Gilberto de Castro Junior

**Expressão da proteína ERCC1 (*Excision Repair Cross
Complementing Group 1*), do seu RNA mensageiro e de
polimorfismos genéticos como fatores prognósticos
em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de
cabeça e pescoço operados e submetidos à
quimiorradioterapia adjuvante**

**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

Castro Junior, Gilberto

Expressão da proteína ERCC1 (Excision Repair Cross Complementing Group 1), do seu RNA mensageiro e de polimorfismos genéticos como fatores prognósticos em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço operados e submetidos à quimioterapia adjuvante / Gilberto Castro Junior. -- 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.Neoplasias de cabeça e pescoço/quimioterapia 2.Neoplasias de cabeça e pescoço/radioterapia 3.Carcinoma de células escamosas/terapia 4.Neoplasias de cabeça e pescoço/patologia 5.Cisplatino/farmacologia 6.Reparo do DNA/genética 7.Prognóstico 8.Seguimentos

USP/FM/SBD-386/09

À minha família, pelo constante apoio

ao longo da vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Miriam Hatsue Honda Federico, Professora Associada da Disciplina de Oncologia do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), minha orientadora neste trabalho. Nestes últimos 12 anos de intenso contato, tem sido para mim exemplo de dedicação ao trabalho.

Ao Dr. Igor Moysés Longo Snitcovsky, Médico do Laboratório de Oncologia Experimental (LIM-24) do Hospital das Clínicas da FMUSP, por tudo que tem me ensinado desde 1992, quando tivemos contato pela primeira vez. Inteligência marcante e espírito crítico exemplares.

À Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira, Diretora Técnica de Serviço da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP, pelo estudo imunohistoquímico deste trabalho.

À Dra. Fátima Solange Pasini, Técnica Especialista Superior do Laboratório de Oncologia Experimental (LIM-24) do Hospital das Clínicas da FMUSP, pelas análises de Biologia Molecular deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alberto Rossetti Ferraz, Professor Titular da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMUSP e a todo o Corpo Clínico do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da FMUSP, pela possibilidade de integração no cuidado multidisciplinar aos pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço.

À Dra. Rosângela Corrêa Villar, Médica Assistente do Serviço de Radioterapia do Hospital das Clínicas da FMUSP, e a toda equipe deste Serviço, pelo trabalho

conjunto que temos desenvolvido nestes últimos anos no tratamento multidisciplinar dos pacientes acometidos por câncer de cabeça e pescoço.

Ao Prof. Dr. Paulo Marcelo Gehm Hoff, Professor Titular da Disciplina de Oncologia da FMUSP, pelo exemplo como Pesquisador de altíssimo nível e por possibilitar continuarmos todo o trabalho na área de câncer de cabeça e pescoço no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, Professor Titular da Disciplina de Oncologia da FMUSP, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Oncologia da FMUSP, pelo apoio nesta Pós-Graduação. Cientista exemplar.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira, Professora Associada da Disciplina de Oncologia da FMUSP, querida amiga, por todas as agradáveis discussões que tivemos ao longo destes anos.

À Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani, Professora Associada da Disciplina de Oncologia da FMUSP, pelo apoio a este trabalho e pelo exemplo como Pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Max Senna Mano, Professor Doutor da Disciplina de Oncologia da FMUSP, pelos comentários e sugestões ao longo deste trabalho.

Ao Corpo Clínico do Serviço de Oncologia Clínica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, e em especial àqueles envolvidos no cuidado ao paciente portador de câncer de cabeça e pescoço, pelo agradável convívio e pelas discussões cotidianas.

Ao Dr. Roberto Jun Arai, Coordenador de Projetos da área de Pesquisa Clínica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, pelo agradável trabalho ao longo destes anos e, principalmente, pela amizade.

Aos colegas da Pós-Graduação Karen Cristina de Sant'Anna Brunialti e Bruno Ferenc Papp Cadima, pela ajuda nos estudos de Biologia Molecular.

À Dra. Júlia Fukushima, pelo auxílio nas análises estatísticas.

A todos os Médicos Residentes que tenho e tive a honra de conviver desde o início da Residência em Oncologia Clínica no Hospital das Clínicas da FMUSP e agora no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo: Cleber, Kelly, Marcelo, Patrícia, Vanessa, Andréa, Daniella, Paulo, Gustavo, Antônio Barcellos, Caio, Otávio, André, Daniel, Lin, Cléber, Suilane, Eduardo, Ciro, Leandro, Williams, Antônio Cavaleiro, Guilherme, Vinícius, Alessandro, Daniela, Karime, Rodrigo Bovolín, Milena, Laura, Tiago e Rodrigo Guindalini, pelo auxílio no cuidado com os pacientes, pelas discussões, pela troca de conhecimento e pela amizade.

Ao Dr. Helano Carioca Freitas, em especial, e aos demais colegas da Pós-Graduação *stricto sensu* em Oncologia da FMUSP, pela amizade e pelas discussões sempre muito interessantes.

A todos os amigos da área de Pesquisa Clínica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, e em especial à Sra. Marlene Pereira e à Sra. Luciene Cardoso, pelo apoio nos aspectos regulatórios deste estudo.

À Sra. Elizângela Dias, secretária do Departamento de Radiologia da FMUSP, pelo apoio constante na realização deste trabalho.

A todos os funcionários do Laboratório de Oncologia Experimental da FMUSP (LIM 24).

Ao serviço de Biblioteca e Documentação da FMUSP.

Às secretárias Maria José e Rosilene, pelo apoio.

E por fim, a todos os pacientes e respectivas famílias, que confiaram e confiam em mim durante o seu tratamento oncológico.

"Le surnaturel baisse comme un lac q'un canal épuise ;
la science à tout moment recule les limites du merveilleux"

(Guy de Maupassant, 1884)

Esta tese está de acordo com:

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 Anneliese 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.

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

Nomenclatura de medicamentos: de acordo com as *Denominações Comuns Brasileiras 2009*. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 38/2009. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF). 2009 08 jul

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de símbolos

Lista de siglas e abreviaturas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Epidemiologia.....	01
1.2. Tratamento adjuvante do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço operado.....	03
1.3. Radioresistência e falha do tratamento do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	07
1.4. Cisplatina: estrutura e mecanismo de ação.....	11
1.5. Mecanismos de reparo do DNA	13
1.6. ERCC1 (<i>Excision Repair Cross-Complementing Group 1</i>).....	18
1.7. Polimorfismos de nucleotídeo único.....	25
1.8. Racional para o estudo: o papel dual de <i>ERCC1</i>	27
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivos	31
3. MÉTODOS.....	32
3.1. Desenho do estudo.....	33
3.2. Critérios de elegibilidade.....	33

3.3. Desfechos avaliados.....	34
3.4. Expressão imunohistoquímica da proteína ERCC1.....	35
3.4.1. Procedimento de imunohistoquímica.....	35
3.4.2. Análise microscópica.....	36
3.5. Extração de ácidos nucleicos.....	37
3.6. Expressão do RNA mensageiro de <i>ERCC1</i>	38
3.7. Determinação de polimorfismos de nucleotídeo único no códon 118 do gene <i>ERCC1</i> (polimorfismo rs11615:T19007C).....	41
3.8. Considerações estatísticas.....	42
3.9. Aspectos regulatórios.....	43
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Características dos pacientes.....	46
4.2. Características da neoplasia.....	46
4.3. Características do tratamento adjuvante.....	49
4.4. Desfechos observados.....	52
4.5. Prognóstico de acordo com variáveis de risco clínicas e anatomopatológicas.....	55
4.6. Prognóstico de acordo com características do tratamento administrado...	57
4.7. Expressão de ERCC1 por imunohistoquímica.....	57
4.8. Expressão do RNA mensageiro de <i>ERCC1</i>	62
4.9 Genotipagem do códon 118 de <i>ERCC1</i> (polimorfismo rs11615:T19007C).....	66
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÕES.....	80
7. REFERÊNCIAS.....	83

8. ANEXO.....	98
---------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cisplatina ou <i>cis</i> -Diaminodicloroplatinum (II).....	11
Figura 2	Ativação por aquação da cisplatina e reação com compostos nucleofílicos.....	12
Figura 3	Aductos DNA-platina.....	13
Figura 4	Reparo por excisão de base (BER).....	16
Figura 5	Reparo por excisão de nucleotídeo (NER).....	17
Figura 6	Via de reparo genômico global por excisão de nucleotídeos.....	20
Figura 7	Estrutura e domínios de ERCC1 e XPF.....	21
Figura 8	Representação do ensaio de PCR em tempo real para determinação da eficiência dos oligonucleotídeos para amplificação do mRNA de <i>ERCC1</i> e do RNA ribossomal 18S.....	44
Figura 9	Fluxograma mostrando o desfecho dos 69 pacientes incluídos neste estudo.....	53
Figura 10	Gráfico de sobrevida global e sobrevida livre de doença, dos 69 pacientes incluídos no estudo, de acordo com o método de Kaplan-Meier.....	54
Figura 11	Expressão imunohistoquímica de ERCC1.....	59
Figura 12	Histograma de distribuição dos escores H da expressão imunohistoquímica de ERCC1 em amostras de 59 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	59
Figura 13	Gráfico de sobrevida global e sobrevida livre de doença, dos 59 pacientes incluídos no estudo, estimadas pelo método de Kaplan-	

	Meier, de acordo com a expressão imunohistoquímica de ERCC1 (escore H).....	61
Figura 14	Gráfico de sobrevida global e sobrevida livre de doença, dos 45 pacientes incluídos no estudo, estimadas pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com a expressão normalizada do RNA mensageiro de <i>ERCC1</i>	65
Figura 15	Correlação de Spearman entre o escore H e a expressão do RNA mensageiro de <i>ERCC1</i> , em 44 pacientes.....	66
Figura 16	Foto do eletroforograma em gel de agarose 3% da análise dos produtos da reação em cadeia da polimerase – polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição do polimorfismo de <i>ERCC1</i> rs11615:T19007C (Asn118Asn), após digestão com <i>Bsr</i> DI.....	67
Figura 17	Gráfico de sobrevida global e sobrevida livre de doença, de 49 pacientes incluídos no estudo, estimadas pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com o genótipo rs11615:T19007C.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Níveis de risco dos pacientes portadores de CECCP tratados com cirurgia e radioterapia adjuvante.....	5
Tabela 2	Resultado dos estudos de quimiorradioterapia adjuvante baseada em cisplatina, em CECCP operados de alto risco tratados com cirurgia (radioterapia isolada vs. quimiorradioterapia).....	6
Tabela 3	Distribuição dos 69 pacientes de acordo com o sítio primário da neoplasia.....	48
Tabela 4	Distribuição dos pacientes de acordo com o estadiamento pTNM.....	49
Tabela 5	Distribuição dos pacientes de acordo com a presença de fatores prognósticos anatomopatológicos.....	51
Tabela 6	Descrição da radioterapia administrada aos 69 pacientes em relação ao tempo total deste tratamento.....	52
Tabela 7	Características clínicas e fatores de risco anatomopatológicos como variáveis prognósticas nos 69 pacientes estudados.....	56
Tabela 8	Distribuição das características dos 59 pacientes de acordo com a expressão de ERCC1 por imunohistoquímica (escore H).....	60
Tabela 9	Distribuição das características dos 45 pacientes de acordo com a expressão normalizada do mRNA de <i>ERCC1</i>	64
Tabela 10	Distribuição das características dos 59 pacientes de acordo com a genotipagem de <i>ERCC1</i>	69

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau centígrado
g	grama ou gravidade
Gy	Gray
HCl	ácido clorídrico
KCl	cloreto de potássio
M	molar
m ²	metro quadrado
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar
N	nitrogênio

ng	nanograma
nM	nanomolar
%	porcentagem
vol	volume

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AP	endonuclease apurínica/apirimidínica
AQUA	análise automática quantitativa
ARO	<i>Arbeitsgemeinschaft Radiologischer Onkologie</i>
BER	<i>base-excision repair</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CDDP	cisplatina
cDNA	DNA complementar
CEC	carcinoma epidermóide
CECCP	carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
CO	cavidade oral
C _t	ciclo do <i>Threshold</i>
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	desoxinucleotídeos-trifosfato

DTT	ditiothreitol
EEC	extravazamento extracapsular da doença nodal
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
ERCC1	<i>Excision Repair Cross Complementing Group 1</i>
EROs	espécies reativas de oxigênio
5-FU	fluoruracila
GGR	reparo genômico global
GST	glutathione-S-transferase
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HR	<i>harzard ratio</i>
IALT	<i>International Adjuvant Lung Trial</i>
IMRT	<i>Intensity modulated radiation therapy</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LN	linfonodo
LVI	invasão linfovascular
MACH-NC	<i>Meta-Analysis of Chemotherapy in Head and Neck Cancer</i>

MGMT	metilguanina DNA metiltransferase
MMR	<i>mismatch repair</i>
N.A.	não alcançada
NER	<i>nucleotide-excision repair</i>
NI	invasão perineural
$\text{OH}^\cdot$	radicais hidroxila livre
OF	orofaringe
PARP	poli-ADP-ribose polimerase
pb	pares de bases
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating-cell nuclear antigen</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
mRNA	RNA mensageiro
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RPA	proteína ligada ao DNA de fita única
RT-PCR tempo real	transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>

RT	Radioterapia
RTOG	<i>Radiation Therapy Oncology Group</i>
SGm	sobrevida global mediana
SLPm	sobrevida livre de doença mediana
TCR	reparo de DNA acoplado à transcrição gênica
TNM	<i>Tumor-Node-Metastasis</i>
vs.	<i>versus</i>
XPV	gene variante do xeroderma pigmentoso

Resumo

Resumo

Castro Junior G. *Expressão da proteína ERCC1 (Excision Repair Cross Complementing Group 1), do seu RNA mensageiro e de polimorfismos genéticos como fatores prognósticos em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço operados e submetidos à quimiorradioterapia adjuvante* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 99p.

