Glauber Moreira Leitão

**Osteopontina como marcador de resposta à radioterapia
e quimioterapia em pacientes com câncer de cabeça e
pescoço localmente avançado**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo no Exame de Qualificação para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Igor Moysés Longo Snitcovsky

**SÃO PAULO
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Leitão, Glauber Moreira

Osteopontina como marcador de resposta a radioterapia e quimioterapia em
pacientes com câncer de cabeça e pescoço localmente avançado / Glauber Moreira
Leitão. -- São Paulo, 2008.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Radiologia.

Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Igor Moysés Longo Snitcovsky.

Descritores: 1.Osteopontina 2.Neoplasias de células escamosas 3.Neoplasias de
cabeça e pescoço 4.Quimioterapia 5.Radioterapia

USP/FM/SBD-226/08

Tua caminhada ainda não terminou...

*A realidade te acolhe dizendo que pela frente o horizonte da vida necessita de tuas
palavras e do teu silêncio.*

Se amanhã sentires saudades, lembra-te da fantasia e sonha com tua próxima vitória.

*Vitória que todas as armas do mundo jamais conseguirão obter, porque é uma vitória que
surge da paz e não do ressentimento.*

*É certo que irás encontrar situações tempestuosas novamente, mas haverás de ver sempre o
lado bom da chuva que cai e não a faceta do raio que destrói.*

*Se não consegues entender que o céu deve estar dentro de ti, é inútil buscá-lo acima das
nuvens e ao lado das estrelas. Por mais que tenhas errado e erres, para ti haverás sempre
esperança, enquanto te envergonhares de teus erros.*

Tu és jovem.

Atender a quem te chama é belo, lutar por quem te rejeita é quase chegar à perfeição.

*A juventude precisa de sonhos e se nutrir de lembranças, assim como o leito dos rios precisa
da água que rola e o coração necessita de afeto.*

Não faças do amanhã o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.

Teus passos ficaram!

*Olhes para trás... mas vá em frente, pois há muitos que precisam que chegues para poderem
seguir-te.*

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Antonia Moreira, um verdadeiro exemplo de perseverança. Mulher lutadora, incansável, trabalhadora, vencedora. A cada realização, a cada etapa de minha vida, um sonho idealizado. Devo tudo à sua força, à sua luta ao meu lado.

Ao meu Avô e à minha Avó maternos, Tonho da viúva e Dona Dilô, que, embora não estejam aqui presentes, continuam sempre ao meu lado e dentro do meu coração. Pessoas do campo que muito me transmitiram e me ensinaram.

Aos pacientes e seus familiares, pelos exemplos de força e esperança inesgotáveis.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Dr. Igor Moysés Longo Snitcovsky, meu orientador e exemplo de profissional dedicado e competente, pela paciência e confiança depositada no desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pela amizade e pelos ensinamentos que foram além da transmissão de conhecimentos.

À Profa. Dra. Miriam Hatsue Honda Federico pelo estímulo e incentivo à carreira acadêmica. Sua seriedade, dedicação na condução dos projetos e humildade ampliam nosso conceito de liderança e administração. Obrigado pela oportunidade e acolhimento no serviço de oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Hakaru Tadokoro pelo honroso convite de trabalho em São Paulo, determinante na trajetória de minha vida. Obrigado pela confiança.

Ao Dr. Luiz Alberto Reis Mattos Júnior, incentivador e colaborador sempre presente, pelas importantes sugestões e apoio na revisão do texto desta dissertação.

À Karen Brunialti, pelo fundamental auxílio no Laboratório de Oncologia Experimental e pelas importantes sugestões durante a realização desse trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Oncologia Experimental HC – FMUSP;

Ao meu irmão Glauco Moreira Leitão e à minha querida família;

Aos amigos e colegas médicos presentes à época do desenvolvimento deste trabalho na divisão de oncologia do Instituto de Radiologia do HCFMUSP: Dr. Luiz Alberto Reis Mattos Júnior, Dra. Guareide Carelli, Dra. Laryssa Barros, Dr. Antonio Barcellos, Dra. Yracema Liandra Matos Machado, Dra. Débora Barton, Profa. Dra. Maria A. A. K. Folgueira, Dra. Maria del Pilar Estevez Diz, Dr. Gustavo F. G. Almeida, Dr. Gilberto de Castro Júnior, dentre outros;

Às enfermeiras Maria Auxiliadora Cury Xará, Daniela Vivas dos Santos, Scheila Frigato e Gabriela Oliveira Lucas, e a assistente social Carmen Andrea Afonso: obrigado pelo constante interesse no cuidado dos pacientes deste estudo.

Às amigas Elizangela N. Dias e Rosilene Arruda, assessoras da Pós-Graduação em Oncologia do Departamento de Radiologia da FMUSP, sempre muito gentis e pacientes durante todo o curso.

À Sra. Marlene Pereira Salgado e Elisabete Regina Sangirotti pela disponibilidade e auxílio nas tramitações do trabalho junto às comissões desta Instituição.

Aos meus amigos: Mário Martins, Regiane Alencar, Núria e Maite Margalef, Gabriela Favero, Sâmea e Sâmela Oliveira, as mães Regina Alencar, Salete Sattin e Alice Santos, pelo apoio e incentivo constante.

*À Dra. Davimar Miranda Maciel Borducchi, Dr. José Maria Borducchi,
Dra. Aline A. P. Rocha Lima, e a todos os colegas da Central Clinic de São
Paulo;*

*A todos que direta ou indiretamente participaram da elaboração deste
trabalho.*

ÍNDICE

	Pag
LISTA DE SÍMBOLOS	
LISTA SIGLAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	18
3. MÉTODOS.....	20
3.1. População do estudo e seleção da amostra.....	21
3.2. Coletas de Amostras de sangue periférico.....	24
3.3. Análise das amostras pelo método ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).....	24
3.4. Planejamento terapêutico.....	28
3.5. Avaliação da resposta e determinação da sobrevida.....	30
3.6. Métodos estatísticos.....	31
4. RESULTADOS.....	32
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
8. ANEXOS.....	74

LISTA DE SÍMBOLOS

dL	decilitro
g	grama
Gy	Gray
Kg	quilograma
m ²	metro quadrado
MeV	mega elétron-volt
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mm ³	milímetro cúbico
ng	nanograma
μL	microlitro
Hb	hemoglobina
≤	menor ou igual a
≥	maior ou igual a

LISTA DE SÍMBOLOS

AUC	<i>area under the curve</i>
DE	Doença estável
DP	desvio-padrão
EBV	vírus Epstein-Barr
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
EUA	Estados Unidos da América
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HPV	Papilomavírus humano
HR	<i>harzard ratio</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
NS	não-significativo estatisticamente
PD	Progressão da doença
pO ₂	pressão de oxigênio
QT	quimioterapia
RC	Resposta completa
RECIST	<i>Revised Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
RP	Resposta parcial
RxT	Radioterapia
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TNM	Estadiamento <i>Tumor-Node-Metastasis</i>

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Representação de algumas características da proteína OPN.....	7
Figura 2. Papel da osteopontina na progressão tumoral.....	11
Figura 3. Esquematização do método ELISA para quantificação de OPN sérica.....	26
Figura 4. Gráfico da estimativa da sobrevida global dos 47 pacientes incluídos no estudo, conforme valor de osteopontina sérica antes do início do tratamento, de acordo com o método de Kaplan-Meier.....	45
Figura 5. Gráfico da estimativa da sobrevida global dos 45 pacientes incluídos no estudo, conforme valor de osteopontina sérica após o término do tratamento, de acordo com o método de Kaplan- Meier.....	46
Figura 6. Gráfico da estimativa da sobrevida livre de progressão dos 47 pacientes incluídos no estudo, conforme valor de osteopontina sérica antes do início do tratamento, de acordo com o método de Kaplan-Meier.....	47
Figura 7. Gráfico da estimativa da sobrevida livre de progressão dos 45 pacientes incluídos no estudo, conforme valor de osteopontina sérica após o término do tratamento, de acordo com o método de Kaplan-Meier.....	48

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Kits ELISA utilizados para quantificação de OPN no plasma.....	27
Tabela 2. Características dos pacientes.....	35
Tabela 3. Sítios primários do tumor.....	26
Tabela 4. Distribuição do estadiamento TMN dos tumores na população por número de pacientes.....	37
Tabela 5. Características dos pacientes quanto ao tipo de tratamento realizado.....	37
Tabela 6. Kit 1: determinação do nível sérico da osteopontina antes e após o término do tratamento.....	39
Tabela 7. Kit 2: determinação da mediana do nível sérico da osteopontina antes e após o término do tratamento.....	40
Tabela 8. Kit 1: determinação da mediana do nível sérico da osteopontina antes e após o término do tratamento.....	41
Tabela 9. Kit 2: determinação da mediana do nível sérico da osteopontina antes e após o término do tratamento.....	41
Tabela 10. Avaliação da resposta ao tratamento.....	43
Tabela 11. Osteopontina pós-tratamento e resposta tumoral.....	43

LEITÃO, GM. Osteopontina como marcador de resposta à radioterapia e quimioterapia em pacientes com câncer de cabeça e pescoço localmente avançado [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 82p.

INTRODUÇÃO: Osteopontina (OPN) é uma glicoproteína presente em tecidos e fluidos orgânicos e envolvida em vários processos patológicos que incluem inflamação, proliferação celular, invasão da matriz extracelular, progressão tumoral e metástase. Em pacientes (pts) portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECCP), OPN tem sido associada a uma maior agressividade tumoral e empregada como marcador prognóstico. Nós investigamos o valor prognóstico e preditivo da OPN sérica em pacientes portadores de CECCP tratados de forma uniforme.

MÉTODOS: Estudo longitudinal prospectivo de 47 pts portadores de CECCP localmente avançado e irresssecável submetidos à quimioterapia e radioterapia. OPN sérica foi determinada pelo método ELISA (kit 1 com 17 pts e kit 2 com 30 pts) com coleta realizada antes e após o término do tratamento e estudada a relação entre OPN, categorizada como alta ou baixa em relação ao valor mediano, e as características clínico-patológicas, resposta ao tratamento, sobrevida global (SG) e sobrevida livre de progressão (SLP). **RESULTADOS:** A OPN sérica mediana dos pacientes determinada pelo kit 1 (em ng/ml) foi de 2,1 e 1,9 pré e pós-tratamento, respectivamente; no kit 2 (em ng/ml) foi de 69,5 e 87,9 pré e pós-tratamento, respectivamente. Pacientes portadores de tumores de orofaringe foram mais freqüentemente associados a baixos níveis séricos de OPN pós-tratamento, em comparação com outros sub-sítios ($p=0,03$). Observada tendência à associação entre os valores séricos baixos de osteopontina pós-tratamento e a resposta tratamento ($p=0,06$). Houve associação entre os valores elevados da osteopontina pós-tratamento e menor SLP ($p=0,09$, *log rank*), com

medianas de 11,9 meses e 14,5 meses, conforme valores séricos de OPN pós-tratamento altos e baixos, respectivamente. Não houve associação dos valores séricos de OPN pré e pós-tratamento e a SG ($p=0,19$ e $p=0,10$, respectivamente). **CONCLUSÃO:** Neste grupo de pacientes portadores de CECCP, sugere-se que OPN sérica baixa após a quimiorradioterapia associa-se à resposta ao tratamento e melhor SLP.

Descritores: Osteopontina, carcinoma de células escamosas, câncer de cabeça e pescoço, quimiorradioterapia.

LEITÃO, GM. Osteopontin as a marker of response to chemotherapy and radiotherapy in patients with locally advanced head and neck cancer [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 82p.

INTRODUCTION: Osteopontin (OPN) is a glycoprotein present in tissues and body fluids involved in several pathological processes that include inflammation, cell proliferation, invasion of the extracellular matrix, tumor progression and metastasis. In head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients, OPN has been associated with greater tumor aggressiveness and used as a prognostic marker. We investigated the prognostic and predictive value of plasma OPN in homogeneously treated (HNSCC) patients. **METHODS:** Longitudinal prospective study of 47 patients with locally advanced and inoperable HNSCC treated with exclusive platin based concomitant chemoradiotherapy. Plasma OPN was determined by ELISA (n=14 kit I, n=32 kit II) pre and posttreatment and correlated with tumor response, overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). **RESULTS:** Median OPN levels in ng/ml were 2,1 and 1,9 pre and posttreatment, respectively, by kit I and 69,5 and 87,9 by kit II. Patients were categorized as OPN low or high, using the median as a cut-off point. Patients with oropharynx tumors, as compared to other subsites, were more frequently categorized as low OPN ($p = 0,03$). A low posttreatment OPN level was associated with tumor response ($p = 0,06$) and a high posttreatment OPN level was associated with poor PFS, 11.9 vs. 14.5 months ($p=0.09$, *log rank*). Mean OS was 16.2 and 13.7 months in low and high posttreatment OPN pts, respectively ($p=0.10$, *log rank*). **CONCLUSIONS:** In this group of HNSCC patients, it is suggested that a low plasma OPN after chemoradiotherapy is associated with a lower response rate and a worse PFS.

