

---

**Karen Cristina de Sant'Anna Brunialti**

**Correlação entre osteopontina sérica e polimorfismos nos genes GSTT1, GSTP1, ERCC1 (118), XPD (751) com prognóstico e sobrevida em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço**

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

Área de concentração: Oncologia  
Orientadora: Profa. Dra. Miriam Hatsue Honda Federico

**São Paulo  
2009**

---

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Brunialti, Karen Cristina de Sant'Anna

Correlação entre osteopontina sérica e polimorfismos nos genes GSTT1, GSTP1, ERCC1 (118), XPD (751) com prognóstico e sobrevida em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço / Karen Cristina de Sant'Anna Brunialti. -- São Paulo, 2009.

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

Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Miriam Hatsue Honda Federico.

Descritores: 1.Carcinoma de células escamosas 2.Neoplasias de cabeça e pescoço  
3.Reparo do DNA 4.Osteopontina 5.Cisplatino 6.Glutationa

USP/FM/SBD-317/09

---

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

---

---

**Dedico esse trabalho a todos os pacientes com câncer, a  
vontade de viver de vocês foi o que me inspirou.**

---

---

---

## **AGRADECIMENTOS**

---

---

## **Agradecimentos**

---

Ao meu pai **Helio Francisco Brunialti** e à minha mãe **Teresa Cristina de Sant'anna**, por todo o tempo e dinheiro gastos na minha educação e por terem me mostrado o caminho a seguir sempre confiando nas minhas escolhas. Vocês são responsáveis pela minha vitória, tenham certeza disso.

À minha irmã **Laisa Tatiana de Sant'Anna Brunialti**, que me fez ter uma nova visão da vida, repensar meus conceitos e valorizar a minha rotina. Você é sem dúvida meu grande amor.

Ao meu namorado **Rafael Dutra de Souza** pelo amor incondicional dado a mim, por estar ao meu lado nos meus piores e melhores momentos e por sempre acreditar na minha capacidade.

Aos meus cães **Jade, Snoopy, Fofo** (em memória), **Neguinho, 220, Gigante, Lola, Lili** (em memória), **Fox e Fred** (em memória), obrigada por toda alegria que vocês me proporcionam e por serem meus fiéis amigos. Aos que já se foram, vocês foram os melhores cães do mundo.

À **Dra. Miriam Hatsue Honda Federico** pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e pela orientação.

À **Dra. Mitzi Brentani** por ter desenvolvido um grupo tão consolidado e do qual tive orgulho de fazer parte. A senhora é mais do que uma referência em pesquisa, é uma referência como pessoa.

Às **Dras. Flávia Mangone e Fátima Pasini**, um carinho especial, por terem estado perto de mim em toda essa jornada de trabalho e por terem feito sempre o papel de vocês.

---

## **Agradecimentos**

---

Ao **Dr. Igor Snitkovisky** e **Dr. Gilberto de Castro** por todo o empenho no desenvolvimento desse trabalho, pelo apoio, por ter estado ao meu lado nos meus momentos de nervoso.

A todas da “casa grande”, **Dra. Maria Lucia Hirata Katayama**, **Dra. Rosimeire Roela** e **Dra. Patrícia Bortmam**, pelo companheirismo e força durante esses anos de trabalho.

Aos meus eternos companheiros de laboratório e da vida, **Lilian Pires Barbeta** (Lilháá), **Bruno Papp Cadima** (Mezenga) e **Karina Escobar** (Brocolita), não tenho palavras para descrever nossos momentos, sem vocês eu teria enlouquecido sozinha, vocês são parte da minha tese e da minha vida, obrigada não é o suficiente para vocês, saibam que os amo muito e sempre.

A todos os amigos da “senzala”, **Mateus Barros**, **Cíntia Milani**, **Adriana Priscila Trapé** (rasgatanga), **Suzana Terumi Honda**, **Paulo Del Valle**, **Laura Tojeiro Campos** (gangola), **Yuri Urata**, **Elen Bastos** e **Natalia** que ainda estão conosco e também aos que deixaram o laboratório **Ticiania**, **Renata**, **Cristina**, **Leonardo** (Sagatiba), **Juliana** (a melhor das estagiárias), **Camila**, **Maira** entre outros. Agradeço a vocês por agüentarem as minhas piadas e por sempre me darem carinho e colo em todos meus momentos, cada um de vocês me tornou uma pessoa melhor e vou levá-los para sempre. Espero que a Gangola continue minha saga no laboratório já que ela é minha versão loira e alta.

A todos do grupo do **Dr. Roger Chammas**, principalmente a **Mara**, **Andrea**, **Tarcísio** e **Luciana** pelos momentos de descontração e amizade.

---

## **Agradecimentos**

---

A **Maria José Benevides** (pessoa espetacular), **Elizangela Dias**, **Rosilene Arruda**, **Jair Cláudio**, **Willame Macedo** (quero te ver na São Silvestre) e **Ivonete Lima**, por sempre me ajudarem em tudo, desde a limpeza do laboratório e preparação dos materiais até os trâmites burocráticos, e também pelo carinho e amizade.

A todos os meus amados amigos que estiveram comigo desde o início da minha jornada, **Flávia Caputo**, **Rodrigo Duarte**, **Alex Mantovanelli**, **Rosane Gomes**, **Gilvan Santos**, **Bruno Leonardo**, **Marcelo Rulhand**, **Fabio Costa**, **Daiany Gomes**, **Renato Macedo**, **Alessandra da Mota Oliveira**, **Vânia Turqui** e **Priscila Turqui** agradeço cada segundo da atenção de vocês, cada abraço e cada colo que me deram nos meus momentos difíceis, agradeço pelo orgulho com que falam de mim e por toda a honestidade dos nossos sentimentos, amo vocês.

Aos meus novos companheiros do LIM 56, principalmente **Liã Bárbara Arruda**, **Fernando Costa** e **Erika Fujihira**, que agora irão me suportar o dia todo. E finalmente quero agradecer imensamente ao **Dr. Jorge Casseb** por ter me escolhido para trabalhar com seu grupo, apoiar-me e acreditar em mim.

A **Capes** por todo apoio financeiro dado durante o desenvolvimento deste trabalho, sem ele certamente não teria chegado até aqui.

---



---

**“Se pude enxergar mais longe é porque me apoiei no ombro de gigantes.” (Isaac Newton)**

**“Nessa vida nascemos e morremos sozinhos, porém só conseguimos progredir juntos.”**

---

---

## Sumário

**Lista de Figuras**

**Lista de Tabelas**

**Resumo**

**Summary**

<b>Introdução</b> .....	<b>01</b>
Osteopontina .....	07
Farmacogenética e câncer .....	11
Polimorfismos nos genes de reparo de DNA .....	13
Polimorfismos nos genes de detoxificação celular .....	16
<b>Objetivos</b> .....	<b>21</b>
Objetivo Geral .....	22
Objetivo Específico .....	22
<b>Casuística e Métodos</b> .....	<b>23</b>
Casuística .....	24
Seleção dos pacientes .....	24
Tratamento .....	24
Avaliação da resposta .....	25
Métodos .....	<b>26</b>
Coleta de sangue periférico .....	26
Determinação da osteopontina .....	26
Determinação dos polimorfismos .....	28
Estatística .....	33
<b>Resultados</b> .....	<b>35</b>
Osteopontina .....	36
Correlações com características tumorais .....	37
Avaliações com relação à resposta ao tratamento e sobrevida .....	38
Polimorfismos .....	41
Frequências genotípicas .....	42
Avaliação dos genótipos e resposta ao tratamento .....	43
Correlações entre os genótipos e sobrevida global .....	45

---

---

<b>Discussão</b> .....	<b>48</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>55</b>
<b>Anexos</b>	

---

---

## Lista de Figuras

<b>Figura 01</b> – Estrutura molecular da cis-diaminocloroplatina II (cisplatina) .....	03
<b>Figura 02</b> – Mecanismo de ação da cisplatina .....	04
<b>Figura 03</b> – Representação das diversas interações da cisplatina com o DNA.....	05
<b>Figura 04</b> – Mecanismo de ação da via de excisão de nucleotídeos .....	14
<b>Figura 05</b> – Gel polimorfismo GSTT1 e GSTM1 .....	29
<b>Figura 06</b> – Gel polimorfismo XPD (751) .....	31
<b>Figura 07</b> – Gel polimorfismo ERCC1 (118).....	32
<b>Figura 08</b> – Gel polimorfismo GSTP1 .....	33
<b>Figura 09</b> – Análise de sobrevida global dos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. ....	46
<b>Figura 10</b> – Análise de sobrevida global dos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. ....	47

---

---

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 01</b> – PCR – RFLP: oligonucleotídeos, enzimas de restrição e tamanho dos fragmentos. ....	30
<b>Tabela 02</b> – Características dos pacientes em que foi realizada a quantificação da osteopontina .....	36
<b>Tabela 03</b> – Níveis séricos da OPN e variáveis clínico-patológicas em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço .....	38
<b>Tabela 04</b> – Níveis de osteopontina em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, de acordo com a resposta ao tratamento	39
<b>Tabela 05</b> – Análise por regressão logística para fatores associados com resposta completa em 32 pacientes com CECCP submetidos a quimiorradioterapia exclusiva.....	40
<b>Tabela 06</b> – Características dos pacientes em que foi realizado o estudo dos polimorfismos.....	41
<b>Tabela 07</b> – Frequência genotípicas dos genes em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço....	42
<b>Tabela 08</b> – Avaliação de resposta ao tratamento em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.....	43
<b>Tabela 09</b> – Resposta ao tratamento em 89 pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço de acordo com seus genótipos....	44

---

---

## **Correlação entre osteopontina sérica e polimorfismos nos genes GSTT1, GSTP1, ERCC1 (118), XPD (751) com prognóstico e sobrevida em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.**

**INTRODUÇÃO:** A resposta ao tratamento no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECCP) varia significativamente em diferentes casos e muitos pacientes não respondem ao tratamento e são expostos aos seus efeitos. A cisplatina é o quimioterápico mais utilizado no tratamento de CECCP e a quimiorradioterapia é o método terapêutico usado nos carcinomas localmente avançado. Neste trabalho foram estudados possíveis marcadores de resposta a quimiorradioterapia e sobrevida em pacientes portadores de CECCP, dentre eles a osteopontina (OPN) que tem sido associada à agressividade tumoral em vários cânceres e também tem sido relacionada a sobrevida, foram estudados também alguns polimorfismos em genes que estão relacionados com a cisplatina, seja na detoxificação deste fármaco, Glutathionas – S – transferase (GSTP1, GSTT1 e GSTM1), seja no reparo dos danos causados no DNA pela via de excisão de nucleotídeos (XPD -751 e ERCC – 118). **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Amostras de 69 pacientes localmente avançados submetidos à quimioterapia adjuvante ou exclusiva com cisplatina tiveram a sua OPN dosada pelo imunoensaio elisa em coletas realizadas antes e depois do término do tratamento. Para a análise dos polimorfismos, amostras de 95 pacientes localmente avançados tratados com quimiorradioterapia com cisplatina exclusiva foram analisadas por PCR – RFLP. **RESULTADOS:** Com relação à OPN, dos 69 pacientes estudados, a concentração da OPN antes do início da quimiorradioterapia no grupo como um todo, foi de 102,5 ng/mL com uma mediana de 82,1 ng/mL. O correspondente valor da OPN após o tratamento n=46 foi de 104,0 ng/mL e mediana de 92,9 ng/mL. A OPN se mostrou mais elevada nos pacientes com maior tamanho tumoral, p=0,009 (ANOVA). Em análises correlacionado resposta ao tratamento e concentração de OPN, observamos que os pacientes que obtiveram resposta completa apresentaram menores níveis de OPN do que aqueles que não responderam ao tratamento. Quando realizamos uma análise multivariada notamos correlação entre baixa OPN antes do tratamento e uma melhor sobrevida global. Na análise dos polimorfismos (n=95), observamos que para os genes de reparo de DNA, XPD e ERCC, o genótipo mais freqüente foi C/T (n=43) e A/A (n=44), respectivamente. Para a GSTP1 a maior freqüência foi de A/G (47,4%) e para a GSTT1 e M1, vimos que a maioria dos pacientes, 83,2% mostrou ter GSTT1 funcional, enquanto 58,9% tiveram GSTM1 não funcional. Neste grupo de pacientes, não notamos nenhuma associação significativa entre os genótipos dos pacientes e a resposta a quimiorradioterapia, assim como não foi possível uma correlação entre a sobrevida global e os genótipos.

**CONCLUSÃO:** Em síntese, a OPN após o término do tratamento pareceu estar associada com a resposta ao tratamento e com uma melhor sobrevida no grupo estudado e em relação aos polimorfismos, um aumento do número de amostras possa talvez mostrar alguma associação com resposta ao

---

---

tratamento e a sobrevida global em pacientes com CECCP localmente avançados.

**DESCRITORES:** carcinoma de células escamosas, neoplasias de cabeça pescoço, cisplatino, osteopontina, reparo de DNA e glutathiona.

---

---

**Relationship between plasma osteopontin and polymorphisms in the GSTT1, GSTP1, ERCC1 (118), XPD (751) genes with the prognosis and survival in patients with head and neck carcinoma.**

**INTRODUCTION:** The response to treatment in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) varies significantly in different cases and many patients do not respond to treatment and are exposed collateral effects. Cisplatin is a chemotherapeutic used to treat HNSCC and chemoradioterapy is the major strategy used in locally advanced carcinomas. In this work, we studied potential markers for chemoradioterapy response and survival in HNSCC patients, such as osteopontin (OPN), which has been associated with tumor aggressiveness and survival. Furthermore, it was studied some genetic polymorphisms related to cisplatin detoxification (glutathione - S - transferase, subtypes GSTP1, GSTT1 and GSTM1), as well genes involved in the repair of DNA damage by nucleotide excision (ERCC and XPD -751 - 118).

**METHODS:** Plasmatic OPN levels, before and end of treatment, were measured in 69 patients with locally advanced tumors submitted to adjuvant chemotherapy with cisplatin only by ELISA. For polymorphism analysis, samples from 95 patients with locally advanced tumors treated with cisplatin alone were analyzed by PCR - RFLP.

**RESULTS:** The OPN levels before the chemoradioterapy in the group (n=69) was 102.5 ng/mL with a median of 82.1 ng/mL. The corresponding value of OPN after treatment (n= 46) was 104.0 ng/mL and a median of 92.9 ng/mL. The OPN was higher in patients with larger tumor size,  $p = 0.009$  (ANOVA). In tests correlated to treatment response and concentration of OPN, we observed that patients who achieved complete response had lower levels of OPN than those who did not respond to treatment. The multivariate analysis revealed that lower OPN levels before treatment significant a better overall survival. In the analysis of the polymorphisms (n = 95) the frequency of genotype for the DNA repair genes (XPD and ERCC), was C / T (n = 43) and A / A (n = 44), respectively. The most frequent genotype for GSTP1 was A/ G (47.4%), in 83.2% of the patients, the GSTT1 was functional, while in 58.9% of patients presented GSTM1 non-functional. In this group of patients, there was no any significant association between the genotypes and chemoradiotherapy response nor overall survival.

**CONCLUSION:** In summary, plasmatic OPN levels after treatment cisplatin seemed to be associated with treatment response and better survival. However, larger sample size would be demonstrating some association with treatment response and overall survival in patients with locally advanced HNSCC.

**DESCRIPTORS:** 1. Carcinoma, squamous cell 2. Head neck neoplasm 3. DNA repair 4. Osteopontin 5. Cisplatin 6. Glutathione

---





## **INTRODUÇÃO**



O carcinoma de cabeça e pescoço é representado na sua imensa maioria por neoplasias epiteliais do tipo epidermóide que acometem as vias aerodigestivas superiores. O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CE) é a quinta doença mais freqüente no mundo (Parkin et al. 2001) e tem grande importância em nosso meio devido a sua alta mortalidade relativa. No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) indicam que em 2009 deve ocorrer cerca de 14.160 casos de câncer na cavidade oral, sendo considerado o 5º mais freqüente entre os homens e o 7º mais freqüente entre as mulheres.

Os fatores de risco que estão comumente associados a esse tipo de neoplasia são: o consumo excessivo de álcool e tabaco. Além disso, está aumentando o número de evidências que relatam o papiloma vírus (HPV) como agente causador de subtipos específicos do CE (Argiris et al., 2008).

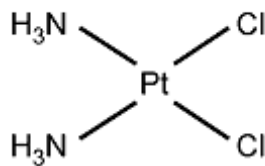
Cerca de dois terços dos pacientes apresentam doença localmente avançada, comumente com o comprometimento linfonodal e a presença de metástases nos estágios iniciais não são comuns, acontecendo somente em cerca de 10% dos pacientes (Argiris et al., 2008). Pesquisas indicam que em São Paulo mais de 50% dos CE na cavidade oral são diagnosticados com estágio IV (FOSP, 2006).

A abordagem terapêutica depende do estadiamento da doença. O tratamento para os carcinomas localmente avançados são desafiadores e muitas vezes um tratamento agressivo é necessário para alcançar a cura (Seiwert et al., 2007). Em nosso serviço o tratamento de escolha para os

---

pacientes com CE localmente avançado é a quimiorradioterapia com cisplatina, com uma taxa de resposta de 60% (Castro et al.,2007).

A cisplatina (figura 01) é um potente radiosensibilizador e é a droga comumente utilizada para a quimiorradioterapia em CE. Apresenta dois radicais lábeis de cloro em configuração cis (Johnson et al., 2001).