INTRODUÇÃO: Quimiorradioterapia (QRT) concomitante adjuvante aumenta a sobrevida livre de doença (SLD) em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECCP) de alto risco operados com intenção curativa, porém está associada a toxicidade não desprezível e seu impacto na sobrevida global (SG) é incerto. ERCC1 (*Excision Repair Cross Complementing Group 1*) é uma proteína com função crítica no reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (NER) e está envolvido na resistência à quimio- e radioterapia. Neste trabalho tivemos como objetivos determinar a expressão da proteína ERCC1, a expressão do RNA mensageiro (mRNA) de *ERCC1* e a ocorrência do polimorfismo de nucleotídeo único T19007C de *ERCC1* em pacientes portadores de CECCP de alto risco, operados e tratados com QRT adjuvante, bem como o valor prognóstico destes marcadores. **MÉTODOS:** Trata-se de um estudo retrospectivo em pacientes portadores de CEC de cavidade oral, orofaringe, hipofaringe ou laringe, operados com intenção curativa e portadores de doença de risco alto ou intermediário. Pacientes elegíveis haviam sido tratados com QRT adjuvante: 60-70 Gy e cisplatina concomitante (100 mg/m², dias 1, 22 e 43), não apresentavam metástases a distância e nem sinais de recidiva após cirurgia. A expressão da proteína ERCC1 foi avaliada por imunohistoquímica, através de um escore H semi-quantitativo, obtido pelo produto da intensidade da coloração nuclear (0-3) pelo escore proporcional atribuído à porcentagem estimada de núcleos corados (0;0,1;0,5;1). O método da transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real quantitativo foi utilizado para determinação da expressão do mRNA de ERCC1 em tecido de tumor primário, normalizada em

relação à expressão da fração 18S do RNA ribossomal. Genotipagem de *ERCC1* (códon 118) foi realizada por PCR - polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição a partir de DNA genômico extraído de linfonodos normais destes pacientes, após digestão com *BsrDI*. RESULTADOS: 69 pacientes com idade mediana de 56a, sendo 81% homens, foram estudados. Em relação à neoplasia, os sítios primários observados foram: cavidade oral (41%), laringe (32%), hipofaringe (16%) e orofaringe (12%), com estadios III 14% e estadios IV 86%, sendo pT3-pT4 78% e pN2-pN3 58%. Quarenta e três pacientes apresentaram-se com pelo menos dois linfonodos positivos, 27 com extravasamento extracapsular da metástase linfonodal e 18 com margens positivas. Achados de alto risco foram detectados em 40 pacientes (58%). No seguimento mediano de 47 meses, observou-se 11 recidivas loco-regionais, sete recidivas a distância, 10 casos com segundo tumor primário (sendo quatro com primário em pulmão e quatro em esôfago) e 30 óbitos (22 pela doença). A taxa de SG em 5 anos foi 40% e a taxa de SLD em 5 anos foi 31%. Escore H superior a 1,5 foi encontrado em 32 pacientes (54%), os quais apresentaram melhor taxa de sobrevida global em 5 anos (50% *versus* 18%, HR 0,43, 95%CI 0,20-0,90, $p=0,026$). Quinze pacientes (33%), dos 45 analisados, apresentaram elevada expressão do mRNA de *ERCC1* ($> 3,1$) e estes pacientes tiveram melhor taxa de sobrevida global em 5 anos em comparação com aqueles com baixa expressão (86% *versus* 31%, HR 0,26, 95%CI 0,14-1,01, $p=0,052$). A distribuição dos genótipos de *ERCC1* no códon 118 em 49 pacientes foi 39% C/T, 37% C/C, e 24% T/T. Não foi encontrada associação significativa entre idade, sexo, estadiamento e achados anatomopatológicos de risco, e os polimorfismos genéticos no códon 118 de *ERCC1* ou a expressão do mRNA de *ERCC1*. Não houve diferença entre os genótipos C/C, C/T e T/T seja em termos de taxa de sobrevida global em 5 anos (45%, 46%, 46%; $p=0,808$), seja em termos de taxa de sobrevida livre de doença em 5 anos (31%, 34%, 20%, $p=0,770$, respectivamente). O escore H ($> 1,5$ *versus* $\leq 1,5$; HR ajustado 0,20, 95%CI 0,07-0,57, $p=0,003$) e a expressão normalizada do mRNA de *ERCC1* ($> 3,1$ *versus* $\leq 3,1$; HR ajustado 0,12, 95%CI 0,03-0,59, $p=0,009$), permaneceram significantes do ponto de vista estatístico, como fatores prognósticos na análise multivariada. CONCLUSÕES: Alta expressão imunohistoquímica da proteína ERCC1 e alta expressão do mRNA de *ERCC1* conferem melhor prognóstico

em pacientes portadores de CECCP operados de alto risco tratados com QRT adjuvante baseada em cisplatina. O polimorfismo genético T19007C de *ERCC1* não apresentou valor prognóstico nestes pacientes.

Descritores: Neoplasias de cabeça e pescoço/quimioterapia, Neoplasias de cabeça e pescoço/radioterapia, Carcinoma de células escamosas/terapia, Neoplasias de cabeça e pescoço/patologia, Cisplatino/farmacologia, Reparo do DNA/genética, Prognóstico, Seguintes.

Summary

Summary

Castro Junior G. *ERCC1 (Excision Repair Cross Complementing Group 1) protein, messenger RNA level and genetic polymorphisms as prognostic markers in patients diagnosed with head and neck squamous cell carcinoma treated with surgery and adjuvant chemoradiation* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009. 99p.

BACKGROUND: Adjuvant concurrent chemoradiation (CRT) improves disease-free survival (DFS) in patients diagnosed with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) presenting with high-risk features treated with surgery with curative intent, but treatment-related toxicity is not negligible and its impact on overall survival (OS) is uncertain. *ERCC1 (Excision Repair Cross Complementing Group 1)* is a protein with a critical role in the nucleotide excision repair (NER) pathway, associated with resistance to chemo- and radiation therapy. We aimed here to study *ERCC1* protein expression, *ERCC1* messenger RNA (mRNA) expression and the single nucleotide polymorphism T19007C of *ERCC1* as prognostic markers in HNSCC patients presenting with high-risk features treated with surgery and adjuvant CRT. **METHODS:** It is a retrospective study in patients with oral cavity, oropharynx, hypopharynx or larynx SCC submitted to radical surgery with curative intent and presenting with pathologic features of high- or intermediate-risk. Eligible patients were treated with adjuvant CRT: 60-70 Gy and concurrent cisplatin (100 mg/m², days 1, 22 and 43), with no distant metastasis and no relapsed disease after surgery. *ERCC1* protein expression was evaluated by immunohistochemistry, using a semi-quantitative H-score, calculated by multiplying the nuclear staining intensity (0-3) by the proportion score attributed to the percentage of positive tumor nuclei (0;0,1;0,5;1). Quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) assay was performed to determine *ERCC1* mRNA expression in primary tumors tissue specimens. The *ERCC1* mRNA expression was normalized using 18S fraction of ribosomal RNA expression as internal reference. *ERCC1* (codon 118) genotypes were detected using PCR – restriction fragment length polymorphism method carried out in genomic DNA extracted from normal lymph nodes. The PCR products were digested with

BsrDI. RESULTS: 69 patients (median age 56 y, 81% male) were studied. Regarding tumor characteristics, primary sites were: oral cavity 41%, larynx 32%, hypopharynx 16%, oropharynx 12%, stage III 14%, stage IV 86%, pT3-pT4 78% and pN2-pN3 58%. Forty-three patients presented with two or more positive lymph nodes, 27 with extracapsular spread of nodal disease and 18 with positive margins. High-risk pathologic features were detected in 40 patients (58%). During the median follow-up of 47 months, we observed 11 locoregional relapses, seven distant relapses, 10 patients were diagnosed with secondary primary tumors (four in lungs and four in esophagus) and 30 deaths (22 disease-related). The 5-year overall survival rate was 40% and the 5-year disease-free survival rate was 31%. High H-score (> 1.5) was seen in 32 patients (54%), who presented better 5-year overall survival rate in comparison to those with lower H-scores (50% versus 18%, HR 0.43, 95%CI 0.20-0.90, $p=0.026$). Fifteen patients (out of 45, 33%) whose tumors presented normalized *ERCC1* expression > 3.1 were classified as having high *ERCC1* mRNA expression, and these patients presented better 5-year overall survival rate in comparison to those with lower *ERCC1* mRNA expression (86% versus 30%, HR 0.26, 95%CI 0.14-1.01, $p=0.052$). Genotype distribution at *ERCC1* codon 118 in 49 patients was 39% C/T, 37% C/C, and 24% T/T. No significant association was found between age, gender, stage, grading and pathological risk features and *ERCC1* codon 118 genotypes or *ERCC1* mRNA expression. No difference was detected among C/C, C/T and T/T genotypes, either in terms of 5-year overall survival rates (45%, 46%, 46%; $p=0.808$), or 5-year disease-free survival rate (31%, 34%, 20%, $p=0.770$, respectively). H-score (> 1.5 versus ≤ 1.5 ; adjusted HR 0.20, 95%CI 0.07-0.57, $p=0.003$) and *ERCC1* mRNA normalized expression (> 3.1 versus ≤ 3.1 ; adjusted HR 0.12, 95%CI 0.03-0.59, $p=0.009$), remained significant as favorable prognostic factors after adjusting for prognostic factors in a multivariate analysis. CONCLUSIONS: High immunohistochemical expression of ERCC1 protein and high *ERCC1* mRNA expression, but not the T19007 single nucleotide polymorphism, were associated with better prognosis in HNSCC patients submitted to surgery and adjuvant cisplatin-based chemoradiation.

Keywords: Head and neck neoplasms/drug therapy, Head and neck neoplasms/radiotherapy, Carcinoma, squamous cell/therapy, Head and neck neoplasms/pathology, Cisplatin/pharmacology, DNA Repair/genetics, Prognosis, Follow-up studies.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia

O câncer de cabeça e pescoço é responsável por cerca de 333.400 mortes anualmente em todo o mundo, sendo 127.900 devido ao câncer da cavidade oral, 89.100 ao câncer da laringe, 78.700 ao câncer da oro/hipofaringe, e 37.800 ao câncer da nasofaringe. Em termos de prevalência, o câncer de cabeça e pescoço é o terceiro mais prevalente mundialmente, representando 7% dos 22,4 milhões de indivíduos com o diagnóstico de câncer, excluindo-se o câncer de pele não-melanoma. Dos aproximadamente 1,6 milhões de pacientes com o diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço, 707.100 têm o diagnóstico de câncer da cavidade oral, 458.100 de câncer da laringe, 248.800 de câncer da oro/hipofaringe, e 171.500 de câncer da nasofaringe. A incidência e a mortalidade por câncer de cabeça e pescoço parecem ser mais elevadas em países em desenvolvimento, em ambos os sexos, quando comparadas com países desenvolvidos, provavelmente um reflexo da exposição maior desta população aos principais fatores de risco para esta doença, a saber, o tabagismo, o etilismo e o papilomavírus humano (Parkin et al., 2001; Parkin et al., 2005).

No Brasil, o Sistema de Informação sobre Mortalidade do Ministério da Saúde apontou as neoplasias malignas de boca, orofaringe e laringe como responsáveis por 5.726 óbitos no ano de 2000, o que em conjunto

representou 4,93% dos óbitos por câncer naquele ano (Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA, 2003). No estado de São Paulo, os cânceres da boca, laringe e faringe em conjunto representaram 10,4% das mortes por câncer na população masculina nos anos 2001-2002 (Fundação Oncocentro de São Paulo, 2007).

No nosso meio, uma grande parte dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECCP), a histologia mais frequente das neoplasias malignas das vias aéreo-digestivas superiores, se apresenta com doença loco-regional avançada, classificada como estádios III ou IV (Fundação Oncocentro de São Paulo, 2007).

1.2. Tratamento adjuvante do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço operado

Nos pacientes portadores de CECCP de alto risco (ver abaixo) tratados com cirurgia radical e radioterapia adjuvante, este tratamento bimodal oferece taxas de sucesso modestas: recorrência loco-regional de 30% em dois anos, metástases à distância em 25% dos casos e sobrevida em cinco anos de 40% (Ang et al. 2001).

Análises retrospectivas de pacientes portadores de CECCP tratados com cirurgia e radioterapia indicaram alguns fatores essencialmente clínico-patológicos indicativos de pior prognóstico, mostrados na tabela 1. Considera-se como os principais fatores determinantes do prognóstico

destes pacientes o comprometimento das margens cirúrgicas e o extravazamento extracapsular da doença nodal (Bernier et al., 2005).

Nas últimas duas décadas o advento de novas tecnologias como a radioterapia com planejamento tridimensional e a radioterapia com modulação da intensidade do feixe de radiação (IMRT), além de esquemas alternativos de fracionamento, têm estimulado o tratamento destes pacientes operados incorporando estas tecnologias sem, entretanto, prova definitiva de benefício clínico em comparação com a técnica tradicional (Fu et al., 2000; Cozzi et al., 2004; Eisbruch et al., 2005; Sanguineti et al., 2005).

Resultados de estudos prospectivos aleatorizados conduzidos na década de 1990 em pacientes portadores de CECCP localmente avançado e irressecável, e de meta-análises, demonstraram ganhos em termos de controle loco-regional da doença que se traduziram em ganhos de sobrevida global, quando se comparou radioterapia isolada *versus* quimiorradioterapia baseada em cisplatina, a favor da quimiorradioterapia. A principal meta-análise, conhecida como MACH-NC (*Meta Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer*) mostrou que o regime padrão de tratamento destes pacientes portadores de CECCP avançado deveria incluir um derivado de platina administrado de modo concomitante à radioterapia (Pignon et al., 2009).

Tabela 1 – Níveis de risco dos pacientes portadores de CECCP tratados com cirurgia e radioterapia adjuvante

Risco	Cooper et al., 1998	Ang et al., 2001	Rosenthal et al., 2002	Langendijk et al., 2003	Bernier et al., 2004
Muito alto	Margem +	EEC; 2 fatores: $\geq$ 2 LN +; LN > 3 cm; CO	$\geq$ 2 LN+; EEC; margem +	EEC em $\geq$ 2 LN; T3 com margem +; pN3	EEC; margem +
Intermediário ou alto	$\geq$ 2 LN +; EEC	1 fator dos acima (com exceção de EEC)	LN > 3 cm; CO	EEC em 1 LN; T1/T2 com margem +; T4	NI; LN+ níveis 4-5 em OF e CO; LVI+; estádios III/IV

CO: cavidade oral; EEC: extravasamento extracapsular da doença nodal; LN: linfonodo; LVI: invasão linfovascular; Margem +: margem(ens) cirúrgica(s) positiva(s) (< 5 mm); NI: invasão perineural; OF: orofaringe.

Nesta linha, a fim de melhorar o prognóstico dos pacientes portadores de CECCP previamente operados, estudos prospectivos e aleatorizados mostraram que a administração de quimioterapia baseada em platina de modo concomitante à radioterapia adjuvante, oferecia ganhos de sobrevida livre de progressão em comparação com a radioterapia isolada, conforme mostrado na tabela 2.

Tabela 2 – Resultado dos estudos de quimiorradioterapia adjuvante baseada em cisplatina em CECCP de alto risco tratados com cirurgia (radioterapia isolada versus quimiorradioterapia)

	RTOG 95-01	EORTC 22931	ARO 96-3
	Cooper et al., 2004	Bernier et al., 2004	Fietkau et al., 2006
No. de pacientes incluídos	459	334	440
Crítérios de risco	≥ 2 LN +; EEC; Margens +	EEC; margem +; NI; LN+ níveis 4-5 em OF e CO; LVI+; estádios III/IV	pT3R1, pT4; ≥ 3 LN +; EEC
Radioterapia adjuvante	60-66 Gy	66 Gy	50 Gy N0 56 Gy pN+ sem EEC 64 Gy EEC+
Quimioterapia adjuvante	CDDP 100 mg/m ² d1, d22, d43	CDDP 100 mg/m ² d1, d22, d43	CDDP 20 mg/m ² d1-d5, d29-d33 + 5-FU 600 mg/m ² IC d1-d5, d29-d33
Recaída loco-regional	28 vs. 18% p=0,01	31 vs. 18% p=0,007	38 vs. 17% p=0,0006
Sobrevida livre de doença (em cinco anos)	27 vs. 36% p=0,04	36 vs. 47% p=0,04	50 vs. 62% p=0,023
Sobrevida global (em cinco anos)	41 vs. 37% p=0,19	40 vs. 53% p=0,02	49 vs. 58% p=0,11
Toxicidade aguda grau 3 ou superior	34 vs. 77% p<0,0001	21 vs. 41% p=0,001	Mucosite* 13 vs. 21% Dermatite 9 vs. 13% Leucopenia* 0 vs. 4% Plaquetopenia 0 vs. 2% Infecções 7 vs. 9% Creatinina > 1,5 x LSN 1 vs. 6% (p<0,04)

5-FU: fluoruracila; CO: cavidade oral; CDDP: cisplatina; EEC: extravasamento extracapsular da doença nodal; LN: linfonodo; LSN: limite superior da normalidade; LVI: invasão linfovascular; Margem +: margem(ens) cirúrgica(s) positiva(s) (< 5 mm); OF: orofaringe; NI: invasão perineural; R1: doença residual microscópica

Alcançando o nível I de evidência, os pacientes portadores de CECCP operados e que apresentam os fatores de risco acima descritos poderiam se beneficiar de quimiorradioterapia adjuvante em termos de controle loco-regional e de sobrevida livre de doença. Entretanto o impacto deste tratamento em termos de ganho de sobrevida global é ainda incerto e a toxicidade desta associação não é desprezível. Deste modo, fica clara a necessidade de melhor definirmos aquele grupo de pacientes que possa mais se beneficiar da quimiorradioterapia em termos de controle da doença e ganho de sobrevida, poupando assim os demais desta toxicidade, principalmente se levarmos em conta o resultado de estudos aleatorizados que mostram que a associação de radioterapia com o anticorpo monoclonal direcionado à porção extracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor* ou EGFR), cetuximabe, é menos tóxica que a quimiorradioterapia (Bonner et al., 2006).

1.3. Radioresistência e falha do tratamento do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

Radioterapia tem um papel essencial e definitivo como modalidade de tratamento do CECCP, seja como tratamento exclusivo ou adjuvante, isolada ou em combinação com tratamentos sistêmicos.