Keywords: Osteopontin, squamous cell carcinoma, head and neck cancer, chemoradiotherapy.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de cabeça e pescoço é a quinta doença maligna mais freqüente no mundo ⁽¹⁾ e tem grande importância em nosso meio devido sua grande morbidade potencial e alta mortalidade relativa. Os carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (CECCP) compreendem mais de 90% dos casos, e os sítios anatômicos do trato aéreo-digestivo superior acometidos compreendem a cavidade oral (mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua, soalho da boca), orofaringe (tonsilas, palato mole, base da língua), nasofaringe, hipofaringe, fossa nasal e seios paranasais, laringe e glândulas salivares. Destes, a cavidade oral é o sítio mais freqüente. No mundo, a incidência dos carcinomas de cabeça e pescoço permaneceu estável durante a última década com 500 mil casos novos por ano. A taxa de mortalidade também segue estável, estimada em 5% dos casos de morte por neoplasia por ano ⁽²⁾. A idade mediana ao diagnóstico do CECCP é de 60 anos, mas a incidência destas neoplasias em adultos jovens com idade inferior a 40 anos parece ter aumentado. A razão entre homens e mulheres é de 1,5: 1, todavia esta razão tem-se mostrado em declínio nos últimos anos ⁽³⁾.

No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) ⁽⁴⁾ indicam que tenham ocorrido 6539 óbitos por câncer de boca, orofaringe e

laringe, representando 5,77% dos óbitos por câncer no ano de 1999. A estimativa para 2002 é de que tenham ocorrido 11.000 casos novos de câncer de boca, com 3.400 óbitos. As características clínicas da doença na população brasileira são distintas quando analisadas em comparação às da população norte-americana, estando relacionada a um maior consumo de álcool e tabaco, doença mais avançada à apresentação e alta taxa de aparecimento subsequente de um segundo tumor primário ⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾.

A distribuição dos fatores de risco varia consideravelmente nas diferentes populações, o que torna a epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço extremamente complexa devido à natureza poligênica atribuída a esta entidade, bem como ao grande número de agentes ambientais potencialmente relacionados. Os principais fatores de risco associados ao CECCP são o consumo de álcool e uso do tabaco, com aproximadamente 90% dos casos ocorrendo após a exposição a estes agentes ⁽⁷⁾. Fatores ocupacionais, exposição à radiação, deficiências nutricionais e agentes infecciosos representam os fatores mais relevantes na carcinogênese, em associação com consumo de álcool e tabaco.

O processamento do tabaco origina cerca de 300 compostos com potencial carcinogênico: hidrocarbonetos aromáticos, nitrosaminas tabaco-específicas e as aminas aromáticas que podem causar dano ao DNA pela ação das enzimas oxidativas ⁽⁸⁾. O uso de álcool também é um importante promotor da carcinogênese e contribui como fator importante em mais de 75% dos casos de CECCP. O consumo excessivo de álcool pode contribuir inclusive para o surgimento de deficiências nutricionais, o que aumenta a

suscetibilidade a carcinógenos e a supressão imunológica, parecendo ter efeito no risco independentemente do uso do tabaco.

Certas viroses têm sido associadas ao CECCP, sendo a infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e o papilomavírus humano (HPV) os mais estudados na associação com a carcinogênese destes tumores. O EBV parece estar associado à maioria dos carcinomas de nasofaringe, e o HPV (mais comumente o tipo 16) é associado a aproximadamente 50% dos carcinomas de orofaringe, além de também poder estar associado à etiologia dos carcinomas epidermóides originados no trato sinonasal ⁽³⁾⁽⁹⁾.

Avanços recentes em determinar a identidade e função dos eventos moleculares envolvendo a patogênese do CECCP têm levado pesquisadores ao desenvolvimento de novos métodos para rastreamento, prevenção e terapia, principalmente nos últimos anos, com o crescente conhecimento das bases genéticas e moleculares das neoplasias e do domínio tecnológico.

Apesar dos recentes avanços no tratamento, a taxa de sobrevida em 5 anos do CECCP melhorou muito pouco na última década ⁽¹⁰⁾ em parte porque, de acordo com metanálise, cerca de 50% dos pacientes apresentam recidiva da doença ⁽¹¹⁾. Além disso, pacientes nos estádios iniciais I e II, curados com cirurgia e posterior radioterapia, apresentam uma alta probabilidade (20% cumulativo) de desenvolver um segundo tumor primário de trato aéreo-digestivo superior. Infelizmente, na maioria dos casos (cerca de 60%) o diagnóstico é feito em estágios mais avançados da doença (estágios III e IV) ⁽¹¹⁾.

A falha ao tratamento cirúrgico, radioterápico e quimioradioterápico para câncer de cabeça e pescoço é atribuída a vários fatores, tais como idade, sexo, localização do tumor primário, estágio TNM e grau histológico que, embora possam auxiliar na decisão terapêutica, não têm valor prognóstico absoluto ⁽¹²⁾. O mais acurado dado prognóstico para recidiva, no momento, é o estágio linfonodal. Como a maioria dos pacientes apresenta estágio avançado ao diagnóstico, o comprometimento linfonodal não é discriminante exclusivo. Tal fato levou a comunidade científica à procura de biomarcadores como indicadores de prognóstico em CECCP, que funcionaria como marcador tumoral facilitador na avaliação do prognóstico.

Por marcador tumoral entendem-se antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas ou hormônios que, facilmente detectadas no plasma, líquidos orgânicos ou em tecidos (por técnicas imuno-histoquímicas), possam ser utilizados como indicadores da presença do câncer. São geralmente utilizados como teste laboratorial para apoiar o diagnóstico, determinar a resposta ao tratamento cirúrgico, radioterápico e/ou combinado (quimioradioterapia) ou para indicar recidiva durante o período de seguimento dos pacientes.

Entre os vários potenciais marcadores estudados, podem-se citar: expressão de moléculas de adesão caderina-E, CD44s, CD44v6 ⁽¹³⁾; a expressão de p53, EGFR, TGF-alfa e ciclina D1 (em carcinoma verrucoso, hiperplasia verrucosa e carcinoma epidermóide da região de cabeça e pescoço) ⁽¹⁴⁾; expressão do transportador-1 de glicose (em pacientes com

carcinoma de hipofaringe)⁽¹⁵⁾; p53 e ciclina D1(em CEC de laringe)⁽¹⁶⁾, dentre outros⁽¹⁷⁾.

Além de não se definir nenhum marcador tumoral validado em neoplasias de cabeça e pescoço, grande parte desses estudos requer amostra tumoral, tecidos normais, lugares especializados em processamento de tecidos, estudos imuno-histoquímicos e análise citogenética. Além da complexidade técnica na reprodução de resultados, custos elevados têm afastado o uso de tais marcadores no uso clínico rotineiro.

Uma alternativa de marcadores com maior aplicabilidade e praticidade são as substâncias presentes no soro de pacientes, como o fragmento de citoqueratina cyfra 21-1 e a molécula de adesão osteopontina, que têm sido avaliadas e correlacionadas com a transformação e invasão tumoral em inúmeros estudos avaliando prognóstico e monitorização de resposta em pacientes portadores de CECCP⁽¹⁸⁻³¹⁾. Destas, a osteopontina (OPN) parece ser o marcador mais promissor.

A osteopontina é uma glicoproteína fosforilada ligadora de cálcio, capaz de se ligar às integrinas da superfície celular, tendo sido inicialmente identificada como a principal sialoproteína no tecido ósseo. Possui peso molecular de aproximadamente 44 kDa, rica em ácido aspártico, ácido glutâmico e contendo cerca de 30 monossacarídeos, incluindo 10 ácidos siálicos. O gene da osteopontina está localizado no cromossomo 4q13^(32,33). OPN foi inicialmente descrita por Senger et al em 1979 por análise de proteínas secretadas por células epiteliais transformadas⁽³⁴⁾.

OPN é expressa constitutivamente num número limitado de tecidos normais tais como rim ⁽³⁵⁾, estando também presente nos fluidos do corpo, e é abundante nos ossos e outros tecidos mineralizados ⁽³⁶⁾. Sua expressão encontra-se também elevada em vários tecidos em um número de afecções, bem como em algumas situações fisiológicas de resposta ao estresse.

A osteopontina tem sido implicada em câncer, respostas imune e inflamatória ^(37,38), remodelação vascular ⁽³⁹⁾, doenças renais, lactação, calcificação e remodelação de tecidos mineralizados. Apesar da diversidade de expressões teciduais, a função de OPN em muitos destes contextos permanece pouco conhecida e é assunto de muitas pesquisas. A OPN existe tanto como uma molécula imóvel da matriz extracelular (ECM) em tecidos mineralizados, quanto como uma citocina em fluidos corporais; não é parte significativa da matriz extracelular de tecidos não-mineralizados.

A Osteopontina pode interagir com um certo número de receptores, incluindo as integrinas αv e $\beta 1$, e também pode ser um ligante de certas formas variantes de CD44 ⁽³³⁾. Estes receptores direta ou indiretamente ativam vias de sinalização celular, permitindo a mediação da OPN nas interações célula-matriz extracelular e, possivelmente, célula-célula ⁽⁴⁰⁾. A OPN possui um sítio protease-sensível que separa os domínios ligados às integrinas e ao CD44. CD44 é uma família de glicoproteínas transmembrana com várias formas variantes envolvidas em vários processos biológicos como de adesão celular, interação célula-célula e célula-matriz extracelular, incluindo migração celular e metástase ⁽⁴¹⁾.

Isoformas de CD44 estão envolvidas em funções biológicas diversas: a variante Cd44v7 parece mediar a doença inflamatória intestinal e a expressão de CD44v6 em células de mieloma múltiplo parece diminuir adesão no micro-ambiente da medula óssea, por exemplo ⁽⁴⁰⁾. A presença de um sítio de clivagem pela trombina sugere que certas funções da OPN dependem deste processo. Várias isoformas de CD44 são geradas como *splicing alternativo* do pré-mRNA e são relatadas como expressos em diferentes células neoplásicas.

A presença de um sítio de clivagem conservado pela trombina sugere que certos processos fisiológicos empregando a OPN dependem desta clivagem. Algumas características moleculares da OPN são representadas na figura 1 abaixo.

Figura 1. Representação de algumas características da proteína OPN. São indicados os locais de oxigênio-glicosilação e fosforilação que variam (principalmente a fosforilação) com a origem celular ou tecidual da proteína. A numeração dos aminoácidos é baseada na proteína humana, e a sequência do sinal não está ilustrada ⁽³³⁾. O fragmento terminal COOH se liga ao CD44 e regula vários eventos celulares. Adaptado de Rangaswami H, et al. 2006 ⁽⁴²⁾.

Os possíveis papéis da osteopontina em câncer foram discutidos por vários autores ⁽⁴³⁻⁴⁶⁾. Sugeriu-se que a OPN poderia ter um papel funcional na doença maligna por meio de estudos nos quais cDNA antisense de OPN ou ribozimas inibiram as propriedades tumorigênicas ou metastáticas de vários tipos de células ⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾. Além disso, a transfecção de OPN cDNA em células epiteliais mamárias de rato foi responsável pelo aumento da habilidade metastática destas células ⁽⁵¹⁾. Estes estudos sugerem que OPN não está apenas associada com malignidade, mas que pode também contribuir funcionalmente para o comportamento de células cancerosas.

Em tumores humanos, a expressão de OPN foi pela primeira vez demonstrada numa variedade de carcinomas humanos por Brown et al. (1994) ⁽³²⁾. Estes autores encontraram níveis substancialmente maiores do RNA mensageiro (RNAm) OPN em todos os 14 tumores (seis tumores de cólon, três de mama, dois de pulmão, um de estômago, um de endométrio e um de tireóide) quando comparados com o correspondente tecido normal. Em contraste, dois tipos de tumores benignos (adenomas de cólon de pacientes com polipose familiar e um leiomioma uterino) tiveram níveis de mRNA de OPN comparáveis àqueles dos tecidos normais correspondentes. Células que expressaram OPN localizaram-se preferencialmente no limite da extensão tumoral e nas áreas próximas de necrose.