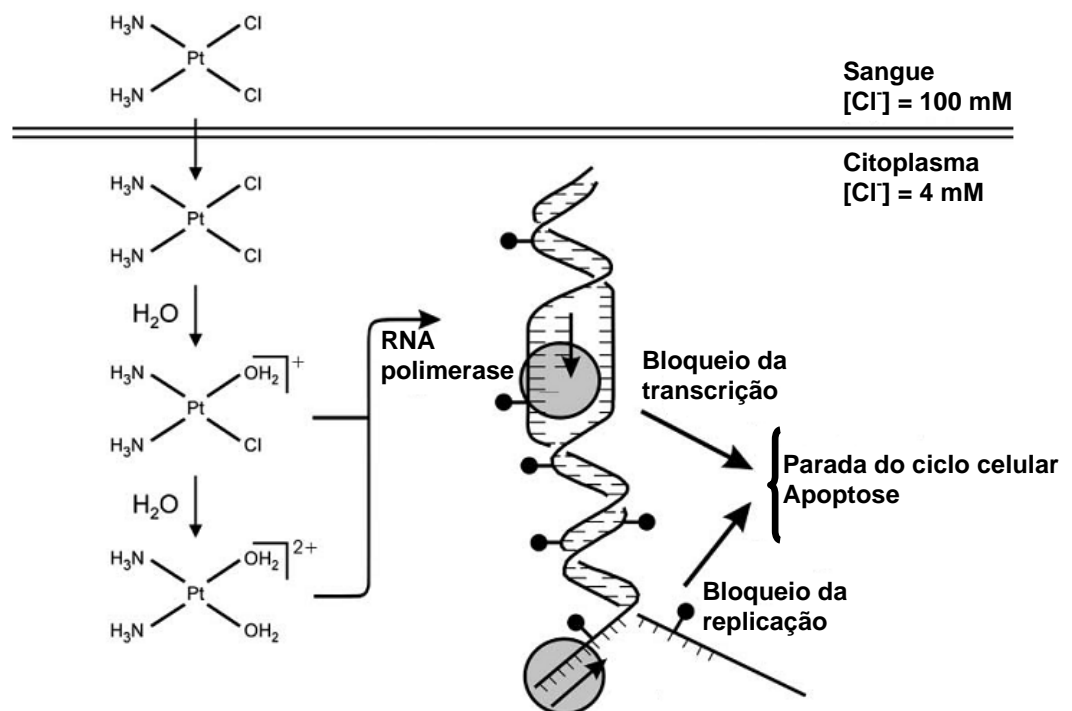


**Figura 01 - Estrutura molecular da cis-diaminocloroplatina II (cisplatina), complexo inorgânico, divalente e hidrossolúvel.**

Atualmente, a dose padrão utilizada é de 100mg/m<sup>2</sup> de cisplatina por três semanas, combinada com radioterapia de aproximadamente 70 grays (Gy), que são dadas em frações de 1,8 a 2,0 Gy por dia (Seiwert et al., 2007).

A cisplatina é muito eficiente no tratamento de vários carcinomas como o testicular, ovário, bexiga, cervical, cabeça e pescoço, esôfago e células não pequenas de pulmão (Giaccone et al.,2000). Desde a introdução da cisplatina como agente quimioterápico muitos estudos sobre seus efeitos citotóxicos na célula foram desenvolvidos. O mecanismo de ação deste quimioterápico (figura 02) mostra que para exercer efeito citotóxico, a cisplatina é ativada, de forma não enzimática, havendo uma troca dos grupos de cloro por moléculas de água. O produto liga-se de forma

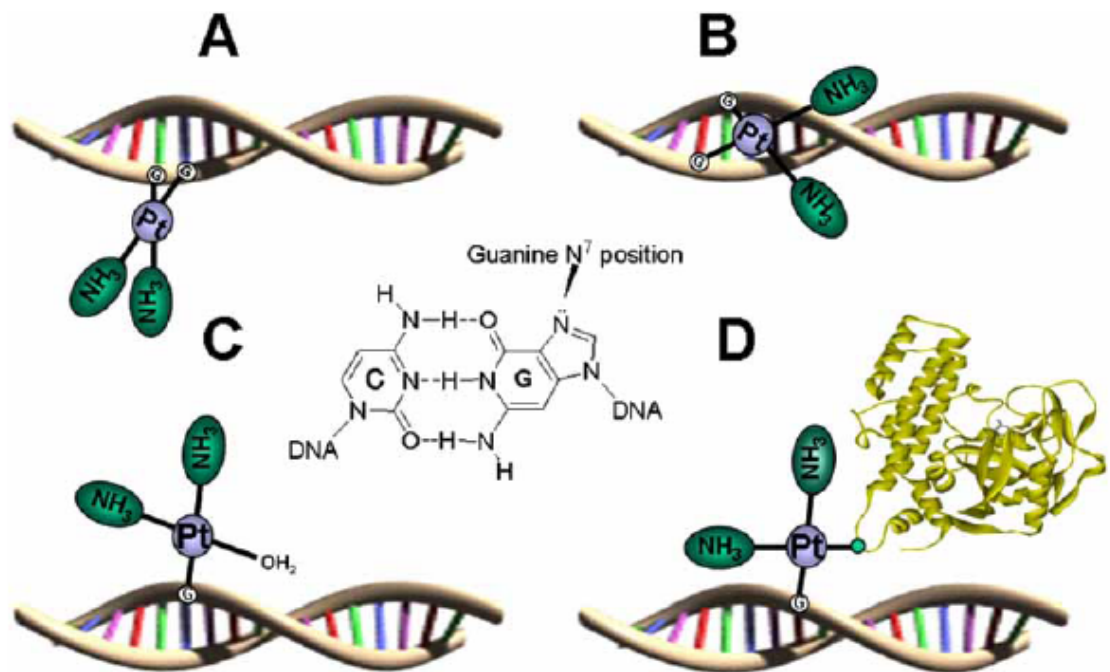
covalente a posição N7 de resíduos de guanina ou adenina, formando pontes na mesma fita ou nas fitas complementares do DNA. Estas alterações levam a erros na síntese do DNA, com acúmulo das células na fase G2 do ciclo celular e indução da apoptose (Johnson et al., 2001).



**Figura 02 – Mecanismo de ação da cisplatina** – A entrada da droga na célula ocorre por difusão passiva, no citoplasma a molécula de platina perde seus cloros e passa então a interagir com a molécula de DNA, promovendo o bloqueio da transcrição e da replicação e assim a parada do ciclo celular e conseqüente apoptose (Modificado de Kartalou et al., 2001).

Muitos componentes celulares que possuem sítios nucleofílicos, como o DNA, RNA, proteínas, membranas fosfolipídicas, microfilamentos do

citoesqueleto, podem reagir com a cisplatina, cerca de aproximadamente 1% da cisplatina intracelular reage com DNA nuclear formando diversos adutos (figura 03) que podem ser ligações cruzadas interfilamento ou intrafilamento e monoadutos com a ligação de proteína (Gonzalez et al., 2001). A interação que acontece com maior frequência é a ligação cruzada intrafilamento entre guaninas adjacentes (Perez et al., 1998).



**Figura 03 – Representação das diversas interações da cisplatina com o DNA:** a) ligação cruzada intrafilamento; b) ligação cruzada interfilamento, c) monoaduto, d) monoaduto, com uma molécula de glutatona ligada (Retirado de Cepeda et al., 2007).

Apesar do sucesso, a cisplatina apresenta muitas desvantagens, como seus efeitos colaterais, incluindo neurotoxicidade, nefrotoxicidade, ototoxicidade, náuseas e vômitos Giaccone et al.,2000. Esses efeitos tóxicos limitam a dose que deve ser ministrada ao paciente (Cepeda et al., 2007).

Embora tenham ocorrido muitos avanços no tratamento, a taxa de sobrevida de 5 anos do CE melhorou muito pouco na última década (Greenlee et al., 2001) seja porque, de acordo com metanálise, cerca de 50% dos pacientes apresentam recidiva da doença (Takes et al., 1997), seja porque 20% dos pacientes estadio I/II, curados com cirurgia/ radioterapia desenvolvem um segundo tumor primário de trato aerodigestivo superior.

Essa falha ao tratamento inicial seja cirurgia, radioterapia ou quimioradioterapia pode ser atribuída a vários fatores, tais como idade, sexo, localização do tumor primário, estágio TNM e grau histológico; que embora possam auxiliar na decisão terapêutica, não tem valor prognóstico absoluto (Piccirillo et al., 1996). O mais acurado dado prognóstico para recidiva, no momento, é o estágio nodal.

Muitos pacientes, infelizmente, apresentam estágio avançado, e, nestes casos, o comprometimento linfonodal não é discriminante. Isto levou a procura de biomarcadores como indicadores de prognóstico em CE. Entre os vários estudados, podemos citar a expressão de p53 e ciclina D1 foi comparada em carcinoma verrugoso, hiperplasia verrugosa e carcinoma epidermóide da região de cabeça e pescoço (Wu et al., 2002), e em CEC de laringe (Vielba et al., 2003). Além da expressão destes marcadores Wu et al. em 2002, avaliaram a expressão de EGFR e TGF-alfa. O valor prognóstico da expressão do transportador 1 de glicose foi estudado em pacientes com carcinoma de hipofaringe (Mineta et al., 2002); o valor prognóstico da expressão de sete marcadores foi determinado em análise multivariada, no

CEC de língua, onde c-myc, ciclina D1 e p21ras apresentaram-se como marcadores de prognóstico independente (Vora et al., 2003).

Além de não se definir nenhum marcador ótimo, muitos destes estudos requerem amostra tumoral, tecidos normais, lugares especializados em processamento de tecidos, estudos imunohistoquímicos e análise citogenética. O tempo gasto na realização desses marcadores pode ainda não ser prático para uso clínico de rotina.

Uma alternativa de marcadores de melhor aplicabilidade são aquelas substâncias presentes no soro ou plasma tais como o fragmento de citoqueratina cyfra 121-1 e a molécula de adesão osteopontina. Estas foram avaliadas e correlacionadas com a transformação e invasão tumoral em inúmeros estudos avaliando prognóstico e monitorização de resposta ao tratamento em pacientes portadores de CE (Ho et al., 1996; Lin et al., 1998; Yen et al., 1998; Ogawa et al., 1999; Gonzalez et al., 1999; Maass et al., 2000; Doweck et al., 2000; Furger et al., 2001; Weber, 2001; Lee et al., 2001; Pauli et al., 2002; Kuropkat et al., 2002; Pradier et al., 2002; Deng et al., 2003; Le et al., 2003), sendo que, a osteopontina (OPN) parece ser o marcador mais promissor.

## **Osteopontina**

Trata-se de uma glicoproteína fosforilada ligadora de cálcio, que é capaz de se ligar às integrinas na superfície celular. OPN é expressa constitutivamente em um número limitado de tecidos normais tais como rim (Wuthrich et al., 1998), estando também presente nos fluidos do corpo, e é

---

---

abundante nos ossos e outros tecidos mineralizados (Denhardt et al., 1998). Sua expressão encontra-se também elevada em vários tecidos em um número de patologias como: câncer, respostas imune e inflamatória (Weber et al., 1996; Giachelli et al., 2000), remodelação vascular (Ramos et al., 1999), doenças renais, lactação, calcificação e remodelação de tecidos mineralizados, bem como em algumas situações fisiológicas de resposta ao stress. Apesar desta diversidade de expressão tecidual, sua função em muitos destes contextos permanece obscura sendo este assunto propósito de muitos estudos.

Os possíveis papéis da osteopontina em câncer foram discutidos por muitos autores e sugeriu-se que a OPN poderia ter um papel funcional na doença uma vez que a inibição da OPN através do cDNA antisense ou riboenzima atenuaram as propriedades tumorigênicas ou metastáticas de vários tipos de células (Behrend et al., 1994; Gardner et al., 1994; Su et al., 1995; Feng et al., 1995). Além disso, a expressão da OPN através da transfecção do cDNA em células epiteliais mamárias normais de rato, foi responsável pelo aumento da habilidade metastática destas células (Oates et al., 1996). Estes estudos sugerem que OPN não esteja apenas associada ao comportamento das células cancerosas, mas também ao estabelecimento do câncer.

Em tumores humanos, a expressão de OPN foi pela primeira vez demonstrada numa variedade de carcinomas por Brown et al., 1994. Estes autores encontraram níveis substancialmente maiores do RNA mensageiro (RNAm) de OPN em 14 tumores analisados (seis tumores de cólon, três de

---



mama, dois de pulmão, um de estômago, um de endométrio e um de tireóide) quando comparados com o correspondente tecido normal. Em contraste, dois tipos de tumores benignos (adenomas de cólon de pacientes com polipose familiar e um leiomioma uterino) tiveram níveis de mRNA de OPN comparáveis àqueles dos tecidos normais correspondentes. Viu-se que nos tumores, as células positivas para OPN localizavam-se preferencialmente no limite da extensão tumoral e nas áreas próximas de necrose.

A positividade tanto para o RNAm de OPN como para sua proteína foram vistas em outros tipos de câncer, incluindo pulmão (Chambers et al., 1996), mama (Tuck et al., 1998) e câncer de esôfago (Casson et al., 1997), câncer gástrico (Ue et al., 1998), lesões benignas pré-malignas e malignas da cavidade oral (Devoll et al., 1999), câncer de próstata (Thalmann et al., 1999) e gliomas (Saitoh et al., 1995). Usando a imunohistoquímica, a proteína da OPN, foi localizada apenas nos macrófagos de alguns tumores, porém em outros a imunoreatividade foi presente tanto nos macrófagos como nas células. Da mesma forma, a expressão do mRNA de OPN foi localizada em células tumorais bem como em macrófagos infiltrando o tumor (Tuck et al., 1998; Casson et al., 1997).

No sangue, a OPN foi detectada em pacientes com uma variedade de cânceres, incluindo carcinoma de pulmão (Chambers et al., 1996), hepático (Senger et al., 1989), de mama (Tuck et al., 1997) e próstata (Tozawa et al., 1999).

Em um trabalho publicado em 2003, Le. et al., investigaram o relacionamento entre a osteopontina plasmática, hipóxia e prognóstico em pacientes com CE, os autores concluem que os níveis de OPN podem ser correlacionados com hipóxia além de poder ser usada como um teste não invasivo para identificar pacientes com risco de recorrência, uma vez que a OPN pode ser detectada em lesões pré-malignas e malignas.

Outro trabalho realizado também em pacientes com CE, foi o de Petrik. Et al., 2006, onde os autores mostram a correlação entre os níveis plasmáticos de OPN e a resposta ao tratamento, além de identificarem a OPN como um marcador prognóstico independente, esse trabalho foi na verdade uma expansão do trabalho descrito anteriormente (Le. et al., 2003), e um viés desse estudo é a heterogeneidade no tratamento aos pacientes.

Um trabalho recente, de Chien. et al., 2009, realizado em pacientes com CE na cavidade oral, mostrou que altos níveis de OPN, tanto plasmáticos quanto no tumor, podem ser associados a progressão tumoral, sugerindo que a expressão de OPN possa ser um importante fator prognóstico em pacientes com CE na cavidade oral.

Como se pode concluir deste pequeno resumo da literatura, não existem dados publicados até o momento que possam afirmar que a OPN é um marcador prognóstico importante de resposta à quimioterapia com platina. Caso isso possa ser confirmado, a OPN pode representar um adequado foco para intervenção terapêutica no futuro.

---

## **Farmacogenética e câncer**

A farmacogenética, definida como o estudo da constituição genética do indivíduo no contexto da resposta aos medicamentos, é outra área em desenvolvimento que parece promissora em câncer de forma geral. No caso da quimioterapia anti-neoplásica, tem-se analisado polimorfismos dos genes de enzimas que servem como alvo dos agentes quimioterápicos, que participam da sua metabolização ou de reparo do dano do DNA. Estas análises podem ser feitas a partir de DNA extraído de sangue periférico, prescindindo de amostra tumoral, nem sempre de fácil obtenção (Lindpaintner, K. 2002).

A farmacogenômica estuda a função do genoma (especialmente do genoma tumoral) na atividade das drogas anticancer. Envolve a avaliação sistemática de como compostos químicos modifica amplo padrão de expressão nos tecidos de interesse, em contraste com a farmacogenética, a farmacogenômica não foca as diferenças de uma pessoa para outra com relação aos efeitos das drogas, mas antes examina as diferenças relacionadas com efeitos das drogas e a mudança do padrão de expressão dos genes (Lindpaintner, K. 2002).

O objetivo da farmacogenética no tratamento do câncer é proporcionar a individualização do tratamento, minimização dos efeitos tóxicos, maximizando assim a eficiência. Assim, é esperado da farmacogenética a estratificação dos indivíduos de acordo com seu perfil genético em grupos de resposta ao tratamento (Abraham et al., 2006).

---

No caso do CE, como dito anteriormente, o agente quimioterápico mais usado é a cisplatina. Este agente é adotado no tratamento de rotina no nosso serviço, associado à radioterapia nos casos da doença localmente avançada, ou em esquemas de quimioterapia exclusiva na doença metastática. Como a taxa de resposta é de 50%, seria altamente desejável a pré-seleção de pacientes com maior chance de resposta. A identificação de mecanismos biológicos que conferem sensibilidade a agentes quimioterápicos poderia permitir a correta seleção de pacientes evitando expor os não respondedores aos efeitos tóxicos (Quintela-Fadino et al., 2008).

Os genes polimórficos apresentam variantes alélicas com frequência superior a 1%, entretanto o uso comum deste termo se refere às mudanças na seqüência do DNA que não afetam ou tem efeito menor na função e produção de uma proteína. O tipo mais comum de polimorfismo é a substituição de um único nucleotídeo (SNP – single nucleotide polymorphism). Esses SNPs em um determinado gene podem afetar a função da proteína (Quintela-Fandino et al., 2008), esteja ela diretamente envolvidas na ação das drogas, ou mesmo quando ela é o alvo ou então quando a proteína participa do reparo ao dano causado pela droga, com isso sua eficácia pode ser comprometida e/ou sua toxicidade aumentada. A identificação de polimorfismos funcionais em pacientes antes da quimioterapia pode ajudar a prescrição de uma combinação ótima de drogas (Robert et al., 2005). Alguns polimorfismos nos genes da via de reparo por excisão de nucleotídeo (NER – nucleotide excision repair) parecem estar

ligados à resposta a cisplatina, assim como polimorfismos em enzimas de detoxificação celular como as glutatonas.