A radiação interage com moléculas dentro da célula de maneira aleatória. Radiações eletromagnéticas ionizantes atuam via ionização de moléculas de água no intracelular, na presença de oxigênio, com geração de

espécies reativas de oxigênio (EROs), especialmente radicais hidroxila livres ($\text{OH}^\bullet$). Tais EROs causam danos na estrutura do DNA como quebras em fita única e na fita dupla desta macromolécula, além de *cross-links* interfitas e oxidação de proteínas associadas à estrutura cromossomal. Estes danos levam à perda da capacidade replicativa celular (morte reprodutiva) e à apoptose. Como este dano é aleatório, nem todas as populações celulares são afetadas do mesmo modo ao mesmo tempo, fazendo com que haja o surgimento de um dano letal em algumas populações celulares e um dano subletal em outras (que pode ser reparado, como discutido a seguir), este responsável pela repopulação tumoral após a exposição a uma fração de radioterapia.

A radiorresistência no caso de pacientes portadores de CECCP, com conseqüente falha desta modalidade terapêutica, tem relevância clínica. Como mecanismos propostos para a resistência à radioterapia, temos (Seiwert et al., 2007a; Seiwert et al., 2007b):

i. Grandes cargas tumorais: a resposta de um tumor clínico à radiação é inversamente proporcional ao seu tamanho. Como a lesão pela radiação é aleatória, quanto maior o número de células irradiadas, maior a possibilidade de clones celulares escaparem ao dano letal.

ii. Hipóxia na célula tumoral e/ou no microambiente do tumor: seja por aumento da pressão intersticial tumoral, causando hipoperfusão, hipóxia e

acidose, ou por anemia, a hipóxia leva a uma menor geração de EROs, essenciais para o efeito citotóxico da radiação.

iii. Repopulação tumoral: o crescimento do tumor, ou repopulação acelerada, induzida pela radioterapia, leva à emergência de clones radorresistentes responsáveis pela falha do tratamento.

iv. Resistência adquirida ou inerente da célula neoplásica à radiação: corresponde a vários mecanismos, mediados por p53 mutado, amplificação dos genes envolvidos no reparo de DNA, aumento dos níveis de “seqüestradores” (*scavengers*) de EROs, e/ou ativação de vias de sobrevivência celular, como por exemplo, a via do EGFR.

Como mencionado acima, uma das estratégias utilizadas na prática clínica para se aumentar o efeito terapêutico da radiação é através da administração concomitante da quimioterapia e da radioterapia. Vários estudos clínicos conduzidos na década de 1990 em pacientes portadores de CECCP localmente avançado demonstraram ganhos em termos de controle loco-regional da doença que se traduziram em ganhos de sobrevida global, quando se comparou radioterapia isolada *versus* quimiorradioterapia baseada em cisplatina, a favor da quimiorradioterapia (Merlano et al., 1996; Brizel et al., 1998; Calais et al., 1999; Adelstein et al., 2003). A meta-análise MACH-NC (*Meta Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer*) mostrou que o regime padrão de tratamento destes pacientes portadores de CECCP localmente avançado deveria incluir um derivado de platina administrado de modo concomitante à radioterapia. Os resultados mais

recentes desta meta-análise, incluindo 93 estudos, mostram que a quimiorradioterapia concomitante oferece um ganho de 8% em termos de sobrevida global em cinco anos, com uma diminuição de 19% do risco relativo de morte, em comparação com a radioterapia exclusiva [*hazard ratio* (HR) 0,81; $p < 0,0001$]. A magnitude deste benefício foi maior para os esquemas baseados em platina (HR 0,75 vs. 0,86; $p < 0,01$) (Pignon et al., 2009).

Os mecanismos propostos pelos quais a ocorre a interação entre a quimioterapia baseada em platina, e a radiação, inibindo a repopulação tumoral, e que favorecem o tratamento combinado são os seguintes (Seiwert et al., 2007a; Seiwert et al., 2007b):

i. Aumento do dano letal causado pela radiação: a incorporação da quimioterapia citotóxica na estrutura do DNA amplia, por cooperação espacial aditiva, a ação da radioterapia, atuando, por exemplo, em células hipóxicas.

ii. Inibição do reparo do dano subletal causado pela radiação, interferindo e inibindo o processo de reparo do DNA

iii. Interferência com o ciclo celular: através da ação em células em divisão (cooperação citotóxica) e acúmulo das células neoplásicas nas fases mais sensíveis do ciclo celular à radiação, como G2 e M.

1.4. Cisplatina: estrutura e mecanismo de ação

Cisplatina ou *cis*-Diaminodicloroplatinum (II) (figura 1) é um complexo inorgânico hidrossolúvel, bivalente, contendo platina. Tais complexos coordenados de platina foram identificados a partir dos trabalhos de Rosenberg et al. (1965, 1967) nos quais uma corrente elétrica entre eletrodos de platina foi capaz de produzir inibição da proliferação de *Escherichia coli* na presença de íons cloreto e amônio. Como agente antineoplásico, cisplatina é parte essencial no tratamento sistêmico dos pacientes portadores de neoplasias malignas epiteliais, como o câncer de células germinativas do testículo e os carcinomas do ovário, de cabeça e pescoço, do pulmão, do esôfago e da bexiga.

Figura 1 – Cisplatina ou *cis*-Diaminodicloroplatinum (II)

Cisplatina tem acesso ao ambiente intracelular por difusão passiva. A troca dos átomos de cloro por moléculas de água (aquação), a qual ocorre no meio intracelular, onde há menor concentração de cloretos, em relação ao extracelular, leva à formação de moléculas carregadas positivamente e é provavelmente o mecanismo responsável pela formação de espécies

ativadas da droga, que reagem com proteínas e especialmente ácidos nucleicos (Colvin, 2003) (figura 2).

Figura 2 – Ativação por aquação da cisplatina e reação com compostos nucleofílicos

A reação destes complexos ativados de platina com ácido desoxirribonucléico (DNA) leva à formação de pontes intrafitas e entre as fitas do DNA (*cross-links*). O nitrogênio na posição 7 (N^7) de resíduos de guanina são muito reativos e são formadas pontes entre resíduos adjacentes de guanina na mesma fita do DNA tal como *cross-links* adenina-guanina. Estes aductos de bases nitrogenadas, isto é, compostos de estruturas moleculares complexas covalentemente ligadas às bases nitrogenadas, principalmente d(GpG) e d(ApG), são gerados (figura 3) e interferem nos processos de replicação conservativa e transcrição do DNA, causando quebras de fita e erros de leitura, inibindo-os, sendo este um dos mecanismo

proposto de citotoxicidade dos compostos derivados de platina. A via pela qual há morte celular ou mesmo apoptose ainda não é completamente compreendida, mas acredita-se que além da parada no ciclo celular em G2 por defeitos na transcrição gênica, possa haver envolvimento de proteínas de reparo de *mismatch* de DNA, como hMLH1 e hMSH2 (Colvin, 2003).

Figura 3 – Adutos DNA-platina: (a) Aduto d(GpG); (b) Aduto d(ApG); (c) Ponte interfitas de DNA

1.5. Mecanismos de reparo do DNA

Células humanas são dotadas de uma variedade de defesas que protegem moléculas de DNA do ataque de agentes mutagênicos. Dentre estas defesas, podemos citar desde defesas físicas, como o pigmento de melanina presente na região basal da epiderme, que protege contra os raios ultravioletas solares, e mecanismos químicos, os quais interceptam carcinógenos químicos antes de ocorrer o dano genômico. Entre estes há uma variedade de enzimas como catalase e superóxido dismutase, as quais catalisam a transformação de EROs a formas não reativas; “seqüestradores”

ou *scavengers* de radicais livres, como vitamina C e alfa-tocoferol; e enzimas que onde glutathione é um substrato, como a classe das glutathione-S-transferases (GSTs) (Weinberg, 2007). A metilação do promotor do gene *GSTP* leva a uma repressão da expressão de GST- π , fato observado em 90% dos adenocarcinomas de próstata humanos em fase precoce, demonstrando a vantagem de proliferação destes clones celulares associada à inativação deste gene (Jerónimo et al., 2002). Outro exemplo da relevância clínica deste mecanismo é a frequência mais elevada do genótipo *null/null* de *GSTT1* em indivíduos portadores de síndrome mielodisplásica, em comparação com a população em geral (Chen et al., 1996).

Uma vez alterado o DNA por agentes mutagênicos, células humanas dispõem de um elaborado mecanismo de reparo que garante a integridade do genoma e remove bases inapropriadamente criadas ou alteradas por ataque físico ou químico, trocando-as por bases preexistentes, e ainda são capazes de manter a integridade da dupla hélice que pode ter sido comprometida. O objetivo final deste sistema, composto por centenas de genes e proteínas diferentes é o de evitar a transmissão do dano genotóxico às células filhas, após a replicação do material genético.

Aqui discutiremos as chamadas enzimas de reparo de DNA. Estas são diferentes das chamadas enzimas de reparo de *mismatch* de DNA (*mismatch repair* - MMR), como hMLH1 e hMSH2. Enquanto enzimas MMR são direcionadas para detecção e correção de nucleotídeos de estrutura normal incorporados em posições erradas no DNA, as enzimas de reparo de

DNA aqui discutidas detectam nucleotídeos de estrutura química anormal (Jiricny et al., 2000).

Como principais enzimas de reparo de DNA, temos:

i. Enzimas de reparo de dealquilação: estão envolvidas no restauro da estrutura química original da base alterada, por exemplo, catalisando a reação química que causou a alteração, mas no sentido inverso. Um exemplo é a chamada DNA-alquiltransferase ou O⁶-metilguanina DNA metiltransferase (MGMT). Em gliomas, o gene *MGMT* é silenciado em 40% dos casos e em pacientes portadores de glioblastoma multiforme tratados com agentes alquilantes, baixa expressão de MGMT está relacionada à maior sobrevida global em comparação com aqueles pacientes com alta expressão: 22 meses *versus* 12 meses (Esteller et al., 2000).

ii. Reparo por excisão de base (*Base-excision repair* ou BER): mecanismo responsável por reparo de danos ao DNA provenientes de fontes predominantemente endógenas como aquelas atribuídas a EROs e depurinação, danos estes que não levam a distorções estruturais na dupla hélice. Tal reparo é iniciado por um grupo de DNA glicosilases, responsáveis pelo reconhecimento da base aberrante e clivagem da ligação desta base com a desoxiribose. Esta desoxiribose livre da base aberrante é clivada a seguir por uma endonuclease apurínica/apirimidínica (APE), na porção 5' do açúcar. A clivagem na porção 3' ocorre por ação de uma APE liase. O defeito resultante, em fita única, é reparado frequentemente pela DNA

polimerase β , e as pontes fosfodiéster são então reparadas pela DNA ligase III (Wilson e Bohr, 2007; Hakem, 2008). Este mecanismo é ilustrado na figura 4.

Figura 4 – Reparo por excisão de base (BER) (modificado de Weinberg, 2007)

iii. Reparo por excisão de nucleotídeo (*Nucleotide-excision repair* ou NER): este mecanismo mais complexo é constituído por um complexo de mais de 30 diferentes proteínas, e é ativado quando além da presença da base aberrante quimicamente alterada ocorre distorção significativa da estrutura da dupla hélice do DNA. A clivagem ocorre na sequência de nucleotídeos a cerca de 24 nucleotídeos a 5' e cerca de 5 nucleotídeos a 3'. A sequência de cerca de 30 nucleotídeos é refeita pela DNA polimerase δ ou ϵ , com a cooperação de PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular ou *proliferating-cell nuclear antigen*) e RPA (proteína ligada ao DNA de fita única), a partir do molde da fita íntegra, com a formação das pontes selada por DNA ligase (figura 5). Este reparo pode ser *acoplado* à transcrição gênica (TCR), juntamente com a ação de RNA polimerases, no caso de genes ativamente transcritos, ou através do chamado reparo genômico

global (GGR) que ocorre ou em seqüências não transcritas do genoma ou mesmo em seqüências transcritas, mas não moldes. A expressão de proteínas NER envolvidas em GGR é regulada por *p53* (de Laat et al., 1999; de Boer e Hoeijmakers, 2000; Park e Choi, 2006; Gossage e Madhusudan, 2007).

Figura 5 – Reparo por excisão de nucleotídeo (NER) (modificado de Weinberg, 2007)

iv. Reparo propenso a erro (*Error-prone repair*): neste caso, o complexo de replicação do DNA se depara com uma lesão não reparada, frequentemente um dímero de timidina, e a DNA polimerase β insere um dímero apropriado (A-A) ou incorpora um dímero G-G. A enzima codificada por *XPV* (variante do xeroderma pigmentoso – ver abaixo) reconhece o dímero T-T causado por radiação ultravioleta e insere A-A na fita oposta, com altas taxas de erro de replicação (Goodman, 2002).

v. Reparo de quebra da fita dupla (*Double-strand break repair*): pode ocorrer através de recombinação homóloga (*homologous recombination*) a outros cromossomos (onde RAD51 é uma proteína chave), ou via junção terminal não-homóloga (*non-homologous end-joining*), mediada principalmente por DNA ligase IV e pelos produtos dos genes *XRCC 4-7* (*X-ray cross-complementing groups 4-7*) ou ainda por enzimas de reparo de quebra de fita única, via poli-ADP-ribose polimerase (PARP), XRCC1 e DNA ligase III (Hakem, 2008).

1.6. ERCC1 (*Excision Repair Cross-Complementing Group 1*)

Os mecanismos de reparo do DNA constituem mecanismos moleculares cruciais potencialmente envolvidos na resistência à quimioterapia, principalmente aos agentes alquilantes e aos derivados da platina. Como os efeitos citotóxicos da cisplatina são mediados pelos aductos “*bulky*” DNA-platina, a remoção destes aductos e reparo do DNA mediado por NER se revelam como um potencial fator de resistência à quimioterapia baseada em platina. Além disso, podem também ter relevante papel em prever resposta à radioterapia (Sancar, 1994; De Silva et al., 2000; Madhusudan e Middleton, 2005).

São mais de 30 as proteínas conhecidas do complexo NER e são altamente conservadas entre as espécies. As lesões no DNA mais comumente processadas por NER incluem aquelas induzidas por luz

ultravioleta e aductos de DNA formados por compostos eletrofílicos como a cisplatina (Gillet e Schärer, 2006).

Como descrito acima, as duas sub-vias descritas de NER são a via de reparo por excisão de nucleotídeo acoplada à transcrição gênica (TCR), direcionada a lesões em seqüências transcritas, de genes expressos, e a via de reparo genômico global (GGR).

Os passos básicos de GGR são mostrados na figura 6 e descritos a seguir. A família de proteínas codificadas pelos genes *XP* está envolvida no reconhecimento e incisão do dano do DNA como parte do mecanismo de NER. Inclui sete genes denominados *XPA*, *XPB*, *XPC*, *XPD*, *XPE*, *XPF*, *XPG*, os quais codificam enzimas do complexo NER. Tais genes são aqueles mutados nos pacientes portadores de xeroderma pigmentoso, divididos em 7 grupos de complementação (*XPA* a *XPG*) e variantes (*XPV*) (Cleaver, 2005).

O reconhecimento do defeito no DNA ocorre pelo complexo XPC-HR23B. A seguir, ocorrem demarcação e verificação da lesão por um complexo de nove proteínas (*XPB*, *XPD*, p62, p52, p44, p34, cdk7, ciclina H, MAT1) conhecido como TFIIH, e montagem do complexo de pré-incisão do DNA (*RPA*, *XPA*, *XPG*), onde *XPA* liga-se ao DNA danificado e facilita a montagem do complexo reparador; abertura da dupla-fita por helicases *XPB* e *XPD*; incisão de nucleotídeo por *ERCC1-XPF* (5') e *XPG* (3'). O oligômero oriundo desta excisão tem de 24 a 32 nucleotídeos e após a sua liberação, a síntese ocorre através da ação de *RPA*, *RFC*, *PCNA* e DNA polimerase δ/ϵ e ligase I. O reparo via TCR é muito semelhante (Park e Choi, 2006).