Outros estudos mostraram aumento da expressão de RNAm de OPN, bem como sua proteína, em vários tipos de câncer, incluindo pulmão ⁽⁵²⁾, mama ^{(53) (54)}, câncer de esôfago ⁽⁵⁵⁾, câncer gástrico ⁽⁵⁶⁾, lesões benignas

pré-malignas e malignas da cavidade oral ⁽⁵⁷⁾, câncer de próstata ⁽⁵⁸⁾ e gliomas ⁽⁵⁹⁾. Utilizando técnica de imuno-histoquímica, a proteína OPN presente em tumores foi localizada em macrófagos de alguns tumores, e nas próprias células tumorais ⁽⁵⁴⁾ ⁽⁵⁵⁾.

No sangue, nível elevado de OPN foi detectado em pacientes de uma variedade de cânceres, incluindo carcinoma de pulmão ⁽⁵²⁾, hepático ⁽⁴³⁾, de mama ⁽⁶⁰⁾ e próstata ⁽⁶¹⁾. A metodologia mais freqüentemente descrita para quantificar níveis séricos de OPN e usada por vários autores é o método *ELISA* de captura, que utiliza uma combinação de anticorpos monoclonais de ratos e coelhos ⁽⁶²⁾. Utilizando este ensaio, demonstrou-se numa coorte de 35 mulheres normais (21 pré- e 14 pós-menopausadas) ⁽⁶³⁾ um nível mediano de OPN de 47µg/l (intervalo: 22-122µg/l). Constatou-se que os níveis de OPN não diferiram entre as mulheres pré- e pós-menopausadas, e que não havia mudança significativa nos valores sanguíneos de OPN individualmente durante o período de 4 semanas. Outro estudo investigou o valor prognóstico do nível plasmático de OPN no seguimento de 70 pacientes com câncer de mama metastático, 44 delas tratadas, sem evidência de doença no momento (grupo controle). Observou-se que o nível plasmático mediano de OPN foi 142µg/l (intervalo: 38-1312µg/l) em mulheres com câncer metastático, contra 60µg/l (intervalo: 15-117µg/l) em pacientes do grupo controle, com diferença estatisticamente significativa ($p=0.001$). Mais importante, verificou-se que valor elevado de OPN plasmática estava associado a uma curta sobrevida, quando o nível sérico dos pacientes foi dividido em alto, médio e baixo ($p<0.001$). Somando-

se a isso, o modelo de Cox de medida de risco (*hazards*) proporcional, usando OPN sérica como uma variável contínua, mostrou uma associação entre aumento de OPN e decréscimo de sobrevida ($p < 0.0001$). Assim, o estudo sugere que OPN plasmática elevada esteja significativamente associada ao prognóstico desfavorável em mulheres com câncer de mama metastático ⁽⁶²⁾.

A expressão de RNAm de osteopontina é passível de inibição e a proteína pode ser bloqueada com anticorpos ou peptídeos sintéticos. O receptor CD44 da osteopontina tem sido alvo de diversas estratégias terapêuticas, incluindo citotoxicidade e abordagem imunoterapêutica. O receptor integrina $\alpha v \beta 3$ contribui não apenas para a disseminação celular do tumor, mas também para angiogênese e osteólise em metástases ósseas. Devido ao fato de receptores e ligantes de citocinas que mediam a formação de metástases serem intensamente expressos no organismo adulto normal e mais prontamente atingidos pelas drogas do que os alvos intracelulares, eles podem representar um adequado foco para intervenção terapêutica ⁽²⁶⁾.

Figura 2. Papel da OPN na transformação maligna e progressão tumoral. OPN ativa diversas quinases oncogênicas e acarreta a ativação de fatores de transcrição, que por sua vez ativam a expressão de genes relacionados à inibição de apoptose, degradação de matriz extracelular e motilidade celular, contribuindo para imortalização celular e metástase. Adaptado de Rangaswami H, et al. 2006 ⁽⁴²⁾.

Em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, a importância da osteopontina pode ser avaliada analisando-se alguns estudos recentemente publicados. Em um estudo realizado na Universidade do Texas, Houston (EUA), pelo grupo de Devoll R. E. ⁽⁵⁷⁾, determinou-se por imuno-histoquímica a expressão de osteopontina em epitélio normal (n=6), hiperplasia epitelial (n=4), displasia epitelial (n=28), carcinoma in situ (n=11) e carcinoma de células escamosas (n=43). As linhagens celulares UMSCC-1, MDA TU 128, MDA 686LN, SCC4, SCC9, SCC25, CAL 27 e MDA 1483 foram analisadas quanto à expressão mRNA de OPN por Northern blotting. OPN não foi detectada em epitélio oral normal. Imunoreatividade intracelular e intercelular foi vista em 75% das hiperplasias, 57% das displasias, 54% dos carcinomas in situ e 67% dos carcinomas de células escamosas. UMSCC-1 expressou elevados níveis de OPN mRNA. Os autores concluem que a proteína OPN é

detectável em lesões pré-malignas e malignas originadas do epitélio oral e que a linhagem UMSCC-1 pode ser usada como modelo *in vitro* de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço que expressa osteopontina.

Outro importante estudo teve como objetivo identificar mediadores moleculares da progressão tumoral do CECCP frente à hipóxia ⁽³¹⁾. Numa primeira etapa identificou-se *in vitro*, por “*microarray*”, a osteopontina como candidata a fator prognóstico. Este achado foi validado *in vivo* pela determinação, por ELISA, dos níveis plasmáticos de OPN em 15 voluntários, 31 pacientes com mutação do gene VHL (diagnosticados por avaliação genética) e 54 pacientes com CECCP. Foi realizada uma análise de regressão, em 49 pacientes pré-tratamento, para identificar fatores que se correlacionam com pO₂ médio do tumor. Os fatores avaliados foram idade, gênero, anos de tabagismo, estágio do tumor, grau de comprometimento linfonodal (N), volume tumoral, Hb e OPN. O nível sérico de osteopontina apresentou forte correlação inversa com o pO₂ do tumor medido por eletrodo intratumoral (p=0.003). Investigou-se a relação entre os níveis de OPN e a resposta ao tratamento (alguns pacientes foram tratados com cirurgia e radioterapia adjuvante, enquanto outros receberam radioquimioterapia definitiva com a cirurgia reservada para terapia de resgate) em 54 pacientes com CECCP. A média de seguimento foi de 14.4 meses (intervalo: 2-32.2 meses) e todos tiveram um período de seguimento de pelo menos 1 ano; 24 pacientes apresentaram recidiva. O tempo médio para recidiva foi de 6.1 meses e 20 das 24 recidivas ocorreram dentro de 1 ano do tratamento. A taxa de sobrevida livre de doença em 1 ano foi 62%.

Os pacientes foram agrupados como tendo alto ou baixo nível de OPN baseados no nível médio de OPN para toda a população de pacientes (OPN > 450 ng/ml versus $\leq$ 450 ng/ml). Pacientes com altos níveis de OPN apresentaram pior controle do tumor quando comparados aos pacientes com níveis baixos ($p=0.005$). Outros fatores que pareciam influenciar a taxa de sobrevida livre de doença na análise univariada com $p<0.05$ foram: idade, localização do tumor primário (preferencialmente em orofaringe) e o uso de quimioterapia. Pacientes com pO₂ média do tumor $\leq$ 10mmHg tiveram uma taxa de sobrevida livre de doença mais baixa do que com pO₂ média >10mmHg. As taxas de sobrevida livre de recidiva de 1 e 2 anos foram de 57 % e 42 %, respectivamente, para pacientes com pO₂ média $\leq$ 10 mmHg, e foram de 68 % e 63%, respectivamente, para pacientes com pO₂ média >10mmHg. Entretanto, a diferença não atingiu significância estatística ($p=0.29$). Análises multivariadas mostraram que os níveis plasmáticos de OPN (preferencialmente níveis baixos de OPN, $p=0.01$) e a localização do tumor primário (preferencialmente orofaringe, $p=0.03$) foram os únicos fatores com relevância estatística para a taxa de sobrevida livre de doença depois de ajustar para os outros fatores significantes na análise univariada. Ao final do seguimento, 19 pacientes morreram; 1 de toxicidade relacionada ao tratamento, 1 de um tumor secundário e 17 de CECCP. A sobrevida geral de 1 ano foi de 81%. OPN foi um importante fator prognóstico para sobrevida ($p=0.0006$). Análises univariadas revelaram que idade, estágio linfonodal, volume do tumor e níveis de OPN foram fatores prognósticos potenciais para sobrevida com $p<0.05$. Análises multivariadas incluindo apenas estes quatro

fatores significantes revelaram que os níveis de OPN (preferencialmente baixos níveis, $p=0.02$) e estágio linfonodal (preferencialmente pacientes N0-2) constituíram fatores prognósticos significantes para maior sobrevida ($p=0.007$). Idade apresentou uma significância média ($p=0.06$). Dentro de cada grupo de estágio linfonodal (N0-2 e N3), o maior nível sérico de OPN também se mostrou um fator prognóstico independente para pior sobrevida.

O mesmo grupo de pesquisadores publicou recentemente uma atualização do estudo anterior com os 54 pacientes previamente relatados⁽⁶⁴⁾ em associação com 86 novos pacientes (numa amostra total de 140 pacientes), defendendo a osteopontina sérica pré-tratamento como fator prognóstico. Os resultados evidenciaram, em um segmento mediano de 46,6 meses, correlação entre os níveis séricos de osteopontina e sobrevida livre de recidiva ($P=0,047$), sobrevida global ($P=0,019$) e sobrevida livre de evento, seja morte ou recidiva ($P=0,023$).

É sabido que tumores de cabeça e pescoço com baixa oxigenação têm pior prognóstico⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾. A carência de oxigênio torna as células neoplásicas menos sensíveis a radioterapia e induz ativação de genes que, em última instância, desenvolvem tumores mais agressivos⁽⁶⁸⁻⁷¹⁾.

Com o intuito de identificar pacientes com elevada hipóxia tumoral e propor o uso de um agente sensibilizador à radioterapia, um grupo de pesquisadores dinamarqueses publicou os resultados de um interessante estudo⁽⁷²⁾. Avaliou-se o nível sérico de osteopontina de 320 pacientes antes do início do tratamento. Destes, 164 pacientes receberam um agente radiosensibilizante, o *nimirazole* – já testado em estudo aleatorizado prévio

⁽⁷³⁾ . As taxas de controle local de doença e de sobrevida destes pacientes foram comparadas com um grupo placebo (n=156). O estudo concluiu que altas concentrações séricas de osteopontina foram associadas com piores resultados após radioterapia, mas que pôde ser atenuado com o uso do nimorazole.

Em recente estudo publicado por Eto et al ⁽⁷⁴⁾, foi avaliada a associação de valores elevados de OPN sérica e características clínicas em um grupo de pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço. Os níveis de OPN sérica foram determinados pelo método ELISA, com a mediana de OPN sérica significativamente maior nos pacientes portadores de CECCP (99.5 ng/ml) do que no grupo controle (55.3 ng/ml). Os níveis séricos de OPN também foram significativamente maiores em pacientes com estágios avançados quando comparados aos pacientes com estágios iniciais, e chamam atenção para a OPN sérica como possível marcador prognóstico em pacientes com CECCP.

Atenção deve ser dada na interpretação dos valores séricos absolutos de OPN nos vários estudos publicados. Vordermark et al apresentaram um estudo com objetivo de avaliar comparativamente os resultados de dosagens séricas de OPN de 88 pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço e câncer de colo uterino, realizadas por reagentes (kits) de método ELISA de diferentes fabricantes ⁽⁷⁵⁾. Os investigadores deste estudo concluíram que os níveis séricos de OPN obtidos por kits de ELISA comercializados devem ser avaliados com cuidado, com análises comparativas dos resultados realizadas sempre com

o mesmo kit comercializado e, principalmente, condenam a comparação de valores absolutos entre estudos. O estudo ainda reafirma que níveis elevados de OPN em diferentes grupos de pacientes portadores de neoplasia são encontrados quando comparados aos controles, independente do tipo comercial de kit ELISA usado.