## **Polimorfismos nos genes de reparo do DNA**

Os danos no DNA induzidos pela cisplatina interferem na replicação e a via chave para correção dos erros é a via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (Suk et al., 2005). A NER processa os danos volumosos que levam a distorção da dupla hélice de DNA (Leibeling et al., 2006).

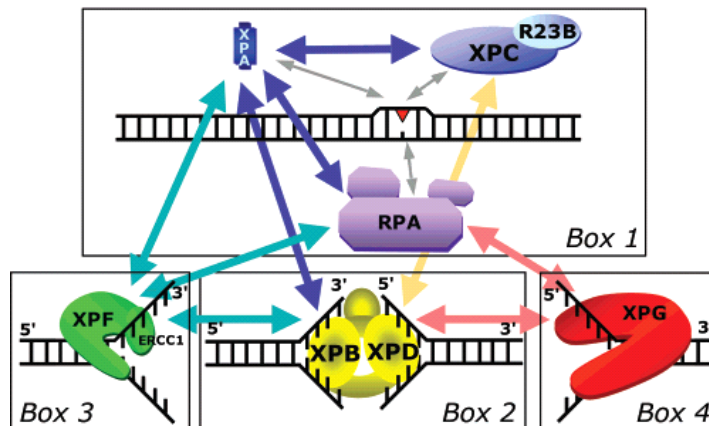
Em humanos, pelo menos três doenças estão relacionadas a defeitos genéticos hereditários na NER, xeroderma pigmentosa (XP), síndrome de Cockayne (CS) e tricotiodistrofia (TTD). Contudo, somente os pacientes com XP são predispostos a desenvolver câncer de pele causado pelos ultravioleta (UV) solares. Sendo assim, XP tornou-se um modelo único para estudos de lesões não reparadas do DNA e mutações causadas por diferentes carcinógenos. Apesar de CS e TTD não apresentarem predisposição ao câncer de pele, apresentam muitas alterações nos genes da NER e em outros genes de reparo do DNA, possuindo assim fenótipos muito diferentes (Saldivar et al., 2007).

O mecanismo de reparo da NER é constituído de múltiplas etapas. Cerca de 20 a 30 proteínas estão envolvidas nesse processo em uma ordem definida. Em primeiro lugar ocorre o reconhecimento do erro, depois sua demarcação, seguida por uma dupla incisão nos dois lados da lesão, com

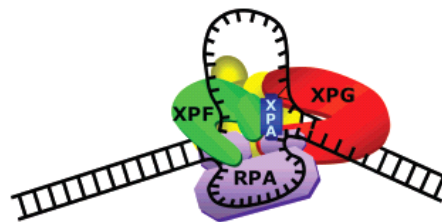
---

subseqüente remoção do fragmento lesionado e por fim a síntese de uma nova fita intacta (figura 04) (Leibeling et al., 2006).

### A) Da interação das proteínas...



### B) ... até a reconstituição do sistema...



**Figura 04 – Mecanismo de ação da via de excisão de nucleotídeos: (A)** Ação individual das proteínas da NER: XPA, RPA, XPC e R23B interagem com o local danificado do DNA (box 1); TFIIH desempenhando sua função de helicase (XPB: 3' - 5', XPD: 5' - 3') (box 2); ERCC1-XPF (box 3); e XPG (box 4) tem uma atividade endonuclease específica. **(B)** Interação das proteínas, removendo o local danificado e promovendo a reconstrução do sistema. (Modificado de Gillet et al., 2006)

O XPD (xeroderma pigmentosum group D) é uma proteína que desempenha papel fundamental na NER, sua função é abrir a dupla fita de DNA em torno do local com o defeito. (Benhamou et al., 2005). Além disso, o XPD atua na transcrição, uma vez que é uma subunidade do fator transcricional TFIIH, que é requerido nas atividades de transcrição pela RNA polimerase II (Schaeffer et al., 1994). Sendo assim, em 1998, de Boer em

---

um estudo com ratos, mostrou que uma inativação do gene XPD leva a uma letalidade embrionária nos estágios de pré-implantação. Sete polimorfismos foram encontrados no gene XPD, destes três são silenciosos, e os outros quatro resultam em troca de aminoácidos.

Os polimorfismos dos códons 312 e 751 de XPD são muito estudados na carcinogênese e, além disso, eles podem influenciar a atividade enzimática *in vitro* (Spitz et al., 2001). Estudo recente envolvendo 39 pacientes portadores de câncer de pulmão de células não pequenas, correlacionou o polimorfismo dos códons 751 (Lys751Gln) e 312 (Asp312Asn) do gene XPD com a resposta a quimioterapia cisplatina/gemcitabina. O DNA foi isolado do sangue periférico e, como resultado, encontrou-se uma tendência estatística de melhor resposta nos pacientes portadores de polimorfismo do códon 312 (Camps et al., 2003). Desta forma, o polimorfismo de XPD poderia ser considerado um candidato promissor a fator preditivo de resposta a cisplatina.

ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementation Group 1) é uma enzima altamente conservada, específica da via de reparo de excisão de nucleotídeos e ela atua removendo o dano no DNA. O aumento do mRNA do ERCC1, está relacionado com a resistência a cisplatina em vários cânceres (Zhou, W et al.. 2004).

Dois comuns polimorfismos do gene ERCC1, nos códons 118 C/T e C8092A têm sido reportados. O polimorfismo do códon 118 é associado com diferentes níveis de mRNA e tem sido relacionado com uma baixa sobrevida

---

global para pacientes com câncer de cólon avançado tratados com quimioterapia baseada em platina. O polimorfismo do códon C8092A, localizado na extremidade 3' não traduzida do gene, pode afetar a estabilidade do mRNA do ERCC1 e tem sido associado com o risco de glioma.

Um estudo com 62 pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas, tratados com cisplatina e docetaxel comparou os SNPs (single nucleotide polymorphisms) dos genes ERCC1, XPD, RRM1 e MDR. Os resultados mostraram que os pacientes com o tipo selvagem (C/C) para o polimorfismo do códon 118 (C/T), apresentou uma melhor sobrevida significativa quando comparada aos pacientes portadores os outros tipos C/T e T/T com  $p=0.03$ , os polimorfismos dos demais genes analisados não tiveram significância estatística (Isla et al., 2004).

### **Polimorfismos nos genes de detoxificação celular**

Assim como os polimorfismos dos genes de reparo do DNA, os polimorfismos encontrados nos genes responsáveis pela detoxificação celular tem sido muito estudados e correlacionados com a susceptibilidade ao câncer e também a resposta à quimioterapia.

A Glutathione S Transferase (GST) é uma família de isoenzimas de que catalisam o conjugado de glutathione em uma variedade de componentes eletrofílicos, incluindo carcinógenos, agentes mutagênicos, drogas

---



---

citotóxicas e seus metabólitos, e promove detoxificação de produtos da reação oxidativa (Hayes et al., 1995; Mannervik et al., 1988).

Em mamíferos existem sete classes de GST são conhecidas, Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega e Zeta. Muitas destas enzimas apresentam polimorfismos que contribuem para as diferentes respostas a xenobióticos. Um dos primeiros estudos a esse respeito foi com indivíduos que possuíam genótipo nulo (não produzia a enzima) para GSTT1 e GSTM1, eles apresentavam uma alta incidência de câncer de bexiga, mama, colonretal, cabeça e pescoço e pulmão (Hayes et al., 2004).

O polimorfismo nas subclasses GSTM1 e GSTT1 são caracterizados pela completa perda da atividade da enzima em cerca de 20% da população caucasiana (Pemble et al., 1994). A isoforma GSTM1 é responsável, em particular, pela detoxificação de nitrosuréia e mostarda nitrogenada. A isoenzimas GSTT1 está envolvida na conjugação de pequenos componentes como diclorometano e óxido de etileno. A variante nula de GSTT1 parece, no entanto, estar envolvida na perda de proteção contra esses agentes tóxicos ambientais. O genótipo nulo do GSTM1 e GSTT1 é devido a muitos tipos de alterações na estrutura do gene, além disso, as SNPs variantes ocorrem tanto na seqüência codificadora, como na região promotora do gene, o que deve ser responsável por uma diminuição da atividade da enzima ou de sua expressão (Alexandrie et al., 2002).

Muitos estudos têm tentado relacionar os genótipos GSTM1 e GSTT1 nulos e a terapia contra o câncer. Um estudo em pacientes com câncer de

---

mama, tratados inicialmente com radiação ou quimioterapia, mostraram que indivíduos portadores do genótipo nulo para GSTM1 e GSTT1 tiveram uma vantagem na sobrevida (Ambrosone et al., 2001). No entanto, em crianças com leucemia linfoblástica aguda, este genótipo, não mostrou nenhuma relação com resposta ao tratamento (Chen et al., 1997; Krajnovic et al., 2002 e Davies et al., 2002).

A isoenzima GSTP1 apresenta dois polimorfismos funcionais, um deles, com uma alta frequência (0,30) consiste em uma SNP (A313G) com a substituição do aminoácido (ile105val) acarretando em uma substancial redução da atividade da enzima (Watson et al., 1998) para muitas classes de substratos (Ali - Osman et al., 1997) e uma perda efetiva na capacidade de detoxificação (Kimura et al., 2004). O outro polimorfismo que é muito menos freqüente (0,10) e é uma SNP (C341T), também com uma substituição de aminoácido (ala114val). Muitos estudos têm tentado correlacionar a presença do polimorfismo A313G com o tratamento de pacientes que recebem agentes alquilantes e platina. Em um estudo 183 pacientes com câncer colorretal metastático, foi investigado associações entre os mais comuns polimorfismos em genes das subclasses de GST (GSTP1, GSTM1 e GSTT1) e a sobrevida dos pacientes que receberam 5-fluoro-uracil (5FU) e oxaliplatina e os pacientes que possuíam o polimorfismo ile105cal no gene GSTP1 tinham uma melhor sobrevida em relação aos pacientes com o tipo selvagem (Stoehlmacher, J. et al. 2002). Vários outros estudos mostram que o polimorfismo ile105val do gene GSTP1 parece estar envolvido no risco de

---

desenvolvimento secundário de uma leucemia mielóide aguda em pacientes tratados com agentes alquilantes ou platina (Allan, JM. et al. 2001).

Geisler et al. em 2005, avaliou o valor prognóstico dos polimorfismos GSTT1, GSTM1 e GSTP1, em um estudo com 190 pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e demonstrou que pacientes com o GSTT1 funcional possui duas vezes mais chances de morrer por qualquer causa e três vezes mais chances de morrer por CE (hazard ratio HR:2,4 e 95%CI: 1,13-4,97).

Em um estudo de cultura de células de CE tratadas com cisplatina, foi observado que as células que possuíam genótipo heterozigoto, o que diminui a capacidade de detoxificação, obtiveram uma boa resposta ao tratamento com cisplatina (Kimura et al., 2004). No entanto, os resultados contraditórios são encontrados na literatura, Booton em 2006, em um estudo com câncer de pulmão de células não pequenas, mostrou que não havia nenhuma associação entre polimorfismos em GSTP1 e resposta a quimioterapia com cisplatina.

Em um imunoensaio com pacientes com CE localmente avançado, tratados com radioterapia somente ou quimioradioterapia com cisplatina, foi avaliada a expressão de p53 e GSTP1 e mostrou-se que uma alta expressão de ambas confere aos pacientes um pior prognóstico (Schumaker et al., 2008).

Apesar, de vários estudos relacionando polimorfismos e resistência a cisplatina já terem sido realizados, há uma grande discordância entre os

---

grupos, o que justifica a investigação do polimorfismo destes vários genes (XPD, ERCC1 e GST) em outros grupos de pacientes tratados com cisplatina

---



## **OBJETIVOS**



## **Objetivo Geral**

Avaliar, prospectivamente, o valor preditivo da osteopontina sérica e do polimorfismo dos genes XPD, ERCC1, GSTM1, GSTT1 e GSTP1 para a resposta ao tratamento de rotina que inclua cisplatina, nos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço localmente avançado ou metastático.

## **Objetivos Específicos**

- ✓ Determinar o nível da osteopontina sérica em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço antes e depois do término da quimiorradioterapia e correlacionar com as características clínico-patológicas, resposta ao tratamento e sobrevida global;
  
  - ✓ Genotipar os pacientes com CE para os polimorfismos de XPD (751), ERCC1 (118), GSTM1, GSTT1 e GSTP1 e relacionar com a resposta ao tratamento e sobrevida global.
-

---

## **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

---

## **Casuística**

Todos os pacientes incluídos neste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e este trabalho obteve a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital da Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), sob o número 487/06 em 27 de julho de 2006 (anexo).

## **Seleção dos pacientes**

Os pacientes incluídos neste estudo são todos do ambulatório de cabeça e pescoço e os critérios de inclusão foram: (a) diagnóstico histológico ou citológico confirmado de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, (b) idade mínima de 18 anos, (c) indicação de rotina de tratamento combinado de cisplatina com radioterapia ou quimioterapia exclusiva que incluía a cisplatina, no Serviço de Oncologia do INRAD-HCFMUSP, (d) aptos e desejosos a assinarem o termo de consentimento pós-informação do Hospital das Clínicas da FMUSP.

## **Tratamento**

Os pacientes incluídos neste que eram inoperáveis foram tratados com quimiorradioterapia baseada em cisplatina e a dose dada foi de

---



100mg/m<sup>2</sup>, nos dias 1, 22 e 43, concomitantes com a radioterapia em que a dose foi de 70 Gy, fracionados em 7 semanas. Já os pacientes que eram operáveis, receberam quimiorradioterapia adjuvante após a cirurgia.

### **Avaliação da resposta**

A avaliação da resposta ao tratamento foi definida segundo os critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos (RECIST), onde se comparou os resultados da tomografia computadorizada antes e após o tratamento.

Foi definido como resposta completa (RC) ao tratamento o desaparecimento total de toda evidência clínica e imageológica da neoplasia, quando mantida por pelo menos quatro semanas; resposta parcial (RP) sendo aquela onde houve uma diminuição de pelo menos 30% do tamanho do maior diâmetro da lesão mensurável à avaliação inicial, confirmada em quatro semanas; progressão da doença (PD) como um aumento do tamanho da lesão em pelo menos 20%, ou aparecimento de novas lesões; doença estável (DE), quando os critérios acima não são alcançados. Estes critérios foram aplicados na tomografia computadorizada realizada após um mês do término do tratamento.

---

## **Métodos**

### **Coleta do sangue periférico**

Foram coletados 10mL de sangue periférico por punção de veia de membro superior em tubos com anticoagulante EDTA. A primeira amostra foi coletada em aproximadamente 15 dias antes do tratamento e a segunda em aproximadamente 15 dias após o término.

Após a coleta as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm (rotor SS34 – Sorvall RC2-B), a 4°C por 10 minutos. O plasma coletado foi estocado a 70°C negativos até a análise de imunoensaio. Além disso, os leucócitos foram separados através de lavagens sucessivas com TE (Tris HCl 10mM – pH 8.0, EDTA 1mM) centrifugados a temperatura ambiente a 1.100rpm (centrífuga LS-3 – Celm) por 8 minutos. O sobrenadante foi desprezado deixando-se 5mL para diluição do pellet e distribuídos em 5 tubos plásticos de 1,5mL devidamente identificados. Esse material foi submetido a centrifugação a 13.000g por 30 segundos e o sobrenadante foi desprezado. O material foi estocado a 70°C negativos.

Para o imunoensaio, foi utilizado o plasma ao invés de soro uma vez que OPN é clivada em soro como resultado da digestão por trombina (Bautista et al., 1994).

### **Determinação da Osteopontina**

A osteopontina sérica foi quantificada por ELISA. Foi utilizado o imunoensaio *Human Osteopontin Assay kit* (IBL, Gunma, Japão).

---

O ELISA utilizado é um ensaio sanduíche que usa dois anticorpos marcados, um desses anticorpos está imobilizado na placa (anti - OPN humana O-17 Rabbitt IgG) e o outro anticorpo foi colocado em uma das etapas do ensaio (HRP conjugado Anti-OPN humana mouse IGg).

Para o ensaio todas as amostras foram diluídas 10 vezes em tampão EIA (1% BSA, 0,05% Tween 20 em PBS) fornecido pelo kit e acondicionadas em gelo até a realização do ensaio.

O anticorpo marcado foi diluído 30 vezes de acordo com as recomendações do kit e o padrão (osteopontina humana) fornecido pelo kit foi diluído em série, ficando com as seguintes concentrações 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 ng/mL.

Após todas as preparações iniciais com as diluições das amostras, anticorpo e padrão, a placa foi montada para o ensaio, o primeiro poço da placa foi destinado ao branco, seguido pelas diferentes concentrações do padrão e subseqüentemente pelas amostras dos pacientes, já diluídas, que foram analisadas em duplicata. Uma das amostras foi escolhida para ser analisada em todos os ensaios realizados.

Após a montagem, a placa foi incubada a 37°C por uma hora, passado esse período lavou-se a placa 7 vezes com a solução de lavagem (0,05% Tween 20 em tampão fosfato). Depois das lavagens, colocou-se 100µL de anticorpo marcado em cada poço e após 30 minutos a 4°C a placa foi lavada novamente por 9 vezes. Em seguida foi adicionada a solução corante (tetra metil benzidina), o conteúdo dos poços se tornou azul com a adição, a placa foi colocada no escuro por 30 minutos, com subseqüente

adição da solução de parada (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), nesta etapa o conteúdo dos poços tornou-se amarela e a leitura da placa foi realizada imediatamente em um comprimento de onda de 450nm. Os dados obtidos foram analisados no programa Graphpad Prism 4.0.