Figura 6 – Via de reparo genômico global por excisão de nucleotídeos (Gossage e Mahusudan, 2007)

XPF (ou ERCC4) é uma endonuclease dimérica envolvida em NER e replicação de DNA e recombinação meiótica. Esta endonuclease associa-se com seu par não catalítico ERCC1 (*Excision Repair Cross Complementing Group 1*) para formar um heterodímero. A organização deste dímero é essencial para a estabilidade e atividade catalítica de XPF.

O gene *ERCC1* é localizado em 19q13.2-q13.3 e tem 10 exons dispersos em 15 kb do genoma. Codifica uma proteína de 297 aminoácidos de peso molecular de 32,5 kDa (figura 7), de localização nuclear e com propriedades estruturais de hélice, com capacidade de ligar-se ao DNA. O

domínio central de ERCC1 é similar ao domínio com atividade de nuclease de XPF, mas não possui esta atividade. É este domínio central que se liga a dsDNA e ssDNA com polaridade definida para interface com porção 5'. O domínio C-terminal de ERCC1 liga-se ao domínio C-terminal de XPF via interações hidrofóbicas e também pode se ligar ao DNA. A função da unidade ERCC1, além de estabilizar XPF, inclui uma ligação funcional com toda a maquinaria de NER, pois interage com XPA e contribui para a seleção do substrato de DNA (Niedernhofer et al., 2004; Choi et al., 2005; Tsodikov et al., 2005; Park e Choi, 2006).

Figura 7 – Estrutura e domínios de ERCC1 e XPF (Park e Choi, 2006)

A expressão gênica de *ERCC1* é regulada pelo seu promotor situado a montante, cerca de 170 bp, e contém um sítio de ligação de AP-1-símile. A exposição de células em cultura à cisplatina revelou um aumento tempo- e

dose-dependente da expressão do RNA mensageiro (mRNA) e da proteína ERCC1, talvez mediada por aumento da expressão de *c-jun* e *c-fos*, que regulariam a atividade AP-1 (Altaha et al., 2004).

Vários estudos analisaram a relevância clínica do papel de ERCC1 no mecanismo de reparo de DNA em câncer do ovário, câncer gástrico, câncer colorretal, carcinoma epidermóide de esôfago, carcinoma de pulmão não-pequenas células e CECCP.

Em linhagens celulares de câncer do ovário e em tecido de pacientes portadores desta neoplasia, foi demonstrado que o aumento da expressão de *ERCC1* estava associado à resistência à cisplatina (Dabholkar et al., 1994; Ferry et al., 2000). A alta expressão de *ERCC1* foi também associada com pior prognóstico (menor sobrevida global) em pacientes portadores de câncer do esôfago tratados com quimiorradioterapia (fluoruracila + cisplatina concomitante à radioterapia), seguida por cirurgia (Warnecke-Eberz et al., 2004). A expressão do mRNA de *ERCC1* também foi um marcador prognóstico independente em pacientes portadores de câncer colorretal tratados com fluoruracila e oxaliplatina (Shirota et al., 2001). Em pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico, a maior expressão do mRNA de *ERCC1* também foram relacionados a menor taxa de resposta e pior sobrevida global, quando tratados com fluoruracila e cisplatina (Metzger et al., 1998).

A baixa expressão de *ERCC1*-mRNA em tecido tumoral de 56 pacientes portadores de câncer de pulmão não-pequenas células avançado tratados com gencitabina-cisplatina foi preditiva de ganho de sobrevida

global no estudo de Lord et al. (2002). No estudo de fase III publicado por Cobo et al. (2007), 444 pacientes portadores de câncer do pulmão não-pequenas células estágio IV foram aleatorizados entre o braço controle e tratados com docetaxel-cisplatina, e o braço experimental (genotípico), onde de acordo com a expressão de *ERCC1*-mRNA eram tratados com docetaxel-cisplatina (no caso de baixa expressão de *ERCC1*) ou docetaxel-gencitabina (no caso de alta expressão). A taxa de resposta, desfecho primário do estudo, foi significativamente maior no braço genotípico: 50,7% *versus* 39,3% ($p=0,02$).

A expressão da proteína ERCC1 foi avaliada em 761 pacientes incluídos no *International Adjuvant Lung Trial* (IALT). Pacientes com tumores ERCC1-negativos aleatorizados para quimioterapia adjuvante baseada em cisplatina apresentaram vantagem em termos de ganho de sobrevida global quando comparados àqueles pacientes aleatorizados à observação (HR 0,65; 95%CI 0,50-0,86; $p=0,009$), o que não foi observado nos pacientes ERCC1-positivos (HR 1,14; 95%CI 0,84-1,55; $p=0,40$), sugerindo que pacientes ERCC1-negativos são melhores candidatos à quimioterapia adjuvante baseada em platina que aqueles ERCC1-positivos (Olaussen et al., 2006).

Por fim, em 107 pacientes portadores de CECCP localmente avançado tratados com quimioterapia neoadjuvante baseada em cisplatina, a baixa expressão de ERCC1 avaliada por imunohistoquímica conferiu um benefício maior em termos de taxa de resposta ao tratamento (odds ratio 4,3; 95%CI 1,4-13,4; $p=0,01$), no estudo publicado por Handra-Luca et al.

(2007). Entretanto, o verdadeiro papel da expressão de ERCC1 como fator preditivo de resposta à cisplatina em CECCP ainda é controverso (Jun et al., 2008; Koh et al., 2009).

Ou seja, evidências pré-clínicas e clínicas se acumulam na literatura sugerindo que a maior expressão de *ERCC1*, avaliada por níveis de mRNA ou pela própria proteína, estão associadas a maior capacidade de reparo de DNA em cânceres humanos, e este marcador poderia ser utilizado como preditivo de resistência à cisplatina.

Entretanto, e em acordo com o papel dual atribuído aos mecanismos de reparo de DNA como fatores prognósticos em pacientes portadores de neoplasias malignas (Wei et al., 2000), a expressão de *ERCC1* poderia ter um significado diferente em diferentes grupos de pacientes. Ou seja, ao mesmo tempo em que a elevada expressão de *ERCC1* seria preditiva de resistência à cisplatina, este mecanismo de reparo de DNA, onde *ERCC1* está envolvido, poderia reduzir o acúmulo de mutações no DNA e interferir de modo favorável na progressão de determinada neoplasia.

Em 51 pacientes portadores de câncer de pulmão de células não-pequenas tratados com cirurgia, a expressão de mRNA de *ERCC1* em material congelado foi avaliada na publicação de Simon et al. (2005). A expressão de *ERCC1* superior a 50 (normalizada àquela da fração 18S do RNA ribossomal) foi preditiva de maior sobrevida global (94,6 *versus* 35,5 meses, $p=0.01$), resultado esse que se manteve em análise multivariada. Neste estudo, não houve correlação significativa entre a expressão de *ERCC1* no tecido tumoral e no tecido normal.

Da mesma forma, no estudo de Zheng et al. (2007), a expressão da proteína ERCC1 verificada por imunofluorescência combinada com análise automática quantitativa (AQUA) se correlacionou com sobrevida global ($p=0,01$) em 184 pacientes portadores de câncer de pulmão de células não-pequenas estágio I tratados com cirurgia. Entre os pacientes incluídos no estudo IALT (Olaussen et al., 2006) tratados com cirurgia apenas, a sobrevida global observada foi de 42 meses nos pacientes com tumores ERCC1 negativos e 55 meses nos pacientes com tumores ERCC1 positivos, o que sugere (significância estatística não mencionada nesta referência) prognóstico superior nestes pacientes.

Em 41 pacientes portadores de câncer do esôfago tratados com cirurgia apenas, pacientes portadores de tumores ERCC1 positivos de acordo com expressão imunohistoquímica desta proteína apresentaram uma tendência a melhor prognóstico em relação àqueles portadores de tumores ERCC1 negativos, com maior sobrevida global ($p=0,085$) e sobrevida livre de eventos ($p=0,094$) (Kim et al., 2008).

1.7. Polimorfismos de nucleotídeo único

Nos estudos de farmacogenética, polimorfismos dos genes que codificam enzimas-alvo dos agentes quimioterápicos, ou que participam da sua metabolização, ou ainda no reparo do dano do DNA causado pela quimioterapia, têm se mostrado úteis em prever sensibilidade ao tratamento e podem servir no futuro como marcadores na seleção de

tratamentos com base nas características genéticas constitutivas de cada indivíduo (Brookes, 1999). Os genes chamados polimórficos apresentam variantes alélicas com frequência superior a 1%. Entretanto, o uso comum deste termo se refere a mudanças na sequência do DNA que não afetam ou têm efeito menor na função e produção de uma proteína. O tipo mais comum de polimorfismo é a substituição da base nitrogenada de um único nucleotídeo (SNP – *single nucleotide polymorphism*). Os SNPs podem ocorrer em genes que codificam proteínas diretamente envolvidas na ação das drogas, tanto quando a proteína é o alvo ou quando a proteína participa do reparo ao dano causado pela droga. Com isso, a eficácia da droga pode ser comprometida e/ou sua toxicidade aumentada (Suk et al., 2005). Alguns SNPs nos genes da via de NER parecem estar ligados à resposta a cisplatina.

Embora esteja fora do escopo deste trabalho, convém mencionar que o efeito combinado de polimorfismos de *ERCC1* e outros genes tem sido associado com risco aumentado de desenvolvimento de certas neoplasias malignas, dentre elas, o CECCP (Sturgis et al., 2002).

Dois SNPs comuns do gene *ERCC1* têm sido explorados. O SNP T19007C do códon 118 é associado com menores níveis da expressão do mRNA e da proteína. O polimorfismo C8092A é localizado na região 3' não traduzida do gene e pode estar relacionado à estabilidade do mRNA (Yu et al., 2000; Chen et al., 2000).

Como exemplo, no estudo de Zhou et al. (2004), o polimorfismo C8092A se mostrou correlacionar com pior sobrevida em comparação com a

variante selvagem (C/C) em 128 pacientes portadores de câncer de pulmão não-pequenas células tratados com quimioterapia baseada em platina. No estudo de Ryu et al. (2004), a presença da variante selvagem C/C do códon 118 de *ERCC1* também foi associada a maior sobrevida global (486 dias *versus* 281 dias) em pacientes portadores de câncer de pulmão não-pequenas células tratados com quimioterapia.

Recentemente, Quintela-Fandino et al. (2006) mostraram que há uma forte correlação entre a presença de alguns polimorfismos genéticos e vantagem de resposta e sobrevida em pacientes portadores de CECCP avançado tratados com quimioterapia neoadjuvante baseada em platina. Na análise multivariada, o acúmulo de variantes polimórficas de *ERCC1*, *XPD312*, *XPD751* e *XRCC1* diminuíram o risco de mortalidade por um fator de 2,1 e a presença das sete variantes polimórficas conferiram uma proteção de 175 vezes!

Em 108 pacientes portadores de CECCP estádios I e II tratados com radioterapia exclusiva, o polimorfismo Thr259Thr conferiu risco aumentado em 8,2 vezes de progressão da doença ($p < 0,00005$) (Carles et al., 2006).

1.8. Racional para o estudo: o papel dual de *ERCC1*

Nos pacientes portadores de CECCP operados, apresentando fatores de risco, a indicação ou não da quimiorradioterapia adjuvante é baseada em características clínico-patológicas exclusivas (ver tabela 2). Entretanto, a predição da evolução individual dos pacientes submetidos a este tratamento

ainda é imperfeita, dado o impacto ainda discutível deste na sobrevida global dos pacientes. Neste contexto, vários marcadores moleculares como fatores prognósticos e preditivos de resposta vêm sendo explorados, ainda sem validação clínica adequada. Ou seja, o valor da adição da quimioterapia à radioterapia adjuvante de modo concomitante é, em termos individuais, ainda imprevisível, e a escolha dos protocolos é frequentemente empírica, com doses fixas e próximas da dose máxima tolerada; já os efeitos tóxicos são comuns e, não raramente, graves (de Castro et al., 2007).

Considerando-se que NER tem participação relevante na emergência de resistência ao tratamento com platinas e valor prognóstico nestes pacientes, e sendo ERCC1 uma proteína crítica nesta via de reparo, este estudo avaliará o valor prognóstico de ERCC1 em pacientes portadores de CECCP operados com fatores de risco, submetidos à quimiorradioterapia adjuvante baseada em cisplatina. Ou seja, nossa hipótese de trabalho é: pacientes apresentando uma expressão mais alta do gene *ERCC1* e/ou da proteína ERCC1 e/ou certos SNPs têm reparo mais eficiente, o que reduziria o acúmulo de mutações no DNA e interferiria de modo favorável na progressão da neoplasia, enquanto que de outro lado seriam quimio/radioresistentes e poderiam não se beneficiar de maneira significativa do tratamento adjuvante, podendo desta forma, ser candidatos a tratamentos alternativos (e potencialmente menos tóxicos, como os anti-EGFR associados à radioterapia) ou simplesmente a um seguimento clínico.

Em vista do modesto número de pacientes que seria incluído, e do seu caráter retrospectivo, este estudo é principalmente de caráter

exploratório, mas poderá ajudar a justificar a realização de um estudo prospectivo, de maior envergadura, que poderá no futuro validar definitivamente o papel destes marcadores neste contexto.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos

Os objetivos do presente estudo são:

- Determinar a expressão da proteína ERCC1 (*Excision Repair Cross Complementing Group 1*), a expressão do RNA mensageiro de *ERCC1* e a ocorrência de polimorfismos genéticos de *ERCC1* no seu códon 118 (polimorfismo rs11615:T19007C) em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço operados e tratados com quimiorradioterapia adjuvante baseada em cisplatina, bem como o valor prognóstico destes marcadores nestes pacientes.

3. MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo e exploratório numa coorte de pacientes portadores de CECCP operados e portadores de fatores de risco (conforme descrito abaixo e de acordo com os critérios descritos por Bernier et al., 2004), tratados no Serviço de Oncologia Clínica – HCFMUSP entre 1998 e 2007, para explorar o valor prognóstico do marcador biológico ERCC1.

3.2. Critérios de elegibilidade

A fim de serem incluídos neste estudo, os pacientes selecionados apresentaram todos os seguintes critérios de elegibilidade:

- Diagnóstico de carcinoma epidermóide comprovado por histologia ou citologia, com sítio primário em cavidade oral, orofaringe, hipofaringe ou laringe, com pelo menos um dos seguintes critérios de risco alto ou intermediário: margem(ens) comprometida(s), extravazamento extracapsular da metástase linfonodal, invasão perineural, invasão linfovascular, estádios III ou IV, comprometimento linfonodal nos níveis cervicais 4 ou 5 no caso de portadores de CEC com sítio primário em cavidade oral ou orofaringe.
- Ter sido submetido à cirurgia radical com intenção curativa.

- Considerados como candidatos à quimiorradioterapia adjuvante: 60-70 Gy, com quimioterapia concomitante, que consistiu em cisplatina 100 mg/m² via intravenosa nos dias 1, 22 e 43 da radioterapia.
- Ter recebido pelo menos o primeiro ciclo da quimioterapia. Toda a quimioterapia deve ter sido administrada no HCFMUSP.
- Ausência de metástases à distância.
- Ausência de sinais de recidiva após a cirurgia e antes do tratamento adjuvante.
- Ausência de outra neoplasia maligna ao diagnóstico.
- Ausência de outro tratamento sistêmico ou radioterapia prévios à cirurgia, incluindo terapia neoadjuvante para CECCP.

3.3. Desfechos avaliados

Sobrevida livre de doença foi definida como o intervalo de tempo entre o final da radioterapia e qualquer tipo de progressão (local, regional ou à distância, ou segunda neoplasia primária) ou óbito por qualquer causa, o que ocorrer primeiro. Sobrevida global foi definida como o intervalo de tempo entre o final da radioterapia e a data do óbito do paciente por qualquer causa. O diagnóstico de segunda neoplasia primária foi baseado nos dados clínicos-imagenológicos-patológicos de cada caso, pelo julgamento do médico assistente do paciente. A data final de seguimento foi 31 de março de 2009.