Até o momento, os estudos publicados que avaliaram o papel da OPN sérica nos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço sugerem que: (1) o nível sérico de osteopontina pré-tratamento apresenta relação inversa com o pO₂ tumoral; (2) altos níveis de OPN sérica pré-tratamento estão associados a pior controle do tumor quando comparados aos pacientes com níveis baixos (pós-radioterapia); e (3) um maior nível sérico de OPN pré-tratamento também se mostrou um fator prognóstico independente para pior sobrevida. Entretanto, a população de pacientes nestes estudos constituía um grupo consideravelmente heterogêneo, com diferentes estágios clínicos, estadiamento linfonodal e variadas formas de tratamento realizadas (cirurgia com dissecação cervical ou não, radioterapia, e associação ou não com quimioterapia). Assim, várias questões ainda não estão respondidas nesta área.

Baseados nestas questões, nós elaboramos um estudo buscando avaliar a associação entre os níveis séricos de osteopontina e a sobrevida (sobrevida global e sobrevida livre de progressão) em uma população mais homogênea de pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço localmente avançado, tanto em relação ao estadiamento quanto ao tipo de tratamento empregado (quimiorradiação). Além disso, a avaliação de OPN

pós-tratamento, não pesquisada nos estudos publicados, poderia fornecer informações relevantes nesta população, visto que muitos pacientes recidivam precocemente, a despeito de uma resposta clínica inicial.

Objetivos

2. OBJETIVOS

- a)** Determinar o nível sérico da osteopontina em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço localmente avançado antes do início e após o término do tratamento não-cirúrgico (quimioterapia e/ou radioterapia) e correlacionar com as características clínico-patológicas;
- b)** Correlacionar os níveis séricos da osteopontina dos pacientes portadores de CECCP determinados antes e após o término do tratamento com a resposta ao mesmo;
- c)** Correlacionar os níveis séricos da osteopontina antes do início do tratamento com a sobrevida livre de progressão dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço localmente avançado.

Métodos

3. MÉTODOS

3.1. População do estudo e seleção da amostra

O estudo consistiu na análise prospectiva de pacientes matriculados no ambulatório de oncologia clínica do Instituto de Radiologia da FMUSP (São Paulo – SP) com diagnóstico de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECCP) irressecáveis ou não operáveis em avaliação inicial (estudo prospectivo longitudinal), independente de estadiamento clínico, no período de novembro de 2004 a abril de 2006, após assinatura de consentimento livre e esclarecido (anexo 1). O projeto foi submetido e aprovado pela comissão de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (anexo 2).

Os pacientes foram incluídos de forma seqüencial à medida que eram matriculados no serviço, obedecido aos seguintes critérios de elegibilidade e exclusão:

Critérios de Inclusão

1. Pacientes portadores de tumores de cabeça e pescoço com diagnóstico histológico (ou citologia compatível) de carcinoma epidermóide tratados no HC/FMUSP;
2. Pacientes não submetidos a tratamento cirúrgico inicial conforme indicação estabelecida pelo departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMUSP (São Paulo – SP): critério de (ir) ressecabilidade ou (in) operabilidade empregado (quando aplicável) foi definido pelo médico assistente do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HC/FMUSP baseando-se nos achados clínicos, endoscópicos e radiológicos de cada caso.
3. Pacientes portadores de carcinoma de cabeça e pescoço com sítios primários em: cavidade oral, orofaringe, laringe e hipofaringe;
4. Performance funcional (PS-ECOG) entre 0 e 2, com expectativa de vida superior a 3 meses.

Critérios de exclusão

1. Pacientes com metástases à distância no momento da admissão no serviço de oncologia clínica;

2. Pacientes portadores de tumores primários simultâneos ou antecedente pessoal de outra neoplasia maligna;
3. Pacientes com tumores de sítio primário em nasofaringe ou glândula salivar;
4. Pacientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida, co-morbidade grave ou performance funcional (status funcional – ECOG) acima de 2.

A abordagem radioterapêutica seguiu as orientações da rotina de tratamento do Serviço de Radioterapia da Divisão de Oncologia do Instituto de Radiologia do HC/FMUSP (ver abaixo). Os esquemas de quimioterapia e seguimento clínico utilizados seguem a rotina estabelecida pelo Serviço de Oncologia Clínica do HC/FMUSP (ver abaixo).

A avaliação de resposta aos tratamentos foi realizada comparando-se os estudos radiológicos por tomografia computadorizada antes e após o término do tratamento, segundo os critérios RECIST - *Response Evaluation Criteria in Solid Tumours* ⁽⁷⁶⁾. Os exames radiológicos (tomografia computadorizada de pescoço e face, quando aplicável) e demais exames complementares (nasofaringolaringoscopia, por exemplo) de avaliação de resposta foram realizados após período de 6-8 semanas do término do tratamento.

3.2. Coletas de Amostras de sangue periférico

A coleta do sangue periférico dos pacientes foi realizada após assinatura do consentimento esclarecido antes do início e após término do tratamento indicado. Esta etapa consistiu na coleta de 10 mL de sangue, coletadas em tubos plásticos, por um acesso venoso periférico sob condições assépticas. O sangue foi coletado com anticoagulante (EDTA) e armazenado a 4°C, por um período máximo de até 16 horas antes de ser processado para obtenção do plasma. Após a coleta, as amostras eram encaminhadas ao Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da USP.

As amostras de sangue eram centrifugadas a 3000rpm, a 4°C por 10 minutos. O plasma era então coletado e estocado a -80°C até a análise de imunoensaio ⁽³¹⁾.

3.3. Análise das amostras pelo método ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

A osteopontina sérica foi quantificada pelo método de ELISA. Utilizou-se 2 kits de fabricantes diferentes: o primeiro (kit 1) denominado *TitlerZyme ELISA kit* (do fabricante *Assay Designs, Ann Arbor-MI, EUA*) e o segundo kit utilizado (kit 2) intitulado *Human Osteopontin Assay Kit (L)* – IBL

(fabricado por IBL, Gunma, Japão). A figura 3 ilustra esquematicamente e de forma resumida o método ELISA utilizado para a quantificação de OPN:

a) cada poço da placa de ELISA foi previamente sensibilizado por anticorpos para captação da OPN sérica e fornecida pelo fabricante;

b) padrão e amostras de soro foram diluídas com solução tampão adicionada aos poços; OPN presente nas amostras ficaram ligadas ao anticorpo formando o complexo antígeno-anticorpo;

c) a placa foi incubada e lavada, para que antígenos não-específicos presentes nas amostras fossem removidos, permanecendo nos poços a OPN sérica capturada pelo complexo antígeno-anticorpo;

d) anticorpo ligado a uma enzima e que reconhece o complexo antígeno-anticorpo foi adicionado aos poços;

e) a placa sofreu incubação e lavagem por uma segunda vez, para que outras moléculas não vinculadas a reação pudessem ser removidas;

f) um substrato incolor foi adicionado aos poços;

g) reação entre a enzima (ligada ao anticorpo) e o substrato converteu este último em substância colorida;

h) acrescentada uma solução de parada, que encerrou a reação enzimática;

i) a intensidade da cor foi finalmente estimada pela espectrofotometria; a intensidade da cor em cada poço foi diretamente proporcional à concentração de OPN.

Figura 3. Esquematização do método ELISA para quantificação de OPN sérica. (adaptado de Ramankulov A, et al.2007 ⁽⁷⁷⁾).

O valor da osteopontina sérica foi determinado em 17 pacientes utilizando-se o kit 1 (desenvolvido pela *Assay Designs* – tabelas 5 e 7) e em 30 pacientes pelo kit 2 (comercializado pela *IBL* – tabelas 6 e 8). Foi necessária a troca e utilização do kit 2 devido à descontinuidade da venda comercial do kit 1 por parte dos fabricantes (*Assay Designs*). Após a determinação dos valores, foi calculada a mediana do conjunto de pacientes e definidos os pacientes que possuíam osteopontina sérica alta ou baixa conforme o valor $\leq$ ou $>$ da mediana, respectivamente. Informações

detalhadas sobre o procedimento experimental de cada kit ELISA encontram-se na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Kits ELISA utilizados para quantificação de OPN no plasma.

	Kit 1	Kit 2
Fabricante	TiterZyme® EIA - Assay Designs, USA	Human Osteopontin Assay Kit® IBL, Japão
Número de poços por placa	96	96
O que o Anticorpo detecta?	Epitopo da OPN ¹	Epitopo da OPN ²
Padrão	2, 4, 8, 16, 32 (µg/L)	5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 (ng/mL)
Diluição da amostra	Plasma, 1:10	Plasma, 1:10
Volume final do padrão ou da amostra	100 µL	100 µL
Incubação I	1 hora, temperatura ambiente, no agitador	1 hora, temperatura ambiente, no agitador
Lavagem I	4 x 400 µL	7 x 400 µL
Anticorpo	100 µL	100 µL
Enzima marcadora	Fosfatase alcalina	Fosfatase alcalina
Incubação II	1 hora, temperatura ambiente, no agitador	30 minutos em 4 ° com placa tampada
Lavagem II	4 x 400 µL	9 x 400 µL
Substrato	p-Nitrophenyl phosphate, 100 µL	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), 100 µL
Incubação III	30min, temperatura ambiente, no agitador	30min, temperatura ambiente, no agitador
Solução de Parada	Fosfato trisódio, 25 µL	Ácido Sulfúrico, 100 µL,

¹Epitopo está localizado após o sítio de clivagem da trombina e inclui a sequência SVVYGLRSKSK.

²Epitopo está localizado na porção direita do sítio de clivagem da trombina e inclui a sequência KSKKFRRPDIQYPDATDE.

Nota: O volume é dado por poço. As amostras e padrões foram processados em duplicata.

Foi utilizado o leitor de placa e medição a 450nm em aparelho espectrofotométrico. A medida foi tomada em até 30 minutos depois da

adição da solução de interrupção. Realizada a mensuração da absorbância das amostras testadas, incluindo os padrões e amostras desconhecidas antes de traçar o gráfico. Relacionou-se a absorbância obtida dos padrões e a concentração padrão num gráfico logarítmico. Foi então desenhada uma curva ao longo desses pontos para construir a curva padrão. Abstraiu-se a concentração de soluções desconhecidas da curva padrão. A determinação do valor sérico de OPN dos pacientes foi estabelecida a partir da medida da absorbância de cada amostra (em duplicata) e a relação com a curva padrão construída.

3.4. Planejamento terapêutico

a) Radioterapia

De uma forma geral, a radioterapia consistiu em teleterapia (radioterapia externa) empregando aceleradores lineares de 6 MeV ou fonte de cobalto-60, com dose total planejada para o sítio primário de 70 Gy. Realizado fracionamento convencional de 2 Gy por dia (fracionamento único diário em campos paralelos), 5 dias por semana, num total de 7 semanas. A dose de radiação aplicada nas regiões com doença macroscópica e nas drenagens cervicais foi de 70 Gy. Todos os campos foram tratados em cada aplicação e não houve interrupções programadas, a menos que houvesse toxicidade impeditiva ou toxicidade que contra-indicasse o segmento do

tratamento. A técnica de tratamento utilizada foi a de raios paralelos-opostos, com proteção da medula aos 44 Gy, *boost* de 20 Gy e tratamento com elétrons em campo direto de 6 Gy. As áreas de doença subclínica ou de drenagem (cadeias cervicais e fossas supraclaviculares) foram tratadas com 50 Gy, com campo direto nas fossas. O tratamento radioterápico seguiu as orientações da rotina de tratamento do Serviço de Radioterapia da Divisão de Oncologia do Instituto de Radiologia do HC/FMUSP.

b) Quimioterapia

A quimioterapia seguiu as orientações da rotina de tratamento do Serviço de Oncologia Clínica do Instituto de Radiologia do HC/FMUSP. Ressalta-se que o esquema de tratamento mais utilizado quando em combinação com a radioterapia nos pacientes deste estudo foi constituído por cisplatina na dose de 100 mg/m² aplicada nos dias 1, 22 e 43 da radioterapia. Outro esquema incluía a combinação de radioterapia e carboplatina (AUC=4) nos dias 1, 22 e 43 da radioterapia.

A escolha de agentes derivados da platina (cisplatina e carboplatina) como esquemas quimioterápicos associados à radioterapia baseia-se nas propriedades radiosensibilizantes e citotóxicas próprias destes fármacos ⁽⁷⁸⁾.

3.5. Avaliação da resposta e determinação da sobrevida

Segundo os critérios *Response Evaluation Criteria in Solid Tumours* (RECIST) ⁽⁷⁶⁾, resposta completa (RC) ao tratamento é definida como o completo desaparecimento de toda a evidência clínica e imagenológica da neoplasia, quando mantida por pelo menos 4 semanas; resposta parcial (RP) como uma diminuição de pelo menos 30% do tamanho do maior diâmetro da lesão mensurável à avaliação inicial, confirmada em 4 semanas; progressão de doença (PD) como aumento do tamanho da lesão mensurável em pelo menos 20%, ou aparecimento de novas lesões; doença estável (DE), quando os critérios acima não são alcançados. Tais critérios foram aplicados na tomografia computadorizada realizada após 1 mês do término do tratamento. Foi indicada biópsia para aqueles pacientes com achados suspeitos no seguimento. Para a análise final da resposta foram incluídos os pacientes que completaram o tratamento.