### Determinação de polimorfismos

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico com o auxílio do kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA). Os genótipos dos genes XPD, ERCC1 e GSTP1 foram determinados por análise de PCR-RFLP. E os genótipos dos genes GSTT1 e GSTM1 foram identificados por PCR multiplex.

A identificação do polimorfismo em GSTM1 e GSTT1 foi realizada por PCR multiplex, segundo a descrição de Arand et al., 1996 os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritos abaixo e foi utilizado o gene da albumina como controle interno da reação.

**GSTM1:** sense 5' – GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C – 3'

antisense: 5' – GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G –3'

**GSTT1:** sense 5': - TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3'

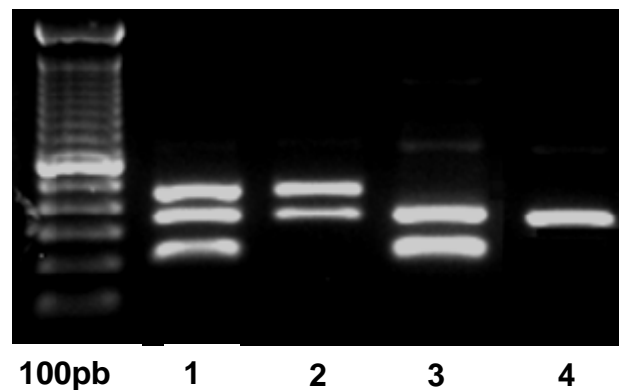
antisense 5': - TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'

**Albumina:** sense 5': GCC CTC TGC TAA CAA GTC CTA C3'

Antisense: 5': - GCC CTA AAA AGA AAA TCG CCA ATC 3'

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL, foram utilizados para a reação 80 ng de DNA, a concentração final de cada reagente utilizado foi de 50mM de KCl, 2,5 mM de Mg Cl<sub>2</sub>, 20mM tris, 3

$\mu\text{g/mL}$  de oligonucleotídeos iniciadores para GSTM1; 1  $\mu\text{g/mL}$  de oligonucleotídeos iniciadores para GSTT1, 600 ng/mL de oligonucleotídeos iniciadores de albumina e 50 U/ mL de taq polimerase. Ao término da reação as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (figura 05).



**Figura 05** – Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando a reação de PCR multiplex para a determinação dos polimorfismos de GSTT1 e GSTM1. Foi utilizado o padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb) da Invitrogen. A banda de 480pb corresponde ao gene da GSTT1, a banda de 350pb corresponde ao gene da albumina e a banda de 215pb corresponde ao gene da GSTM1. Em 1 temos um paciente T1 / M1positivo; em 2 um paciente T1 positivo e M1 negativo; em 3 um paciente T1 negativo e M1 positivo e em 4 um paciente negativo tanto para T1 quanto para M1. Em todas as amostras as bandas do gene da albumina foram visualizadas.

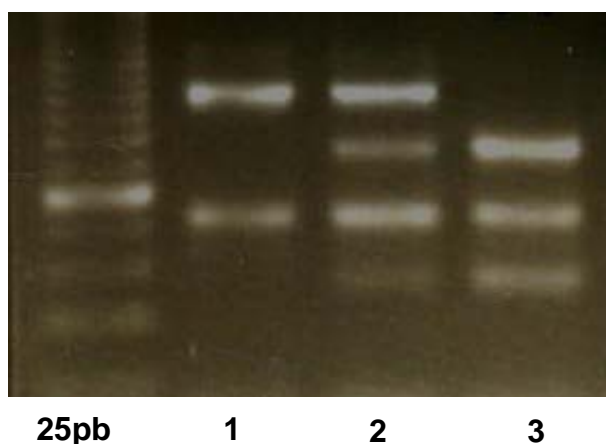
Para a identificação dos polimorfismos dos genes XPD (751), ERCC1 (118) e GSTP1, foi utilizada a técnica de PCR-RFLP, que consiste na digestão por enzima de restrição de um produto de uma reação de PCR. Os oligonucleotídeos e as enzimas de restrição utilizadas para cada um dos genes estão descritas na tabela 01.

Tabela 01 PCR – RFLP: oligonucleotídeos, enzimas de restrição e tamanho dos fragmentos.

	XPD (751)	ERCC1 (118)	GSTP1
<b>Oligonucleotídeos iniciadores</b>			
<b>Sense</b>	5' - GCC CGC TCT GGA TTA TAC G - 3'	5' GAGGTGCAAGAAG AGGTGGA - 3'	5' - ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA - 3'
<b>Anti-sense</b>	5' - CTA TCA TCT CCT GGC CCC C - 3'	5' - GTTCTCAGGTGA GCTCTGC -3'	5' - TGA GGG GAC AAG AAG CCC CT - 3'
<b>Tamanho do produto da PCR</b>	324pb	208pb	176pb
<b>Enzima de restrição</b>	<i>Pst</i> I	<i>Bse</i> DI	<i>A</i> Iw261
<b>Tamanho dos fragmentos de restrição</b>	A/A: 224 e 100pb A/C: 224, 158, 100 e 66pb C/C: 158, 100 e 66pb	C/C: 208pb T/T: 128 e 80pb C/T: 208, 128 e 80pb	Ile/Ile: 176pb Ile/Val: 176, 91 e 85pb Val/Val: 91, 85pb
<b>Referência</b>	Dybdahl et al., 1999	Zhou et al.; 2004	Beeghly et al., 2006

A reação de PCR para a identificação do genótipo do gene XPD (751) usou 100 ng de DNA, em uma reação de 25 µL, contendo 20mM de trisHCl, 50mM de KCl, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 1µM de cada oligo iniciador (Invitrogen, USA) e 0,5 U de Taq polimerase (Invitrogen, USA). A reação ocorreu nas seguintes condições de temperatura: 96°C por 1 minuto, trinta ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 72°C por 2 minutos. Ao final da reação, uma alíquota de 3µL foi submetida à eletroforese em um gel de

agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. As amostras em que a reação ocorreu de forma satisfatória foram levadas para a digestão com a enzima de restrição *PstI* (*Providencia stuarti*) (Fermentas, USA), sob as seguintes condições, 15µL da reação de PCR foram digeridos em 15U da enzima, por 2 horas a 37°C, após a digestão o produto foi aplicado em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo e o gel foi submetido a eletrofore. (figura 06)



**Figura 06** – Gel de agarose 3,0% corado com brometo de etídeo, mostrando o produto da digestão por *PstI*, o marcador de peso molecular utilizado foi o de 25pb; em 1 temos as bandas de 224 e 100pb, o que caracteriza o genótipo A/A (selvagem); em 2, visualizados as bandas de 224, 158, 100 e 66pb, genótipo A/C e em 3 vemos as bandas de 158, 100 e 66 pb, genótipo C/C (polimórfico).

Para a genotipagem do polimorfismo do gene ERCC1 (118), foram utilizados 50 ng de DNA, em uma reação de 50 µL, contendo 20mM de trisHCl, 50mM de KCl, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 5µM de cada oligo iniciador (Invitrogen, USA) e 2,5 U de Taq polimerase (Invitrogen, USA). A reação ocorreu nas seguintes condições de temperatura: 95°C por 15 segundos, trinta ciclos de 95°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, seguido de uma extensão final de 72°C por 5

minutos. Ao final da reação, uma alíquota de 5µL foi submetida à eletroforese em um gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. As amostras em que a reação ocorreu de forma satisfatória foram levadas para a digestão com a enzima de restrição Bse MI (*Bacillus stearothermophilus* ISL 15-111) (Fermentas, USA), 45µL da reação de PCR foram digeridos em 2,5U da enzima, por 2 horas a 55°C, após a digestão o produto foi aplicado em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo e o gel foi submetido a eletroforese. (figura 07)



25pb

1

2

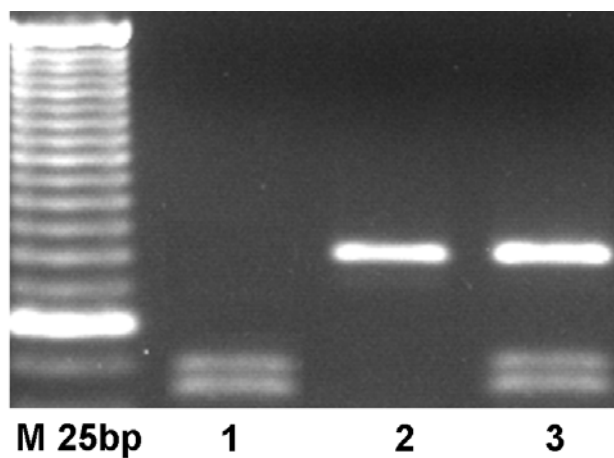
3

**Figura 07** – Gel de agarose 3,0% corado com brometo de etídeo, mostrando o produto da digestão por BseMI, o marcador de peso molecular utilizado foi o de 25pb; em 1 visualizamos somente a banda de 208 pb, C/C(selvagem); em 2, visualizados as bandas de 208, 128, e 80pb, genótipo C/T e em 3 vemos as bandas de 128 e 80pb, genótipo T/T (polimórfico).

Para a caracterização do polimorfismo de GSTP1 foram utilizados 80ng de DNA para a reação de PCR em um volume final de 40µL, contendo 20mM de trisHCl, 50mM de KCl, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3mM de dNTPs, 7,5µM de cada oligo iniciador (Invitrogen, USA), 3% DMSO e 2,5 U de Taq polimerase (Invitrogen, USA). As condições da reação foram, 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 5 minutos. Ao final da reação 5µL



da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e após a confirmação da amplificação, 30µL do produto da PCR foram digeridos em 20U da enzima Alw26I (*Acinetobacter Iwoffii* RFL26) a 37°C por 16 horas e ao final do tempo de digestão o produto foi levado a eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo.(figura 08)



**Figura 08** – Gel de agarose 3,0% corado com brometo de etídeo, mostrando o produto da digestão por Alw26I, o marcador de peso molecular utilizado foi o de 25pb; em 1 visualizamos as bandas de 91 e 85pb G/G (polimórfico); em 2, visualizados a banda de 176pb, genótipo A/A (selvagem) e em 3 vemos as bandas de 176, 91 e 85pb, genótipo A/G.

## Estatística

O valor das variáveis categóricas OPN e dos polimorfismos estudados, como determinante de resposta à cisplatina, foram analisados pelo método de regressão logística. As curvas de sobrevivência serão construídas segundo o método de Kaplan-Meier e a importância prognóstica de OPN e dos polimorfismos estudados foi determinada pelo teste de log

rank. A significância estatística será considerada com  $p < 0,05$ . Todas as análises serão realizadas com o auxílio do programa SPSS 15.0.

---



## **RESULTADOS**



## Osteopontina

Os resultados apresentados nesta tese foram submetidos e aceitos para a publicação na Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery (anexo). A quantificação da OPN foi realizada em amostras de plasma 69 pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (tabela 02).

**Tabela 02 – Características dos pacientes em que foi realizada a quantificação da osteopontina**

<b>Número de pacientes</b>	<b>N=69 (%)</b>
<b>Idade mediana (variação)</b>	57 anos (29-76)
<b>Gênero</b>	
Masculino	64 (92,7)
Feminino	5 (7,3)
<b>Mediana da hemoglobina (variação)</b>	12.8 g/dL (9,0-15,9)
<b>Hábitos</b>	
Tabagismo	63 (91,3)
Etilismo	50 (72,4)
<b>Localização do tumor primário</b>	
Cavidade oral	19 (29,6)
Orofaringe	19 (29,6)
Hipofaringe	6 (8,6)
Laringe	23 (33,3)
Outros	2 (2,8)
<b>Grau de diferenciação</b>	
Muito diferenciado	19 (29,6)
Moderadamente diferenciado	33 (47,8)
Pouco diferenciado	8 (11,5)
Desconhecido	9 (13,0)
<b>Status T</b>	
T1	1 (1,4)
T2	10 (14,4)
T3	12 (17,3)
T4	45 (65,2)
Tx	1 (1,4)
<b>Status N</b>	
N0	16 (23,1)
N1	8 (11,5)
N2	28 (40,5)
N3	17 (24,6)

A maioria dos pacientes eram homens com uma idade mediana de 57 anos em sua maioria tabagistas e etilistas. O sítio tumoral mais afetado foi a laringe (33,3 %), seguida pela cavidade oral e orofaringe. Muitos dos pacientes eram T4 (65,2%) e N2 (40,5%). Do total de pacientes 52 foram tratados exclusivamente com quimiorradioterapia e o restante foi tratado com cirurgia seguida por quimiorradioterapia adjuvante.

### **Correlações com características tumorais**

A concentração da OPN (ng/mL) antes do início da quimiorradioterapia no grupo como um todo, foi de  $102,5 \pm 68,1$  (média  $\pm$  desvio padrão) com uma mediana de 82,1 (3,9 - 333,8). O correspondente valor da OPN após o tratamento (n=46) foi de  $104,0 \pm 53,6$  e mediana de 92,9 (19,4 - 247,8). Nenhuma diferença foi encontrada entre a osteopontina antes e depois do tratamento. ( $p=0,18$ , teste T pareado), assim como entre os pacientes submetidos a quimiorradioterapia exclusiva e ou a adjuvancia.

Com relação aos parâmetros clínicos - patológicos, foi observado que a OPN apresentou níveis mais elevados em pacientes com maior tamanho tumoral e status linfonodal, quando comparado aos estágios menores ( $p=0,009$  e  $0,07$ , respectivamente, ANOVA). A localização tumoral não se mostrou como um fator importante na expressão da OPN, muito embora a hipofaringe tenha apresentado maiores níveis de OPN. (tabela 3)

**Tabela 03 – Níveis séricos da OPN e variáveis clínico-patológicas em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.**

Variável	N° de pacientes	Osteopontina (ng/ml) média ±DP	valor de p
<b>Status T</b>			
T1+ T2	11	60.6 ± 23.5	.009
T3	14	80.2 ± 50.5	
T4	43	121.9 ± 74.2	
Tx	1	---	
<b>Status N</b>			
N0 + N1	24	79.0 ± 43.2	.07
N2	28	108.1 ± 69.6	
N3	17	127.2 ± 86.2	
<b>Grau de diferenciação</b>			
Muito diferenciado	19	97.4 ± 75.3	.77
Moderadamente diferenciado	33	102.5 ± 62.7	
Pouco diferenciado	8	118.8 ± 95.2	
Desconhecido	9	---	
<b>Localização do tumor</b>			
Orofaringe	19	115.0 ± 82.9	.18
Laringe	23	84.5 ± 43.3	
Cavidade oral	19	100.5 ± 64.4	
Hipofaringe	6	152.6 ± 96.3	
outros	2	60.5 ± 29.6	
<b>Tipo de tratamento</b>			
Exclusivo	52	107.5 ± 73.5	.29
Adjuvante	17	87.4 ± 46.9	

### Avaliações com relação a resposta ao tratamento e sobrevida

Quando comparamos os dados da OPN com a resposta ao tratamento, observamos que em pacientes submetidos à exclusiva quimiorradioterapia, os pacientes que obtiveram resposta completa

apresentaram menores níveis de OPN do que aqueles que não responderam ao tratamento (tabela 04).

**Tabela 04 - Níveis de osteopontina em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, de acordo com a resposta ao tratamento.**

Resposta completa (No.)	Osteopontina (ng/ml) média $\pm$ DP	valor de p
Antes do tratamento		
sim(22)	75.0 $\pm$ 41.5	.005
não(30)	131.2 $\pm$ 82.9	
Depois do tratamento		
sim (17)	86.8 $\pm$ 40.5	.004
não (15)	141.6 $\pm$ 58.4	

Outros fatores foram analisados com resposta completa através do teste de chi-quadrado, entre eles o status T ( $p=0,007$ ), N ( $p=0,002$ ), OPN antes da quimiorradioterapia (82,1 ng/mL;  $p=0,007$ ), OPN após a quimiorradioterapia (92,9 ng/mL;  $p=0,016$ ), localização tumoral, categorizada como cavidade oral versus outros ( $p=0,018$ ). Usando o modelo de regressão logística observamos que entre os pacientes com alta OPN após quimiorradioterapia houve um menor número de respostas completas (tabela 05). Tanto os valores de OPN antes do tratamento como os valores pareados da OPN não se mostraram como marcadores de resposta.

**Tabela 05 – Análise por regressão logística para fatores associados com resposta completa em 32 pacientes com CE submetidos a quimiorradioterapia exclusiva.**

	valor de <i>p</i>	Odds ratio para a resposta completa	95.0% C.I.	
			menor	maior
Osteopontina depois do tratamento	.043	.978	.958	.999
<b>Status T</b> T4 vs T1-T3	.511	.453	.043	4.818
<b>Status N</b> N3 vs N0 - N2	.091	.120	.010	1.402
<b>Localização tumoral</b> Oral cavity vs outros	.999	.000	.000	--

Nas análises entre osteopontina e sobrevida, temos que a mediana de seguimento dos pacientes foi de 23,5 meses (8 -37 meses) e 30 pacientes morreram. Em uma análise univariada, o teste de log rank mostrou que o status T, N e o tamanho tumoral foram associados à sobrevida global, com  $p=0,014$ ;  $0,007$  e  $0,001$ , respectivamente.



## **Polimorfismos**

A genotipagem foi realizada em 95 pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (tabela 06). A idade mediana dos pacientes foi de 59 anos (intervalo: 29 – 81 anos), a maioria dos pacientes (91,6%) era do sexo masculino e apenas 6,3% dos pacientes não eram tabagistas e 15,8% não eram etilistas. Quase a totalidade dos pacientes apresentou doença localmente avançada (estadiamento IV, 87,4%; T4, 69,5% e N2, 44,2%) sendo a orofaringe o sítio mais freqüente, seguido por cavidade oral e laringe (37%, 24,2% e 21%, respectivamente).