3.4. Expressão imunohistoquímica da proteína ERCC1

3.4.1. Procedimento de imunohistoquímica

O procedimento operacional padrão de imunohistoquímica adotado na Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foi utilizado neste estudo, conforme descrito a seguir, em cortes de 5 µm dos blocos de parafina contendo amostras representativas do tumor primário:

- 1) Desparafinização (a quente): em xilol a 60°C, por 30 minutos;
- 2) Desparafinização (a frio): em xilol a temperatura ambiente, por 10 minutos;
- 3) Hidratação sequencial dos cortes em álcool absoluto (2 vezes), álcool 95% (2 vezes), álcool 75%, lavagens em água corrente e destilada.
- 4) Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada a 6% (20 volumes), em 5 banhos de 5 minutos cada.
- 5) Pré-tratamento para recuperação antigênica por calor com solução de ácido cítrico 0,01 M, pH 6,0 em panela de pressão, por 2-5 minutos. Lavagem em água corrente/destilada e em tampão PBS (3 vezes).
- 6) Incubação com anticorpo primário murino anti-ERCC1 Ab-2, clone 8F1, NeoMarkers (Neomarkers, Fremont, CA, EUA) diluído em solução de albumina 1% e em PBS, em câmara úmida por 18 horas (*overnight*) a 4°C. Lavagem em tampão PBS (3 vezes).

7) Incubação com o anticorpo secundário conjugado com polímero Novolink (Novocastra, Bannockburn, IL, EUA) por 30 minutos a 37°C. Lavagem em tampão PBS (3 vezes).

8) Revelação com substrato cromogênico diaminobenzidina a 60 mg/100mL em PBS + 1,5 mL de água oxigenada a 20 vol, de 3-5 minutos (a 37°C). Lavagem em água corrente e destilada.

9) Contra-coloração (leve) em hematoxilina (Harrys ou Mayer). Lavagem em água corrente e destilada.

10) Desidratação dos cortes em álcool 75%, álcool 95% (duas vezes), álcool absoluto (duas vezes), xilol (3 vezes).

13) Montagem com lamínula.

14) Identificação das lâminas.

3.4.2. Análise microscópica

A análise microscópica dos cortes histológicos após imunohistoquímica foi realizada, conforme descrito em Handra-Luca et al. (2003) e Al-Haddad et al. (1999), por um único Patologista. A intensidade da coloração nuclear na neoplasia foi graduada numa escala de 0 (zero) a 3 (três), usando como referência (intensidade 2) a coloração de células não malignas adjacentes à neoplasia. Casos sem controles internos válidos foram excluídos. Utilizando microscopia óptica convencional numa magnificação de 400 vezes, a porcentagem de núcleos corados de células neoplásicas foi avaliada em cerca de 1000 células neoplásicas e um escore

proporcional foi atribuído à porcentagem estimada de núcleos corados: 0 se 0%; 0,1 se 1 a 9%; 0,5 se 10 a 49% e 1,0 se 50% ou mais dos núcleos de células neoplásicas estivessem corados. Este escore proporcional foi então multiplicado pela intensidade de coloração nuclear para se obter um escore final semiquantitativo H, para cada caso.

3.5. Extração de ácidos nucleicos

DNA genômico e RNA total foram extraídos de linfonodo livre de neoplasia à microscopia óptica e tumor primário, respectivamente, fixados em formaldeído e emblocados em parafina com o Kit *RecoverAllTotal Nucleic Acid Isolation* (Ambion, Austin, TX, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada amostra, 3 a 4 cortes com 10-20 µm de espessura foram coletados em micro-tubo de 2 mL. Tais cortes do tumor primário tinham evidente predomínio da neoplasia. Para desparafinização, os cortes foram tratados com 1 mL de xileno 100% e rapidamente homogeneizados, seguido de incubação em banho-maria a 50°C durante 3 minutos. Após centrifugação a 13.000 g por 5 minutos desprezou-se o sobrenadante e foram feitas 2 lavagens do precipitado com etanol 100% e centrifugação a 13.000 g por 5 minutos a cada lavagem. Ao final o máximo possível de etanol foi removido com pipeta e o precipitado foi deixado secar na temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, ao precipitado foram adicionados 400 µL de tampão de digestão e 4 µL de protease, sendo então feita incubação em banho-maria a 50°C durante 3 horas para extração de

RNA e por 48 horas para extração do DNA. Na extração de RNA uma incubação a 70°C por 20 minutos foi adicionada para aumentar a recuperação de fragmentos de RNA de maior tamanho. Para separação do ácido nucléico foram adicionados 480 µL “*Isolation additive*” em cada amostra. Após homogenização e adição de 1,1 mL de etanol 100%, 700 µL dessa mistura foram filtrados num sistema de filtro em microtubo com auxílio de centrifugação a 10.000 g por 30 segundos. O efluente era resgatado e a operação repetida até esgotar todo volume da mistura, operação de filtragem esta repetida 3 vezes.

Para recuperação do RNA a amostra foi tratada com uma mistura contendo DNase e incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Para a recuperação do DNA o tratamento realizado foi com uma solução contendo RNase A. Após sucessivas lavagens com soluções contendo concentrações diferentes de etanol o RNA total ou o DNA foi recuperado do filtro com adição de 60 µL de água livre de nucleases previamente aquecida a 95°C.

3.6. Expressão do RNA mensageiro de *ERCC1*

O método de RT-PCR (transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real ou *real-time reverse transcriptase PCR*) foi utilizado para determinação da expressão do mRNA de *ERCC1* em tecido de tumor primário. A expressão do mRNA foi normalizada em relação à expressão da fração 18S do RNA ribossomal. Os ensaios foram realizados

em duplicata e foi aceito uma variação entre a duplicata menor que 1,0 no seu C_t (ciclo do *Threshold*). Além disso, houve em todos os ensaios uma mesma amostra aleatoriamente escolhida como referência e um controle negativo no qual não foi adicionado o cDNA (DNA complementar).

De 1 a 5 μ g do RNA total foram utilizadas no ensaio de síntese de cDNA. O RNA total foi incubado a 70°C por 10 minutos com 40 η g de hexâmeros aleatórios, dNTP 100 μ M (desoxinucleotídeos-trifosfato) e água em volume final de 12 μ L. Após resfriamento em gelo por 2 minutos, adicionamos Tris-HCl 25 mM, KCl 37,6 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, DTT 5 mM e 40 unidades da enzima SuperScript III RNase H (MMLV modificada - Invitrogen Co., Carlsbad, CA, EUA). A mistura foi incubada a 50°C por uma hora e ao final a enzima foi inativada através de incubação a 70°C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas no freezer a 20°C negativos.

Para cada reação de PCR em tempo real foram usados 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 200 μ M de dNTP; 5% de DMSO (dimetil sulfóxido), 100 nM dos oligonucleotídeos senso e anti-senso para cada gene alvo, 1,0 mM de $MgCl_2$; 1,5 vezes de *SYBR Green*; 1,5 U de *Platinum[®] Taq DNA Polymerase* (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, EUA) e 100 η g do cDNA para determinação de *ERCC1* e 1 η g de cDNA para o determinação do RNA 18S, em um volume final de 20 μ L. As amostras foram amplificadas com uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, temperatura de hibridização a 60°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos. No final dos 40 ciclos foi

realizada a curva de desnaturação com aumento da temperatura no intervalo de 72°C a 95°C, sendo 1°C por etapa.

Os oligonucleotídeos usados foram desenhados com o auxílio do programa *Primer 3* Input (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies INC., IA, EUA):

ERCC1: senso: 5' GACTATGTGCTGGGCCAGAG 3'

ERCC1 antisenso: 5' GTAGCGGAGGCTGAGGAAC 3'

18S senso: 5' CGCCGCTAGAGGTGAAATTC 3'

18S antisenso: 5' TTGGCAAATGCTTTTCGCTC 3'

O resultado da PCR em tempo real foi analisado com auxílio do programa *Rotor-Gene 6* versão 6.0 (Corbett Research, Sydney, Austrália). Os resultados obtidos foram normalizados através do modelo matemático proposto por Pfaffl (2001):

$$R = (E_{\text{alvo}})^{\Delta C_T^{\text{alvo}}} / (E_{\text{normalizador}})^{\Delta C_T^{\text{normalizador}}}$$

Onde E_{alvo} corresponde à eficiência da amplificação dos oligonucleotídeos para o gene alvo e $E_{\text{normalizador}}$ corresponde à eficiência da amplificação dos oligonucleotídeos para o gene normalizador (18S). As eficiências foram calculadas como $10^{(-1/\text{slope})}$, sendo que o *slope* corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do C_T em função do log de diferentes quantidades de cDNA e uma eficiência de 100% da reação de equivale a 2. O $\Delta C_{T\text{alvo}}$ é a média do C_T do gene alvo na amostra

referência subtraída da média do C_T da amostra alvo. O $\Delta C_{T\text{normalizador}}$ por sua vez, é a média do C_T do gene normalizador na amostra referência subtraída da média do C_T da amostra normalizadora.

A curva de eficiência para o mRNA de ERCC1 foi traçada com quatro concentrações diferentes de cDNA (200 ng, 100 ng, 50 ng e 25 ng) e para o RNA 18S essas concentrações foram de 12,5 ng, 2,5 ng, 0,5 ng e 0,1 ng. Os valores de C_t para cada ponto foram imobilizados em um gráfico em relação a correspondente concentração de cDNA. A eficiência de amplificação (E) de cada oligonucleotídeo foi determinada pela seguinte equação:

$$E = 10^{(-1/a)} - 1$$

Onde, a é o valor do coeficiente angular determinado pela equação da reta $y = ax + b$.

A eficiência obtida para o gene *ERCC1* foi 2,1 e para o 18S foi 1,99 (figura 8).

3.7. Determinação de polimorfismos de nucleotídeo único no códon 118 do gene *ERCC1* (polimorfismo rs11615:T19007C)

O método da reação em cadeia da polimerase, associado com o polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição (PCR-RFLP, ou *polymerase chain reaction - restriction fragment lenght*

polymorphism) foi utilizado para determinação dos genótipos para o códon 118 do gene *ERCC1*.

Cerca de 50ng de DNA foram amplificados em 50µL de uma mistura contendo 200 µM de cada um dos desoxinucleotídeos trifosfatos, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ e 0,2 µM de cada oligonucleotídeo:

senso 5' GCAGAGCTCACCTGAGGAAC 3'

antisenso 5' GAGGTGCAAGAAGAGGTGGA 3'

Após uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, foram realizados 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, seguidos de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto da PCR de 208 pares de bases (pb) foi submetido à digestão com a enzima de restrição *BsrDI*. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose 3,0% contendo brometo de etídeo. No caso do genótipo C/C o tamanho do produto esperado é de 208 pb, ou seja, não ocorre fragmentação do produto da PCR. Para o genótipo C/T, ou seja, que apresenta um alelo com o polimorfismo, obtivemos um produto com três fragmentos: 208 pb, 128 pb e 80 pb. Para o genótipo T/T (polimorfismo nos dois alelos) temos dois fragmentos com 128 pb e 80 pb.

3.8. Considerações estatísticas

O melhor valor de corte para segregarmos pacientes em categorias (exemplo, considerados como alta ou baixa expressão do mRNA ou da

proteína estudada) foi obtido por análise de curva ROC, com a melhor sensibilidade e especificidade para cada característica estudada. As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier (1958) e o valor prognóstico dos fatores de risco clínico-patológicos, da expressão da proteína ERCC1, da expressão de mRNA de *ERCC1* e dos polimorfismos de *ERCC1* foi determinado pelo teste de log-rank. Análise de regressão de Cox (“stepwise procedure”) foi utilizada para avaliarmos a associação entre potenciais fatores prognósticos e sobrevida. Aqueles fatores prognósticos que apresentaram valores de $p < 0,1$ na análise univariada foram incluídos na análise multivariada.

Comparações entre médias foram efetuadas com o teste *t* pareado. Frequências foram comparadas com o teste exato de Fisher ou qui-quadrado, conforme o caso. Para correlacionar (medida de associação) variáveis discretas (como escore H, por exemplo), utilizamos a correlação de Spearman.

A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$ para os testes bicaudados.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa MedCalc (MedCalc, Mariakerk, Bélgica), versão 9.3.2.0.

3.9. Aspectos regulatórios

Este estudo foi aprovado pela 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 27 de junho de 2008, protocolo 0386/08 (ver anexo).

Figura 8 - Representação do ensaio de PCR em tempo real para determinação da eficiência dos oligonucleotídeos para amplificação do mRNA de *ERCC1* (A) e do RNA ribossomal 18S (B). Em cada quadro, (de cima para baixo) estão representadas as curvas de concentração, os gráficos da intensidade de fluorescência pelo número de ciclos para a determinação do C_t (ciclo de *threshold*) de cada concentração e as curvas de desnaturação, onde o único pico apresenta a especificidade da reação. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Características dos pacientes

No período de 1998 a 2007, foram identificados 69 pacientes que obedeceram aos critérios de elegibilidade descritos anteriormente. A idade mediana foi 56 anos, variando de 25 a 79 anos. Destes pacientes, 56 eram homens (81%).

4.2. Características da neoplasia

Todos os pacientes eram portadores de carcinoma epidermóide. A distribuição de acordo com o sítio primário da neoplasia é mostrada na tabela 3. O sítio primário mais frequente foi a cavidade oral (28 pacientes, 41%), seguido por laringe (22 pacientes, 32%), hipofaringe (11 pacientes, 16%) e orofaringe (8 pacientes, 12%).

Em termos do estadiamento pTNM, mostrado na tabela 4, 54 pacientes (78%) apresentavam tumor primário com estadiamento pT3 ou pT4, e 40 pacientes (58%) apresentavam linfonodos cervicais com estadiamento pN2 ou pN3. Dez pacientes (14%) foram classificados como sendo estágio patológico III e 59 pacientes (86%) como estágio patológico IV. A mediana do tamanho tumoral foi 3,5 cm (intervalo, 1,2 – 11 cm) e a mediana do tamanho da profundidade da invasão tumoral foi 1,9 cm (intervalo, 0,2 – 6,5 cm).

Características anatomopatológicas relacionadas ao prognóstico da neoplasia são mostradas na tabela 5. De acordo com o grau de diferenciação, a maioria dos pacientes apresentava grau de diferenciação dois (36 pacientes, 52%). Invasão linfovascular foi identificada em 25 casos (36%), invasão perineural em 40 casos (58%) e as margens foram consideradas como positivas/exíguas em 18 casos (26%). A mediana do número de linfonodos dissecados foi 46 (intervalo, 14 - 153) considerando-se os 69 pacientes incluídos no estudo. Nestes, a mediana do número de linfonodos positivos (comprometidos pela neoplasia) foi dois (intervalo, 0 - 46). Quando presentes, a mediana do número de linfonodos positivos foi três (intervalo, 1 - 46). Pelo menos dois linfonodos comprometidos foram encontrados em 43 pacientes (62%). Extravazamento extra-capsular da doença linfonodal foi identificado em 27 pacientes (39%).

Tabela 3 – Distribuição dos 69 pacientes de acordo com o sítio primário da neoplasia

Sítio primário	Subsítio	N	%
Cavidade oral		28	41
	Língua	16	
	Rebordo gengival	1	
	Assoalho da boca	10	
	Área retromolar	1	
Orofaringe		8	12
	Base da língua	4	
	Pálato mole	2	
	Tonsila	2	
Hipofaringe		11	16
	Seio piriforme	11	
Laringe		22	32
	Transglótico	14	
	Glótico	3	
	Supraglótico	5	

N corresponde ao número de pacientes e %, porcentagem do total

Tabela 4 – Distribuição dos pacientes de acordo com o estadiamento pTNM*

	pT1	pT2	pT3	pT4	Total
pN0	-	-	2	7	9
pN1	1	4	3	12	20
pN2	2	8	7	20	37
pN3	-	-	1	2	3
Total	3	12	13	41	69

*Os pacientes foram classificados de acordo com o tamanho do tumor primário (T1, T2, T3, T4), e segundo o *status* nodal (N0, N1, N2, N3), segundo a classificação TNM (Greene et al., 2002).

De um modo geral, fatores prognósticos anatomopatológicos de alto risco foram identificados em 40 pacientes (58%) e de risco intermediário em 29 pacientes (42%).