A sobrevida livre de progressão foi definida como o tempo transcorrido desde o início do tratamento até a progressão da doença, para os pacientes com doença estável, resposta completa ou parcial ao tratamento. A sobrevida global foi definida como o tempo transcorrido desde o diagnóstico da neoplasia até a última consulta realizada ou data do óbito.

3.6. Métodos estatísticos

A sobrevida global e a sobrevida livre de progressão foram estimadas usando o método de Kaplan-Meier ⁽⁷⁹⁾. Todos os pacientes que iniciaram o tratamento proposto no momento da assinatura do consentimento esclarecido (anexo 1) foram incluídos para a análise final da sobrevida. A diferença entre as curvas de sobrevida global e de sobrevida livre de doença obtidas na avaliação de fatores prognósticos foi calculada pelo método de log-rank. A relação entre a resposta ao tratamento e a OPN sérica foi avaliada pelo teste exato de Fisher. Em todos os testes realizados considerou-se como estatisticamente significativo um valor de $p \leq 0,05$ e marginalmente significativo um valor de $p \leq 0,10$. Os cálculos estatísticos foram feitos empregando-se o programa SPSS para ambiente Windows, versão 10.0 ⁽⁸⁰⁾.

Resultados

4. RESULTADOS

a) Características dos pacientes

Quarenta e sete pacientes assinaram o termo de consentimento esclarecido e foram incluídos nesta avaliação no período de novembro de 2004 a abril de 2006 (tabela 2). Com idade mediana de 58 anos (intervalo: 37-76 anos), a maioria dos pacientes (85,1%) foi composta por pacientes do sexo masculino. Dois pacientes não referiam tabagismo presente ou no passado, enquanto somente 12 pacientes negavam etilismo. Quarenta e cinco pacientes (95,7%) apresentavam bom desempenho clínico conforme escala do ECOG (*status funcional* 0 e 1), estando a maioria dos pacientes com ingestão alimentar oral preservada (83%). Ao diagnóstico, 25% dos pacientes aproximadamente estavam traqueostomizados. A análise hematemétrica dos pacientes demonstrou um nível de hemoglobina mediano de 13,1 g/dl (intervalo: 7,5-16,1 g/dl).

b) Características do tumor

À apresentação, a quase totalidade dos pacientes (95,8%) possuía doença localmente avançada com estágios III (6,4%) e IV (89,4%), sendo os

sítios mais freqüentes a orofaringe (tabela 3), com 17 pacientes (36,2%), seguido por laringe (27,6%), cavidade oral (21,3%) e hipofaringe (14,9%). Dois pacientes com estágio clínico II foram incluídos (ambos com sítio primário em laringe) devido à contra-indicação cirúrgica inicial (decorrente da localização da lesão cervical ou por se considerar o tratamento exclusivo quimioradioterápico como melhor opção no momento da avaliação pela equipe cirúrgica). Vinte pacientes apresentavam carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado – grau histológico II (57,5%). Em 6 pacientes não foi possível a determinação do grau histológico (material do tumor coletado pela punção por agulha fina e avaliados por citologia). A tabela 4 mostra a distribuição do estadiamento TMN na população estudada, observando-se maior número de pacientes com tumores localmente avançados (T4) em todos os sítios primários.

c) Características do tratamento realizado

Dos 47 pacientes incluídos no estudo, apenas dois não cumpriram o tratamento estabelecido inicialmente, (um por óbito e um por interrupção do protocolo por toxicidade limitante). A taxa de mortalidade no estudo foi de 2,1%. Com mediana de duração do tratamento de 58 dias (intervalo: 51-107 dias), 91,5% dos pacientes foram submetidos ao tratamento concomitante de quimioterapia e radioterapia. Desses, 90% (39 pacientes) utilizaram como droga quimioterápica a cisplatina, enquanto o restante utilizou como droga a carboplatina (tabela 5).

Tabela 2. Características dos pacientes.

<i>Variável</i>	<i>N</i>	<i>(%)</i>
Pacientes	47	100
Idade (anos)		
Mediana (intervalo)		58 (37 – 76)
Média ± D.P.		57,4 ± 9,1
Sexo		
Masculino	40	85,1
Feminino	7	14,9
Status Funcional (ECOG)		
0	8	17
1	37	78,7
2	2	4,3
Hábitos		
Tabagismo	45	95,7
Etilismo	35	74,5
Via de Ingesta alimentar		
Oral	39	83
Sonda naso-enteral	8	17
Hemoglobina (g/dL)		
Mediana (intervalo)		13,1 (7,5 – 16,1)
Média ± D.P.		12,90±4,07
Traqueostomizados	12	25,5%

Tabela 3. Sítios primários do tumor.

<i>Sítio Primário</i>	<i>N</i>	<i>(%)</i>
Cavidade Oral	10	21,3
Laringe	13	27,6
Orofaringe	17	36,2
Hipofaringe	7	14,9

Tabela 4. Distribuição do estadiamento TMN dos tumores na população por número de pacientes

Sítio Primário		T1	T2	T3	T4
Cavidade Oral	N0	-	-	-	-
	N1	-	-	-	1
	N2	-	1	2	5
	N3	-	-	-	-
Laringe	N0	-	2	2	1
	N1	-	-	-	3
	N2	-	-	1	1
	N3	-	1	-	2
Orofaringe	N0	-	-	-	4
	N1	-	1	-	2
	N2	-	-	1	1
	N3	-	1	1	6
Hipofaringe	N0	-	-	-	2
	N1	-	-	-	-
	N2	-	-	2	-
	N3	-	-	-	3

Tabela 5. Características dos pacientes quanto ao tipo de tratamento realizado

Tratamento realizado	n	%
Quimiorradioterapia	43	91,5
Quimioterapia seguida por quimiorradiação	2	4,2
Quimioterapia ou radioterapia isoladas	2	4,2

d) Avaliação sérica de osteopontina

Após o término do tratamento, foi determinada a dosagem sérica de 45 pacientes (2 pacientes não concluíram o tratamento). A maioria desses apresentou níveis elevados de osteopontina sérica. A OPN sérica mediana dos pacientes determinada pelo kit 1 (desenvolvido por *Assay Designs*) em ng/ml foi de 2,1 e 1,9 pré e pós-tratamento respectivamente (tabela 6 e 8); A OPN sérica mediana dos pacientes determinada pelo kit 2 (desenvolvido por *IBL*) em ng/ml foi de 69,5 e 87,9 pré e pós-tratamento respectivamente (tabela 7 e 9).

O tempo mediano entre a coleta das amostras de plasma e o início do tratamento foi de 34 dias (intervalo: 1-168 dias), enquanto que o tempo mediano foi de 31 dias (intervalo: 1-178 dias) entre o término do tratamento e a nova coleta. A diferença no tempo de tratamento dos pacientes ocorreu principalmente devido a interrupções (não programadas) durante a radioterapia causadas por defeitos e necessidade de manutenção nos equipamentos (aceleradores lineares ou fonte de cobalto).

Tabela 6. Kit 1: Resultado por paciente do nível sérico da osteopontina (em ng/ml) antes e após o término do tratamento

Pacientes Sítio/TNM (estágio clínico)	Osteopontina (ng/ml)	
	Antes	Depois
Cavidade oral/T4N2M0 (IV)	1,9	-
Cavidade oral/T4N2M0 (IV)	3,1	2,7
Laringe/T4N1M0 (IV)	2,6	2,1
Orofaringe/T4N3M0 (IV)	1,2	1,4
Orofaringe/T4N1M0 (IV)	2,5	1,1
Hipofaringe/T4N2M0 (IV)	2,3	1,6
Hipofaringe/T4N2M0 (IV)	1,9	6,7
Laringe/T4N3M0 (IV)	7,6	1,3
Cavidade oral/T4N2M0 (IV)	2,6	1,9
Laringe/T4N2M0 (IV)	2,5	3,7
Orofaringe/T2N3M0 (IV)	2,1	2,1
Hipofaringe/T4N0M0 (IV)	1,9	3,8
Orofaringe/T4N0M0 (IV)	1,7	3,7
Orofaringe/T4N3M0 (IV)	1,9	1,8
Orofaringe/T4N1M0 (IV)	1,9	1,7
Laringe/T4N3M0 (IV)	2,1	2,5
Orofaringe/T4N0M0 (IV)	1,4	1,1

Tabela 7. Kit 2: Resultado por paciente do nível sérico da osteopontina (em ng/ml) antes e após o término do tratamento

Pacientes Sítio/TMN (estágio clínico)	Osteopontina (ng/ml)	
	Antes	Depois
Orofaringe/T3N2M0 (IV)	129,6	166,0
Cavidade oral/T3N2M0 (IV)	64,8	75,3
Cavidade oral/T3N2M0 (IV)	96,5	111,9
Cavidade oral/T4N2M0 (IV)	89,9	163,2
Cavidade oral/T4N2M0 (IV)	194,0	-
Cavidade oral/T4N2M0 (IV)	102,1	169,6
Laringe/T3N0M0 (III)	93,4	63,0
Cavidade oral/T4N1M0 (IV)	64,1	52,4
Laringe/T2N0M0 (II)	56,8	31,8
Hipofaringe/T4N3M0 (IV)	311,8	154,1
Orofaringe/T4N2M0 (IV)	68,2	87,9
Laringe/T2N3M0 (IV)	76,9	65,9
Hipofaringe/T4N3M0 (IV)	144,7	96,3
Laringe/T4N1M0 (IV)	164,2	247,8
Hipofaringe/T4N0M0 (IV)	45,3	44,8
Hipofaringe/T4N3M0 (IV)	41,5	83,5
Orofaringe/T2N1M0 (III)	34,7	137,3
Orofaringe/T4N3M0 (IV)	26,2	45,2
Orofaringe/T4N3M0 (IV)	154,3	131,8
Cavidade oral/T2N2M0 (IV)	110,8	4,1
Orofaringe/T4N0M0 (IV)	65,4	104,1
Laringe/T4N1M0 (IV)	43,5	1,3
Laringe/T4N0M0 (IV)	70,7	184,5
Orofaringe/T3N3M0 (IV)	154,4	146,3
Orofaringe/T4N3M0 (IV)	53,6	58,4
Orofaringe/T4N0M0 (IV)	25,9	45,8
Hipofaringe/T4N3M0 (IV)	73,4	83,4
Laringe/T3N2M0 (IV)	3,9	72,9
Laringe/T2N0M0 (II)	37,8	77,8
Laringe/T3N0M0 (III)	52,5	119,7

Tabela 8. Kit 1: determinação da mediana do nível sérico da osteopontina antes e após o término do tratamento

Osteopontina sérica (antes x após, teste t pareado-p=0,8)	Kit 1	
	Antes	Após
Mediana	2,0	1,9
Média±D.P.	2,4±1,4	2,41±1,5

Tabela 9. Kit 2: determinação da mediana do nível sérico da osteopontina antes e após o término do tratamento.

Osteopontina sérica (antes x após, teste t pareado-p=0,52)	Kit 2	
	Antes	Após
Mediana	69,5	87,9
Média±D.P.	88,4±62,6	102,8±62,0

e) Relação da OPN e características tumorais

Considerando a análise da associação entre os valores séricos baixos de osteopontina antes do tratamento e características tumorais, foi observada influência do sítio primário da neoplasia, através do *teste exato de Fisher*, com tumores primários de orofaringe determinando globalmente um número maior de valores séricos baixos ($p=0,03$). Não houve influência do sítio primário da neoplasia nos valores séricos baixos de osteopontina após o término do tratamento ($p=0,76$).

Não houve associação entre o grau histológico e os valores de osteopontina sérica pré-tratamento ($p=0,73$) e pós-tratamento ($p=0,72$).

Não foi observada associação entre os níveis séricos de osteopontina sérica e os valores de hemoglobina dos pacientes antes do início do tratamento ($p=0,45$).

f) Avaliação da resposta ao tratamento

No total de 45 pacientes que concluíram o tratamento, observamos uma taxa de resposta global (completa e parcial) acima de 70%. Treze pacientes apresentaram resposta completa (27,6%), 20 pacientes com resposta parcial (42,5%), 9 pacientes com doença estável (20%) e 3 pacientes com progressão da doença (6,7%) (tabela 10).