**Tabela 06 – Características dos pacientes em que foi realizado o estudo dos polimorfismos**

<b>Número de pacientes</b>	<b>N=95 (%)</b>
<b>Idade mediana (variação)</b>	59 anos (29-81)
<b>Gênero</b>	
Masculino	87 (91,6)
Feminino	8 (8,4)
<b>Hábitos</b>	
Tabagismo	89 (93,7)
Etilismo	80 (84,2)
<b>Localização do tumor primário</b>	
Cavidade oral	23 (24,2)
Orofaringe	35 (37,0)
Hipofaringe	12 (12,6)
Laringe	20 (21,0)
Língua	1 (1,0)
Outros	4 (4,2)
<b>Estadiamento</b>	
II	6 (6,3)
III	6 (6,3)
IV	83 (87,4)
<b>Status T</b>	
T2	12 (12,6)
T3	9 (9,5)
T4	66 (69,5)
Tx	8 (8,4)
<b>Status N</b>	
N0	18 (18,9)
N1	7 (7,4)
N2	42 (44,2)
N3	28 (29,5)

## Frequências Genotípicas

A frequência dos diferentes polimorfismos está mostrada na tabela 07. Para o gene ERCC1 (118), o genótipo mais freqüente foi o heterozigoto (C/T) com 45,3%, no gene XPD (751) 44 pacientes (46,3%) foram genotipados como homozigoto selvagem (A/A), para o gene GSTP1 observamos que 47,4% dos pacientes eram heterozigotos (A/G).

Em relação as GSTT1 e GSTM1 determinamos que os genótipos que o gene fosse nulo, este seria chamado de não funcional, uma vez que não produz a proteína e de funcional quando o gene estivesse presente. Assim, 83,2 % dos pacientes apresentaram GSTT1 funcional e 58,9 % dos pacientes se mostraram como tendo o gene GSTM1 não funcional. (tabela 07)

**Tabela 07 – Frequência genotípicas dos genes em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.**

Genes	Homozigoto Selvagem		Heterozigoto		Homozigoto polimórfico	
	N°	%	N°	%	N°	%
<b>ERCC1 (118)</b>	29	30,5	43	45,3	23	24,2
<b>XPD (751)</b>	44	46,3	40	42,1	11	11,6
<b>GSTP1</b>	35	36,8	45	47,4	15	15,8

Genes	Funcional		Não funcional	
	N°	%	N°	%
<b>GSTT1</b>	79	83,2	16	16,8
<b>GSTM1</b>	39	41,1	56	58,9

### Avaliação dos genótipos e resposta ao tratamento

Os 95 pacientes incluídos no estudo eram inoperáveis e foram tratados com quimiorradioterapia exclusiva, em apenas 06 pacientes não foi possível a avaliação da resposta. A taxa de resposta global (parcial e completa) foi de 61,8%. A tabela 08 mostra que 30,3% dos pacientes apresentaram resposta completa, 31,5% resposta parcial, enquanto 38,2 % dos pacientes não responderam ao tratamento (progressão da doença e doença estável).

**Tabela 08 – Avaliação de resposta ao tratamento em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.**

Tipo de resposta	Nº de pacientes	%
Resposta completa (RC)	27	30,3
Resposta parcial (RP)	28	31,5
Progressão da doença (PD)	29	32,6
Doença estável (DE)	05	5,6

Não encontramos correlações entre os genótipos e a resposta a quimiorradioterapia (tabela 09). O único gene que parece estar relacionado com tratamento é a GSTP1, em que um maior número de pacientes respondedores ao tratamento foi identificado com o genótipo heterozigoto polimórfico (A/G;  $p=0,04$ ,  $\chi^2$  Pearson teste).

**Tabela 09 – Resposta ao tratamento em 89 pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço de acordo com seus genótipos.**

Genes	Respondedores		Não respondedores		P( $\chi^2$ )
	Nº	%	Nº	%	
<b>ERCC (118)</b>					
C/C	19	65,5	10	34,5	,752
C/T	23	57,5	17	42,5	
T/T	13	65,0	07	35,0	
<b>XPD (751)</b>					
A/A	25	59,5	17	40,5	,827
A/C	23	62,2	14	37,8	
C/C	07	70,0	03	30,0	
<b>GSTP1</b>					
A/A	22	68,8	10	31,2	,044
A/G	28	66,7	14	33,3	
G/G	05	61,8	10	38,2	
<b>GSTT1</b>					
Funcional	45	61,6	28	38,4	1,00
Não funcional	10	62,5	06	37,5	
<b>GSTT1</b>					
Funcional	23	59,0	16	41,0	,66
Não funcional	32	64,0	18	36,0	

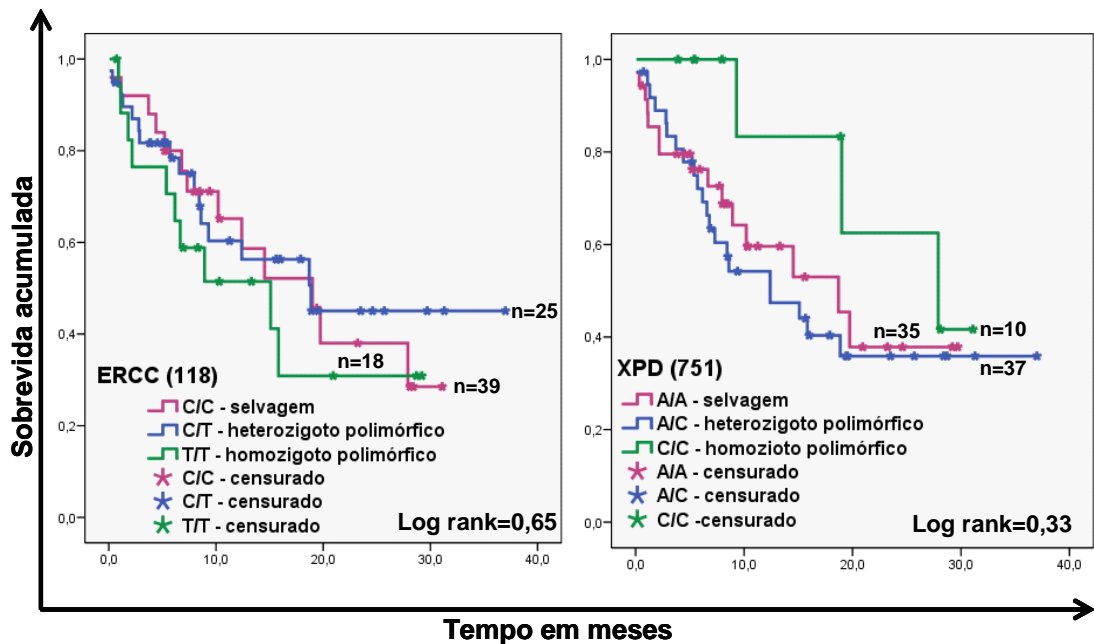
## **Correlações entre os genótipos e sobrevida global**

A mediana de segmento dos pacientes foi de 11,2 meses (intervalo: 0,6 -37 meses), ao final do tratamento 39 pacientes estavam vivos e houve uma perda de segmento de 13 pacientes.

Em uma correlação entre resposta ao tratamento e sobrevida global, notamos que os pacientes que foram respondedores (completa e parcialmente) ao tratamento obtiveram uma melhor sobrevida global (média: 26,9 meses, 95%CI: 22,4 -31,3 meses; log rank=0,000).

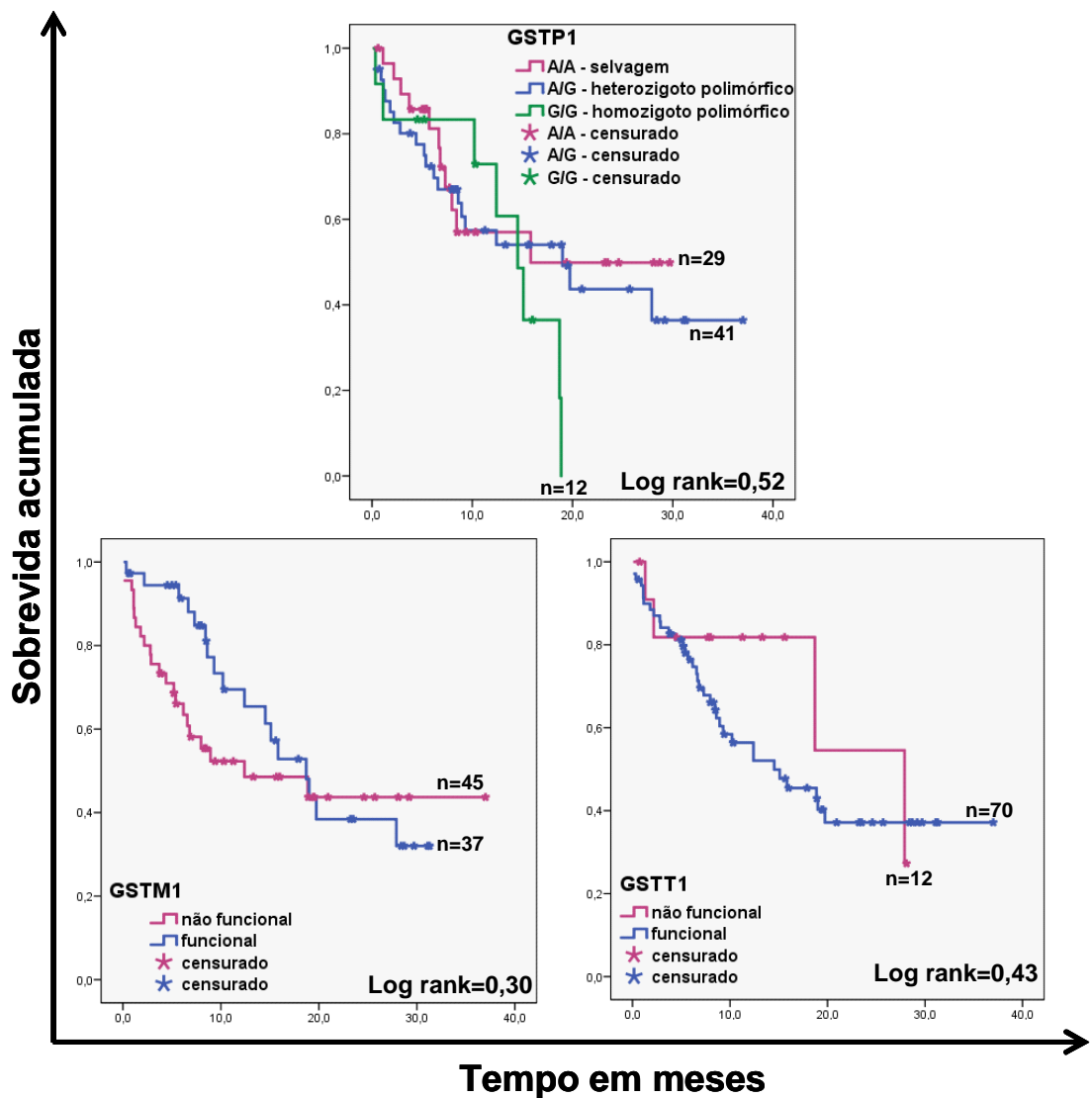
A análise das curvas de Kaplan Meier dos pacientes portadores de CE mostrou não haver associação entre os genótipos dos genes de reparo de DNA, ERCC (118) e XPD (751) com a sobrevida global dos pacientes. Embora, possamos notar que em relação ao gene XPD, o genótipo homozigoto polimórfico (C/C) tenha apresentado uma vantagem na sobrevida quando comparado aos demais perfis, A/A e A/C, sendo a sobrevida mediana de 27,9 meses; 18,7 e 12,4, respectivamente (figura 09).

---



**Figura 09 – Análise de sobrevida global em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.** Na figura vemos as curvas de sobrevida dos pacientes de acordo com seus genótipos para os genes ERCC (118) e XPD (751). A análise de sobrevivência foi realizada segundo o teste do Log Rank e os valores estão representados ao lado de cada curva. Foi considerado significativo  $p \leq 0,05$ .

Mantendo a mesma análise das curvas de sobrevida, observamos que com relação aos genes de detoxificação celular as GSTP1, M1 e T1, nenhuma associação com sobrevida global também foi possível, mas podemos notar uma evidente melhor vantagem na sobrevida para os pacientes que possuem GSTT1 não funcional, com uma mediana de 27,9 meses em relação aos que possuem o gene funcional com uma mediana de 14,5 meses. O mesmo resultado não é observado com a GSTM1, onde percebemos uma relação inversa, em que os pacientes que apresentam a GSTM1 não funcional têm uma menor sobrevida do que os funcionais, 12,4 e 18,7 meses, respectivamente (figura 10).



**Figura 10 – Análise de sobrevida global em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.** Na figura vemos as curvas de sobrevida dos pacientes de acordo com seus genótipos para os genes GSTP1, GSTM1 e GSTT1. A análise de sobrevivência foi realizada segundo o teste do Log Rank e os valores estão representados ao lado de cada curva. Foi considerado significativo  $p \leq 0,05$ .



**DISCUSSÃO**





---

O propósito deste estudo foi a busca por um marcador de resposta a quimioterapia e sobrevida dos pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço tratados com quimiorradioterapia.

Muitos trabalhos têm avaliado o uso de biomarcadores e o entrego de técnicas de seqüenciamento gênico na busca por determinantes prognósticos evitando que pacientes não respondedores ao tratamento sofram com os efeitos tóxicos de muitos quimioterápicos.

No presente estudo, trabalhamos com duas linhas distintas, em uma delas avaliamos os níveis da OPN sérica em pacientes com CE antes e depois do término da quimiorradioterapia E, além disso, traçamos o perfil dos polimorfismos dos genes de reparo de DNA (ERCC e XPD) e detoxificação celular (glutathionas), também em pacientes com CE, apesar destas duas frentes distintas, a idéia central era a mesma: a busca por uma correlação entre a resposta a quimiorradioterapia e a sobrevida destes pacientes.

Em relação à OPN, nós não encontramos nenhuma significância estatística entre as amostras coletas antes e depois do tratamento, também não nenhuma associação entre resposta e alterações individuais nos níveis de OPN, talvez devido ao pequeno número de amostras, a ampla variação dos valores ou mesmo pela avaliação em somente um dos momentos. Em um estudo anterior em pacientes com câncer de mama metastático foi mostrado que o aumento da OPN no plasma estava relacionado com o pior prognóstico (Bramwell et al., 2006), embora em um outro estudo com

---

mieloma múltiplo o mesmo resultado não tenha sido encontrado (Kang et al., 2007).

Em nossos achados, nós encontramos associação entre os altos níveis de OPN no plasma em pacientes com avançados status T e N, quando comparado aos estágios iniciais, o que está de acordo com outras publicações em câncer de língua (Chien et al., 2008), laringe e hipofaringe (Eto et al., 2007). No primeiro estudo, a OPN foi mensurada por imunohistoquímica e no segundo por elisa, e em ambos os valores altos estavam associados com alto risco de complicações patológicas.

Uma associação entre a baixa osteopontina antes do tratamento e a resposta completa a quimiorradioterapia foi encontrada em uma análise univariada, estando de acordo com uma publicação de Overgaard em 2005, em que há uma correlação entre altos níveis de OPN no plasma e o grupo de pacientes não respondedores. Um achado interessante foi o fato de a OPN estar inversamente correlacionada com os níveis de hemoglobina, o que reforça a ligação entre a osteopontina e a hipóxia (Overgaard et al., 2005; Bache et al., 2006 e Nordmark et al., 2004). Além disso, um aumento da OPN depois do tratamento foi independentemente relacionado com a resposta completa do tumor, sugerindo uma ligação entre tamanho tumoral e os níveis de OPN no plasma.

Observamos uma correlação entre baixa OPN antes do tratamento e uma melhor sobrevida global, quando realizada uma análise multivariada, o mesmo foi encontrado em estudos anteriores com pacientes de CE

---

submetidos a diferentes modalidades de tratamento (Bache et al., 2006 e Petrik et al., 2006).

Polimorfismos em genes de reparo de DNA ou mesmo em enzimas de detoxificação celular têm sido muito estudados, mas seu significado biológico ainda não é muito compreendido. Muitas evidências epidemiológicas têm associado essas variações individuais à resposta à quimioterapia. Essas variações podem incluir, alterações no metabolismo das drogas, no caso das enzimas de detoxificação e na forma como as lesões causadas ao DNA são reparadas, no caso das enzimas de reparo de DNA.

A via de reparo mais importante para os danos causados ao DNA pela cisplatina é a NER (Suk et al., 2005) e polimorfismos nas enzimas que atuam nesta via de reparo tem sido amplamente estudada.

No gene XPD (751) há uma troca de uma adenina por uma citosina levando a uma substituição de uma lisina por uma glicina na posição 751 da cadeia de aminoácidos o que afeta os níveis da proteína (Yu et al., 1997). Em um estudo funcional Spitz et al., mostraram que a variante homozigota polimórfica (C/C) possui uma capacidade sub-ótima de reparo. No caso do gene ERCC (118), há uma substituição de uma citosina por uma timina, que codifica para o mesmo aminoácido: asparagina (Yu et al., 1997). Em um trabalho com células de ovário Yu et al. em 2000, mostrou que a transição de uma citosina para uma timina leva a diminuição da expressão do RNAm do gene ERCC.

---

Em nosso estudo, encontramos o genótipo selvagem (aquele que não apresenta a substituição da base nitrogenada), como sendo o mais freqüente para o gene XPD (751) e o heterozigoto polimórfico o mais freqüente para o gene ERCC (118), esses dados variam de acordo com o grupo étnico estudado, na Europa e na América do Norte aproximadamente 50% da população possui genótipo polimórfico para o gene XPD, enquanto o genótipo selvagem é encontrado na maior parte da população chinesa, japonesa e coreana (Benhamou et al., 2005).