4.3. Características do tratamento adjuvante

Todos os pacientes foram tratados com intenção curativa. Embora estivesse fora do escopo deste trabalho descrever e avaliar as características do tratamento adjuvante oferecido a estes pacientes, foram avaliados alguns aspectos dadas as possíveis implicações prognósticas de variações do mesmo. Detalhes em relação ao planejamento da radioterapia, como número e tamanho de campos e fonte de radiação, não foram coletados.

O tempo mediano entre a cirurgia e o início da radioterapia adjuvante foi de 2,9 meses (1,3 – 10,6 meses). Todos os pacientes foram tratados com fracionamento convencional da radiação, isto é, somente uma fração diária de radiação foi administrada, cinco dias por semana. O tempo mediano de radioterapia para os 69 pacientes foi 56 dias (intervalo, 37 – 134 dias). A tabela 6 detalha a duração da radioterapia administrada e planejada.

O número mediano de ciclos administrados de cisplatina foi três (intervalo, 1 - 3). Todos os pacientes receberam o primeiro ciclo de cisplatina e a dose mediana administrada foi de 100 mg/m² neste ciclo. Sessenta e um (88%) e 42 pacientes (61%) receberam o segundo e o terceiro ciclo de cisplatina, respectivamente, sendo a dose mediana administrada de cisplatina de 100 mg/m² nestes ciclos. A mediana da intensidade de dose de cisplatina administrada foi de 31,4 mg/m²/semana e a média foi de 30,2 ± 11,1 mg/m²/semana.

A mediana do tempo global de tratamento, ou seja, o intervalo de tempo entre a cirurgia e o fim da quimiorradioterapia adjuvante foi de 21 semanas (intervalo, 13 - 54).

Tabela 5 – Distribuição dos pacientes de acordo com a presença de fatores prognósticos anatomopatológicos

Característica anatomopatológica	N	%
Grau de diferenciação da neoplasia		
1	24	35
2	36	52
3	9	13
Invasão linfovascular		
Presente	25	36
Ausente	44	64
Invasão perineural		
Presente	40	58
Ausente	29	42
Comprometimento das margens		
Presente	18	26
Ausente	51	74
Número de linfonodos positivos		
Zero ou um	26	38
Dois ou mais	43	62
Extravazamento extracapsular da doença nodal		
Presente	27	39
Ausente	42	61
N corresponde ao número de pacientes e %, porcentagem do total		

Tabela 6 - Descrição da radioterapia administrada aos 69 pacientes em relação ao tempo total deste tratamento

Dose planejada de RT (Gy)	N	%	Dose de RT administrada (Gy) (média ± DP)	Duração da RT (dias)		
				Planejada	Administrada	Diferença
60	13	19	60 ± 0	42	56	14
66	43	62	65,8 ± 0,6	45	56	11
70	10	14	70 ± 0	49	61	12
Outros*	2	3	-	-	-	-
Sem informação	1	1	-	-	-	-

*50 Gy, 64 Gy; N corresponde ao número de pacientes e %, porcentagem do total;

DP: desvio padrão; RT: radioterapia

4.4. Desfechos observados

A data final considerada como fim da observação neste estudo foi 31 de março de 2009. O seguimento mediano para os pacientes vivos ao final deste período de observação foi de 47 meses (intervalo, 6 – 91 meses), contando-se a partir do final da quimiorradioterapia adjuvante. Neste seguimento, observou-se 11 recidivas loco-regionais, sete recidivas a distância, 10 casos com segundo tumor primário (sendo quatro com primário em pulmão, quatro em esôfago, um em via biliar e um em próstata) e 30 óbitos (22 pela doença). Ao final deste seguimento, 39 pacientes estavam

vivos e 29 destes permaneciam sem evidências de recidiva. A figura 9 mostra os desfechos observados para os 69 pacientes incluídos neste estudo.

Figura 9 – Fluxograma mostrando o desfecho dos 69 pacientes incluídos neste estudo

A sobrevida global mediana observada foi 52,5 meses, com sobrevida global em cinco anos de 40%, e a sobrevida livre de doença mediana foi 36,6 meses, com sobrevida livre de doença em cinco anos de 31%, estimadas pelo método de Kaplan-Meier (figura 10a e 10b).

Figura 10 – Gráfico de (a) sobrevida global e (b) sobrevida livre de doença, dos 69 pacientes incluídos no estudo, de acordo com o método de Kaplan-Meier. Intervalo de confiança de 95% é mostrado.

4.5. Prognóstico de acordo com variáveis de risco clínicas e anatomopatológicas

O valor prognóstico das variáveis clínicas e anatomopatológicas de risco em termos de sobrevida livre de doença e sobrevida global é mostrado na tabela 7.

Em termos de sobrevida livre de doença, observou-se maior sobrevida livre de doença mediana nos pacientes com idade inferior a 56 anos (50,3 *versus* 27,7 meses, HR 0,53, 95%CI 0,27 – 0,98, $p=0,043$), e uma tendência à maior sobrevida livre de doença mediana naqueles pacientes cuja neoplasia apresentava grau 2 ou 3 em comparação àqueles com neoplasia grau 1 (42,1 *versus* 23,2 meses, HR 1,77, 95%CI 0,95 - 3,85, $p=0,071$).

Nenhuma das variáveis clínicas ou anatomopatológicas estudadas teve impacto em termos sobrevida global mediana que alcançasse significância estatística. Os pacientes com idade inferior a 56 anos (não alcançada *versus* 43,2 meses, HR 0,51, 95%CI 0,24 – 1,03, $p=0,060$) e do sexo feminino (não alcançada *versus* 48,7 meses, HR 0,37, 95%CI 0,20 – 1,11, $p=0,085$) apresentaram uma tendência à maior sobrevida global mediana.

Tabela 7 – Características clínicas e fatores de risco anatomopatológicos como variáveis prognósticas nos 69 pacientes estudados. Sobrevida global e sobrevida livre de doença mediana estimadas pelo método de Kaplan-Meier e diferenças avaliadas pelo *log-rank*.

	SLDm (meses)	HR	95% CI	p	SGm (meses)	HR	95%CI	p
Idade								
Até 56 anos	50,3	0,53	0,27-	0,043	N.A.	0,51	0,24-	0,060
56+ anos	27,7		0,98		43,2		1,03	
Sexo								
Masculino	30,0	0,49	0,26-	0,122	48,7	0,37	0,20-	0,085
Feminino	N.A.		1,17		N.A.		1,11	
pT								
pT1 – pT2	42,0	1,12	0,51-	0,786	N.A.	1,09	0,43-	0,854
pT3 – pT4	36,6		2,46		52,5		2,78	
pN								
pN0	28,5	1,14	0,46-	0,771	43,2	1,29	0,46-	0,604
pN+	36,6		2,86		52,5		3,78	
Estádio								
III	42,1	1,13	0,46-	0,784	48,5	1,27	0,46-	0,630
IV	36,0		2,82		53,8		3,67	
Sítio primário								
Cavidade oral, orofaringe	27,7	1,31	0,70- 2,44	0,397	48,7	1,29	0,63- 2,65	0,487
Hipofaringe, laringe	42,1				53,8			
Número de linfonodos comprometidos								
Zero ou um	28,5	1,15	0,60- 2,21	0,673	50,3	1,12	0,53- 2,38	0,771
Dois ou mais	37,7				53,8			
Grau histológico								
G1	23,2	1,77	0,95- 3,85	0,071	50,3	1,36	0,63- 3,03	0,418
G2 ou G3	42,1				58,7			
Invasão linfovascular								
Ausente	36,6	0,74	0,38- 1,39	0,335	58,7	0,72	0,33- 1,51	0,373
Presente	25,6				52,5			
Invasão perineural								
Ausente	46,3	0,93	0,49- 1,74	0,813	N.A.	0,76	0,37- 1,59	0,473
Presente	36,0				52,5			
Margens								
Livres	42,0	0,64	0,28- 1,28	0,187	52,5	0,79	0,34- 1,78	0,552
Positivas/exíguas	14,1				58,7			
EEC								
Ausente	42,1	0,76	0,40- 1,43	0,386	N.A.	0,73	0,35- 1,51	0,392
Presente	27,7				48,5			

SLPm: sobrevida livre de progressão mediana; SGm: sobrevida global mediana;

N.A.: não alcançada; EEC: extravasamento extracapsular

4.6. Prognóstico de acordo com características do tratamento administrado

Como já mencionado, o tempo mediano entre a cirurgia e o início da radioterapia adjuvante foi de 2,9 meses (1,3 – 10,6 meses), o tempo mediano de radioterapia para os 69 pacientes foi 56 dias (intervalo, 37 – 134 dias), o número mediano de ciclos administrados de cisplatina foi três (intervalo, 1 - 3) e a mediana do tempo global de tratamento, ou seja, o intervalo de tempo entre a cirurgia e o fim da quimiorradioterapia adjuvante foi de 21 semanas (intervalo, 13-54). Avaliando o impacto prognóstico destas características na sobrevida global e na sobrevida livre de progressão, observou-se maior sobrevida global (sem alcançar significância estatística) nos pacientes que receberam três ciclos de cisplatina em comparação àqueles que receberam menos de três ciclos (58,7 *versus* 37,7 meses, HR 0,63, 95%CI 0,29 - 1,30, p=0,204).

4.7. Expressão de ERCC1 por imunohistoquímica

A avaliação da expressão da proteína ERCC1 por imunohistoquímica foi realizada em amostras de 59 pacientes. Não foi possível obtenção dos blocos de parafina de 10 pacientes para esta análise. A figura 11 apresenta dois casos com escore H de 0 e 3,0. O escore H mediano da expressão de ERCC1 foi 2,0 (média $1,78 \pm 1,14$; intervalo, 0 – 3,0). O histograma da distribuição dos escores obtidos é mostrado na figura 12.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em termos de frequências de sítio primário, acometimento linfonodal, grau histológico, presença de invasão linfovascular, presença de invasão perineural, positividade de margens e presença de extravazamento extracapsular entre os 69 pacientes incluídos no estudo e os 59 cujas amostras foram avaliadas por imunohistoquímica.

A fim de discriminar os pacientes cuja neoplasia apresentava alta ou baixa expressão desta proteína, utilizamos uma análise ROC e o melhor valor de corte do escore H obtido que discriminava os pacientes vivos e mortos foi 1,5 (sensibilidade 61%, especificidade 68%, área sob a curva ROC 0,63, erro padrão 0,07, 95%CI 0,49 – 0,75, $p=0,081$). Assim, aqueles 32 pacientes (54%) cujo escore H era superior a 1,5 foram considerados como portadores de neoplasia com alta expressão de ERCC1.

Na tabela 8 é mostrada a distribuição das características dos pacientes de acordo com o escore H. O escore H teve uma tendência, sem alcançar significância estatística, a ser maior naqueles pacientes mais jovens ($p=0,074$), do sexo feminino ($p=0,092$) e no estágio III ($p=0,092$). Nenhuma das outras características avaliadas mostrou diferença em relação à expressão de ERCC1 por imunohistoquímica.

Como mostrado na figura 13, naqueles pacientes cujo tumor primário apresentou escore $H > 1,5$ observamos maior taxa de sobrevida global em cinco anos (50% *versus* 18%, HR 0,43, 95%CI 0,20 - 0,90, $p=0,026$). Não se observou diferença em relação à taxa de sobrevida livre de doença em cinco anos quando comparamos os pacientes com alta e baixa expressão de

ERCC1 (respectivamente, 28% *versus* 16%, HR 0,67, 95%CI 0,34-1,26, $p=0,210$).

Figura 11 – Expressão imunohistoquímica de ERCC1 (x 400; anticorpo anti-ERCC1 Ab-2, clone 8F1, NeoMarkers), representando: (a) escore H: $3 \times 1,0 = 3,0$; (b) escore H: $0 \times 0 = 0$

Figura 12 – Histograma de distribuição dos escores H da expressão imunohistoquímica de ERCC1 em amostras de 59 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. No eixo das ordenadas é mostrado o número de pacientes (% , porcentagem do total) e no eixo das abscissas, os valores obtidos do escore H.

Tabela 8 – Distribuição das características dos 59 pacientes de acordo com a expressão de ERCC1 por imunohistoquímica (escore H).

Característica	ERCC1 (baixa) Escore H $\leq$ 1,5 (N = 27)		ERCC1 (alta) Escore H $>$ 1,5 (N = 32)		p
	n	%	n	%	
Idade					
Até 56 anos	8	30	18	56	0,074
56+ anos	19	70	14	44	
Sexo					
Masculino	25	93	24	75	0,092
Feminino	2	7	8	25	
pT					
pT1 – pT2	3	11	10	31	0,113
pT3 – pT4	24	89	22	69	
pN					
pN0	5	19	2	6	0,229
pN+	22	81	30	94	
Estádio					
III	2	7	8	25	0,092
IV	25	93	24	75	
Sítio primário					
Cavidade oral ou orofaringe	12	44	21	66	0,171
Hipofaringe ou laringe	15	56	11	34	
Número de linfonodos comprometidos					
Zero ou um	11	41	12	38	0,989
Dois ou mais	16	59	20	62	
Grau histológico					
G1	9	33	13	41	0,759
G2 ou G3	18	67	19	59	
Invasão linfovascular					
Ausente	16	59	20	62	0,989
Presente	11	41	12	38	
Invasão perineural					
Ausente	9	33	16	50	0,305
Presente	18	67	16	50	
Comprometimento das margens					
Ausente	18	67	25	78	0,489
Presente	9	33	7	22	
Extravazamento extracapsular					
Ausente	15	56	21	66	0,602
Presente	12	44	11	34	

n corresponde ao número de pacientes e %, porcentagem do total

Figura 13 – Gráfico de (a) sobrevida global (HR 0,43, 95%CI 0,20 - 0,90, $p=0,026$) e (b) sobrevida livre de doença (HR 0,67, 95%CI 0,34 – 1,26, $p=0,210$), de 59 pacientes incluídos no estudo, estimadas pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com a expressão imunohistoquímica de ERCC1 (escore H). Diferença entre as curvas avaliada pelo método de *log-rank*.

4.8. Expressão do RNA mensageiro de *ERCC1*

Expressão do RNA mensageiro de *ERCC1* foi determinada em 45 pacientes e normalizada em relação à expressão da fração 18S do RNA ribossomal. Em dez pacientes não obtivemos os blocos de parafina respectivos, em outros dez pacientes o RNA extraído se encontrava degradado e em quatro pacientes a quantidade de RNA extraído foi insuficiente para a análise.

A mediana de expressão normalizada do mRNA de *ERCC1* no tumor primário nestes 45 pacientes foi 2,58 (intervalo, 0,25 – 19,26). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em termos de frequências de sexo, idade, estadiamento, sítio primário, acometimento linfonodal, grau histológico, presença de invasão linfovascular, presença de invasão perineural, positividade de margens e presença de extravazamento extracapsular entre os 69 pacientes incluídos no estudo e os 45 cujas amostras de tumor primário foram avaliadas para expressão do mRNA de *ERCC1*.

Na tabela 9 é mostrada a distribuição das características dos pacientes de acordo com a expressão do mRNA de *ERCC1*. O valor de corte da expressão normalizada de mRNA de *ERCC1* que melhor discriminou pacientes vivos e mortos foi 3,10 pela curva ROC (sensibilidade 89%, especificidade 48%, área sob a curva ROC 0,58, erro padrão 0,09, 95%CI 0,43 – 0,73, $p=0,335$) e aqueles 15 pacientes (33%) cuja expressão

normalizada do mRNA foi superior a 3,10 foram classificados como de alta expressão. Esta expressão foi marginalmente maior nos pacientes cuja neoplasia apresentava invasão linfovascular ($p=0,054$). Nenhuma das outras características avaliadas mostrou diferença em relação à expressão normalizada do mRNA de *ERCC1*.

Os pacientes com alta expressão do mRNA da *ERCC1* apresentaram maior taxa de sobrevida global em cinco anos em comparação com aqueles de baixa expressão (86% versus 31%, HR 0,26, 95%CI 0,14-1,01, $p=0,052$), conforme mostrado na figura 14. Não se observou diferença em relação taxa de sobrevida livre de doença em cinco anos entre os pacientes com alta e baixa expressão normalizada de *ERCC1* (respectivamente, 55% versus 13%, HR 0,46, 95%CI 0,23-1,15, $p=0,106$). A correlação de Spearman (figura 15) entre o escore H e a expressão do mRNA de *ERCC1* em 44 pacientes mostrou um coeficiente rho 0,073 (95% CI: -0,23 a 0,36, $p=0,632$). O teste de qui-quadrado entre categorias de expressão da proteína ERCC1 e do mRNA não alcançou significância (qui-quadrado = 0,000, $p=0,988$).

Usando análise multivariada de modelo de riscos proporcionais de Cox, o escore H ($> 1,5$ versus $\leq 1,5$; HR ajustado 0,20, 95%CI 0,07-0,57, $p=0,003$) e a expressão normalizada do mRNA de *ERCC1* ($> 3,1$ versus $\leq 3,1$; HR ajustado 0,12, 95%CI 0,03-0,59, $p=0,009$), permaneceram significantes do ponto de vista estatístico, como fatores prognósticos após ajuste por sexo e idade.

Tabela 9 – Distribuição das características dos 45 pacientes de acordo com a expressão normalizada do mRNA de *ERCC1*.

	Baixa expressão mRNA $\leq 3,10$ N=30		Alta expressão mRNA $> 3,10$ N=15		p
	n	%	n	%	
Idade					
Até 56 anos	13	43	6	40	1,000
56+ anos	17	57	9	60	
Sexo					
Masculino	26	87	12	80	0,670
Feminino	4	13	3	20	
pT					
pT1 – pT2	6	20	3	20	1,000
pT3 – pT4	24	80	12	80	
pN					
pN0	5	17	2	13	1,000
pN+	25	83	13	87	
Estádio					
III	6	20	1	7	0,395
IV	24	80	14	93	
Sítio primário					
Cavidade oral ou orofaringe	17	57	6	40	0,461
Hipofaringe ou laringe	13	43	9	60	
Número de linfonodos comprometidos					
Zero ou um	14	47	6	40	0,916
Dois ou mais	16	53	9	60	
Grau histológico					
G1	13	43	5	33	0,747
G2 ou G3	17	57	10	67	
Invasão linfovascular					
Ausente	14	47	12	80	0,054
Presente	16	53	3	20	
Invasão perineural					
Ausente	14	47	8	53	0,916
Presente	16	53	7	47	
Comprometimento das margens					
Ausente	24	80	11	73	0,710
Presente	6	20	4	27	
Extravazamento extracapsular					
Ausente	20	67	10	67	1,000
Presente	10	33	5	33	

mRNA: expressão do RNA mensageiro de *ERCC1*; n corresponde ao número de

pacientes e %, porcentagem do total

Figura 14 - Gráfico de (a) sobrevida global (HR 0.26, 95%CI 0.14-1.01, $p=0.052$) e (b) sobrevida livre de doença (HR 0.46, 95%CI 0.23-1.15, $p=0.106$), de 45 pacientes incluídos no estudo, estimadas pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com a expressão normalizada do RNA mensageiro de *ERCC1*. Diferença entre as curvas avaliada pelo método de *log-rank*.

Figura 15 – Correlação de Spearman entre o escore H e a expressão do RNA mensageiro de *ERCC1*, em 44 pacientes. Coeficiente rho 0,073 (95% CI: -0,23 a 0,36, $p=0,632$).

4.9. Genotipagem do códon 118 de *ERCC1* (polimorfismo rs11615:T19007C)

A genotipagem do códon 118 de *ERCC1* a partir do DNA genômico extraído de linfonodos normais (sem evidência de células neoplásicas na análise anatomopatológica convencional) foi possível de ser realizada em 49 pacientes (figura 16). Em dez pacientes não obtivemos os blocos de parafina respectivos, em outros sete pacientes o DNA extraído se encontrava degradado e em três pacientes a quantidade de RNA extraído foi insuficiente para a análise. As frequências de C/C, C/T e T/T observadas foram 37%,

39% e 24%, respectivamente. Este polimorfismo obedeceu o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos pacientes estudados (Qui-quadrado = 2,242, $p=0,326$) para as frequências dos alelos C e T. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em termos de frequências de sexo, idade, estadiamento, sítio primário, acometimento linfonodal, grau histológico, presença de invasão linfovascular, presença de invasão perineural, positividade de margens e presença de extravazamento extracapsular entre os 69 pacientes incluídos no estudo e os 49 avaliados para genotipagem do polimorfismo rs11615:T19007C.

Figura 16 – Foto do eletroforograma em gel de agarose 3% da análise dos produtos da reação em cadeia da polimerase – polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição do polimorfismo (RFLP) de *ERCC1* rs11615:T19007C (Asn118Asn), após digestão com *Bsr*DI. A análise de RFLP do fragmento de 208 pares de base (pb) mostra os genótipos C/C (208 pb), C/T (208, 128 e 80 pb) e T/T (128 e 80 pb). Em 1 e 2, genótipo C/T; em 3 – 5, genótipo C/C; em 6 e 7, genótipo T/T; M, marcador 50 pb; 8, controle negativo.

Na tabela 10 é mostrada a distribuição das características dos pacientes de acordo com a genotipagem de *ERCC1*. As características estudadas não mostraram diferentes frequências entre os genótipos. A expressão do mRNA de *ERCC1* não foi diferente entre os pacientes com genótipos C/C, ou C/T e T/T ($p=0,758$).

Não se observou diferenças entre os genótipos C/C, C/T e T/T seja em termos de taxa de sobrevida global em cinco anos (respectivamente, 45%, 46%, 46%; $p=0,808$), seja em termos de taxa de sobrevida livre de doença em cinco anos (31%, 34%, 20%, $p=0,770$), conforme mostrado na figura 17.

Tabela 10 – Distribuição das características dos 49 pacientes de acordo com a genotipagem de *ERCC1*.

	Genótipo C/C		Genótipo C/T ou T/T		p
	N=18		N=31		
	n	%	n	%	
Idade					
Até 56 anos	9	50	15	48	0,851
56+ anos	9	50	16	52	
Sexo					
Masculino	15	83	24	77	0,726
Feminino	3	17	7	23	
pT					
pT1 – pT2	2	11	9	29	0,178
pT3 – pT4	16	89	22	71	
pN					
pN0	4	22	2	6	0,175
pN+	14	78	29	94	
Estádio					
III	1	6	6	19	0,238
IV	17	94	25	81	
Sítio primário					
Cavidade oral ou orofaringe	8	44	18	58	0,533
Hipofaringe ou laringe	10	56	13	42	
Acometimento linfonodal					
Zero ou um	6	33	14	45	0,610
Dois ou mais	12	67	17	55	
Grau histológico					
G1	6	33	13	42	0,771
G2 ou G3	12	67	18	58	
Invasão linfovascular					
Ausente	12	67	17	55	0,610
Presente	6	33	14	45	
Invasão perineural					
Ausente	6	33	18	58	0,170
Presente	12	67	13	42	
Comprometimento das margens					
Ausente	13	72	25	81	0,744
Presente	5	28	6	19	
Extravazamento extracapsular					
Ausente	12	67	17	55	0,610
Presente	6	33	14	45	

n corresponde ao número de pacientes e %, porcentagem do total

Figura 17 – Gráfico de (a) sobrevida global ($p=0,808$) e (b) sobrevida livre de doença ($p=0,770$) de 49 pacientes incluídos no estudo, estimadas pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com o genótipo rs11615:T19007C. Diferença entre as curvas avaliada pelo método de *log-rank*.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Avaliamos aqui a expressão de *ERCC1* tal como o polimorfismo de nucleotídeo único T19007C de *ERCC1* como marcadores prognósticos em pacientes diagnosticados com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço de risco alto ou intermediário, e tratados com cirurgia e quimiorradioterapia adjuvante baseada em cisplatina. Aqueles pacientes que apresentaram expressão mais elevada de *ERCC1*, seja ao nível protéico ou ao nível de RNA mensageiro, apresentaram melhor prognóstico. Tal resultado está de acordo com àqueles já descritos em pacientes portadores de câncer de pulmão não pequenas células e câncer do esôfago tratados com cirurgia apenas (Simon et al., 2005; Olaussen et al., 2006; Zheng et al., 2007; Kim et al., 2008). Considerando-se a dualidade do papel de *ERCC1* nestes pacientes, poderíamos supor que o reparo de DNA mais eficiente (via NER) após quimiorradioterapia adjuvante baseada em cisplatina, favoreceu reduzir o acúmulo de mutações no DNA e retardou a ocorrência de eventos moleculares relacionados à progressão da neoplasia (Wei et al., 2000; Gazdar et al., 2007), interferindo assim favoravelmente na evolução destes pacientes.

Outros autores avaliaram o valor prognóstico da expressão imunohistoquímica de *ERCC1* através do escore H em pacientes portadores de CECCP localmente avançado. No trabalho de Handra-Luca et al. (2007), em pacientes submetidos a quimioterapia de indução contendo cisplatina, verificou-se maior taxa de resposta (*odds ratio* 4,3, $p=0,01$) e uma sobrevida

global mediana numericamente superior (40,5 *versus* 27,7 meses, $p=0,25$) nos pacientes com escore H menor que 3. Entre os 45 pacientes avaliados por Jun et al. (2008), tratados com quimiorradioterapia concomitante contendo cisplatina, observou-se maior taxa de resposta completa (83% *versus* 52%, $p=0,010$) e maior sobrevida global em 3 anos (91,7% *versus* 45,5%, $p=0,013$) e menor mortalidade na análise multivariada (HR 0,12, $p=0,043$) nos pacientes com escore H menor que 2,0. Já nos 85 pacientes tratados com quimioterapia de indução contendo cisplatina, seguido por radioterapia ou cirurgia como tratamento definitivo, na série publicada por Koh et al. (2009), escore H de ERCC1 não foi prognóstico em termos de sobrevida global ($p=0,470$), sobrevida livre de progressão ($p=0,275$) ou taxa de resposta ($p=0,419$).

A natureza retrospectiva destes três estudos mencionados (e do presente estudo) ajuda a explicar estes resultados aparentemente discrepantes. O presente é um estudo retrospectivo de natureza essencialmente exploratória e está sujeito aos vieses inerentes à sua natureza. O número baixo de casos aqui analisados pode também ser outra fonte de viés. A avaliação da expressão imunohistoquímica de ERCC1 está sujeita a algumas limitações, tais como aquelas relacionadas à técnica (especificidade do anticorpo, por exemplo), e à avaliação semi-quantitativa observador-dependente, com alta variação intra- e inter-observador, além dos diferentes valores de *cut-off* nos diferentes estudos. Devemos ainda ter em mente que as análises exploratórias dos biomarcadores foram aqui feitas a partir de blocos parafinados de materiais coletados, fixados e

armazenados em condições não controladas. Apesar disso, foi possível extrair DNA de linfonodos sem acometimento neoplásico para genotipagem de *ERCC1* e, sobretudo, conseguiu-se quantificar a expressão do mRNA de *ERCC1* a partir de amostras de tumor em blocos de parafina, dispensando material coletado a fresco e congelado ou mantido em fixadores especiais, por vezes técnicas custosas e não disponíveis rotineiramente.

Como ponto forte deste estudo, temos a uniformidade da população estudada: todos os pacientes foram submetidos à cirurgia com intenção curativa, apresentavam-se em estágio III ou IV e se encontravam na categoria de alto risco ou risco intermediário, além de serem tratados com o mesmo esquema de quimiorradioterapia contendo cisplatina.

Considerando-se os resultados obtidos nestes pacientes: sobrevida global de 52,5 meses e a sobrevida livre de progressão de 36,0 meses, com sobrevida global em cinco anos de 39% e sobrevida livre de progressão em cinco anos de 30%, os resultados observados são numericamente inferiores aos descritos nos estudos aleatorizados de fase III (Cooper et al., 2004; Bernier et al., 2004), onde o mesmo tratamento adjuvante oferecido aos pacientes aqui estudados foi avaliado prospectivamente. Embora nem sempre seja adequado comparar resultados de diferentes estudos, em termos dos desfechos avaliados, algumas hipóteses podem ser aventadas para o que foi aqui observado: (i) os pacientes aqui avaliados foram tratados dentro do contexto da assistência pública ao paciente do Sistema Único de Saúde, fora do contexto da pesquisa clínica; (ii) menor proporção de pacientes portadores de tumores com sítio primário na orofaringe (12%

neste estudo, em comparação a 48% em Cooper et al., 2004 e 32% em Bernier et al., 2004); (iii) maior frequência de margem comprometida (26%, em comparação a 17% em Cooper et al., 2004); (iv) a mediana total do tempo de tratamento global de paciente, ou seja, desde a cirurgia até o final da radioterapia, foi de 21 semanas. Sabe-se que tempo de tratamento global superior a 11 semanas é associado a pior prognóstico, pelo menos em pacientes tratados com radioterapia adjuvante exclusiva (Ang et al., 2001).

Nestes pacientes apresentando fatores de alto risco de recidiva e mortalidade pelo CECCP (margens positivas e extravazamento extracapsular da metástase linfonodal) tanto a radioterapia como a quimioterapia são essenciais no controle da doença loco-regional, prevenindo recidivas. Assim sendo, o grupo de pacientes com CECCP operados com baixa expressão de *ERCC1* seria o que teoricamente mais se beneficiaria de intensificação da radioterapia através do tratamento concomitante com cisplatina, pois teria pior prognóstico *a priori* e seria mais sensível à quimioterapia, por menor capacidade de reparo de DNA considerando-se apenas a via de NER. Tal hipótese poderia ser testada em futuros estudos clínicos.

Os resultados aqui apresentados sugerem que o polimorfismo genético T19007C:rs11615 no códon 118 do gene *ERCC1* não tem influência como fator prognóstico neste grupo de pacientes. A frequência aqui observada dos genótipos neste códon se aproxima daquela descrita por outros autores na população caucasiana (Krivak et al., 2008; Tibaldi et al., 2008; Warnecke-Eberz, 2009). Os mesmos polimorfismos foram

relacionados a diferentes taxas de resposta à quimioterapia baseada em derivados de platina e sobrevida em pacientes portadores de câncer do esôfago, câncer colorretal, câncer do ovário e câncer do pulmão não pequenas células (Isla et al., 2004; Smith et al., 2007; Chang et al., 2009; Warnecke-Eberz et al., 2009). Outro polimorfismo (C8092A:rs3212986) localizado na região 3' não traduzida do gene pode afetar a estabilidade do mRNA de *ERCC1* (Chen et al., 2000) e parece ter valor prognóstico em câncer do ovário e câncer do pulmão não pequenas células (Krivak et al., 2008; Takenaka et al., 2009).

Talvez mais importante que estudarmos um único polimorfismo, ao nível de um paciente individual, seja avaliarmos o seu conjunto de polimorfismos a fim de predizermos prognóstico e resposta a tratamentos. O acúmulo de variantes polimórficas de *ERCC1*, *XPB312*, *XPB751* e *XRCC1* diminuíram o risco de mortalidade por um fator de 2,1 e a presença das sete variantes polimórficas conferiram uma proteção de 175 vezes na publicação de Quintela-Fandino et al. (2006) em pacientes portadores de CECCP tratados com quimioterapia de indução baseada em cisplatina, como já mencionado. Este conjunto de polimorfismos analisados em conjunto, ou haplótipos, pode ser mais facilmente identificado através de técnicas de bioinformática que avaliam conjuntos dos “*tagging polymorphisms*”, como sugerido por Hopkins et al. (2008).

Outro ponto ainda a ser discutido seria o real valor de *ERCC1* na via NER. Pode-se aventar a hipótese que enzimas responsáveis pelo reconhecimento de aductos de DNA (como XPC) sejam tão ou mais

importantes a serem estudadas que o complexo de nucleases ERCC1-XPF, como fatores prognósticos e preditivos de resposta nestes pacientes portadores de CECCP. Este mecanismo ainda não é bem compreendido (Bergstralh e Sekelsky, 2008; Staresincic et al., 2009).