Foi observada ainda uma tendência à associação entre os valores séricos baixos de osteopontina após término do tratamento e a resposta (parcial e completa) ao tratamento, através do *teste exato de Fisher* ($p=0,06$). A tabela 11 demonstra o número de pacientes respondedores e a associação com OPN alta pós-tratamento.

Tabela 10. Avaliação da resposta ao tratamento

Resposta	n	%
Completa	13	27,6
Parcial	20	42,5
Estável	9	19,2
Progressão	3	6,4
Não Avaliáveis	2	4,3
Total	47	100

Tabela 11. Osteopontina pós-tratamento e resposta tumoral (p=0,06 - teste do qui- quadrado).

OPN pós-tratamento Resposta	alta	baixa
Presente (RC e RP)	14 pacientes	19 pacientes
Ausente (DE e PD)	9 pacientes	3 pacientes

RC: resposta completa; RP: resposta parcial; DE: doença estável; PD: progressão de doença.

g) Avaliação da sobrevida global e da sobrevida livre de progressão da doença

O segmento mediano foi de 8,9 meses (intervalo: 4,7-28,9 meses). Dos 45 pacientes avaliados para resposta, 12 pacientes evoluíram para o óbito. A sobrevida livre de progressão mediana foi de 7,7 meses (intervalo:

2,3-17,8 meses) e a sobrevida global mediana observada foi de 8 meses (intervalo de 2,3-19,7 meses).

Através da análise pelo método de *log-rank*, não foi observado impacto do valor baixo ou alto de osteopontina sérica pré-tratamento sobre a sobrevida global dos pacientes avaliados ($p=0,19$), embora tenha sido uma tendência ao distanciamento das curvas de sobrevida global, com favorecimento para os pacientes que possuíam baixos níveis séricos de osteopontina antes do início do tratamento (figura 4). A mesma tendência de distanciamento de curvas foi verificada na análise da sobrevida global dos pacientes com valores séricos baixos de osteopontina após o término do tratamento (figura 5), todavia sem também alcançar significado de impacto estatístico pelo *método de log-rank* ($p=0,10$).

A estimativa da sobrevida global mediana, de acordo com o *método de Kaplan-Meier*, foi de 15,6 meses e 14,1 meses, para os pacientes com OPN sérica pré-tratamento com valores baixos e altos, respectivamente. Na avaliação de OPN sérica pós-tratamento, as medianas de sobrevida global pelo *método de Kaplan-Meier* foram de 16,2 meses e 13,7 meses, para níveis baixos e altos, respectivamente.

Não foi observada associação entre o nível sérico de OPN pré-tratamento e sobrevida livre de progressão ($p=0,33$; *log-rank*) (figura 6).

Foi observada uma tendência à associação ($p=0,09$; *log-rank*) entre os valores elevados da osteopontina pós-tratamento e menor sobrevida livre de progressão (figura 7).

As medianas de sobrevida livre de progressão, considerando os valores de OPN sérica pré-tratamento, foram de 12,3 meses e 14,8 meses conforme valores altos e baixos, respectivamente. Considerando os valores de OPN sérica pós-tratamento, as medianas de sobrevida livre de progressão foram de 11,9 meses e 14,5 meses, para valores séricos altos e baixos, respectivamente.

Figura 4. Gráfico da estimativa (%) da sobrevida global (OS – em meses) dos 47 pacientes incluídos no estudo, conforme valor de osteopontina sérica antes do início do tratamento, de acordo com o método de Kaplan-Meier (seguimento mediano de 9 meses).

Figura 5. Gráfico da estimativa (%) da sobrevida global (OS – em meses) dos 45 pacientes incluídos no estudo, conforme valor de osteopontina sérica após o término do tratamento, de acordo com o método de Kaplan-Meier (seguimento mediano de 9 meses).

Figura 6. Gráfico da estimativa (%) da sobrevida livre de progressão (SLP – em meses) dos 47 pacientes incluídos no estudo, conforme valor de osteopontina sérica antes do início do tratamento, de acordo com o método de Kaplan-Meier (seguimento mediano de 9 meses).

Figura 7. Gráfico da estimativa (%) da sobrevida livre de progressão (SLP – em meses) dos 45 pacientes incluídos no estudo, conforme valor de osteopontina sérica após o término do tratamento, de acordo com o método de Kaplan-Meier (seguimento mediano de 9 meses)

Discussão

5. DISCUSSÃO

Em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, a despeito dos avanços terapêuticos, a sobrevida mediana em 5 anos apresentou apenas um pequeno aumento sobre a última década ⁽¹⁰⁾ e a taxa de recidiva da doença é observada em cerca de 50% dos pacientes ⁽¹¹⁾. A falha no tratamento desta neoplasia pode ser atribuída a múltiplos fatores. Alguns determinantes clínicos como sexo, idade, sítio tumoral, estadiamento TNM e grau histológico podem auxiliar na escolha do tratamento, porém não são fatores prognósticos confiáveis. A característica clínica mais importante na avaliação prognóstica de recidiva é o estágio linfonodal (grau de comprometimento de linfonodos cervicais). Infelizmente, a maioria dos pacientes em nosso país apresenta-se em estágio avançado ⁽⁴⁾, o que impossibilita caracterizar o comprometimento dos linfonodos cervicais como fator discriminante neste grupo de pacientes (estágios clínicos III e IV). Vários estudos têm avaliado o uso de biomarcadores e o emprego de técnicas de seqüenciamento gênico na busca de determinantes prognósticos destes pacientes. Recentes publicações sugerem que a elevação sérica de OPN está associada à invasão, progressão tumoral e metástases em vários tipos de neoplasias que acometem seres humanos, incluindo câncer de mama, próstata e pulmão ⁽⁵²⁻⁵⁷⁾; outros estudos ainda evidenciaram uma

importante elevação da expressão de OPN em tecidos tumorais (avaliada por métodos imuno-histoquímicos) em diversos tumores dentre os quais os carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço^(81, 82, 83, 84, 85). Em pacientes portadores de CECCP, altas concentrações séricas de OPN foram associadas à pior resposta frente à radioterapia e menor sobrevida^(72, 73, 74).

Baseando-se na extensão local da doença, os pacientes com CECCP localmente avançado podem ser categorizados cirurgicamente em ressecáveis e irressecáveis. Com diferentes prognósticos, esses dois grupos têm taxas de sobrevida bem distintas. Em pacientes com doença ressecável, a terapia padrão é a quimioterapia e radioterapia concomitante⁽⁸⁶⁾. Desses, somente 37% têm longa sobrevida⁽⁸⁷⁾. Por outro lado, pacientes com doença irressecável correspondem a um grupo heterogêneo, com pior prognóstico e taxa de sobrevida global inferior a 25% em 3 anos^(88, 87).

A análise das características clínico-patológicas da população do presente estudo, bem como a resposta à quimiorradiação e as taxas de sobrevida são concordantes com outros estudos aleatorizados que empregaram a quimiorradioterapia como estratégia⁽⁸⁹⁾. Predominância do sexo masculino, tabagismo importante e etilismo demonstram conformidade com os aspectos epidemiológicos extensivamente relatados na literatura.

A taxa de mortalidade associada ao tratamento no presente estudo foi de 2,1%. Dados da literatura demonstram uma taxa inferior a 5%^(86,90). Um estudo brasileiro publicado recentemente, desenvolvido no serviço de oncologia clínica do HC/FMUSP, relatou mortalidade associada à

quimiorradiação em pacientes portadores de CECCP localmente avançado e irresssecável de 10% ⁽⁹¹⁾.

Em nosso estudo, o sítio primário mais freqüentemente acometido foi a orofaringe, seguido por laringe e cavidade oral. No estudo de Adelstein et al. o sítio primário mais acometido também foi a orofaringe ⁽⁸⁶⁾; todavia, não há uniformidade nos dados da literatura a respeito da predominância de localização tumoral ^(89, 90).

Com taxas de resposta completa de 27,6% e resposta global (completa e parcial) de 70%, nosso estudo se alinha a outros ensaios que apresentam altas taxas de resposta (completa e parcial). Jeremic et al. relatam cerca de 75% de respostas completas a favor da quimiorradiação ⁽⁹²⁾; Merlano et al. obtiveram 43% de respostas completas ⁽⁹⁰⁾; Adelstein et al. evidenciaram uma taxa de resposta completa de 40,2% em um dos braços experimentais do estudo ⁽⁸⁹⁾. Uma das possíveis explicações para a diferença nas taxas de resposta completa e parcial encontradas nos estudos seria a heterogeneidade dos tratamentos empregados – esquemas quimioterápicos, dose e fracionamento da radioterapia. O tempo de duração da radioterapia também é determinante para os resultados do tratamento: atrasos causados por interrupções não programadas constituem fator prognóstico adverso descrito na literatura ⁽¹⁾.

Observamos que pacientes portadores de tumores de orofaringe, em comparação com pacientes portadores de tumores de outros sub-sítios, apresentavam níveis séricos mais baixos OPN pré-tratamento ($p=0,03$), embora apresentassem uma proporção maior de tumores avançados T4 e

N3. Neste caso, a OPN deve refletir características biológicas do tumor, como hipóxia, e não volume tumoral ^(65, 66, 68, 69, 93).

Embora a baixa concentração de hemoglobina seja considerada como um indicador de hipóxia tecidual (aumento da radio-resistência dos tecidos e deficiente controle local do tumor em pacientes sob quimioterapia), não foi observada associação entre os níveis séricos de osteopontina sérica e os valores de hemoglobina dos pacientes antes do início do tratamento, o que pode sugerir a maior importância de fatores locais, como vascularização anômala, na gênese da hipóxia tecidual ^(25, 46, 94).

Observamos ausência de associação entre sobrevida global e sobrevida livre de progressão e valor sérico de OPN pré-tratamento. Um fator temporal pode ter contribuído para este fato. O tempo mediano entre a coleta das amostras de plasma e o início do tratamento e entre o término do tratamento e nova coleta tiveram, ambos, intervalo superior a 3 meses. Embora tenha sido realizada uma conservação adequada das amostras, entendemos que quanto maior o intervalo entre a coleta da amostra e o início do tratamento, maior a probabilidade de progressão tumoral neste período, o que pode interferir na análise dos dados. Não foi observada associação entre a sobrevida global e os valores séricos de OPN pré-tratamento, embora possamos observar um afastamento das curvas de sobrevida global sem significância estatística. O aumento do número de pacientes incluídos no estudo, possivelmente, determinaria o alcance da significância estatística. Estes resultados estariam de acordo com estudo publicado por Overgaard et al., que demonstraram uma associação entre

valor sérico alto de OPN pré-tratamento e pior resultado da radioterapia empregada, com menor sobrevida livre de progressão e pior mortalidade específica em pacientes portadores de CECCP que não receberam droga modificadora de hipóxia tecidual ⁽⁷²⁾.

No presente estudo foi observada uma tendência a menor sobrevida livre de progressão para os pacientes que possuíam valor sérico alto de OPN após o término do tratamento ($p=0,09$). O papel prognóstico da OPN sérica pós-tratamento não tem sido avaliado nos estudos publicados até o momento. Considerando que a OPN é produzida pelas células tumorais, especulamos que a diminuição do valor sérico de OPN pós-tratamento esteja relacionada a uma redução da carga tumoral. Esta hipótese é apoiada pelos nossos dados, já que houve uma associação entre OPN baixa e resposta tumoral. De maneira semelhante, em tumores de cólon e ovário, por exemplo, observa-se diminuição dos níveis séricos dos marcadores CEA e CA-125 após cirurgia citorrredutora ⁽⁹⁵⁾. Caso este resultado seja confirmado em estudos posteriores, OPN poderá ser estabelecida como um marcador útil após quimiorradioterapia na ausência de doença detectável por métodos de imagem. Neste cenário, pacientes com OPN sérica elevada poderiam ser candidatos a protocolos de intensificação do tratamento.