Após as análises das freqüências, passamos a correlacionar os genótipos dos pacientes com a resposta a quimiorradioterapia, através do teste estatístico de *Pearson* e nenhuma relação foi encontrada, o que é semelhante aos resultados encontrados por Isla et al. em 2004 com carcinoma de pulmão de células não pequenas. No entanto, Quintela-Fandino em 2006, mostraram correlação entre os genes de reparo e a resposta a quimiorradioterapia em pacientes com CE. Essa discrepância nos dados pode ser explicada pelo fato de que muitos em muitos estudos os pacientes recebem vários esquemas de tratamento.

A respeito das análises de sobrevivência global, não foi possível uma correlação significativa entre os genótipos encontrados e a sobrevida dos pacientes. Embora tenha sido interessante notar que os pacientes que possuíam o genótipo homozigoto polimórfico (C/C) no gene XPD (751) apresentaram uma melhor sobrevida em relação ao selvagem e ao heterozigoto, isso pode estar relacionado ao fato de que o pacientes com

---

genótipo C/C tem uma capacidade menor de reparo no DNA, e assim, a cisplatina causaria mais danos ao DNA levando a célula a apoptose.

Outro fator que pode estar relacionado a resposta ao tratamento e sobrevida em pacientes tratados com cisplatina são os polimorfismos em enzimas de detoxificação celular e as glutathionas estão particularmente envolvidas no efluxo deste quimioterápico.

Nos nossos pacientes incluídos neste estudo, observamos que a maioria dos pacientes apresentaram o genótipo polimórfico heterozigoto para o gene GSTP1 (A/G). Este polimorfismo se caracteriza pela troca de uma adenina por uma guanina o que leva a substituição de uma isoleucina por uma valina na posição 115 da cadeia de aminoácidos, essa mudança torna faz com que a enzima tenha uma perda da atividade catalítica e redução na capacidade de detoxificação celular.

Para os genes GSTT1 e GSTM1, notamos que a maioria dos pacientes possuía uma deleção no gene GSTT1 e formam assim chamados de não funcionais e o inverso ocorreu para o genótipo GSTM1. A deleção desses genes pode ser resultado de uma falha durante o crossing-over (Xu et al., 1998), o resultado dessas deleções é caracterizado pela deficiência na atividade enzimática, e isso tem sido amplamente associado a resposta a quimioterapia e o aumento de risco para doenças malignas (McIlwain et al., 2006).

Nas análises realizadas entre a resposta ao tratamento e os genótipos, vimos que não houve uma correlação entre resposta ao

---

tratamento e as glutatona, esse resultado também é observado em outros estudos entre eles, Beeghly et al. em 2006, com pacientes com câncer de ovário.

As análises da curva de sobrevida mostraram um resultado interessante, embora não ter sido um resultado estatisticamente significativo, os pacientes que apresentaram a GSTT1 não funcional obtiveram uma vantagem na sobrevida com relação aos pacientes que possuíam a GSTT1 funcional, fator que era previsto uma vez que se o gene não está presente não haverá a produção da enzima e conseqüentemente a droga não será expulsa, assim muitos danos serão causados e a célula será encaminhada para apoptose.

Apesar dos dados apresentados não indicarem correlações entre os polimorfismos estudados e a resposta ao tratamento e sobrevida global dos pacientes, mais análises estatísticas ainda serão realizadas entre elas as análises multivariadas e univariadas, fazendo assim uma melhor análise de todos os dados.

---

---

---

## REFERÊNCIAS

---

---

- 
- Alexandrie AK, Rannug A, Juronen E, Tasa G, Warholm M. **Detection and characterization of a novel functional polymorphism in the GSTT1 gene.** *Pharmacogenetics.* 2002; 12(8): 613-9.
- Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. **Molecular cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins.** *J Biol Chem.* 1997 Apr 11;272(15):10004-12.
- Allan JM, Wild CP, Rollinson S, Willett EV, Moorman AV, Dovey GJ, Roddam PL, Roman E, Cartwright RA, Morgan GJ. **Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 25;98(20):11592-7. Epub 2001 Sep 11. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Dec 18;98(26):15394.
- Ambrosone CB, Sweeney C, Coles BF, Thompson PA, McClure GY, Korourian S, Fares MY, Stone A, Kadlubar FF, Hutchins LF. **Polymorphisms in glutathione S-transferases (GSTM1 and GSTT1) and survival after treatment for breast cancer.** *Cancer Res.* 2001 1; 61(19): 7130-5.
-



- 
- Anderson NL, Anderson NG. **The Human plasma proteome. History, Character and diagnostic prospects.** Molecular and Cellular Proteomics 2002 v1: 845-867.
- Arand M, Mühlbauer R, Hengstler J, Jäger E, Fuchs J, Winkler L, Oesch F. **A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms.** Anal Biochem. 1996 Apr 5;236(1):184-6.
- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. **Head and neck cancer.** Lancet. 2008 May 17;371(9625):1695-709.
- Bache M, Reddemann R, Said HM, et al. **Immunohistochemical detection of osteopontin in advanced head-and-neck cancer: prognostic role and correlation with oxygen electrode measurements, hypoxia-inducible-factor-1alpha-related markers, and hemoglobin levels.** Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2006;66:1481-7.
- Bautista DS, Saad Z, Chambers AF, Tonkin KS, O'Malley FP, Singhal H, Tokmakejian S, Bramwell V, Harris JF. **Quantification of osteopontin in human plasma with an ELISA: basal levels in pre- and postmenopausal women.** Clin Biochem. 1996 Jun;29(3):231-9
-

- 
- Beeghly A, Katsaros D, Chen H, Fracchioli S, Zhang Y, Massobrio M, Risch H, Jones B, Yu H. **Glutathione S-transferase polymorphisms and ovarian cancer treatment and survival.** *Gynecol Oncol.* 2006 Feb;100(2):330-7.
- Behrend EI, Craig AM, Wilson SM, Denhardt DT, Chambers AF. **Reduced malignancy of ras-transformed NIH 3T3 cells expressing antisense osteopontin RNA.** *Cancer Res.* 1994 Feb 1;54(3):832-7
- Benhamou S, Sarasin A. **ERCC2 /XPD gene polymorphisms and lung cancer: a HuGE review.** *Am J Epidemiol.* 2005 Jan 1;161(1):1-14. Review.
- Booton R, Ward T, Heighway J, Ashcroft L, Morris J, Thatcher N. **Glutathione-S-transferase P1 isoenzyme polymorphisms, platinum-based chemotherapy, and non-small cell lung cancer.** *J Thorac Oncol.* 2006 Sep;1(7):679-83.
- Bramwell VH, Doig GS, Tuck AB, et al. **Serial plasma osteopontin levels have prognostic value in metastatic breast cancer.** *Clin Cancer Res.* 2006;12:3337-43.
- Brown LF, Papadopoulos-Sergiou A, Berse B, Manseau EJ, Tognazzi K, Perruzzi CA, Dvorak HF, Senger DR. **Osteopontin expression and**
-

**distribution in human carcinomas.** Am J Pathol. 1994 Sep;145(3):610-23

Camps C, Sarries C, Roig B, Sanchez JJ, Queralt C, Sancho E, Martinez TaronM, Rosell R **Assessment of nucleotide excision repair XPD polymorphisms in the peripheral blood of gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer patients.** Clin Lung Cancer. 2003 Jan;4(4):237-41.

Casson AG, Wilson SM, McCart JA, O'Malley FP, Ozcelik H, Tsao MS, Chambers AF. **ras mutation and expression of the ras-regulated genes osteopontin and cathepsin L in human esophageal cancer.** Int J Cancer. 1997 Sep 4;72(5):739-45

Castro G Jr, Snitcovsky IM, Gebrim EM, Leitão GM, Nadalin W, Ferraz AR, Federico MH. **High-dose cisplatin concurrent to conventionally delivered radiotherapy is associated with unacceptable toxicity in unresectable, non-metastatic stage IV head and neck squamous cell carcinoma.** Eur Arch Otorhinolaryngol. 2007 Dec;264(12):1475-82. Epub 2007 Jul 21.

Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. **Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity.** Anticancer Agents Med Chem. 2007 Jan;7(1):3-18. Review.

---

---

Chambers AF, Wilson SM, Kerkvliet N, O'Malley FP, Harris JF, Casson AG

**Osteopontin expression in lung cancer.** *Lung Cancer.* 1996

Nov;15(3):311-23

Chen CL, Liu Q, Pui CH, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro R, Evans WE,

Relling MV. **Higher frequency of glutathione S-transferase deletions**

**in black children with acute lymphoblastic leukemia.** *Blood.* 1997 1;

89(5): 1701-7.

Chien CY, Su CY, Chuang HC, Fang FM, Huang HY, Chen CM, Chen CH,

Huang CC.. **Clinical significance of osteopontin expression in T1**

**and T2 tongue cancers.** *Head Neck.* 2008;30:776-81.

Chien CY, Su CY, Chuang HC, Fang FM, Huang HY, Chen CH, Chen CM,

Huang CC. **Comprehensive study on the prognostic role of**

**osteopontin expression in oralsquamous cell carcinoma.** *Oral Oncol.*

2009 Feb 10. [Epub ahead of print]

Curran JE, Vaughan T, Lea RA, Weinstein SR, Morrison NA, Griffiths LR

**Association of A vitamin D receptor polymorphism with sporadic**

**breast cancer development.** *Int J Cancer.* 1999; 83:723-726

Davies SM, Bhatia S, Ross JA, Kiffmeyer WR, Gaynon PS, Radloff GA,

Robison LL, Perentesis JP. **Glutathione S-transferase genotypes,**

**genetic susceptibility, and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia.** Blood. 2002 1;100(1):67-71.

de Boer J, Donker I, de Wit J, Hoeijmakers JH, Weeda G. **Disruption of the mouse xeroderma pigmentosum group D DNA repair/basal transcription gene results in preimplantation lethality.** Cancer Res. 1998 Jan 1;58(1):89-94.

Deng YF, Chen P, Lin YZ, Le JZ, Wu XL, Yu MQ, Zhuang PY, Gao MH. **Analytical and clinical evaluation of CYFRA 21-1 by electrochemiluminescent immunoassay in head and neck squamous cell carcinoma.** J Laryngol Otol. 2003 Mar;117(3):190-4

Denhardt DT, Chambers AF. **Overcoming obstacles to metastasis--defenses against host defenses: osteopontin (OPN) as a shield against attack by cytotoxic host cells.** J Cell Biochem. 1994 Sep;56(1):48-51

Denhardt DT, Noda M. **Osteopontin expression and function: role in bone remodeling.** J Cell Biochem Suppl. 1998;30-31:92-102

Devoll RE, Li W, Woods KV, Pinero GJ, Butler WT, Farach-Carson MC, Happonen RP. **Osteopontin (OPN) distribution in premalignant and malignant lesions of oral epithelium and expression in cell lines**

---

- derived from squamous cell carcinoma of the oral cavity.** *J Oral Pathol Med.* 1999 Mar;28(3):97-101.
- Doweck I, Barak M, Uri N, Greenberg E. **The prognostic value of the tumour marker Cyfra 21-1 in carcinoma of head and neck and its role in early detection of recurrent disease.** *Br J Cancer.* 2000 Dec;83(12):1696-701
- Dybdahl M, Vogel U, Frenzt G, Wallin H, Nexø BA. **Polymorphisms in the DNA repair gene XPD: correlations with risk and age at onset of basal cell carcinoma.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999 Jan;8(1):77-81.
- Eto M, Kodama S, Nomi N, Uemura N, Suzuki M. **Clinical significance of elevated osteopontin levels in head and neck cancer patients.** *Auris Nasus Larynx.* 2007;34:343-
- Feng B, Rollo EE, Denhardt DT. **Osteopontin (OPN) may facilitate metastasis by protecting cells from macrophage NO-mediated cytotoxicity: evidence from cell lines down-regulated for OPN expression by a targeted ribozyme.** *Clin Exp Metastasis.* 1995 Nov;13(6):453-62
-

- 
- Furger KA, Menon RK, Tuckl AB, Bramwelll VH, Chambers AF. **The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis.** *Curr Mol Med.* 2001 Nov;1(5):621-32
- Gardner HA, Berse B, Senger DR. **Specific reduction in osteopontin synthesis by antisense RNA inhibits the tumorigenicity of transformed Rat1 fibroblasts.** *Oncogene.* 1994 Aug;9(8):2321-6
- Geisler SA, Olshan AF, Cai J, Weissler M, Smith J, Bell D. **Glutathione S-transferase polymorphisms and survival from head and neck cancer.** *Head Neck.* 2005 Mar;27(3):232-42.
- Giaccone G. **Clinical perspectives on platinum resistance.** *Drugs.* 2000;59 Suppl 4:9-17; discussion 37-8.
- Giachelli CM, Steitz S. **Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization.** *Matrix Biol.* 2000 Dec;19(7):615-22
- Gillet LC, Schärer OD. **Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair.** *Chem Rev.* 2006 Feb;106 (2):253-76.
- Gonzalez Sanchez E, Lopez-Rios Velasco J, Calvo Boizas E, Garcia-Talavera Fernandez JR, Martin Rodriguez M, Munoz Herrera A, Del
-

- 
- Canizo Alvarez A. **Study of Cyfra 21-1 as a new tumor marker for the diagnosis of epidermoid carcinoma of the head and neck.** Acta Otorrinolaringol Esp. 1999 Mar;50(2):85-9
- Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. **Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?** Mol Pharmacol. 2001 Apr;59(4):657-63. Review.
- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. **Cancer statistics.** Cancer J Clin. 2001 Jan-Feb;51(1):15-36.
- Hayes JD, Pulford DJ. **The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance.** Crit Rev Biochem Mol Biol. 1995;30(6):445-600. Review.
- Ho S, Leung WT, Yuen J, Johnson PJ. **Serum levels of CYFRA 21-1 in nasopharyngeal carcinoma and its possible role in monitoring of therapy.** Eur J Cancer B Oral Oncol. 1996 Nov;32B(6):377-80
- Hu X, Herzog C, Zimniak P, Singh SV. **Differential protection against benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced DNA damage in HepG2 cells stably transfected with allelic variants of pi class**
-



---

**human glutathione S-transferase.** Cancer Res. 1999 May 15;59(10):2358-62.

Hu X, Xia H, Srivastava SK, Herzog C, Awasthi YC, Ji X, Zimniak P, Singh SV. **Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1-1 for diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons.** Biochem Biophys Res Commun. 1997 Sep 18;238(2):397-402.

Isla D, Sarries C, Rosell R, Alonso G, Domine M, Taron M, Lopez-Vivanco G, Camps C, Botia M, Nunez L, Sanchez-Ronco M, Sanchez JJ, Lopez-Brea M, Barneto I, Paredes A, Medina B, Artal A, Lianes P. **Single nucleotide polymorphisms and outcome in docetaxel-cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer.** Ann Oncol. 2004 Aug;15(8):1194-203

Johnson SW, Stevenson JP, O'Dwyer PJ. **Cisplatin and its analogues.** Cancer, Principles and Practice of Oncology. 2001(6): 376-380.

Kang SY, Lee JJ, Lee WI. **Clinical significance of serum osteopontin in patients with multiple myeloma.** Korean J Lab Med. 2007;27:400-5.

Kimura S, Imagawa Y, Satake K, Tsukuda M. **The relationship of the human glutathione S-transferase P1 polymorphism and**

---

---

**chemotherapeutic sensitivity in head and neck squamous carcinoma.** Int J Mol Med. 2004 Aug;14(2):185-9.

Krajcinovic M, Labuda D, Mathonnet G, Labuda M, Moghrabi A, Champagne J, Sinnott D. **Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia.** Clin Cancer Res. 2002 Mar;8(3):802-10.

Kurokat C, Lippert BM, Werner JA. **Follow-up with serum Cyfra 21-1 in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck.** Oncology. 2002;63(3):280-5

Le QT, Sutphin PD, Raychaudhuri S, Yu SC, Terris DJ, Lin HS, Lum B, Pinto HA, Koong AC, Giaccia AJ. **Identification of osteopontin as a prognostic plasma marker for head and neck squamous cell carcinomas.** Clin Cancer Res. 2003 Jan;9(1):59-67

Lee JK, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Sun SS, Kao CH. **Comparison of CYFRA 21-1 and squamous cell carcinoma antigen in detecting nasopharyngeal carcinoma.** Ann Otol Rhinol Laryngol. 2001 Aug;110(8):775-8

---

- 
- Lin WY, Yen TC, Cheng KY, Wang SJ. **The value of CYFRA 21-1, a new tumor marker, in nasopharyngeal carcinoma.** Neoplasma. 1998;45(1):21-4.
- Lindpaintner, K. **The impact of pharmacogenetics and pharmacogenomics on drug discovery.** Nature Reviews. Drug Discovery. 2002; 1:463-9.
- Maass JD, Hoffmann-Fazel A, Goeroegh T, Hoffmann M, Meyer JE, Gottschlich S, Rudert H, Maune S. **Cyfra 21-1: a serological help for detection of distant metastases in head and neck cancer.** Anticancer Res. 2000 May-Jun;20(3B):2241-3
- Mannervik B, Danielson UH. **Glutathione transferases-structure and catalytic activity.** CRC Crit Rev Biochem. 1988; 23(3): 283-337. Review.
- Mcllwain CC, Townsend DM, Tew KD. **Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy.** Oncogene. 2006 Mar 13;25(11):1639-48.
- Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Misawa K, Araki K, Misawa Y, Ueda Y **Prognostic value of glucose transporter 1 expression in patients with hypopharyngeal carcinoma.** Anticancer Res. 2002 Nov-Dec;22(6B):3489-94
-

---

Nordsmark M, Overgaard J. **Tumor hypoxia is independent of hemoglobin and prognostic for loco-regional tumor control after primary radiotherapy in advanced head and neck cancer.** *Acta Oncol.* 2004;43:396–403.

Oates AJ, Barraclough R, Rudland PS. **The identification of osteopontin as a metastasis-related gene product in a rodent mammary tumour model.** *Oncogene.* 1996 Jul 4;13(1):97-104

Oates AJ, Barraclough R, Rudland PS. **The role of osteopontin in tumorigenesis and metastasis.** *Invasion Metastasis.* 1997;17(1):1-15.