Assim sendo, é importante estudarmos as diversas vias de reparo de DNA em conjunto (Martin et al., 2008). Deficiência de *mismatch repair*, por *down-regulation* da expressão de hMLH1 ou por hipermetilação deste gene tem sido mostrado como fator de resistência à cisplatina, mas não à oxaliplatina, sugerindo que este derivado diaminociclohexano possa ser ativo em deficiência de *mismatch repair* (Scartozzi et al., 2006).

Avaliações de resposta a um determinado tratamento e impacto em sobrevida levando-se em consideração um único gene (*ERCC1* neste caso) não refletem a complexidade da regulação genética dos fatores determinantes de predição de resposta e de prognóstico, apesar de serem mais factíveis na prática clínica diária em termos de acesso a uma determinada tecnologia, e interpretação e aplicabilidade de resultados. Isso ajuda a explicar em parte os resultados aqui observados, pois poderíamos esperar pior prognóstico nos pacientes com tumores ERCC1-positivos, com reparo de DNA mais eficiente após quimiorradioterapia adjuvante baseada em cisplatina. Análises da expressão genética global de uma determinada neoplasia, utilizando-se de técnicas de DNA *microarray* têm o potencial de revelar biomarcadores com forte poder prognóstico e preditivo. Dados publicados por Chung et al. (2006) sugerem uma assinatura genética de alto risco, baseando-se na expressão de 75 genes, preditiva de recidiva da

doença, obtida a partir de material fixado em formol (*training set*) e testada em 60 amostras de tumor congelado de pacientes portadores de CECCP (*test set*). A diferença na sobrevida livre de recidiva entre pacientes de alto e baixo risco, classificados com o auxílio desta assinatura, alcançou significância estatística tanto no *training set* como no *test set* ($p=0,002$ e $0,03$, respectivamente). O conjunto de genes associado aos tumores de alto risco se mostrou rico em genes associados à transição epitélio-mesênquima, ativação da via do NF- κ B e adesão celular.

De qualquer modo, a inibição de reparo de DNA como arma terapêutica se encontra em fases avançadas de estudo clínico. Naquelas neoplasias onde sabidamente há deficiência no reparo de quebra de fita dupla com recombinação homóloga, como cânceres de mama que se originam no contexto de mutações nos genes *BRCA-1* e *BRCA-2*, a inibição de poli(adenosina difosfato [ADP]-ribose) polimerases, conhecidas como PARPs, leva ao acúmulo de quebras de fita única e quebras da dupla fita ao nível da forquilha de replicação, letais neste contexto das células neoplásicas deficientes em *BRCA-1* ou *BRCA-2* (Dantzer et al., 2000; Farmer et al., 2005; Bryant et al., 2005; McCabe et al., 2006; Ashworth et al., 2008). Inibidores da PARP-1, como olaparib e BSI-201, já em fase III de desenvolvimento, teriam elevado índice terapêutico, pois pelo descrito anteriormente, sua ação tóxica seria restrita àquelas células já deficientes no reparo de quebra de fita dupla com recombinação homóloga – as células neoplásicas no caso – poupando as demais células do organismo (com reparo normal), o que se conhece pelo nome de terapêutica letal sintética.

Os resultados preliminares em tumores de pacientes carreadores de mutações em *BRCA* e em câncer de mama triplo-negativo são bastante promissores (Fong et al., 2009; O'Shaughnessy et al., 2009).

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Com base nos dados aqui apresentados, podemos concluir que:

1. Alta expressão (escore H superior a 1,5) da proteína ERCC1 pelo tumor primário foi observada em 54% dos pacientes testados, portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço tratados com cirurgia com intenção curativa e quimiorradioterapia baseada em cisplatina, e foi associada a melhor prognóstico nestes pacientes, em comparação com aqueles pacientes cujos tumores apresentavam baixa expressão desta proteína.
2. Alta expressão normalizada do RNA mensageiro de *ERCC1* pelo tumor primário foi observada em 33% dos pacientes testados e também foi associada a melhor prognóstico, em comparação com aqueles pacientes cujos tumores apresentavam baixa expressão. Não houve correlação entre a expressão da proteína e do RNA mensageiro de *ERCC1*.
3. As frequências dos polimorfismos de nucleotídeo único no códon 118 de *ERCC1* (T19007C:rs11615) foram 37% C/C, 39% C/T e

24% T/T. Este polimorfismo genético não apresentou valor prognóstico nestes pacientes.

4. ERCC1 pode ser considerado como um fator prognóstico nesta população.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, et al. An Intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:92-8.

Al-Haddad S, Zhang Z, Leygue E, et al. Psoriasin (S100A7) expression and invasive breast cancer. *Am J Pathol*. 1999;155:2057-66.

Altaha R, Liang X, Yu JJ, et al. Excision repair cross complementing-group 1: gene expression and platinum resistance. *Int J Mol Med*. 2004;14:959-70.

Ang KK, Trotti A, Brown BW, et al. Randomized trial addressing risk features and time factors of surgery plus radiotherapy in advanced head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;51:571-8.

Ashworth A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancer deficient in DNA double-strand break repair. *J Clin Oncol*. 2008;26:3785-90.

Bergstralh DT, Sekelsky J. interstrand crosslink repair: can XPF-ERCC1 be let off the hook? *Trends Genet*. 2008;24:70-6.

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

Bernier J, Cooper JS, Pajak TF et al. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (#9501). *Head Neck*. 2005;27:843-50.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006;354:567-78.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Estimativas de Incidência e Mortalidade por Câncer, Rio de Janeiro (RJ). 2003.

Brizel DM, Albers ME, Fisher SR, et al. Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med*. 1998;338:1798-804.

Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234:177-86.

Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*. 2005;434:913-7.

Calais G, Alfonsi M, Bardet E, et al. Randomized trial of radiation versus concomitant chemotherapy and radiation for advanced-stage oropharynx carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:2081-6.

Carles J, Monzo M, Amat M, et al. Single-nucleotide polymorphisms in base excision repair, nucleotide excision repair, and double strand break genes as markers for response to radiotherapy in patients with Stage I to II head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;66:1022-30.

Chang MHC, Tzeng CH, Chen PM, et al. ERCC1 codon 118 C→T polymorphism associated with ERCC1 expression and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer Sci.* 2009;100:278-83.

Chen H, Sandler DP, Taylor JA, et al. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet.* 1996;347:295-7.

Chen P, Wiencke J, Aldape K, et al. Association of an ERCC1 polymorphism with adult-onset glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:843-7.

Choi YJ, Ryu KS, Ko YM, et al. Biophysical characterization of the interaction domains and mapping of the contact residues in the XPF-ERCC1 complex. *J Biol Chem.* 2005;280:28644-52.

Chung CH, Parker JS, Ely K, et al. Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor- κ B signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2006;66:8210-8.

Cleaver JE. Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:564-73.

Cobo M, Isla D, Massuti B, et al. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:2747-54.

Colvin M. Alkylating agents and platinum antitumor compounds. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR et al. (eds.). *Holland & Frei Cancer Medicine*. 6th ed. London: BC Decker; 2003.

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere A, et al. Precisely defining high-risk operable head and neck tumors based on RTOG #85-03 and #88-24: targets for postoperative radiochemotherapy? *Head Neck*. 1998;20:588-94.

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

Cozzi L, Fogliata A, Bolsi A, et al. Three-dimensional conformal vs. intensity-modulated radiotherapy in head-and-neck cancer patients: comparative analysis of dosimetric and technical parameters. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58:617-24.

Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, et al. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest*. 1994;94:703-8.

Dantzer F, de La Rubia G, Ménissier-De Murcia J, et al. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry*. 2000;39:7559-69.

de Boer J, Hoeijmakers JH. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. 2000;21:453-60.

de Castro G Jr, Snitcovsky IM, Gebrim EM, et al. High-dose cisplatin concurrent to conventionally delivered radiotherapy is associated with

unacceptable toxicity in unresectable, non-metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2007;264:1475-82.

de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 1999;13:768-85.

de Silva IU, McHugh PJ, Clingen PH. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2000;20:7980-90.

Eisbruch A. Intensity-modulated radiation therapy in the treatment of head and neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005;2:34-9.

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000;343:1350-4.

Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al. targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* 2005;434:917-21.

Ferry KV, Hamilton TC, Johnson SW. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. *Biochem Pharmacol.* 2000;60:1305-13.

Fietkau R, Lautenschläger C, Sauer R, et al. Postoperative concurrent radiochemotherapy versus radiotherapy in high-risk SCCA of the head and neck: Results of the German phase III trial ARO 96-3. *J Clin Oncol*. 2006;24 (suppl 18):5507.

Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*. 2009;361:123-34.

Fu KK, Pajak TF, Trotti A, et al. A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;48: 7-16.

Fundação Oncocentro de São Paulo. Disponível em www.fosp.saude.sp.gov.br. Acessado em 10 de julho de 2009.

Gazdar AF. DNA repair and survival in lung cancer – the two faces of Janus. *N Engl J Med*. 2007;356:771-3.

Gillet LC, Schärer OD. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev*. 2006;106:253-76.

Gossage L, Madhusudan S. Current status of excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in cancer. *Cancer Treat Rev*. 2007;33:565-77.

Goodman MF. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:17-50.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al, editors. AJCC Cancer Staging Handbook. 6th ed. New York: Springer-Verlag; 2002.

Hakem R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. EMBO J. 2008;27:589-605.

Handra-Luca A, Hernandez J, Mountzios G, et al. Excision repair cross complementation group 1 immunohistochemical expression predicts objective response and cancer-specific survival in patients treated by cisplatin-based induction chemotherapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2007;13:3855-9.

Hopkins J, Cescon DW, Tse D et al. Genetic polymorphisms and head and neck cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008;17:490-9.

Isla D, Sarries C, Rosell R, et al. Single nucleotide polymorphism and outcome in docetaxel-cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer. Ann Oncol. 2004;15:1194-203.

Jerónimo C, Varzim G, Henrique R, et al. I105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002;11:445-50.

Jiricny J, Nyström-Lahti M. Mismatch repair defects in cancer. Curr Opin Genet Dev. 2000;10:157-61.

Jun HJ, Ahn MJ, Kim HS, et al. ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. Br J Cancer. 2008;99:167-72.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53:457-81.

Kim MK, Cho KJ, Kwon et al. Patients with ERCC1-negative locally advanced esophageal cancaers may benefit from preoperative chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res.* 2008;14:4225-31.

Koh Y, Kim TM, Jeon YK, et al. Class III β -tubulin, but not ERCC1, is a strong predictive and prognostic marker in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2009;20:1414-9.

Krivak TC, Darcy KM, Tian C, et al. Relationship between ERCC1 polymorphisms, disease progression, and survival in the Gynecologic Oncology Group phase III trial of intraperitoneal versus intravenous cisplatin and paclitaxel for stage III epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:3598-606.

Langendijk JA, de Jong MA, Leemans CR, et al. Postoperative radiotherapy in squamous cell carcinoma of the oral cavity: the importance of the overall treatment time. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;57:693-700.

Lord RV, Brabender J, Gandara D, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8:2286-91.

Madhusudan S, Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev.* 2005;31:603-17.

Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res.* 2008;14:1291-5.

McCabe N, Turner NC, Lord CJ, et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res.* 2006;66:8109-15.

Merlano M, Benasso M, Corvo R, et al. Five-year update of a randomized trial of alternating radiotherapy and chemotherapy compared with radiotherapy alone in treatment of unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:583-9.

Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1998;16:309-16.

Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, et al. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol.* 2004;24:5776-87.

Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med.* 2006;355:983-91.

O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen J, et al. Efficacy of BSI-201, a poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) inhibitor, in combination with gemcitabine/carboplatin (G/C) in patients with metastatic triple-negative breast cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol.* 2009;27(15S Pt II):793s.

Park CJ, Choi BS. The protein shuffle. Sequential interactions among components of the human nucleotide excision repair pathway. *FEBS J*. 2006;273:1600-8.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*. 2001;94:153-6.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:74-108.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:e45.

Pignon JP, le Maître A, Maillard E, et al. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-HN): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol*. 2009;92:4-14.

Quintela-Fandino M, Hitt R, Medina PP, et al. 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;24:4333-9.

Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 1965;205:698-9.

Rosenberg B, Van Camp L, Grimley EB, et al. The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum (IV) complexes. *J Biol Chem*. 1967;242:1347-52.

Rosenthal DI, Liu L, Lee JH, et al. Importance of the treatment package time in surgery and postoperative radiation therapy for squamous carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 2002;24:115-26.

Ryu JS, Hong YC, Han HS, et al. Association between polymorphisms of ERCC1 and XPD and survival in non-small-cell lung cancer patients treated with cisplatin combination chemotherapy. *Lung Cancer*. 2004;44:311-6.

Sancar A. Mechanisms of DNA excision repair. *Science*. 1994;266:1954-6.

Sanguineti G, Richetti A, Bignardi M, et al. Accelerated versus conventional fractionated postoperative radiotherapy for advanced head and neck cancer: results of a multicenter Phase III study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;61:762-71.

Scartozzi M, Franciosi V, Campanini N, et al. Mismatch repair system status correlates with response and survival in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2006;53:103-9.

Seiwert TY, Salama JK, Vokes EE. The concurrent chemoradiation paradigm--general principles. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007;4:86-100.

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

Shirota Y, Stoecklacher J, Brabender J, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2001;19:4298-304.

Simon GR, Sharma S, Cantor A, et al. ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with non-small cell lung cancer. *Chest*. 2005;127:978-83.

Smith S, Su D, Rigault de la Longrais IA, et al. ERCC1 genotype and phenotype in epithelial ovarian cancer identify patients likely to benefit from paclitaxel treatment in addition to platinum-based therapy. *J Clin Oncol*. 2007;25:5172-9.

Staresincic L, Fagbemi AF, Enzlin JH, et al. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J*. 2009;28:1111-20.

Sturgis EM, Dahlstrom KR, Spitz MR, et al. DNA repair gene ERCC1 and ERCC2/XPD polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;128:1084-8.

Suk R, Gurubhagavatula S, Park S, et al. Polymorphisms in ERCC1 and grade 3 or 4 toxicity in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1534-8.

Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2008;14:1797-803.

Tsodikov OV, Enzlin JH, Schärer OD, et al. Crystal structure and DNA binding functions of ERCC1, a subunit of the DNA structure-specific endonuclease XPF-ERCC1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:11236-41.

Warnecke-Eberz U, Metzger R, Miyazono F, et al. High specificity of quantitative excision repair cross-complementing 1 messenger RNA expression for prediction of minor histopathological response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:3794-9.

Warnecke-Eberz U, Vallböhmer D, Alakus H, et al. ERCC1 and XRCC1 gene polymorphisms predict response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *J Gastrointest Surg*. 2009;13:1411-21.

Wei Q, Frazier ML, Levin B. DNA repair: a double-edged sword. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:440-1

Weinberg RA. Maintenance of genomic integrity and the development of cancer. In: Weinberg RA. *The biology of cancer*. 1st edition. London: Garland Science, 2007.

Wilson III DM, Bohr VA. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6: 544–59.

Yu JJ, Lee KB, Mu C, et al. 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;16:555-60.

Zheng Z, Chen T, Li X, et al. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med*. 2007;356:800-8.

Zhou W, Gurubhagavatula S, Liu G, et al. 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;10:4939-43.

8. ANEXO

8. ANEXO

Anexo – Aprovação da 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 referente ao protocolo de pesquisa intitulado “Expressão da proteína ERCC1 (*Excision Repair Cross Complementing Group 1*), do seu RNA mensageiro e de polimorfismos genéticos como fatores prognósticos em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço operados e submetidos à quimiorradioterapia adjuvante”

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 25/06/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0386/08**, intitulado: "**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ERCC1 (EXCISION REPAIR CROSS COMPLEMENTING GROUP 1), DO SEU RNA MENSAGEIRO E DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COMO FATORES PROGNÓSTICOS EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO OPERADOS E SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE**" apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA**.

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: **Gilberto de Castro Junior**

Pesquisador (a) Executante: **Miriam Hatsue Honda Federico, Igor Moisés Longo Snitcovsky; Flávia Regina Rotea Mangone; Fatima Solange Pasini, Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira**

CAPPesq, 27 de Junho de 2008

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