Vários estudos publicados demonstram o papel da OPN sérica pré-tratamento como marcador prognóstico ^(64, 72, 73), porém o valor sérico de OPN pós-tratamento não foi estudado. O presente estudo sugere que, numa população de portadores de CECCP localmente avançado (estágios III e IV), tratados de forma uniforme com quimiorradiação, OPN sérica baixa pós

tratamento está associada a resposta e à maior sobrevida livre de progressão. Estudos futuros deverão ser conduzidos visando confirmar tais achados.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e nos dados obtidos no presente estudo é possível concluir que:

1. Observou-se associação (valor de p com significância estatística marginal) entre a resposta ao tratamento empregado (resposta completa e/ou parcial) e diminuição do valor sérico de OPN pós-tratamento;
2. Existe uma associação entre os tumores de orofaringe e valores séricos baixos de OPN antes do tratamento;
3. Observada associação (valor de p com significância estatística marginal) entre os valores elevados da osteopontina pós-tratamento e menor sobrevida livre de progressão;
4. Não houve associação entre os valores de OPN sérica pré e pós-tratamento e a sobrevida global.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and Neck cancer. *N Engl J Med*. 2001;345:1890-1900.
2. Le QT, Sutphin PD, Raychaudhuri S, Yu SC, Terris DJ, Lin HS, Lum B, Pinto HA, Koong AC, Giaccia AJ. Identification of Osteopontin as a Prognostic Plasma Marker for Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2003;9:59–67.
3. Diaz Jr EM, Sturges EM, Laramore GE, Sabichi AL, Lippman SM, Clayman G. Neoplasms of the Head and Neck. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC Jr, Gansler TS, Holland JF, Frei III E (eds.). *Cancer Medicine*. 6a ed. Hamilton, Ontario: BC Decker Inc; 2003. p.1325-71.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Estimativas de Incidência e Mortalidade por Câncer. Rio de Janeiro: INCA; 2003.
5. Erkal HS, Mendenhall WM, Amdur RJ, Villaret DB, Stringer SP. Synchronous and metachronous squamous cell carcinomas of the head and neck mucosal sites. *J Clin Oncol*. 2001;19:1358-62.

6. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin.* 2003; 53:5-26.
7. Franceschi S, Talamini R, Barra S, Barón AE, Negri E, Bidoli E, Serraino D, La Vecchia C. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in Northern Italy. *Cancer Res.* 1990; 50:6502-7.
8. Ostwald C, Gogacz P, Hillmann T, Schweder J, Gundlach K, Kundt G, Barten M. p53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinoma of the lip and the oral cavity. *Int J Cancer.* 2000;88:82-6.
9. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988;48:3282-7.
10. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2001 *CA Cancer J Clin.* 2001;51:15-36.
11. Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuuring E, Hermans J, Vis AA, Litvinov SV, van Krieken JH. Markers for assessment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;123:412-9.
12. Piccirillo JF, Feinstein, AR. Clinical symptoms and comorbidity: significance for the prognostic classification of cancer. *Cancer.* 1996;77:834-42.

13. Rodrigo Tapia JP, Domínguez Iglesias F, Alvarez Marcos C, González Meana MV, García Pedrero J, Suárez Nieto C. Prognostic significance of the expression of adhesion molecules E-cadherin, Cd44s and CD44V6 in supraglottic squamous carcinoma. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2002;53:745-51.
14. Wu M, Putti TC, Bhuiya TA. Comparative study in the expression of p53, EGFR, TGF- α , and cyclin D1 in verrucous carcinoma, verrucous hyperplasia, and squamous cell carcinoma of head and neck region. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2002;10:351-6.
15. Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Misawa K, Araki K, Misawa Y, Ueda Y. Prognostic value of glucose transporter 1 expression in patients with hypopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res.* 2002;22:3489-94.
16. Vielba R, Bilbao J, Ispizua A, Zabalza I, Alfaro J, Rezola R, Moreno E, Elorriaga J, Alonso I, Baroja A, de la Hoz C. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope.* 2003;113:167-72.
17. Vora HH, Shah NG, Patel DD, Trivedi TI, Chikhlikar PR. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis. *J Surg Oncol.* 2003;82:34-50.
18. Ho S, Leung WT, Yuen J, Johnson PJ. Serum levels of CYFRA 21-1 in nasopharyngeal carcinoma and its possible role in monitoring of therapy. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996;32:377-80.

-
19. Lin WY, Yen TC, Cheng KY, Wang SJ. The value of CYFRA 21-1, a new tumor marker, in nasopharyngeal carcinoma. *Neoplasma*. 1998;45:21-4.
20. Yen TC, Lin WY, Kao CH, Cheng KY, Wang SJ. A study of a new tumour marker, CYFRA 21-1, in squamous cell carcinoma of the head and neck, and comparison with squamous cell carcinoma antigen. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1998;23:82-6.
21. Ogawa T, Tsurusako Y, Kimura N, Nishioka S, Akagi H, Nishizaki K, Nishioka K, Rutka J. Comparison of tumor markers in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Otolaryngol Suppl* 1999;540:72-6.
22. González Sánchez E, López-Ríos Velasco J, Calvo Boizas E, García-Talavera Fernández JR, Martín Rodríguez M, Muñoz Herrera A, Del Cañizo Alvarez A. Study of Cyfra 21-1 as a new tumor marker for the diagnosis of epidermoid carcinoma of the head and neck. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 1999; 50:85-9.
23. Maass JD, Hoffmann-Fazel A, Goeroegh T, Hoffmann M, Meyer JE, Gottschlich S, Rudert H, Maune S. Cyfra 21-1: a serological help for detection of distant metastases in head and neck cancer. *Anticancer Res*. 2000;20:2241-3.
24. Doweck I, Barak M, Uri N, Greenberg E. The prognostic value of the tumour marker Cyfra 21-1 in carcinoma of head and neck and its role in early detection of recurrent disease. *Br J Cancer*. 2000;83:1696-1701.

-
25. Furger KA, Menon RK, Tuck AB, Bramwell VH, Chambers AF. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. *Curr Mol Med*. 2001;1:621-32.
26. Weber GF. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1552:61-85.
27. Lee JK, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Sun SS, Kao CH. Comparison of CYFRA 21-1 and squamous cell carcinoma antigen in detecting nasopharyngeal carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001;110:775-8.
28. Pauli C, Stieber P, Schmitt UM, Andratschke M, Hoffmann K, Wollemberg B. The significance of Tenascin-C serum level as tumor marker in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res*. 2002;22:3093-7.
29. Kuropkat C, Lippert BM, Werner JA. Follow-up with serum Cyfra 21-1 in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oncology*. 2002;63:280-5.
30. Deng YF, Chen P, Lin YZ, Le JZ, Wu XL, Yu MQ, Zhuang PY, Gao MH. Analytical and clinical evaluation of CYFRA 21-1 by electrochemiluminescent immunoassay in head and neck squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol*. 2003;117:190-4.
31. Le QT, Sutphin PD, Raychaudhuri S, Yu SC, Terris DJ, Lin HS, Lum B, Pinto HA, Koong AC, Giaccia AJ. Identification of osteopontin as a prognostic plasma marker for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2003;9:59-67.

-
32. Brown LF, Papadopoulos-Sergiou A, Berse B, Manseau EJ, Tognazzi K, Perruzzi CA, Dvorak HF, Senger DR. Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *Am J Pathol.* 1994;145:610-23.
33. Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, Herrlich P, Hotta H, Tanaka K, Chikuma S, Yagita H, Okumura K, Murakami M, Saiki I, Chambers AF, Uede T. CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res.* 1999;59:219-26.
34. Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell.* 1979;16:885–93.
35. Wuthrich RP. The complex role of osteopontin in renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13:2448-50.
36. Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem.* 1998;Suppl.30-31:92-102.
37. Weber GF, Cantor H. The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996;7:241-8.
38. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol.* 2000;19:615-22.

-
39. Ramos KS. Redox regulation of c-Ha-ras and osteopontin signaling in vascular smooth muscle cells: implications in chemical atherogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:243-65.
40. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest*. 2001;107:1055-61.
41. Makrydimas G, Zagorianakou N, Zagorianakou P, Agnantis NJ. CD44 family and gynaecological cancer. *In Vivo*. 2003;17:633-40.
42. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol*. 2006;16:79-87.
43. Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A. Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation. *Anticancer Res*. 1989;9:1291-9.
44. Denhardt DT, Chambers AF. Overcoming obstacles to metastasis--defenses against host defenses: osteopontin (OPN) as a shield against attack by cytotoxic host cells. *J Cell Biochem*. 1994;56:48-51.
45. Weber GF, Ashkar S, Cantor H. Interaction between CD44 and osteopontin as a potential basis for metastasis formation. *Proc Assoc Am Physicians*. 1997;109:1-9.
46. Oates AJ, Barraclough R, Rudland PS. The role of osteopontin in tumorigenesis and metastasis. *Invasion Metastasis*. 1997;17:1-15.

-
47. Behrend EI, Craig AM, Wilson SM, Denhardt DT, Chambers AF. Reduced malignancy of ras-transformed NIH 3T3 cells expressing antisense osteopontin RNA. *Cancer Res.* 1994;54:832-7.
48. Gardner HA, Berse B, Senger DR. Specific reduction in osteopontin synthesis by antisense RNA inhibits the tumorigenicity of transformed Rat1 fibroblasts. *Oncogene.* 1994;9:2321-6.
49. Su L, Mukherjee AB, Mukherjee BB. Expression of antisense osteopontin RNA inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation of mouse JB6 epidermal cells. *Oncogene.* 1995;10:2163-9.
50. Feng B, Rollo EE, Denhardt DT. Osteopontin (OPN) may facilitate metastasis by protecting cells from macrophage NO-mediated cytotoxicity: evidence from cell lines down-regulated for OPN expression by a targeted ribozyme. *Clin Exp Metastasis.* 1995;13:453-62.
51. Oates AJ, Barraclough R, Rudland PS. The identification of osteopontin as a metastasis-related gene product in a rodent mammary tumour model. *Oncogene.* 1996;13:97-104.
52. Chambers AF, Wilson SM, Kerkvliet N, O'Malley FP, Harris JF, Casson AG. Osteopontin expression in lung cancer. *Lung Cancer.* 1996;15:311-23.
53. Singhal H, Bautista DS, Tonkin KS, O'Malley FP, Tuck AB, Chambers AF, Harris JF. Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin Cancer Res.* 1997;3:605-11.

-
54. Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Harris JF, Tonkin KS, Kerkvliet N, Saad Z, Doig GS, Chambers AF. Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int J Cancer*. 1998;79:502-8.
55. Casson AG, Wilson SM, McCart JA, O'Malley FP, Ozcelik H, Tsao MS, Chambers AF. ras mutation and expression of the ras regulated genes osteopontin and cathepsin L in human esophageal cancer. *Int J Cancer*. 1997;72:739-45.
56. Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, Yamamoto S, Yasui W, Ishikawa T, Tahara E. Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *Int J Cancer*. 1998;79:127-32.
57. Devoll RE, Li W, Woods KV, Pinero GJ, Butler WT, Farach-Carson MC, Happonen RP. Osteopontin (OPN) distribution in premalignant and malignant lesions of oral epithelium and expression in cell lines derived from squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Pathol Med*. 1999;28:97-101.
58. Thalmann GN, Sikes RA, Devoll RE, Kiefer JA, Markwalder R, Klima I, Farach-Carson CM, Studer UE, Chung LW. Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. *Clin Cancer Res*. 1999;5:2271-7.
59. Saitoh Y, Kuratsu J, Takeshima H, Yamamoto S, Ushio Y. Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy. *Lab Invest*. 1995;72:55-63.
60. Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, , Tonkin KS, Harris JF, Bautista D, Chambers AF. Osteopontin and p53 expression are associated with tumor

progression in a case of synchronous, bilateral, invasive mammary carcinomas. *Arch Pathol Lab Med*. 1997;121:578-84.

61. Tozawa K, Yamada Y, Kawai N, Okamura T, Ueda K, Kohri K. Osteopontin expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Urol Int*. 1999;62:155-8.

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

63. Bautista DS, Saad Z, Chambers AF, Tonkin KS, O'Malley FP, Singhal H, Tokmakejian S, Bramwell V, Harris JF. Quantification of osteopontin in human plasma with an ELISA: basal levels in pre- and postmenopausal women. *Clin Biochem*. 1996;29:231-9.

64. Petrik D, Lavori PW, Cao H, Zhu Y, Wong P, Christofferson E, Kaplan MJ, Pinto HA, Sutphin P, Koong AC, Giaccia AJ, Le QT. Plasma Osteopontin Is an Independent Prognostic Marker for Head and Neck Cancers. *J Clin Oncol*. 2006;24:5291-7.

65. Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:266–76.