Ogawa T, Tsurusako Y, Kimura N, Nishioka S, Akagi H, Nishizaki K, Nishioka K, Rutka J. **Comparison of tumor markers in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Acta Otolaryngol Suppl.* 1999;540:72-6

Overgaard J, Eriksen JG, Nordsmark M, et al. **Plasma osteopontin, hypoxia, and response to the hypoxia sensitizer nimorazole in radiotherapy of head and neck cancer: results from the DAHANCA 5 randomised double-blind placebo-controlled trial.** *Lancet Oncol.* 2005;6:757-64.

---

---

Pandya U, Srivastava SK, Singhal SS, Pal A, Awasthi S, Zimniak P, Awasthi YC, Singh SV. **Activity of allelic variants of Pi class human glutathione S-transferase toward chlorambucil.** Biochem Biophys Res Commun. 2000 Nov 11;278(1):258-62.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. **Estimating the world cancer burden: Globocan 2000.** Int J Cancer. 2001 Oct 15;94(2):153-6.

Pauli C, Stieber P, Schmitt UM, Andratschke M, Hoffmann K, Wollenberg B. **The significance of Tenascin-C serum level as tumor marker in squamous cell carcinoma of the head and neck.** Anticancer Res. 2002 Sep-Oct;22(5):3093-7

Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB. **Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism.** Biochem J. 1994 May 15;300 ( Pt 1):271-6.

Perez RP. **Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance.** Eur J Cancer. 1998 Sep;34(10):1535-42.

Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. **Use of proteomic**

---

---

**patterns in serum to identify ovarian cancer.** *Lancet.* 2002 Feb 16;359(9306):572-7

Petrik D, Lavori PW, Cao H, et al. **Plasma Osteopontin Is an Independent Prognostic Marker for Head and Neck Cancers.** *J Clin Oncol.* 2006;24:5291-5297.

Piccirillo JF, Feinstein AR. **Clinical symptoms and comorbidity: significance for the prognostic classification of cancer.** *Cancer.* 1996 Mar 1;77(5):834-42.

Pradier O, Hille A, Schimberger H, Hess CF. **Monitoring of therapy in head and neck patients during the radiotherapy by measurement of Cyfra 21-1.** *Cancer Radiother.* 2002 Feb;6(1):15-21

Quintela-Fandino M, Hitt R, Medina PP, Gamarra S, Manso L, Cortes-Funes H, Sanchez-Cespedes M. **DNA-repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome among patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based induction chemotherapy.** *J Clin Oncol.* 2006 Sep 10;24(26):4333-9. Epub 2006 Aug 8.

---

- 
- Ramos KS. **Redox regulation of c-Ha-ras and osteopontin signaling in vascular smooth muscle cells: implications in chemical atherogenesis.** Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1999;39:243-65
- Robert J, Morvan VL, Smith D, Pourquier P, Bonnet J. **Predicting drug response and toxicity based on gene polymorphisms.** Crit Rev Oncol Hematol. 2005 Jun;54(3):171-196
- Rodrigo Tapia JP, Dominguez Iglesias F, Alvarez Marcos C, Gonzalez Meana MV, Garcia Pedrero J, Suarez Nieto C. **Prognostic significance of the expression of adhesion molecules E-cadherin, Cd44s and CD44V6 in supraglottic squamous carcinoma.** Acta Otorrinolaringol Esp. 2002 Dec;53(10):745-51
- Saitoh Y, Kuratsu J, Takeshima H, Yamamoto S, Ushio Y. **Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy.** Lab Invest. 1995 Jan;72(1):55-63
- Schumaker L, Nikitakis N, Goloubeva O, Tan M, Taylor R, Cullen KJ. **Elevated expression of glutathione S-transferase pi and p53 confers poor prognosis in head and neck cancer patients treated with chemoradiotherapy but not radiotherapy alone.** Clin Cancer Res. 2008 Sep 15;14(18):5877-83.
-

---

Seiwert TY, Salama JK, Vokes EE. **The chemoradiation paradigm in head and neck cancer.** *Nat Clin Pract Oncol.* 2007 Mar;4(3):156-71.

Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A. **Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation.** *Anticancer Res.* 1989 Sep-Oct;9(5):1291-9

Singhal H, Bautista DS, Tonkin KS, O'Malley FP, Tuck AB, Chambers AF, Harris JF. **Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival.** *Clin Cancer Res.* 1997 Apr;3(4):605-11

Spitz MR, Wu X, Wang Y, Wang LE, Shete S, Amos CI, Guo Z, Lei L, Mohrenweiser H, Wei Q. **Modulation of Nucleotide Excision Repair Capacity by XPD Polymorphisms in Lung Cancer Patients.** *Cancer Research* 2001.61, 1354-1357.

Srivastava SK, Singhal SS, Hu X, Awasthi YC, Zimniak P, Singh SV. **Differential catalytic efficiency of allelic variants of human glutathione S-transferase Pi in catalyzing the glutathione conjugation of thiotepa.** *Arch Biochem Biophys.* 1999 1;366(1):89-94.

Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Groshen S, Tsao-Wei DD, Yu MC, Lenz HJ. **Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1**

---



**genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer.** J Natl Cancer Inst. 2002 Jun 19;94(12):936-42

Su L, Mukherjee AB, Mukherjee BB. **Expression of antisense osteopontin RNA inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation of mouse JB6 epidermal cells.** Oncogene. 1995 Jun 1;10(11):2163-9

Suk R, Gurubhagavatula S, Park S, Zhou W, Su L, Lynch TJ, Wain JC, Neuberg D, Liu G, Christiani DC. **Polymorphisms in ERCC1 and grade 3 or 4 toxicity in non-small cell lung cancer patients.** Clin Cancer Res. 2005 Feb 15;11(4):1534-8.

Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Wijffels K, Schuurung E, Litvinov SV, Hermans J, van Krieken JH. **Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer.** J Pathol. 2001 Jul;194(3):298-302.

Tew KD. **Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance.** Cancer Res. 1994 Aug 15;54(16):4313-20. Review

Thalmann GN, Sikes RA, Devoll RE, Kiefer JA, Markwalder R, Klima I, Farach-Carson CM, Studer UE, Chung LW. **Osteopontin: possible role in prostate cancer progression.** Clin Cancer Res. 1999 Aug;5(8):2271-

- 
- Tozawa K, Yamada Y, Kawai N, Okamura T, Ueda K, Kohri K. **Osteopontin expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia.** Urol Int. 1999;62(3):155-8.
- Trougakos IP, So A, Jansen B, Gleave ME, Gonos ES. **Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein j gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress.** Cancer Res. 2004 Mar 1;64(5):1834-42
- Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Tonkin KS, Harris JF, Bautista D, Chambers AF. **Osteopontin and p53 expression are associated with tumor progression in a case of synchronous, bilateral, invasive mammary carcinomas.** Arch Pathol Lab Med. 1997 Jun;121(6):578-84
- Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, Yamamoto S, Yasui W, Ishikawa T, Tahara E. **Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer.** Int J Cancer. 1998 Apr 17;79(2):127-32.
- Vielba R, Bilbao J, Ispizua A, Zabalza I, Alfaro J, Rezola R, Moreno E, Elorriaga J, Alonso I, Baroja A, de la Hoz C. **p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx.** Laryngoscope. 2003 Jan;113(1):167-72
-

- 
- Vora HH, Shah NG, Patel DD, Trivedi TI, Chikhlikar PR. **Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis.** J Surg Oncol. 2003 Jan;82(1):34-50
- Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. **Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution.** Carcinogenesis. 1998 Feb;19(2):275-80.
- Weber GF, Ashkar S, Cantor H. **Interaction between CD44 and osteopontin as a potential basis for metastasis formation.** Proc Assoc Am Physicians. 1997 Jan;109(1):1-9
- Weber GF, Cantor H. **The immunology of Eta-1/osteopontin.** Cytokine Growth Factor Rev. 1996 Oct;7(3):241-8
- Weber GF. **The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy.** Biochim Biophys Acta. 2001 Dec 28;1552(2):61-85
- Wu M, Putti TC, Bhuiya TA. **Comparative study in the expression of p53, EGFR, TGF-alpha, and cyclin D1 in verrucous carcinoma, verrucous hyperplasia, and squamous cell carcinoma of head and neck region.** Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2002 Dec;10(4):351-6.
-

---

Wuthrich RP. **The complex role of osteopontin in renal disease.** Nephrol Dial Transplant. 1998 Oct;13(10):2448-50

www.fosp.saude.sp.gov.br; consultado em abril de 2008

Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. **Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion.** J Biol Chem. 1998 Feb 6;273(6):3517-27.

Yen TC, Lin WY, Kao CH, Cheng KY, Wang SJ. **A study of a new tumour marker, CYFRA 21-1, in squamous cell carcinoma of the head and neck, and comparison with squamous cell carcinoma antigen.** Clin Otolaryngol. 1998 Feb;23(1):82-6

Yu JJ, Lee KB, Mu C, Li Q, Abernathy TV, Bostick-Bruton F, Reed E. **Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene.** Int J Oncol. 2000 Mar;16(3):555-60.

Yu JJ, Mu C, Lee KB, Okamoto A, Reed EL, Bostick-Bruton F, Mitchell KC, Reed E. **A nucleotide polymorphism in ERCC1 in human ovarian cancer cell lines and tumor tissues.** Mutat Res. 1997 Sep;382(1-2):13-20.

---

Zhang LY, Ying WT, Mao YS, He HZ, Liu Y, Wang HX, Liu F, Wang K, Zhang DC, Wang Y, Wu M, Qian XH, Zhao XH. **Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches.** World J Gastroenterol. 2003 Apr;9(4):650-4

Zhou W, Gurubhagavatula S, Liu G, Park S, Neuberg DS, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC. **Excision repair cross-complementation group 1 polymorphism predicts overall survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy.** Clin Cancer Res. 2004 Aug 1;10(15):4939-43.

---



**ANEXOS**





## **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27.07.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 487/06, intitulado: **"Marcadores séricos e polimorfismos prognósticos no carcinoma epidermóide da cabeça e pescoço"** apresentado pelo Departamento de Radiologia, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Dr(a): Mirian Hatsue Honda Federico

Pesquisador (a) Executante: Sr(a): Karen Cristina de Sant'Anna Brunialti

CAPPesq, 27 de Julho de 2006.

**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa

1       **Plasma Osteopontin in Head and Neck Cancer Patients**  
2       **Submitted to Chemoradiotherapy**

3  
4       Igor Snitcovsky, MD<sup>1</sup>; Glauber Moreira Leitão, MD<sup>1</sup>; Fátima Solange  
5       Pasini, PhD<sup>1</sup>; Karen Cristina Sant'Anna Brunialti, BS<sup>1</sup>; Flavia Regina  
6       Rotea Mangone, PhD<sup>1</sup>; Simone Maistro, PhD<sup>1</sup>; Gilberto de Castro Jr,  
7       MD<sup>2</sup>; Rosangela Correia Villar, MD<sup>3</sup>; Miriam Hatsue Honda Federico, MD,  
8       PhD<sup>1</sup>.

9  
10       **Author Affiliations:**

11       <sup>1</sup>Departamento de Radiologia e Cancerologia, Disciplina de Oncologia,  
12       Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM24), Av. Dr.  
13       Arnaldo, 455 sala 4123, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brasil.

14       <sup>2</sup>Departamento de Oncologia Clínica, INRAD, Hospital das Clínicas da  
15       Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

16       <sup>3</sup>Departamento de Radioterapia, INRAD, Hospital das Clínicas da  
17       Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

---



26        **ABSTRACT**

27

28        **Background:** Osteopontin (OPN), a phosphoglycoprotein with adhesive  
29        properties, has been proposed as a prognostic factor in several  
30        malignancies. **Objectives:** The aim of this study was to explore the  
31        prognostic role of plasma OPN levels in head and neck squamous cell  
32        carcinoma (HNSCC) patients submitted to concomitant  
33        chemoradiotherapy. **Design:** Prospective analysis of plasma OPN levels,  
34        before and within 12 weeks after treatment, was done in a cohort of  
35        HNSCC patients submitted to platinum based chemoradiotherapy at our  
36        center. **Setting:** Academic center. **Patients and methods:** OPN was  
37        assessed in the plasma of 69 patients with a diagnosis of HNSCC, before  
38        the start and after chemoradiotherapy, using a commercially available  
39        ELISA kit (IBL, Japan). Chemoradiotherapy was either exclusive (n=52)  
40        or adjuvant to surgery. OPN levels were correlated with  
41        clinocopathological characteristics, response to treatment and overall  
42        survival. **Results:** Plasma OPN levels, assessed before treatment, were  
43        higher in patients with advanced T and N stages, as compared to early  
44        stages (  $P=.009$  and  $.07$ , respectively). OPN plasma values (ng/mL,  
45        mean  $\pm$  SD) did not differ, as assessed before ( $102.5 \pm 68.1$ ) or after  
46        treatment ( $104.0 \pm 53.6$ ;  $P = .18$ , paired  $t$  test). OPN levels, as measured  
47        either before or after treatment , were lower in those patients who  
48        achieved a complete response, as compared to non responding patients:  
49         $75.0 \pm 41.5$  vs  $131.2 \pm 82.9$  ( $P= .005$ ) and  $86.8 \pm 40.5$  vs  $141.6 \pm 58.4$

---

50 (P= .004), respectively. Patients with high pre treatment OPN , above  
51 82.1, had shorter survival ( $P < .001$ ). Post treatment OPN was marginally  
52 ( $P = .10$ ) associated with survival at univariate analysis. **Conclusions:** In  
53 HNSCC patients submitted to chemoradiotherapy, low pre treatment  
54 plasma OPN was associated with treatment response and better survival.  
55 OPN modulation by chemoradiotherapy may also be associated with  
56 outcome. Further studies with serial OPN measurements are warranted in  
57 these patients.

---

58           **INTRODUCTION**

59

60           Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), a common  
61 cancer in the developing world, usually presents with advanced disease  
62 with resulting poor survival rates.<sup>1</sup> In this group of patients, concomitant  
63 chemoradiotherapy with high dose platinum is thought to confer a five to  
64 eight percent five year survival benefit, as compared to radiotherapy  
65 alone.<sup>2-5</sup> For this reason, concomitant chemoradiotherapy has been  
66 increasingly used in the routine treatment of these high risk subgroups of  
67 HNSCC patients, both as an exclusive treatment modality or as an  
68 adjuvant to surgery. However, several investigators, including ourselves,  
69 have observed a marked toxicity with these aggressive regimens and  
70 discussed on the need of candidate markers for appropriate patient  
71 selection.<sup>2,6</sup>

72           One such marker is Osteopontin (OPN), a secreted  
73 phosphoglycoprotein that binds  $\alpha\beta3$  integrins and some CD44 isoforms.<sup>7</sup>  
74 Though the molecular mechanisms are not entirely clear, OPN action in  
75 carcinogenesis and metastasis formation seems to occur through changes  
76 in cell migration, angiogenesis and apoptosis.<sup>8</sup> In tumors such as breast,  
77 prostate and stomach, OPN was described in the tumor tissue and in the  
78 body fluids, and higher expression associated with poor prognosis.<sup>9-12</sup>

79           In head and neck cancer, OPN expression, as assessed by  
80 immunohistochemistry, was progressively higher from normal tissue to  
81 epithelial hyperplasia, dysplasia and carcinoma in situ,<sup>13</sup> suggesting its  
82 role in the carcinogenetic process. In tongue squamous cell carcinoma,

---

83 immunohistochemical expression of OPN was also described as  
84 associated with aggressive features of T1 and T2 tumors.<sup>14</sup>

85 Plasma OPN expression was described as an independent marker  
86 of shorter survival in a cohort of 140 HNSCC patients submitted to various  
87 treatment modalities.<sup>15</sup> In a small series of Japanese HNSCC patients,  
88 higher serum OPN levels were associated with advanced stage tumors.<sup>16</sup>  
89 In the only published study on the interaction of OPN expression and  
90 response to a radiosensitizer, high OPN expression seemed to select for  
91 patients who benefited from treatment.<sup>17</sup>

92 For these reasons, the aim of this study was to explore the  
93 prognostic role of plasma OPN levels in head and neck squamous cell  
94 carcinoma (HNSCC) patients submitted to concomitant  
95 chemoradiotherapy.

---

96 **PATIENTS AND METHODS**

97 STUDY POPULATION

98

99 Criteria for patients participating in the study included: (a)  
100 histologically confirmed HNSCC (b) no prior radiation or chemotherapy  
101 treatment (c) indication, by the treating surgeon, for chemoradiotherapy,  
102 either as an exclusive treatment or as an adjuvant after surgery. Exclusive  
103 chemoradiotherapy was indicated in patients with unresectable or  
104 medically inoperable tumors. Unresectability criteria included invasion of  
105 the base of skull, prevertebral fascia, cervical spine or carotid artery.  
106 Adjuvant chemoradiotherapy was indicated in patient whose resected  
107 tumors presented any high risk feature, defined as more than two  
108 compromised lymph nodes, extracapsular extension in compromised  
109 lymph nodes and close or microscopically compromised tumor margins.  
110 (d) willing to sign an informed consent approved by the institutional review  
111 board of our institution, in accordance with the guidelines of good clinical  
112 practices and the Brazilian law. Between January 2005 and December  
113 2006, sixty nine patients who fit the above criteria were enrolled in the  
114 study, conducted at the Hospital das Clínicas da USP, in Brazil. Tumor  
115 staging was performed according to the 1998 American Joint Committee  
116 on Cancer system and treatment followed the routine guidelines of our  
117 institution. The intended treatment included radiotherapy 70 or 60-66Gy  
118 for exclusive or adjuvant purposes, respectively, in daily 2 Gy fractions  
119 and chemotherapy (cisplatin 100mg/m<sup>2</sup>), concomitant with radiotherapy,

---

120 on days 1, 21 and 43. Treatment response evaluation was performed  
121 within 4 weeks of treatment completion. A complete tumor response was  
122 defined as no tumor detection by clinical and imaging studies. Overall  
123 survival was defined as the interval between the start of  
124 chemoradiotherapy and death, with the last follow-up in February 2008.

