	0,418	0,165		
Coef. Correlação	FUT6	-0,029	0,771	0,714	-0,029	0,429	0,100		0,064	0,456	0,347	0,341	0,162	FUT6	
<i>p</i>		0,957	0,072	0,111	0,957	0,397	0,873		0,808	0,066	0,188	0,181	0,535		
Coef. Correlação	IL10	0,543	0,257	0,029	0,543	0,771	0,200	0,029		0,669 **	-0,453	0,642 **	0,564 *	IL10	
<i>p</i>		0,266	0,623	0,957	0,266	0,072	0,747	0,957		0,003	0,078	0,005	0,018		
Coef. Correlação	IL6	-0,486	-0,029	-0,314	-0,486	0,314	0,900 *	-0,143	0,029		-0,482	0,831 **	0,706 **	IL6	
<i>p</i>		0,329	0,957	0,544	0,329	0,544	0,037	0,787	0,957		0,058	3,61e-05	0,002		
Coef. Correlação	KRT19	0,143	-0,029	-0,771	0,143	0,143	0,200	-0,543	0,257	0,714		-0,494	-0,541 *	KRT19	
<i>p</i>		0,787	0,957	0,072	0,787	0,787	0,747	0,266	0,623	0,111		0,052	0,030		
Coef. Correlação	TGF-β	0,486	0,714	-0,371	0,486	0,371	-0,400	0,143	0,314	0,371	0,657		0,828 **	TGF-β	
<i>p</i>		0,329	0,111	0,468	0,329	0,468	0,505	0,787	0,544	0,468	0,156		3,99e-05		
Coef. Correlação	TNF-α	0,600	0,657	-0,257	0,600	-0,029	-0,100	0,429	0,143	-0,143	0,029	0,486		TNF-α	
<i>p</i>		0,208	0,156	0,623	0,208	0,957	0,873	0,397	0,787	0,787	0,957	0,329			
		Epidermóide													
		CD209	CEA	EpCAM	FOXP3	FUT3	FUT4	FUT6	IL10	IL6	KRT19	TGF-β	TNF-α		

Tabela representativa dos resultados da análise estatística de correlação de Spearman para o grupo SCC e para o grupo controlo. . *. Correlation is significant at the 0,05 level (2-tailed). **. Correlation is significant at the 0,01 level (2-tailed). *** Correlation is significant at the 0,0001 level (2-tailed).