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

-
67. Nordsmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, Becker A, Adam M, Molls M, Dunst J, Terris DJ, Overgaard J. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multicenter study. *Radiother Oncol.* 2005; 77:18-24.
68. Beasley NJ, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, Millard P, Fuggle S, Harris AL. Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res.* 2002;62:2493–7.
69. Nordsmark M, Alsner J, Keller J, , Nielsen OS, Jensen OM, Horsman MR, Overgaard J. Hypoxia in human soft tissue sarcomas: adverse impact on survival and no association with p53 mutations. *Br J Cancer.* 2001;84:1070–5.
70. Leo C, Giaccia AJ, Denko NC. The hypoxic tumour microenvironment and gene expression. *Semin Radiat Oncol.* 2004;14:207–14.
71. Le QT, Denko NC, Giaccia AJ. Hypoxic gene expression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2004;23:293–310.
72. Overgaard J, Eriksen JG, Nordismark M, Alsner J, Horsman MR; Danish Head and Neck Cancer Study Group. Plasma osteopontina, hipóxia, and response to the hipóxia sensitizer nimorazole in radiotherapy of head and neck cancer: results from the DAHANCA 5 randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 2005;6:757-64.

73. Overgaard J, Hansen HS, Overgaard M, Bastholt L, Berthelsen A, Specht L, Lindelov B, Jorgensen K. A randomized doubleblind phase III study of nimorazole as a hypoxic radiosensitizer of primary radiotherapy in supraglottic larynx and pharynx carcinoma. Results of the Danish Head and Neck Cancer Study (DAHANCA) Protocol 5-85. *Radiother Oncol.* 1998;46: 135–46.
74. Eto M, Kodama S, Nomi N, Uemura N, Suzuki M. Clinical significance of elevated osteopontin levels in head and neck cancer patients. *Auris Nasus Larynx.* 2007;34:343-6.
75. Vordermark D, Said HM, Katzer A, Kuhnt T, Hänsgen G, Dunst J, Flentje M, Bache M. Plasma osteopontina levels in patients with head and neck cancer and cervix cancer are critically dependent of ELISA system. *BMC Cancer.* 2006;6:207-19.
76. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA , Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:205-16.
77. Ramankulov A, Lein M, Kristiansen G, Loening SA, Jung K. Plasma osteopontin in comparison with bone markers as indicator of bone metastasis and survival outcome in patients with prostate cancer. *Prostate.* 2007; 67:330-340.

78. El Sayed S, Nelson N. Adjuvant and adjunctive chemotherapy in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck region. A meta- analysis of prospective and randomized trials. *J Clin Oncol*. 1996;14: 838-47.
79. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457-81.
80. SPSS for Windows, release 10.0.5. Copyright© SPSS Inc. 1989-1999.
81. Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D, Yeatman TJ. Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:513-21.
82. Gotoh M, Sakamoto M, Kanetaka K, Chuuma M, Hirohashi S. Overexpression of osteopontin in hepatocellular carcinoma. *Pathol Int*. 2002; 52:19-24.
83. Hu Z, Lin D, Yuan J, , Xiao T, Zhang H, Sun W, Han N, Ma Y, Di X, Gao M, Ma J, Zhang J, Cheng S, Gao Y. Overexpression of osteopontin is associated with more aggressive phenotypes in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:4646-52.
84. Rittling SR, Chambers AF. Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer*. 2004;90:1877-81.

-
85. Chien CY, Su CY, Chuang HC, Fang FM, Huang HY, Chen CM, Chen CH, Huang CC. Clinical significance of osteopontin expression in T1 and T2 tongue cancers. *Head Neck*. 2008;30:776-81.
86. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, Glisson B, Trotti A, Ridge JA, Chao C, Peters G, Lee DJ, Leaf A, Ensley J, Cooper J. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med*. 2003;349:2091-8.
87. Adelstein DJ, Tan EH, Lavertu P. Treatment of head and neck cancer: the role of chemotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1996;24:97-116.
88. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and Neck. *N Engl J Med*. 1993;328:184-194.
89. Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, Wagner H Jr, Kish JA, Ensley JF, Schuller DE, Forastiere AA. 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.
90. Merlano M, Benasso M, Corvò R, Rosso R, Vitale V, Blengio F, Numico G, Margarino G, Bonelli L, Santi L. 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.

91. de Castro G Jr, Snitcovsky IM, Gebrim EM, Leitão GM, Nadalin W, Ferraz AR, Federico MH. High-dose cisplatin concurrent to conventionally delivered radiotherapy is associated with unacceptable toxicity in unresectable, non-metastatic stage IV head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2007;264:1475-82.
92. Jeremic B, Shibamoto Y, Milicic B, Nikolic N, Dagovic A, Aleksandrovic J, Vaskovic Z, Tadic L. Hyperfractionated radiation therapy with or without concurrent low-dose daily cisplatin in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 2000;18:1458-64.
93. Le QT. Identification and Targeting Hypoxia in Head and Neck Cancer – A Brief Overview of Current Approaches. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007; 69(2 Suppl):S56–8.
94. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. Review. *N Engl J Med*. 2008;358:2039-49.
95. Boente MP, Yeh K, Hogan WM, Ozols RF. Current status of laparotomy in colorectal and ovarian cancer. *Cancer Treat Res*. 1996;82:337-57.

Anexos

8. ANEXOS

Anexo 1. Termo de consentimento pós-informado para o protocolo de pesquisa: *marcadores séricos e polimorfismos prognósticos no carcinoma de cabeça e pescoço*

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS -INFORMAÇÃO

(Instruções para preenchimento no verso)

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Marcadores séricos e poliformismos prognósticos no carcinoma de cabeça e pescoço.
PESQUISADOR: Igor Snitcovsky e Miiriam Hatsue Honda Federico
CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente HCFMUSP LIM24 e Professora Associada -Oncologia
UNIDADE DO HCFMUSP: INRAD
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO	☐	RISCO MÍNIMO	☒
RISCO MÉDIO	☐		
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ;
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais;
3. desconfortos e riscos esperados;
4. benefícios que poderão ser obtidos;
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

O Senhor (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. O Sr (a) não é obrigado a participar desta pesquisa e não vai ser prejudicado ou sofrer preconceito se não quiser participar da mesma. A pesquisa não envolve o tratamento da sua doença, que é o de receber um tratamento combinado de radioterapia e quimioterapia que é o recomendado para seu caso. Reforço que esse tratamento não será modificado, esteja ou não o Sr (a) na pesquisa. O nosso objetivo na pesquisa é de saber se existem marcadores no exame de sangue que possa ajudar o médico a prever a sua chance de resposta ao tratamento. A pesquisa envolve a colheita de aproximadamente 2 colheres de sopa (10 ml) de sangue de uma veia do seu braço, antes do início do tratamento e novamente após o final do mesmo, usando uma seringa com uma agulha. A colheita tem um risco muito pequeno de tontura durante a colheita, dor no local e formação de hematoma (mancha de sangue) no braço, riscos estes ligados à qualquer colheita de sangue para exame. O sangue colhido será encaminhado ao Laboratório de Oncologia e dele separado, para estocagem e pesquisa, o plasma (parte líquida) e células (linfócitos). Esse material será usado para pesquisar a presença de uma substância chamada osteopontina no plasma e de alterações do material genético (polimorfismos) do gene XPD. Como sabemos que outros marcadores podem ser definidos no futuro com mesma finalidade, pretendemos guardar o material excedente por máximo 5 (cinco) anos para futuros estudos de substâncias (proteínas) que possam ajudar na avaliação da resposta ao tratamento. Caso o material não seja usado para pesquisa ou o Sr (a) decida retirar o seu consentimento a qualquer momento desta pesquisa, solicitamos que se comunique com este pesquisador e será garantida ou a devolução do material ou a destruição do mesmo. Durante toda a pesquisa e em eventuais trabalhos publicados, o seu nome será mantido em sigilo. Embora esta pesquisa não beneficie o Sr(a) diretamente, achamos que os resultados da pesquisa ajudarão a indicar candidatos a novas formas de tratamento no futuro.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
 2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
 3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
 4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
 5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.
-

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dr. Igor Snitcovsky- Serviço de Oncologia- INRAD-HCFMUSP. Av Dr Eneas Carvalho Aguiar n 255- 3 andar, sala 7.21. tel 30696721

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo 2. Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa- CPPesq da Diretoria Clínica do HCFMUSP referente ao protocolo de pesquisa *marcadores séricos e polimorfismos prognósticos no carcinoma de cabeça e pescoço*

COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PROTOCOLO

Local: *Pós-Graduação*
Recebido por: *[assinatura]*
Data:

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 20.12.06, tomou conhecimento que do Protocolo de Pesquisa nº **478/04**, intitulado: "**Marcadores séricos e polimorfismos com valor prognóstico no epidermóide de cabeça e pescoço**", apresentado pelo Departamento de Radiologia **será dissertação de mestrado do Sr. Glauber Moreira Leitão**, tendo como orientador Dr. Igor Moyses Longo Snitcovsky.

CAPPesq, 20 de dezembro de 2006.

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

Conte,
C. Renzo Brentani
Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani
Coordenador da Área de Oncologia
FMUSP

PROTOCOLO
Local: *Dr. Igor Moyses Longo Snitcovsky*
Recebido por: *[assinatura]*
Data: *05/01/07*
[assinatura]
04/04/07

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP

Anexo 3. Ficha de dados clínicos.**FICHA CLÍNICA**

PROTOCOLO OSTEOPONTINA

SERVIÇO DE ONCOLOGIA CLÍNICA – INRAD – HC/FMUSP

Identificação

Nome Completo: _____

RGHC: _____ Data de

Nascimento: ____/____/____

Idade: _____ Sexo: _____

Endereço: _____

Data da Assinatura Consentimento Informado: ____/____/____

Data da Coleta: ____/____/____ () Osteopontina () Polimorfismos

Médico Assistente: _____ Ambulatório: _____

Questionário *Qualidade de Vida*: () ____/____/____ (pré-tratamento)
() ____/____/____ (pós-

tratamento)

Dados Gerais

Data do diagnóstico: ____/____/____

Diagnóstico Histológico: _____

Grau histológico: _____ Sítio primário: _____

Sub-sítio: _____

Estadiamento TNM: T _____ N _____ M _____ (6ª Edição)

Estágio Clínico: _____

Dados PRÉ-tratamento

Data: ____/____/____

Peso: _____ Altura: _____ Valor Osteopontina: _____

ECOG: _____

Hábitos

() Tabagismo: _____ () Etilismo: _____

Traqueostomia () sim () não

Via de Ingesta Alimentar () oral

() Sonda Naso-enteral

Exames Laboratoriais

Data: ____/____/____
 Hb(g/dL)____ Ht(%)____ Leuc.totais:____
 Neutrófilos:____ Linfócitos:____ Plaquetas:____
 Albumina sérica:____ Creatinina sérica:____
 Sódio:____ Potássio:____ Uréia:____

Avaliação de Dor: _____

PROPOSTA DE TRATAMENTO

() QT + radioterapia concomitantes adjuvante
 () QT + radioterapia concomitantes neoadjuvante
 () QT paliativa
 () Outro: _____

INÍCIO DO TRATAMENTO: ____/____/____

TÉRMINO DO TRATAMENTO: ____/____/____

Dados PÓS-tratamento

Data: ____/____/____
 Peso:____ Altura:____ Valor Osteopontina:____
 ECOG:____
 Hábitos () Tabagismo:____
 () Etilismo:____
 Traqueostomia ()sim () não
 Via de Ingesta Alimentar () oral
 () Sonda Naso-enteral

Exames Laboratoriais

Data: ____/____/____
 Hb(g/dL)____ Ht(%)____ Leuc.totais:____
 Neutrófilos:____ Linfócitos:____ Plaquetas:____
 Albumina sérica:____ Creatinina sérica:____
 Sódio:____ Potássio:____ Uréia:____

Avaliação de Dor: _____

Necessidade de transfusão sanguínea: () sim () não

Necessidade de internação hospitalar: () sim () não

Toxicidades relatadas durante tratamento:

() mucosite – grau:____
 () radioepidermite:____
 () disfagia faríngea:____
 () Vômitos:____
 () Náuseas:____

() Infecção : _____

() Outros: _____

Tratamentos Realizados

#Quimioterapia: _____

#Radioterapia: _____

Avaliação de Resposta Pós-Tratamento

Data da última Consulta: ____/____/____

Avaliação atual: () RC () RP () SED () DE

Método de avaliação usado: _____

Data da Coleta Pós-tratamento: ____/____/____
() Não Aplicável

Data da última Consulta: ____/____/____

Avaliação atual: () RC () RP () SED () DE

Método de avaliação usado: _____

Data da Coleta Pós-tratamento: ____/____/____
() Não Aplicável

Data da última Consulta: ____/____/____

Avaliação atual: () RC () RP () SED () DE

Método de avaliação usado: _____

Data da Coleta Pós-tratamento: ____/____/____
() Não Aplicável