125

### 126 SAMPLE COLLECTION AND OSTEOPONTIN PLASMA ASSAY

127

128 Blood samples were collected before the start of  
129 chemoradiotherapy (n=69) and within 12 weeks of treatment completion  
130 (n=46). Blood aliquots were withdrawn into tubes with EDTA  
131 anticoagulant, kept at 4°C for a maximum of 16 hours and subsequently  
132 centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes. The resulting plasma was  
133 divided into aliquots and stored at -70° C. Osteopontin levels were  
134 determined by a commercially available ELISA assay kit (IBL, Japan),  
135 following the manufacturer's instructions. Samples were tested in  
136 duplicate, and the results determined by a standard curve, which was built  
137 using the human OPN control supplied by the kit.

138

### 139 STATISTICAL ANALYSIS

140

141 ANOVA was used to test for differences in OPN across the various  
142 clinicopathological categories. A paired *t* test was used to determine the

---

143       significance of differences of pre and post treatment OPN levels. Linear  
144       regression and chi square tests were used when appropriate.

145               To test for factors associated with tumor response and survival,  
146       patients were categorized as OPN negative or positive, according to the  
147       median value. Survival analysis was performed by Kaplan Meier method  
148       and differences between groups were assessed by the log-rank test. A *P*  
149       value less than .05 was considered significant. All analysis were  
150       performed by using SSPS 10.0 software.

---

151       **RESULTS**

152

153               STUDY POPULATION

154               ***A total of 69 patients were included in this study. The***  
155               ***great majority were male, with a median age of 57 years,***  
156               ***and a history of tobacco and alcohol consumption. Mild***  
157               ***anemia was present in most patients. Hystopathological***  
158               ***analysis confirmed the diagnosis of squamous cell***  
159               ***carcinoma in all patients, the majority with a moderately***  
160               ***differentiated grade. The most commonly affected site was***  
161               ***the larynx, followed by the oral cavity and oropharynx. The***  
162               ***most frequent T and N stages were T4 and N2,***  
163               ***respectively. 52 patients were treated exclusively with***  
164               ***chemoradiotherapy and the remaining with surgery***  
165               ***followed by adjuvant chemoradiotherapy. Median radiation***  
166               ***and cisplatin doses were 70Gy and 260 mg/m<sup>2</sup>,***  
167               ***respectively, delivered in a median of 58 days (range : 49-***  
168               ***90 days) (Table 1).***

169

170               **OSTEOPONTIN AND**

171               **CLINICOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS**

172               The plasma OPN concentration (ng/mL) in the group as a whole (n  
173               = 69) before the start of chemoradiotherapy was: 102.5 ± 68.1 (mean  
174               ±SD), 82.1(median) and 3.9-333.8 (range). Correspondent post treatment  
175               values (n= 46) were: 104.0 ± 53.6, 92.9 and 19.4-247.8. No difference  
176               was found between OPN values before and after treatment (P = .18,  
177               paired t- test) or between the subgroups submitted to exclusive or  
178               adjuvant chemoradiotherapy. When measured in a individual patient level,

---



179 the magnitude of the difference between post and pre treatment OPN  
180 levels (ng/mL) varied widely, from minus 157.7 to plus 128.6, with a  
181 median of plus 11.7.

182 Concerning clinical pathological parameters, OPN levels were  
183 higher in patients with advanced T and N stages, as compared to earlier  
184 stages, *P* values of .009 and .07 (ANOVA), respectively. Undifferentiated  
185 tumors were associated with numerically higher, although not statistically  
186 different, values of OPN. Tumor site seemed not to influence OPN levels,  
187 although hypopharynx tumor patients presented numerically higher OPN  
188 levels (Table 2). Hemoglobin levels, which presumably influence the  
189 degree of tumor hypoxia, were inversely correlated with OPN levels ( $R = -$   
190  $0.387$ ;  $P = .04$ ).

191

### 192 OSTEOPONTIN VARIATION AND TUMOR RESPONSE

193 Out of the 52 patients submitted to exclusive chemoradiotherapy,  
194 22 (42.3%) had a complete response and 30 were classified as treatment  
195 failures. The latter were subclassified as: progressive disease 11 (  
196 21.2%), stable disease 3 (5.8%) and partial response 16 (30.8 %). Mean  
197 plasma OPN levels, as measured either before or after treatment , were  
198 lower in those patients who achieved a complete response, as compared  
199 to non responding patients:  $75.0 \pm 41.5$  vs  $131.2 \pm 82.9$  ( $P = .005$ ) and  
200  $86.8 \pm 40.5$  vs  $141.6 \pm 58.4$  ( $P = .004$ ), respectively (Figure 1).

201 In the subgroup of patients submitted to exclusive  
202 chemoradiotherapy who had a complete response and both pre and post

---

203 treatment OPN measurements available (n=17/22), the paired OPN  
204 values did not differ:  $70.1 \pm 44.2$  vs  $86.8 \pm 40.5$ , respectively ( $P=.14$ ),  
205 although, numerically, the OPN levels decreased in 7 patients and  
206 increased in 10 patients.

207 Factors associated with complete response, as determined by chi  
208 square test, included T status ( $P = .007$ ), N status ( $P = .002$ ), pre  
209 chemoradiotherapy OPN, categorized by the median value 82.1 ng/ml ( $P$   
210 = .007), post chemoradiotherapy OPN, categorized by the median value  
211 92.9 ng/ml ( $P = .016$ ), tumor site, categorized as oral cavity vs others ( $P =$   
212 .018) but not radiotherapy and chemotherapy dose or treatment duration.

213

### 214 OSTEOPONTIN AND SURVIVAL

215 After a median follow up of 23.5 months (range 8.0 – 37.0) for living  
216 patients, 30 of 69 patients had died. In univariate analysis, the log rank-  
217 test showed that T stage, N stage and tumor site were predictive of  
218 overall survival, with  $P$  values of .014, .007 and .001, respectively.  
219 Positivity for OPN, defined as pre chemoradiotherapy plasma OPN above  
220 median value (82.1 ng/ml) of the whole group, was a negative predictor  
221 of overall survival at univariate analysis with 9.3 month median survival  
222 versus not reached for the negative OPN patients ( $P < .001$ , log-rank  
223 test), with a total of 22/35 and 8/34 deaths, respectively. Post  
224 chemoradiotherapy OPN, categorized by the median value (92.9 ng/ml)  
225 was marginally predictive of survival by the log-rank test ( $P = .10$ )  
226 (Figure2 ).

---

227

## DISCUSSION

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

In the present study, we evaluated OPN levels in the plasma of HNSCC patients before the start and after the completion of chemoradiotherapy. We did not find any statistically significant difference between the paired values and no association between response and OPN changes in an individual patient level, perhaps due to the wide range of values, small sample size, and evaluation in only two time points. Based on the hypothesis that serial measurements would possibly be more informative, only two studies have previously evaluated changes in plasma OPN levels over time. The first one reported data in metastatic breast cancer patients, and showed that increases in plasma OPN over time were strongly associated with a poor survival,<sup>9</sup> in contrast, a multiple myeloma study did not find any association.<sup>18</sup>

240

241

242

243

244

245

246

In our study, we have found higher pre treatment plasma OPN levels in patients with advanced T and N stages, as compared to early stages, which is in agreement with previous published data in tongue cancer,<sup>14</sup> and in a cohort of 37 patients with larynx and hypopharynx tumors.<sup>16</sup> In these studies OPN was assessed by immunohistochemistry and in the patient's sera, respectively, and higher values were also associated with high risk pathological features.

247

248

249

250

Here we show that high pre treatment plasma OPN was associated with a lack of response to chemoradiotherapy, which agrees with the results from another study, in which patients were treated with exclusive radiotherapy.<sup>17</sup> Interestingly, in our patients, we found that OPN and

---

251 hemoglobin levels were inversely correlated, which is in agreement with  
252 previous works, reinforcing the link between osteopontin and tissue  
253 hypoxia.<sup>17,19-20</sup> In addition, lower post treatment OPN was also associated  
254 with a complete tumor response, suggesting a link between tumor bulk  
255 and plasma OPN levels.

256 We were surprised, however, to find that OPN levels did not  
257 decrease in the small subgroup of responding patients who had both pre  
258 and post treatment measurements. A possibility is that tumor destruction  
259 could cause a transient increase in plasma OPN, liberated by dying cells  
260 or tumor stroma. Since the timing of our post treatment collection differed  
261 among patients, serial post treatment OPN measurements would be  
262 useful to clarify the issue, as previously shown in breast cancer and  
263 multiple myeloma<sup>9,18</sup>. Another possibility is the existence of residual  
264 disease in some complete responders, as determined by conventional  
265 methods. In this situation, survival analysis may be a better indicator of  
266 treatment result.

267 In terms of survival, low pre-treatment OPN (below the  
268 median 82.1 ng/mL) was associated, in univariate analysis, with a  
269 better overall survival. This is in agreement with previous data on  
270 HNSCC patients submitted to different treatment modalities.<sup>15,19</sup>  
271 Interestingly, positivity for post treatment OPN, (with patients  
272 categorized by the median 92.9 ng/mL), was only a marginally  
273 significant predictor of survival at univariate analysis, perhaps

---

274 related to a reduced tumor mass, but taking in consideration the  
275 confounding factors discussed above.

276 There are limitations of our study that warrant some comments.  
277 Distinct commercially available ELISA kits yield different OPN values,  
278 which make it difficult to compare studies and define clinically useful cut-  
279 off values.<sup>21</sup> In this regard, our absolute values are similar to the ones  
280 reported in the only study employing the same kit in HNSCC patients.<sup>16</sup>  
281 Although patients with missing OPN values did not differ from the whole  
282 group, regarding T/ N stage and tumor site (not shown), missing values  
283 could bias our results.

284 In summary, in this group of high risk HNSCC patients, low pre  
285 treatment plasma OPN levels were associated with tumor response and  
286 better survival. In addition, OPN modulation by chemoradiotherapy may  
287 also be associated with outcome. Thus, further work with serial  
288 measurements may be warranted in these patients.

---

289       **REFERENCES**

290

291       Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.*  
292       2006;56:106-30.

293       Adelstein DJ, Yi L, Adams GL et al. An intergroup phase III comparison of  
294       standard radiation therapy and two schedules of concurrent  
295       chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and  
296       neck cancer. *J Clin Onco.* 2003;21:92-98.

297       Bernier J, Dometge C, Ozsahin M, et al. Postoperative irradiation with or  
298       without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck  
299       cancer. *N Engl J Med.* 2004;350:1945-52.

300       Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, et al. Postoperative concurrent  
301       radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of  
302       the head and neck. *N Engl J Med.* 2004;350:1937-44.

303       Bourhis J, Le Maître A, Baujat B, et al. Individual patients' data meta-  
304       analyses in head and neck cancer. *Curr Opin Oncol.* 2007;19:188-94.

305       de Castro G Jr, Snitcovsky IM, Gebrim EM et al. High-dose cisplatin  
306       concurrent to conventionally delivered radiotherapy is associated with  
307       unacceptable toxicity in unresectable, non-metastatic stage IV head and  
308       neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*  
309       2007;264:1475-82.

310       Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, et al. CD44 variants but not CD44s  
311       cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to

---

312 osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby  
313 stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res.* 1999;59:219-26.

314 Chakraborty G, Jain S, Behera R, et al. The multifaceted roles of  
315 osteopontin in cell signaling, tumor progression and angiogenesis. *Curr*  
316 *Mol Med.* 2006;6:819-30.

317 Bramwell VH, Doig GS, Tuck AB, et al. Serial plasma osteopontin levels  
318 have prognostic value in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.*  
319 2006;12:3337-43.

320 Wang X, Chao L, Ma G, et al. Increased expression of osteopontin in  
321 patients with triple-negative breast cancer. *Eur J Clin Invest.* 2008;38:438-  
322 46.

323 Vergis R, Corbishley CM, Norman AR, et al. Intrinsic markers of tumour  
324 hypoxia and angiogenesis in localised prostate cancer and outcome of  
325 radical treatment: a retrospective analysis of two randomized radiotherapy  
326 trials and one surgical cohort study. *Lancet Oncol.* 2008;9:342-51.

327 Wu CY, Wu MS, Chiang EP, et al. Elevated plasma osteopontin  
328 associated with gastric cancer development, invasion and survival. *Gut.*  
329 2007;56:782-9.

330 Devoll RE, Li W, Woods KV, et al. Osteopontin (OPN) distribution in  
331 premalignant and malignant lesions of oral epithelium and expression in  
332 cell lines derived from squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral*  
333 *Pathol Med.* 1999;28:97-101.

334 Chien CY, Su CY, Chuang HC et. al. Clinical significance of osteopontin  
335 expression in T1 and T2 tongue cancers. *Head Neck.* 2008;30:776-81.

---

- 336 Petrik D, Lavori PW, Cao H, et al. Plasma Osteopontin Is an Independent  
337 Prognostic Marker for Head and Neck Cancers. *J Clin Oncol.*  
338 2006;24:5291-5297.
- 339 Eto M, Kodama S, Nomi N, Uemura N, Suzuki M. Clinical significance of  
340 elevated osteopontin levels in head and neck cancer patients. *Auris*  
341 *Nasus Larynx.* 2007;34:343-17. Overgaard J, Eriksen JG, Nordsmark M,  
342 et al. Plasma osteopontin, hypoxia, and response to the hypoxia  
343 sensitizer nimorazole in radiotherapy of head and neck cancer: results  
344 from the DAHANCA 5 randomised double-blind placebo-controlled trial.  
345 *Lancet Oncol.* 2005;6:757-64.
- 346 Kang SY, Lee JJ, Lee WI. Clinical significance of serum osteopontin in  
347 patients with multiple myeloma. *Korean J Lab Med.* 2007;27:400-5.
- 348 Bache M, Reddemann R, Said HM, et al. Immunohistochemical detection  
349 of osteopontin in advanced head-and-neck cancer: prognostic role and  
350 correlation with oxygen electrode measurements, hypoxia-inducible-factor-  
351 1alpha-related markers, and hemoglobin levels. *Int J Radiat Oncol Biol*  
352 *Phys.* 2006;66:1481-7.
- 353 Nordsmark M, Overgaard J. Tumor hypoxia is independent of hemoglobin  
354 and prognostic for loco-regional tumor control after primary radiotherapy  
355 in advanced head and neck cancer. *Acta Oncol.* 2004;43:396–403.
- 356 Vordermark D, Said HM, Katzer A, et al. Plasma osteopontina levels in  
357 patients with head and neck cancer and cervix cancer are critically  
358 dependent of ELISA system. *BMC Cancer.* 2006;6:207-19.
-



359 **FIGURE LEGENDS**

360

361

362

363

364 Figure 1 Plasma OPN levels in ng/ml, before (A) or after (B)  
365 chemoradiotherapy, according to response status: complete response  
366 (Yes) and not a complete response (No).

367 Figure 2 Overall survival curves of patients with head and neck squamous  
368 cell carcinoma submitted to chemoradiotherapy, according to plasma  
369 osteopontin Patients were categorized as OPN positive or negative,  
370 according to values above or equal/ below the median (ng/ml),  
371 respectively. (A) pre treatment (median 82.1) or (B) post treatment  
372 (median 92.9).

<b>Table 1. HNSCC Patients and Tumor Characteristics</b>	
<b>Variable</b>	<b>N=69 (%)</b>
<b>Median Age (range)</b>	57 years (29-76)
<b>Gender</b>	
Male	64 (92.7)
Female	5 (7.3)
<b>Median Hemoglobin (range)</b>	12.8 g/dL (9.0-15.9)
<b>Habits</b>	
Tobacco	63 (91.3)
Alcohol	50 (72.4)
<b>Primary tumor site</b>	
Oral cavity	19 (29.6)
Oropharynx	19 (29.6)
Hypopharynx	6 (8.6)
Larynx	23 (33.3)
Other	2 (2.8)
<b>Differentiation grade</b>	
well	19 (29.6)
moderately	33 (47.8)
poorly	8 (11.5)
Unknown	9 (13.0)
<b>T stage</b>	
T1	1 (1.4)
T2	10 (14.4)
T3	12 (17.3)
T4	45 (65.2)
Tx	1 (1.4)
<b>N stage</b>	
N0	16 (23.1)
N1	8 (11.5)
N2	28 (40.5)
N3	17 (24.6)

**Table 2. Plasma Osteopontin Levels and Clinicopathological Variables from HNSCC Patients**

<b>Variable</b>	<b>No. of patients</b>	<b>Osteopontin (ng/ml) mean±SD</b>	<b>P value</b>
<b>T stage</b>			
T1+ T2	11	60.6 ± 23.5	.009
T3	14	80.2 ± 50.5	
T4	43	121.9 ± 74.2	
Tx	1	---	
<b>N stage</b>			
N0 + N1	24	79.0 ± 43.2	.07
N2	28	108.1 ± 69.6	
N3	17	127.2± 86.2	
<b>Differentiation grade</b>			
well	19	97.4 ± 75.3	.77
moderately	33	102.5 ± 62.7	
poorly	8	118.8 ± 95.2	
unknown	9	---	
<b>Tumor site</b>			
Oropharynx	19	115.0 ± 82.9	.18
Larynx	23	84.5 ± 43.3	
Oral cavity	19	100.5 ± 64.4	
Hypopharynx	6	152.6 ± 96.3	
Other	2	60.5 ± 29.6	
<b>Type of treatment</b>			
Exclusive	52	107.5 ± 73.5	.29
Adjuvant	17	87.4 ±46.9	

Abbreviation: HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma.