

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIENCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**CELENY MILAGROS FIGUERA GÓMEZ**

**ANÁLISE DO POTENCIAL DA OSTEOPONTINA E DA  
SERPINA1 COMO BIOMARCADORES DO CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO**

VITÓRIA

2017

**CELENY MILAGROS FIGUERA GÓMEZ**

**ANÁLISE DO POTENCIAL DA OSTEOPONTINA E DA  
SERPINA1 COMO BIOMARCADORES DO CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Profa.Dra.Sonia Alves Gouvea

VITÓRIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

G633a Gómez, Celeny Milagros Figuera, 1990 -  
Análise do potencial da Osteopontina e da Serpina1 como  
biomarcadores do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço  
/ Celeny Milagros Figuera Gómez - 2017.  
77 f. : il.

Orientador: Sônia Alves Gouvêa.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Carcinoma de Células Escamosas. 2. Cabeça.  
3. Pescoço. 4. Biomarcadores. 5. Osteopontina. I. Gouvêa,  
Sônia Alves. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro  
de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

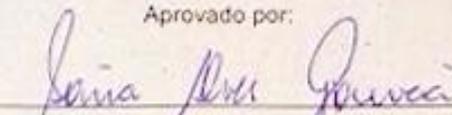
---

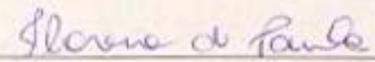
"Análise do Potencial da Osteopontina e da Serpina1 como Biomarcadores do  
Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço"

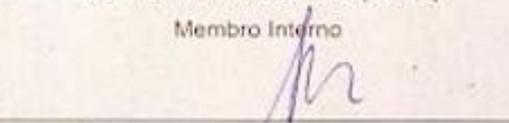
Celeny Milagros Figuera Gómez

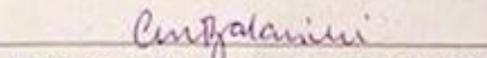
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Sofia Alves Gouveia (UFES)  
Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Flavia de Paula (UFES)  
Membro Interno

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Suely Gomes de Figueiredo (UFES)  
Membro Externo

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Camille de Moura Balarini (UFPB)  
Membro Externo

Vitória-ES, 22 de Fevereiro de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço principalmente aos meus pais, Ada e Leny, pela confiança que sempre colocam em mim, pelos conselhos, pelas palavras de apoio quando estou feliz ou triste, por me acompanhar sempre no meu processo de crescimento profissional inclusive na distância e pelo amor incondicional. Todo o que eu sou é graças a vocês.

Agradeço minha orientadora, Dra. Sonia Gouvêa, quem me deu a oportunidade de trabalhar com ela nos projetos que ela desenvolve, quem sabendo o risco que representava ter uma estudante que não falava português me deu a mão para continuar na pesquisa e sempre me deu os conselhos necessários no caminho do mestrado que não foi fácil.

Agradeço a oportunidade da parceria com o grupo do Laboratório de Patologia Molecular, especialmente à Dra. Sandra Ventorin por me permitir trabalhar com as amostras e os dados dos pacientes.

Agradeço aos alunos da professora Sonia que sempre me ajudaram quando precisei (Alliny, Karine, Marcela, Bárbara, Iasmim, João, Vinícius e Danielle). Especialmente agradeço a Alliny, companheira e amiga de trabalhos, brigas, choros, alegrias e festas latinas. Obrigada pela paciência com esta gringa.

Agradeço ao Dr. Agenor Sena, a equipe do Hospital Santa Rita e a todos os pacientes por sempre estar dispostos a colaborar com nossa pesquisa.

Agradeço à equipe de Fisiologia: Dr. Roger Lyrio, representante do Laboratório de Biologia Molecular; à professora Dra. Nazaré Bissoli e os alunos dela que me permitiram usar o laboratório quando necessitei; à Dra. Maylla Ronacher Simoes quem me ajudou em diferentes oportunidades com o Blot e ao Wender do Nascimento Rouver quem sempre me acompanhou quando precisei e me deu toda a ajuda possível para me fazer sentir bem.

Agradeço a minha família e amigos que na distância sempre me apoiaram e tiveram palavras lindas para mim quando precisei. São muitos para mencionar, mas Lu tem esse lugar especial na lista.

Agradeço a todos os amigos que fiz durante estes dois anos, tanto brasileiros como de outros países, vocês fizeram minha vida mais bonita. Especialmente, obrigada a meu irmão de coração Aaron Conte pelas histórias e a confiança. Obrigada também a Valeria, Felicia, Jossi, Nico, Caro por sua presença.

Agradeço ao Marlon, quem chegando tarde à minha estância no Brasil conseguiu me alegrar os dias com carinho. Obrigada por sempre me ajudar e me cuidar.

Agradeço aos meus colegas do mestrado, professores e secretários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Finalmente, agradeço à Organização dos Estados Americanos (OEA), o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras, às agências de fomento CAPES e FAPES e a Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade.

## RESUMO

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) representa o tipo histológico mais frequente nos cânceres de cabeça e pescoço. Apesar dos numerosos estudos realizados ainda não foi estabelecido um conjunto comum de biomarcadores para o CECP que facilitem o prognóstico e o diagnóstico precoce. O objetivo deste estudo foi avaliar no CECP o possível potencial de biomarcador da Serpina1 e Osteopontina (OPN) por serem moléculas pouco avaliadas neste câncer. Os dados clínico-patológicos e amostras biológicas foram obtidos de 40 pacientes com CECP e 11 indivíduos saudáveis. Foi realizada a detecção da expressão relativa do mRNA de Serpina1 e OPN por ensaio de qPCR em amostras de tecido tumoral e tecido normal. A avaliação da expressão proteica de OPN e Serpina1 foi realizada pela técnica de Western Blot em amostras soro de pacientes com CECP e indivíduos saudáveis. Foi observado aumento significativo no mRNA da Serpina1 em tecido tumoral em relação ao tecido normal ( $p=0.0014$ ) e em relação às diferentes características clínico-patológicas avaliadas (sexo, hábito de beber e fumar, estadiamento e desenvolvimento linfonodal). A expressão proteica da Serpina1 no soro foi significativamente maior ( $p=0.0007$ ) em pacientes com CECP quando comparados aos controles, assim como as características clínico-patológicas avaliadas. Os níveis de OPN no mRNA não foram diferentes entre os tecidos. A expressão proteica da OPN foi maior nos pacientes com estadiamento avançado da doença (III/IV) ( $p=0.0181$ ). A Serpina1 mostrou-se como um potencial biomarcador do CECP, seus níveis aumentados nos pacientes com CECP podem ser detectados tanto no tecido tumoral como no sangue o que pode facilitar sua aplicação no desenvolvimento da doença. A OPN deve ser melhor avaliada para estabelecer as possíveis diferenças significativas.

**Palavras-chave:** Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Biomarcadores. Osteopontina. Serpina1.

## ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the most frequent histological type of head and neck cancers. Despite the numerous studies, a common set of biomarkers for HNSCC has not been established yet, evidencing the necessity to find molecules that facilitate the prognosis and early diagnosis of this disease. The objective of this research was to evaluate the Serpine1 and Osteopontin (OPN) as biomarkers in HNSCC because they are poorly evaluated molecules in this cancer. Biological samples and clinical-pathological data were collected from 40 patients with HNSCC and 11 healthy individuals. The detection of Serpina1 and OPN mRNA expression was performed by qPCR trials on tumor tissues and normal tissue samples. The evaluation of Serpina1 and OPN protein expression was performed with serum from both HNSCC patients and a control group by Western blotting. A significant increase in Serpina1 mRNA was observed in tumor tissue compared to normal tissue ( $p=0.0014$ ) and in relation to different clinical-pathological characteristics evaluated (sex, smoking and smoking, staging and lymph node development). Serpina1 protein expression was also elevated in patients with HNSCC in relation to controls ( $p=0.0007$ ) and in clinical-pathological characteristics evaluated. For OPN, no relevant significant differences were found for mRNA and protein except OPN protein expression, which was shown higher in the advanced stage (III/IV) ( $p=0.0181$ ). Serpina1 has been shown as a potential biomarker of HNSCC for alterations found in tumor tissue and blood, which may facilitate its application in the development of the disease. The OPN should be better evaluated to establish the possible significant differences.

**Key words:** Head and neck squamous cell carcinoma. Biomarkers. Osteopontin. Serpina1.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da organização genómica dos exões do gene humano SPP1. ....	19
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura da osteopontina (OPN). ....	20
Figura 3 - Mecanismo molecular de osteopontina (OPN) no crescimento do tumor e metástases através das vias integrina- $\alpha\beta 3$ e CD44 .....	26
Figura 4 - Papel da OPN na progressão tumoral. OPN liga-se com integrinas ou CD44 e induz a vários eventos de sinalização celular. ....	28
Figura 5 - Modelo que descreve o papel de osteopontina (OPN) na regulação do activador de plasminogénio de urocinase (uPA) e activação de metaloproteases da matriz (MMPs) durante a progressão de tumores e metástases. ....	29
Figura 6 – Resumo do Western Blotting.....	39
Figura 7 - Avaliação da expressão relativa do mRNA entre tecido normal e tecido tumoral. (A) Expressão relativa do mRNA de OPN. ....	47
Figura 8 - Avaliação da expressão relativa do mRNA da Serpina1 entre subgrupos (de tecido tumoral) e tecido normal.. ....	51
Figura 9 - Avaliação da expressão relativa do mRNA da OPN entre subgrupos (de tecido tumoral) e tecido normal.. ....	54
Figura 10 - Limpeza de albumina das amostras de soro.....	56
Figura 11 – Western blot para a análise das proteínas de interesse.....	57
Figura 12 - Avaliação da expressão relativa das proteínas de interesse entre casos e controles.....	58
Figura 13 - Avaliação da expressão relativa da proteína da Serpina1 entre subgrupos e controles.....	62
Figura 14 - Avaliação da expressão relativa da proteína da Osteopontina Total entre subgrupos e controles.. ....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüência de primers SPP1, Serpina1 e $\beta$ -Actina.....	38
Tabela 2 - Protocolo para a preparação de géis de SDS-PAGE.....	41
Tabela 3 - Características clínico-patológicas dos pacientes e controles .....	45
Tabela 4 - Avaliação da expressão relativa do mRNA de Serpina1 em relação aos dados clínico-patológicos dos pacientes tecido tumoral (TT) (N= 12) e tecido normal (TN) (N=4).....	50
Tabela 5 - Avaliação da expressão relativa do mRNA da Osteopontina em relação aos dados clínico-patológicos dos pacientes em tecido tumoral (TT) (N= 12) e tecido normal (TN) (N=4).....	53
Tabela 6 - Avaliação da expressão relativa da proteína Serpina1 em relação aos dados clínico-patológicos dos pacientes (N=40) e os controles (N=11).....	61
Tabela 7 - Avaliação da expressão relativa da proteína OPN Total e OPN-32kDa em relação aos dados clínico-patológicos dos pacientes (N=40) e dos controles (N=11).....	64

## LISTA DE SIGLAS

AAT	Alfa-1-antitripsina
AP1	Proteína activadora-1 (do inglês <i>Activator protein-1</i> )
cDNA	DNA complementar
CECP	Carcinoma epidermoide de câncer de cabeça e pescoço.
c-Src	Proteína tirosina-quinase codificada pelo gene Src (do inglês <i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i> )
ECM	Matriz extracelular (do inglês <i>Extracellular matrix</i> )
Eta-1	Ativação inicial de linfócitos T (do inglês <i>early T lymphocyte activation 1</i> )
FGF2	Fator de crescimento 2 dos fibroblastos humanos (do inglês <i>Fibroblast Growth Factor 2</i> )
HCC	Células de carcinoma hepatocelular (do inglês <i>hepatocellular carcinoma</i> )
HLE	Elastasa dos leucócitos humanos (do inglês <i>Human leukocyte elastasa</i> )
HNSCC	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (do inglês <i>Head and neck squamous cell carcinoma</i> )
HPV	Vírus do papiloma humano (do inglês <i>Human Papillomavirus</i> )
ILs	Interleucinas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAP3K	MAP quinases
MMP	Metaloproteases da matriz
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NIK	Quinase indutora de NF-κB

OMS	Organização Mundial da Saúde
OPLs	Lesões pré-malignas orais (do inglês oral <i>pre-malignant lesions</i> )
OPN	Osteopontina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PTC	Carcinoma papilar de tireoide
PVDF	Membrana de fluoreto de polivinilideno
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (do inglês <i>Real time quantitative polymerase chain reaction</i> )
RGD	Aminoácidos Arginina-Glicina-Aspartato
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i> )
SMC	Células musculares lisas (do inglês <i>Smooth muscular cells</i> )
Snail	Proteína dedo de zinc (do inglês <i>zinc finger protein</i> )
SPP1	Fosfoproteína secretada – 1 (do inglês <i>Secreted Phosphoprotein 1</i> )
uPa	Uroquinase ativadora do plasminogénio
VD3	1-alfa-1,25-dihidroxitamina D3
VDR	Receptor da vitamina D

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1. Câncer de Cabeça e Pescoço.....	14
1.2. Biomarcadores em Câncer de Cabeça e Pescoço .....	16
1.3. SPP1 (Osteopontina):.....	18
1.3.1. <i>Descrição Geral.</i> .....	18
1.3.2. <i>Função e regulação do gene.</i> .....	21
1.3.3. <i>Modelo animal.</i> .....	23
1.3.4. <i>OPN nos diferentes tipos de câncer.</i> .....	24
1.3.4. <i>Mecanismo de ação de OPN no câncer.</i> .....	25
1.3.4.1. <i>Sinalização da OPN via integrinas e CD44.</i> .....	25
1.3.4.2. <i>c-Src quinase induzida por OPN regula a sinalização integrina-EGFR.</i> .....	27
1.3.4.3. <i>Papel da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K).</i> .....	27
1.3.4.4. <i>Ativação da quinase NIK.</i> .....	28
1.3.4.5. <i>Degradação da Matriz Extracelular (ECM).</i> .....	28
1.4. SERPINA1 (Alfa-1-antitripsina (AAT)):.....	30
1.4.1. <i>Descrição Geral.</i> .....	30
1.4.2. <i>Função e regulação do gene.</i> .....	31
1.4.3. <i>Serpina1 nos diferentes tipos de câncer.</i> .....	32
2. OBJETIVOS .....	35
2.1. Objetivo geral .....	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
3. METODOLOGIA.....	36
3.1. Aprovação pelo Comitê de Ética e Perfil clínico-epidemiológico .....	36
3.2. Amostras.....	36
3.3. Análise da expressão gênica por qPCR. ....	37
3.3.1. <i>Extração de RNA total</i> .....	37
3.3.2. <i>Desenho de primers.</i> .....	37
3.3.3. <i>Síntese de cDNA.</i> .....	38
3.3.4. <i>PCR quantitativo em tempo real.</i> .....	38
3.4. Western Blotting.....	39
3.4.1. <i>Preparo das amostras.</i> .....	40

<b>3.4.2. Quantificação das Proteínas</b> .....	<b>40</b>
<b>3.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)</b> .....	<b>40</b>
<b>3.4.4. Transferência de proteínas à membrana</b> .....	<b>42</b>
<b>3.4.5. Immunoblotting</b> .....	<b>42</b>
<b>3.4.6. Revelado e análise das membranas</b> .....	<b>43</b>
<b>3.5. Análise Estatística</b> .....	<b>43</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1 Expressão relativa do mRNA de Osteopontina e Serpina1 em tecido tumoral e tecido normal de pacientes com CECP</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2. Análise da expressão protéica de Osteopontina e Serpina1 em soro sanguíneo de pacientes com CECP e controles</b> .....	<b>55</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>68</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>76</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer de Cabeça e Pescoço

Câncer é um termo genérico dado a um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Sua característica comum é a rápida multiplicação de células anormais que se estendem dos seus limites habituais e podem invadir partes adjacentes do corpo ou se espalhar para outros órgãos, processo conhecido como metástase. As metástases são a principal causa de morte por câncer (OMS, 2015).

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Em 2012 havia cerca de 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes. Espera-se o aumento do número de novos casos em cerca de 70% ao longo dos próximos 20 anos (OMS, 2015). No Brasil, o câncer representa a segunda causa de morte na população, sendo quase 17% dos óbitos de causa conhecida no país (INCA, 2010).

Especificamente, os cânceres de cabeça e pescoço representam o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo, com aproximadamente 630.000 novos casos de pacientes diagnosticados anualmente, o que resulta em mais de 350.000 mortes por ano. Mais de 90% dos cânceres de cabeça e pescoço são correspondentes ao tipo histológico de carcinoma de células escamosas (HNSCC), também chamado de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP), que surgem das superfícies mucosas da cavidade oral, orofaringe e laringe (VIGNESWARAN; WILLIAMS, 2014). Os sítios anatômicos que estão incluídos nesse grupo de neoplasias constituem em geral: a cavidade oral, que compreende mucosa bucal; gengivas; palato duro; língua; assoalho de língua; faringe, e que inclui: orofaringe; nasofaringe; hipofaringe; cavidade nasal e seios paranasais; laringe glótica e supraglótica e glândulas (COLOMBO, 2009).

Na América e na Europa o CECP representa de 5% a 10% de todos os novos casos de câncer, porém tem uma ampla variação geográfica na incidência e na distribuição

anatômica no mundo inteiro. Esta variação é atribuída predominantemente às diferenças demográficas nos hábitos de consumo de tabaco e álcool, que contribuem para o desenvolvimento de quase 80% de todos os casos diagnosticados. Em países de alto risco (Índia, Sri Lanka, Bangladesh e Paquistão, por exemplo), a CECP é o câncer mais comum nos homens e o terceiro câncer mais comum nas mulheres (WARNAKULASURIYA, 2009).

Os principais fatores etiológicos relacionados com o desenvolvimento do CECP são o tabagismo, etilismo e a infecção por Papilomavírus Humano (HPV). Em particular o consumo combinado de tabaco e álcool parece atuar em conjunto com o aumento do risco de câncer (INCA, 2010). O cigarro contém nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos carcinogênicos genotóxicos que podem aumentar o risco de doença por levar a alterações do perfil molecular dos indivíduos e causar mutações (COLOMBO, 2009). A infecção por HPV (*Human Papillomavirus*), principalmente HPV-16 e HPV-18, também desempenha um papel no desenvolvimento de CECP especialmente nas regiões nasofaríngeal e orofaríngeal (CHOI; MYERS, 2008). Outros fatores que podem contribuir para a carcinogênese de cabeça e pescoço incluem a poluição ambiental e certas condições de trabalho associadas a indústrias como a metalurgia e a petroquímica, assim como a nutrição, a má dentição, a idade avançada e a predisposição e suscetibilidade genética (CHOI; MYERS, 2008; DÖBROSSY, 2005).

O diagnóstico de CECP é baseado na realização de exames locais da cavidade oral e em testes histopatológicos (FEDELE, 2009). Desta forma o desenvolvimento inicial deste câncer pode ser identificado visualmente por meio da avaliação de lesões pré-malignas orais (OPLs) que incluem leucoplasia oral, a eritroplasia oral, liquen plano oral, estomatite da nicotina, a queratose e fibrose submucosa (WARNAKULASURIYA; RALHAN, 2007). Lamentavelmente, os pacientes afetados comumente procuram tratamento no estágio avançado da doença, diminuindo assim as chances de sucesso terapêutico e aumentando a mortalidade (MCGURK et al., 2005)

O planejamento terapêutico e do prognóstico do CECP baseia-se principalmente em parâmetros clínicos, radiológicos e histopatológicos, os quais consistem no local do tumor primário e no sistema de estadiamento TNM (tamanho do tumor, T. Presença de metástase em linfonodos cervicais, N. Metástase a distância, M). A presença de

metástase em linfonodos cervicais é o principal fator prognóstico adverso independente. Em geral os pacientes com CECP são classificados nos estadiamentos I, II, III e IV, dependendo da gravidade da doença segundo o sistema TNM. Os pacientes no estágio inicial (I ou II) são tratados com cirurgia ou radioterapia, já os pacientes no estágio avançado (III ou IV) são tratados de forma multimodal com cirurgia, radioterapia e quimioterapia. No entanto, pacientes com tumores apresentando o mesmo estadiamento clínico podem demonstrar padrões de crescimento e evolução diferentes, sugerindo a necessidade da análise de outros fatores complementares para encontrar com precisão o prognóstico da doença (NIH, 2014; THOMAS; NADIMINTI; REGALADO, 2005).

Assim, é necessário o desenvolvimento de metodologias que permitam o diagnóstico precoce e o tratamento do CECP a partir de exames de rotina com amostras facilmente disponíveis (MISHRA, 2012). A avaliação de biomarcadores de câncer oral nos estádios iniciais poderá ajudar no diagnóstico preciso através da identificação de um conjunto comum de biomarcadores a partir de exames de fluidos corporais, como saliva e plasma.

## **1.2. Biomarcadores em Câncer de Cabeça e Pescoço**

Um biomarcador é definido como uma característica que pode ser medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, patogênicos ou por respostas farmacológicas de diversas intervenções terapêuticas. Como exemplos de biomarcadores podem-se ter proteínas, lipídios, genes, metabolitos, ou padrões de proteômica, padrões de imagem, sinais elétricos e células presentes em exames de urina (ATKINSON A.J. et al., 2001).

Na medicina, os processos do desenvolvimento das doenças são heterogêneos na fisiopatologia e na apresentação clínica, o que gera que o diagnóstico, prognóstico e tratamento seja desafiador. Especificamente no desenvolvimento de medicamentos, os biomarcadores são essenciais para avaliar e determinar a eficácia e toxicidade destes no espectro pré-clínico e clínico (ATKINSON A.J. et al., 2001).

O estudo de novos e melhores biomarcadores é necessário para avaliar a eficácia e toxicidade de drogas em estudos pré-clínicos, ter um diagnóstico precoce de diferentes doenças, gerar um prognóstico do paciente doente e identificar quais destes irão responder positivamente a uma intervenção. Além disso, encontrar biomarcadores eficientes permitiria uma classificação estratificada dos pacientes para potenciais terapias no futuro (VAIDYA; BONVENTRE, 2010)

Apesar dos numerosos estudos realizados, ainda não foi estabelecido um conjunto comum de biomarcadores para o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, porém há a necessidade de encontrar moléculas que sirvam como preditoras do prognóstico e diagnóstico precoce desta doença. Especificamente, no estudo feito por Chakrabarti, et al, (2015) na identificação de biomarcadores diferenciais em tecidos de câncer bucal em pacientes de etnia indiana, foi realizada uma comparação entre tecidos tumorais e a mucosa bucal normal, encontrando mediante a análise de cDNA 425 genes diferencialmente expressos. Estes genes estavam associados com importantes funções biológicas como: proliferação celular (AIM2, FAP, TNFSF13b, TMPRSS11A); transdução de sinal (FOLR2, MME, HTR3B); invasão e metástase (SPP1, TNFAIP6, EPHB6); diferenciação (CLEC4A, ELF5); angiogénese (CXCL1); apoptose (GLIPR1, WISP1, DAPL1); respostas imunitárias (Serpina1, CD300A, IFIT2, TREM2); e metabolismo (NNMT; ALDH3A1) (CHAKRABARTI et al., 2015). Estes resultados mostraram que existe uma importante variedade de possíveis biomarcadores, no entanto são necessários mais estudos para avaliar a alta capacidade de serem considerados como prognósticos e terapêuticos.

Para esta pesquisa foram selecionados dois genes que encontraram-se sobre-expressos no estudo citado anteriormente. Assim, os genes que foram analisados como possíveis biomarcadores são: SPP1 (Osteopontina) relacionado com invasão e metástase e Serpina1 (alfa-1-antitripsina) relacionado com a inibição enzimática. Poucos estudos têm relacionado o papel destes genes no Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço, evidenciando a necessidade de avaliar seu papel na doença.

### **1.3. SPP1 (Osteopontina):**

#### **1.3.1. Descrição Geral.**

Osteopontina (OPN) é uma glicofosfoproteína da matriz celular codificada pelo gene SPP1 (Secreted Phosphoprotein 1), secretada e não colágena, que facilita as interações célula-matriz. Ela encontra-se envolvida na mineralização óssea pela função de ligação dos osteoclastos à matriz óssea mineralizada. Os osteoclastos são células grandes, multinucleadas, observadas ao longo das superfícies dos ossos, o que sugere um papel destas células na reabsorção das células ósseas. A OPN é produzida pelos osteoblastos, pela estimulação por calcitriol e liga-se fortemente a hidroxiapatita (OGBUREKE; FISHER, 2007)

A OPN está envolvida na ancoragem dos osteoclastos à matriz óssea mineralizada, pelo receptor da vitronectina, específico para a osteopontina, que se localiza preferencialmente na área da membrana plasmática dos osteoclastos envolvida no processo de ligação (REINHOLT et al., 1990).

Esta proteína é também conhecida como uma citocina que regula positivamente a expressão de interferon- $\gamma$  e interleucina-12 (ASHKAR et al., 2000). Ao mesmo tempo, OPN é membro da família das cinco glicofosfoproteínas SIBLINGs, que se ligam aos domínios N-terminais das integrinas (OGBUREKE; FISHER, 2007). As integrinas são proteínas transmembranares que podem reconhecer uma ampla variedade de ligantes (CLARK; BRUGGE, 1995)

Em relação á estrutura do gene, o gene SPP1 é compreendido por sete exons, seis dos quais contêm uma sequência de codificação (CROSBY et al., 1995) (Figura 1). Estes autores também assinaram o gene SPP1 na localização cromossômica 4q21-q25 no ser humano.

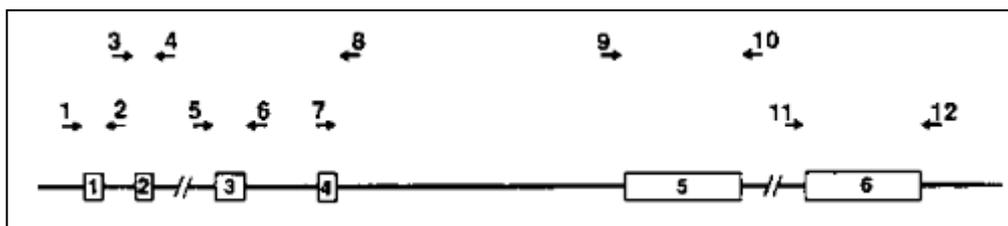


Figura 1 - Representação esquemática da organização genômica dos exons do gene humano SPP1. Os exons são indicados por caixas e os introns por linhas. O diagrama é a escala. Os primers utilizados para amplificar exons e introns estão indicados por setas numeradas (CROSBY et al., 1995).

A OPN é composta por 314 resíduos de aminoácidos e é codificada por um único gene, mas existem várias isoformas como resultado do splicing alternativo, tradução alternativa e diferentes modificações pós-traducionais (PTMs), que permitem um peso molecular variado entre 41 a 75 kDa de proteína sem clivar (KAHLES; FINDEISEN; BRUEMMER, 2014). A OPN mostra uma conservação dos aminoácidos arginina-glicina-aspartato (Arg-Gly-Asp ou RGD) no local de ligação com as células (YOUNG et al., 1990). Uma característica da estrutura do OPN é a presença de um sítio de clivagem pela proteína trombina próxima com esta região de RGD. A clivagem da OPN no plasma sanguíneo ocorre naturalmente após a ativação da via de coagulação sanguínea. Tem sido encontrado que a OPN clivada por trombina apresenta maior adesão e espalhamento sobre diversas linhas celulares do que a OPN não clivada, mostrando que a trombina permite uma maior acessibilidade do domínio RGD a receptores da superfície celular (SENGER; PERRUZZI, 1994).

A OPN clivada por trombina apresenta um fragmento C-terminal que se liga diretamente com CD44v6 e CD44v3 (isoformas da CD44) através de uma ponte de heparina. CD44 é uma glicoproteína de membrana celular de adesão com a matriz extracelular com um importante papel na ativação de linfócitos (ARUFFO et al., 1990). O fragmento N-terminal da OPN clivada por trombina apresenta a região RGD ativada, necessária para a ligação com o receptor de integrinas  $\alpha v \beta 3$ . Assim, a clivagem de OPN pela trombina libera dois domínios de ligação ao receptor que realizam funções de sinalização distintas (Figura 2) (RANGASWAMI; BULBULE; KUNDU, 2006). Outros estudos indicam que a OPN pode atuar como substrato para as metaloproteases de matriz, MMP-3 e MMP-7, e que os fragmentos clivados melhoram a adesão e a migração através da ligação a receptores (AGNIHOTRI et al.,

2001).

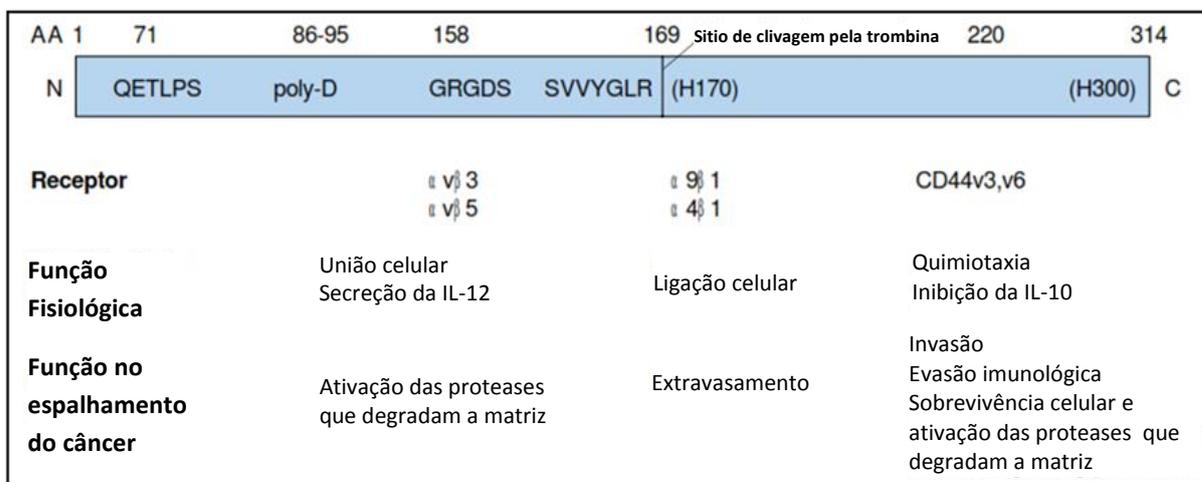


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura da osteopontina (OPN). Uma sequência poli-aspartato (poli-D) no N-terminal torna acida. O motivo de clivagem da trombina divide a proteína em dois domínios funcionais. A sequência GRGDS na região do terminal N desempenha um papel crucial na ligação de OPN para as integrinas, tais como  $\alpha v \beta 3$  e  $\alpha v \beta 3$ . O fragmento C-terminal liga-se a CD44. Entre o motivo RGD e o local de clivagem pela trombina, encontra-se o local de reconhecimento para a integrina B1 (SVVYGLR) revelado apenas após clivagem da trombina (RANGASWAMI; BULBULE; KUNDU, 2006).

A Osteopontina foi inicialmente identificada em ossos (PRINCE et al., 1987) e posteriormente encontrada em rins, cérebro, macrófagos, células vasculares de músculo liso e diferentes linhas celulares epiteliais (WEBER, 2001). Por exemplo, o cálcio urinário dos cálculos de oxalato apresentou esta proteína, além disso, foi mostrada a presença de mRNA de osteopontina no rim, mais especificamente nas células tubulares distais (KOHRI et al., 1993). Por análise imuno-histoquímica, outros pesquisadores descobriram a presença de OPN em células de secreção humana e glândulas sudoríparas (OGBUREKE; FISHER, 2007). A osteopontina também é um componente constitutivo das fibras elásticas na pele humana e na aorta, independente da idade, e observado na pele do feto e na aorta de crianças, jovens, adultos e idosos (BACCARANI-CONTRI; TAPARELLI; PASQUALI-RONCHETTI, 1995).

### **1.3.2. Função e regulação do gene.**

A transcrição de OPN encontra-se regulada pelo gene 1-alfa-1,25-dihidroxitamina D3 (VD3), codificador da forma hormonal da vitamina D (Calcitriol). A transcrição de OPN em tecido ósseo é mediada por interações de fatores de trans-ativação induzíveis por VD3 com elementos responsivos de VD3 (VDREs). Os fatores de trans-ativação induzíveis por VD3 interagem com os complexos OPN-VDREs, formando dois complexos heterodiméricos distintos, todos contendo o receptor da vitamina D (VDR) e o receptor do retinóide X-alfa (RXR). Os complexos OPN-VDR/RXR-alfa gerados mostram que VD3 é requerida na regulação da expressão do gene de OPN em resposta a estímulos fisiológicos que medeiam a diferenciação dos osteoblastos (STAAL et al., 1996).

A presença de osteopontina nas fibras elásticas sugeriu um papel na precipitação mineral, na modulação da nucleação e no crescimento de cristais na mineralização dos tecidos (BACCARANI-CONTRI; TAPARELLI; PASQUALI-RONCHETTI, 1995)

Em estudos *in vitro* tem sido encontrada correlação entre a indução da osteopontina e a atividade da enzima fosfatasa alcalina, geradora de fosfato livre. A elevação de fosfato livre no meio é sinal suficiente para induzir o RNA e a proteína osteopontina. A indução específica da osteopontina em resposta ao aumento dos níveis de fosfato poderia explicar a regulação da expressão no osso, e a sobre-regulação em tecidos danificados (BECK; ZERLER; MORAN, 2000)

Na imunologia a proteína osteopontina (OPN) encontra-se relacionada com a imunidade de tipo 1 mediada por células, podendo receber o nome de Eta-1, por a “ativação inicial de linfócitos T” (*early T lymphocyte activation 1*) e a sua relação como ligando da proteína de CD44 (ASHKAR et al., 2000; WEBER et al., 1996). A imunidade de tipo 1 mediada por células é necessária para a proteção contra a maior parte dos patógenos intracelulares. Em experimentos com ratos deficientes na expressão da Eta-1, observa-se que estes apresentam diminuição da imunidade de tipo 1 com aumento da infecção viral e bacteriana. Também se observa que a produção da interleucina-12 (IL-12) e interferón- $\gamma$  (IFNG) é diminuída, e a produção da interleucina-10 (IL-10) endógena é aumentada. Em condições normais, a

interação entre a porção amino-terminal da Eta-I e o seu receptor de integrina estimula a expressão de IL-12, e a interação com CD44 inibe a expressão de IL-10. Desta forma Eta-I (OPN) é uma citocina chave que define as respostas imunitárias do tipo I através de regulação diferencial da expressão das citocinas IL-12 e IL-10 nos macrófagos (ASHKAR et al., 2000).

A osteopontina, também pode desempenhar um papel na supressão do crescimento do tumor *in vivo*. O gene da OPN foi identificado como um alvo de p53, o qual aumenta a expressão da proteína OPN. Estudos demonstraram que o gene OPN tem um elemento responsivo para p53 na região promotora. A regulação dirigida por p53 sugeriu um novo mecanismo de participação desta proteína na vigilância imunológica, controlando o sistema imune do hospedeiro para evitar que as células danificadas sofram transformação maligna (MORIMOTO et al., 2002).

Foi encontrado que o FGF2 ou “Fator de crescimento 2 dos fibroblastos humanos” (*Fibroblast Growth Factor 2*) induz indiretamente a expressão de OPN em cultura de células de rato e o fechamento de suturas cranianas. Assim, FGF2 induz expressão de genes relacionados com a codificação da proteína AP1 (*Activator protein-1*), e AP1 induz a expressão de osteopontina através de um elemento de resposta ao AP1 no promotor do seu gene (KIM et al., 2003).

Foi revelado através do uso de células musculares lisas (SMC) da aorta de rato, que a osteopontina encontra-se associada com a ativação e migração deste tipo celular. O mecanismo de ação encontra-se regulado por os nucleótidos extracelulares UTP que induzem a expressão do OPN. Assim, UTP atua induzindo o aumento do mRNA de OPN pela estabilização do mRNA e a ativação do promotor de OPN. No promotor de OPN foi encontrada a região -96 ao +16 responsável pela expressão aumentada de OPN induzida por UTP. Dentro dessa região, especificamente no local 76, encontra-se um sítio de união a AP1 que inicia a transcrição, mas quando o sítio AP1 é eliminado a ativação induzida por UTP é totalmente inibida. Assim, este sítio AP-1 (76) está envolvido na transcrição de OPN induzida por UTP (RENAULT et al., 2003).

### **1.3.3. Modelo animal.**

O mRNA da OPN foi determinado no citoplasma dos cardiomiócitos do músculo hipertrofiado de ratos hipertensos e em corações humanos com cardiomiopatia idiopática ou isquêmica. Em contraste, OPN não foi determinado em corações de ratos adultos normais e em material de biópsia histologicamente normal do endomiocárdio humano. Com base nestas observações, foi relacionada a presença de OPN com a regulação da remodelação cardíaca (GRAF et al., 1997).

Liaw et al. (1998) geraram camundongos *knock-out* para o gene da OPN, e testaram a cicatrização de incisões na pele destes. Estes camundongos foram viáveis e férteis. O gene SPP1 estava fortemente expresso após a lesão. A análise ultraestrutural mostrou uma maior desorganização da matriz e uma alteração da fibrilogênese do colágeno. Estes dados indicam um papel da OPN na remodelação de tecidos *in vivo* e sugeriu funções fisiológicas durante a reorganização da matriz após a lesão (LIAW et al., 1998).

Foram identificadas concentrações elevadas de mRNA de OPN em amostras de cérebros de pacientes com esclerose múltipla, ao contrario de cérebros controle. No modelo de rato para esclerose múltipla, revelou-se um aumento dos transcritos de OPN. Em contraste, ratos com deficiência na produção de OPN resultaram mais resistentes a sofrer doenças como encefalomielite autoimunes progressivas além de produzir mais IL10 e menos interferon-gama. Estes resultados indicaram que a OPN poderia ser um alvo potencial no bloqueio do desenvolvimento da esclerose múltipla progressiva (CHABAS et al., 2001).

#### **1.3.4. OPN nos diferentes tipos de câncer.**

Como foi mencionado a OPN é expressa por vários tecidos do corpo humano, porém também é expressa em níveis aumentados em células tumorais de vários tipos de câncer (SHEVDE; SAMANT, 2014), incluindo o do pulmão, da mama e do cólon (RICH; SINGAL, 2014), colo de útero (HUANG et al., 2015), carcinoma de células escamosas orais (HUANG et al., 2014), etc.

Encontraram-se evidências de uma associação entre a elevada expressão dos níveis de OPN, mRNA em tecido e também sua concentração em plasma, no câncer de ovário, sugerindo uma utilidade clínica como biomarcador (KIM et al., 2002).

Em soro, altos níveis de OPN foram significativamente correlacionados com a redução da sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma do pâncreas (PORUK et al., 2013). Outros estudos em plasma demonstraram que a sobrevida global dos pacientes com níveis elevados do OPN foi pior que aqueles com níveis baixos do OPN e que OPN poderia ser um marcador de prognóstico independente no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (PETRIK et al., 2006; SHIMADA et al., 2005). Além disso, altos níveis de OPN foram associados com metástases linfonodal (SHIMADA et al., 2005).

Em uma meta-análise para neoplasma de ovário foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis de osteopontina no soro e a presença do câncer (WANG et al., 2014). Outro estudo feito com amostras de soro, em pacientes com adenocarcinoma do pâncreas encontraram que altos níveis séricos de OPN foram significativamente correlacionados com a redução da sobrevida do paciente (PORUK et al., 2013).

Em outro estudo, específico para carcinoma de células escamosas orais, foi avaliada por técnicas imunohistoquímicas a expressão de OPN, PAI e caveolina-1, como possíveis marcadores prognósticos. Os resultados sugeriram que o aumento da expressão destas proteínas está ligada à carcinogênese e à progressão tumoral (HUANG et al., 2014).

Foi estudada em conjunto, em pacientes com carcinoma cervical de células escamosas, a expressão de E-caderina (um marcador de transição epitelial-mesenquimal) e OPN em relação com a radiorresistência. A avaliação imunohistoquímica mostrou uma elevada expressão de osteopontina e baixa expressão de E-caderina no grupo resistente à radiação, e os pacientes com esta condição tinham uma taxa mais baixa de vida. Os resultados sugeriram que a alta expressão de OPN e a baixa expressão da E-caderina pode ser considerada um fator prognóstico negativo na sobrevida do paciente (HUANG et al., 2015).

Tem sido encontrado que o número de células estreladas hepáticas ativadas foi positivamente correlacionado com o nível de acidificação nos tecidos tumorais de doentes de células de carcinoma hepatocelular (HCC) e que, neste tipo celular baixo estas condições, a excreção de OPN encontra-se aumentada promovendo a migração de células de HCC (SONG et al., 2015).

#### ***1.3.4. Mecanismo de ação de OPN no câncer.***

Há informação suficiente da influência da OPN no desenvolvimento de tumores e metástase (Figura 2). OPN é conhecida por atuar através de várias integrinas (domínio N-terminal) e CD44 (domínio C-terminal), e participar na sinalização através do EGFR (RICH; SINGAL, 2014; SHEVDE; SAMANT, 2014; WEBER, 2001; ZDUNIAK et al., 2015).

O mecanismo de ação da proteína OPN ocorre pela ativação de diversas vias de sinalização na tumorigênese, que se encontram estabelecidas nos seguintes passos:

##### ***1.3.4.1. Sinalização da OPN via integrinas e CD44.***

As integrinas são proteínas transmembranares que podem reconhecer uma ampla variedade de ligantes, incluindo proteínas da matriz extracelular, da membrana



#### **1.3.4.2. c-Src quinase induzida por OPN regula a sinalização integrina-EGFR.**

c-Src é uma tirosina quinase citoplasmática dependente da ativação das integrinas que tem um papel na sinalização e ativação de outras proteínas, encontrando-se altamente expressa em diversos cânceres. Apresenta relação com o desenvolvimento de características de invasão e metástase tumoral (ALPER; BOWDEN, 2005). A atividade de c-Src é necessária para formação do complexo macromolecular entre o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e a integrina  $\alpha\beta3$ , e a ativação da via das proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (MORO, 2001). Assim, a ligação de OPN-integrina leva à transativação de EGFR dependente de c-Src, resultando na ativação de vias de sinalização das PI3-quinase, Ras-MAPK, fosfolipase C-g e PKC nas células cancerígenas (EZASHI; DAS; ROBERTS, 2005) (Figuras 3 e 4). Os efeitos oncogênicos de EGFR incluem a síntese de DNA, crescimento celular, invasão e metástase (MORO, 2001).

#### **1.3.4.3. Papel da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K).**

A PI3K é uma proteína induzida por OPN que regula a mobilidade e a invasão celular. PI3-quinase pode ser ativada por estresse genotóxico, físico e químico. Uma das moléculas alvo da PI3-quinase é Akt, que é uma serina/treonina quinase também conhecida como proteína quinase B (PKB), que regula a progressão do ciclo celular, a sobrevivência e a migração celular (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Dados indicam que a OPN induz a PI3-quinase e a Akt através da via  $\alpha\beta$  integrina em células de câncer de mama (DAS; MAHABELESWAR; KUNDU, 2003) (Figura 4). Em contraste, a sobre-expressão da fosfatase PTEN pode antagonizar a ação da PI3-quinase (SUGATANI; ALVAREZ; HRUSKA, 2003) (Figura 3).

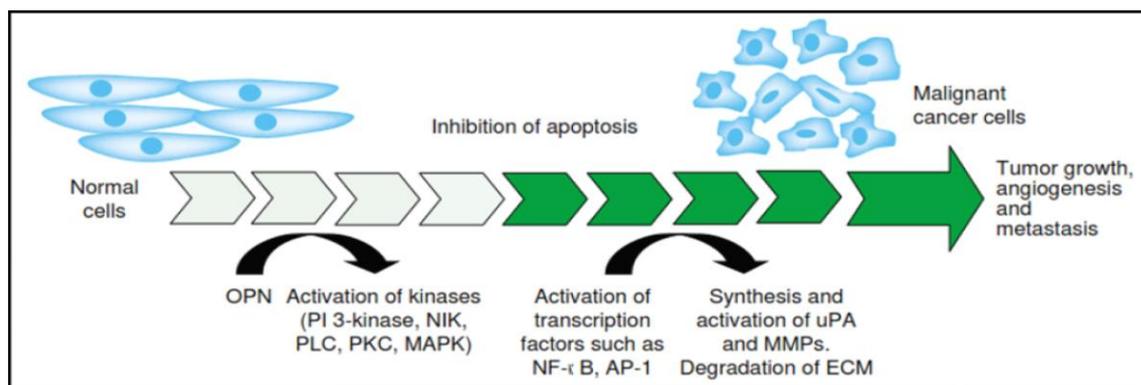


Figura 4 - Papel da OPN na progressão tumoral. OPN liga-se com integrinas ou CD44 e induz a vários eventos de sinalização celular. A fosforilação e ativação de várias quinases (fosfatidilinositol-3-quinase, NIK, PLC, PKC, MAPK) induz a ligação ao ADN de vários fatores de transcrição, incluindo a NFκB e AP-1. Assim, a OPN induz a inibição da apoptose e a ativação de várias proteases que degradam a matriz, tais como ativador de plasminogénio de uroquinase (uPA) e metaloproteases da matriz (MMPs), que conduz ao crescimento tumoral e metástase.(RANGASWAMI; BULBULE; KUNDU, 2006).

#### 1.3.4.4. Ativação da quinase NIK.

A quinase indutora de NF-κB (NIK) é um membro da família das MAP quinases (MAP3K), induzida pela ação de OPN. NIK interage com as serim proteases IKKα e IKKβ e estimula a atividade catalítica das IKKS. NIK pode também estar envolvido na regulação do fator de transcrição AP-1 e na formação do complexo heterodimérico de AP-1 (SHAULIAN; KARIN, 2002). A OPN, via NIK, estimula a secreção do ativador de plasminogénio de uroquinase (uPA) e a ativação da metaloprotease de matriz 9 (MMP-9), através das vias das quinases IKKα/β e MAPKs (também conhecida como MKKs, MEKKs ou MEKs)(RANGASWAMI; BULBULE; KUNDU, 2004). A expressão aumentada de MEKK1, em resposta ao OPN, leva à ativação de JNK1 que pode suprimir a ativação de ERK induzida por OPN, regulando a ativação de AP-1 e gerando uma regulação negativa ainda pouco conhecida (Figura 3) (RANGASWAMI; BULBULE; KUNDU, 2006).

#### 1.3.4.5. Degradação da Matriz Extracelular (ECM).

A degradação da ECM é uma etapa importante na tumorigênese e na metástase, e é dependente da atividade proteolítica gerada pelas metaloproteinasas de matriz

(MMPs) e a uroquinase ativadora do plasminogênio (uPa) (Figura 5). As MMPs são uma família de metaloendopeptidases que clivam proteínas próprias da matriz extracelular e desempenham um papel fundamental na remodelação de tecidos. Elas encontram-se implicadas na regulação funcional de um grande número de moléculas não-ECM que incluem fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, receptores de adesão e proteoglicanos da superfície celular (STAMENKOVIC, 2003). Por outro lado, a proteína uPA encontra-se envolvida na migração celular, invasão e sinalização celular, gerando respostas diferentes em condições fisiológicas e patológicas. A ligação de uPA com o seu receptor, dirige a proteólise extracelular de membrana e envia sinais através de proteínas transmembranares, regulando a regeneração de tecidos, angiogênese, crescimento do câncer e metástases. uPA é responsável pela ativação e a libertação de vários fatores de crescimento modulando a taxa de proliferação celular/apoptose através do controle célula-matriz (HILDENBRAND et al., 2008). A OPN tem mostrado induzir a ativação de MMP-2 (TETI et al., 1998) e MMP-9, gerando a ativação de uPA e a posterior degradação da ECM (RANGASWAMI; BULBULE; KUNDU, 2006).

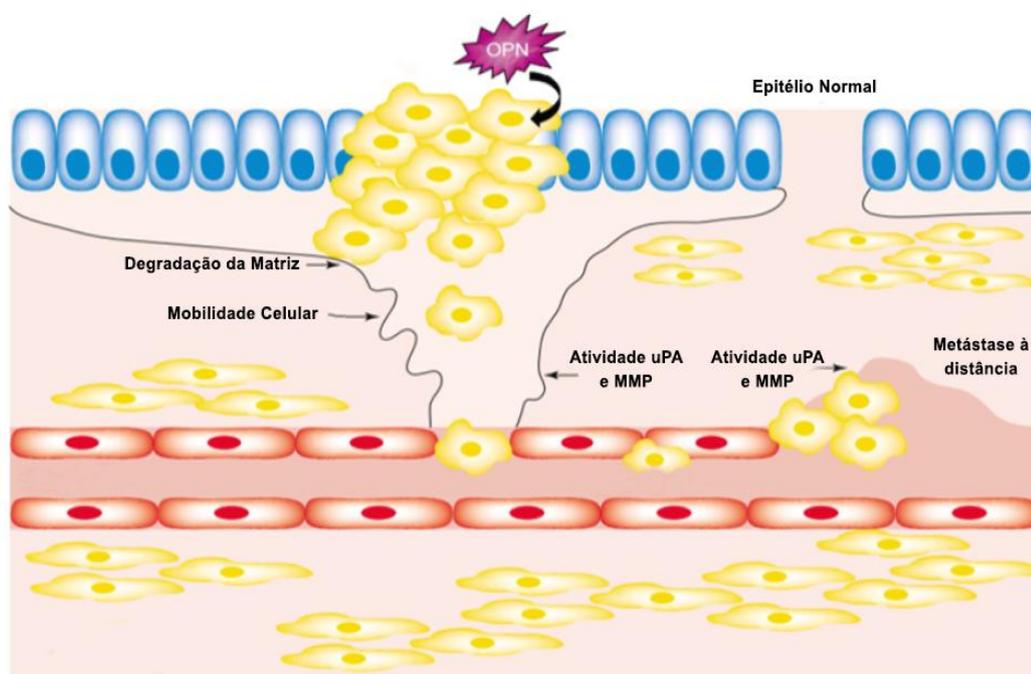


Figura 5 - Modelo que descreve o papel de osteopontina (OPN) na regulação do ativador de plasminogênio de uroquinase (uPA) e ativação de metaloproteases da matriz (MMPs) durante a progressão de tumoral e metástases. A invasão envolve translocação de células neoplásicas através da barreira da matriz extracelular. Este processo exige a adesão celular e proteólise local (RANGASWAMI; BULBULE; KUNDU, 2006).

## **1.4. SERPINA1 (Alfa-1-antitripsina (AAT)):**

### ***1.4.1. Descrição Geral.***

O gene SERPINA1 codifica para a proteína alfa-1-antitripsina (AAT), também conhecida como inibidor da protease (PI), uma importante proteína inibidora de serina proteases no sangue. AAT geralmente forma complexos com elastase, tripsina, quimotripsina, trombina, e proteases bacterianas. A ação inibidora mais importante da AAT é contra a elastase de neutrófilos (Elane, ou HLE), uma protease que degrada a elastina das paredes alveolares e outras proteínas estruturais de diferentes de tecidos. Diversas variantes de transcritos que codificam a mesma proteína foram encontrados para este gene (COX, 1981).

A proteína Alfa-1-antitripsina é produzida principalmente no fígado, e em macrófagos, como discutido adiante, mas pela circulação alcança aos pulmões, onde exerce sua função antielastolítica. Os níveis séricos de AAT podem estar aumentados em situações de inflamação. Normalmente, as doenças mais conhecidas em relação à expressão de AAT são aquelas relacionadas com a deficiência desta proteína, gerada por distúrbios genéticos que tem diversas implicações clínicas e que afeta especialmente pulmões e fígado (CAMELIER et al., 2008).

Em relação à estrutura do gene, foi encontrada mais de 96% de homologia entre o cDNA (DNA complementar a o RNA do gene, porém sem introns) de AAT full-length AAT de babuínos e o cDNA de AAT parcial de humano (KURACHI et al., 1981).

A análise da sequência do cDNA de AAT humana revelou uma molécula precursora que contém um peptídeo sinal de 24 aminoácidos e uma proteína madura de 394 aminoácidos. A AAT é sintetizada principalmente nos hepatócitos de fígado, mas também em fagócitos mononucleares e neutrófilos (CRYSTAL, 1990; LONG et al., 1984).

A sequência completa do gene SERPINA1 é de 10,2 kb com uma região de codificação de 1434 pb. O gene tem quatro introns e, o exon 1, a porção 5' do exon 2, e a porção 3' do exon 5 são regiões não codificantes (LONG et al., 1984). Em relação à localização citogenética para o gene SERPINA1, ela encontra-se em 14q32.13 (TURLEAU et al., 1984).

SERPINA1 é transcrito em macrófagos a partir de três promotores específicos de macrófagos, localizados upstream de um promotor específico em hepatócitos. A transcrição a partir dos dois promotores de AAT é mutuamente exclusiva na maioria dos casos, assim, o promotor de macrófago encontra-se silenciado em hepatócitos e o promotor do hepatócito encontra-se silenciado em macrófagos. Em macrófagos são gerados dois mRNA distintos por splicing alternativo (PERLINO; CORTESE; CILIBERTO, 1987). Os macrófagos usam os três locais de iniciação durante a expressão basal e modulada, na diferença dos hepatócitos, que usam o local de iniciação de transcrição específico de hepatócitos durante a expressão basal e modulada e, além disso, podem usar o local de iniciação de transcrição específico dos macrófagos durante a fase aguda da expressão da interleucina-6 (HAFEEZ; CILIBERTO; PERLMUTTER, 1992).

#### **1.4.2. Função e regulação do gene.**

O principal substrato fisiológico da alfa-1-antitripsina é a elastase, particularmente no pulmão. Os níveis séricos de AAT encontram-se aumentados com a inflamação, trauma, e a gravidez. Já a deficiência de AAT está principalmente associada com o risco de enfisema e doença do fígado (COX, 2001).

A AAT apresenta um papel importante na germinação. Estudos feitos na avaliação da relação entre a expressão de AAT e a fertilidade encontraram a existência do aumento da frequência de heterozigidade de AAT em gêmeos e pais dos gêmeos. Assim, níveis baixos desta inibidora de proteases encontram-se relacionados com o aumento da germinação, uma vez que as enzimas proteolíticas estão envolvidas na

fertilização de óvulos por espermatozoides e na gametogênese (LIEBERMAN; BORHANI; FEINLEIB, 1979).

Alfa-1-antitripsina também apresenta um papel na infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Foi mostrado que a diminuição da carga viral do VIH encontra-se correlacionada com a diminuição do AAT circulante, sugerindo que a deficiência AAT associada ao HIV pode proporcionar um alvo estratégico para prevenir patofisiologia associada a essa doença (BRISTOW; PATEL; ARNOLD, 2001). A AAT pareceu promover a localização com o co-receptor de superfície do HIV, HLE (leucocito elastase), permitindo assim o aumento da infecção pelo HIV (BRISTOW; MERCATANTE; KOLE, 2003).

Aproximadamente 75 alelos de AAT têm sido identificados ao nível do gene e/ou da proteína (NUKIWA et al., 1988). Para cada alelo foram dados símbolos de acordo com a mobilidade relativa. Cada variante alélica foi classificada em “normal” ou “em risco”, encontrando-se 10 de aqueles “normais” por seqüenciamento. Os alelos “em risco” capazes de desencadear doenças, foram classificados em alelos 'deficiência' e alelos 'nulo', exceto o alelo raro Pittsburgh, relacionado com problemas hemorrágicos, que afeta só aos caucasianos de descendência europeia (CRYSTAL, 1989).

#### **1.4.3. *Serpina1 nos diferentes tipos de câncer.***

Recentemente estudos encontraram relações entre a alta expressão da Serpina1 e o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer. Por exemplo, em um estudo feito em carcinoma de células escamosas cervicais, de pacientes que expressavam o antígeno HLA de classe I, encontrou-se um aumento da expressão de alguns genes, especialmente Serpina1 e Serpina3 que foram associados ao pior prognóstico do paciente (KLOTH et al., 2008).

Outro estudo feito em 2011 por FARSHCHIAN et al., com a finalidade de avaliar a expressão da família das Serpinas no carcinoma de células escamosas cutâneas (SCC), revelou uma alta expressão de Serpina1 na linha celular de SCC em

comparação com queratinócitos normais. Além disso, encontraram que a produção de SerpinA1 foi dependente da atividade quinase da proteína p38, e foi aumentada pela ação dos genes do fator de crescimento epidermal, fator de necrose tumoral  $\alpha$ , interferon- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ .

Uma meta-análise realizada por Vierlinger et al. (2011) baseada em quatro conjuntos de dados obtidos por análise de DNA microarrays para encontrar diferenças de expressão para carcinoma papilar de tireoide (PTC), além de uma validação utilizando uma tecnologia independente, RT-PCR. A análise mostrou que o gene SerpinA1 encontra-se mais expresso no carcinoma papilar de tireoide que nos nódulos benignos, gerando um possível biomarcador para a PTC (VIERLINGER et al., 2011).

Outros estudos examinaram o papel da Serpina1 na migração e invasão do câncer gástrico e foi determinado seu mecanismo subjacente. Foi analisada a ligação da proteína Snail ao promotor da Serpina1 por imunoprecipitação da cromatina e os papéis da Serpina1 foram estudados usando ensaios de invasão e migração celular. Os resultados mostraram que o aumento da expressão de Snail resultou em aumento da Serpina1 em duas linhas celulares do câncer gástrico, mas que quando estas linhas celulares eram knockdown de Snail a expressão da Serpina1 era inibida. O aumento da expressão da Serpina1 aumentou a migração e invasão de células de câncer gástrico, e foi significativamente associada ao aumento de tamanho do tumor, estadiamento avançado, invasão perineural, invasão linfática, metástases em linfonodos, e menor sobrevida global (KWON et al., 2014).

Para Serpina1 ainda não tem se estabelecido o mecanismo de ação no desenvolvimento do câncer, nem as vias de sinalização na tumorigênese. Além disso, o mecanismo de ação em outras vias de sinalização encontra-se pouco descrito, o que dificulta sugerir alguma relação com o câncer.

Diante do exposto é possível considerar que a Osteopontina e a Serpina1 podem estar envolvidas na carcinogênese e que o seu papel no desenvolvimento do CECP ainda não está esclarecido. É necessário avaliar a sua expressão nos tumores, nas células normais e no soro para poder ser esclarecido a via pela qual elas podem atuar e serem usadas como biomarcadores do câncer CECP.

Baseados nos trabalhos de Chakrabarti, et al, (2015) na identificação de biomarcadores diferenciais no câncer oral, nossa hipótese foi que os níveis elevados tanto dos mRNAs como das proteínas (Serpina1 e Osteopontina) contribuem no desenvolvimento do CECP.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Analisar os níveis de Osteopontina e Serpina1 no Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço (CECP).

### **2.2. Objetivos específicos**

- a. Avaliar a concentração de mRNA dos genes de Osteopontina e Serpina1 em tecido tumoral e normal;
- b. Avaliar expressão proteica de Osteopontina e Serpina1 em soro de pacientes com CECP e indivíduos saudáveis. No soro deve-se realizar limpeza de albumina com o uso de uma técnica nova e econômica;
- c. Relacionar as análises dos biomarcadores com tabagismo, alcoolismo, sexo, idade e estadiamento clínico dos pacientes.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Aprovação pelo Comitê de Ética e Perfil clínico-epidemiológico**

Um estudo clínico transversal preliminar foi realizado nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço atendidos no ambulatório do Hospital Santa Rita de Cássia – AFECC e Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes - HUCAM sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa CIAS n° 318/2011 e o consentimento informado obtido de acordo com o Conselho Nacional de Saúde n°466, de 12 de dezembro de 2012.

Foram incluídos no presente estudo indivíduos com diagnóstico confirmado de CECP de ambos os gêneros, grupos étnicos e qualquer idade superior a 18 anos, sem antecedentes de CECP, que ainda não iniciaram o tratamento antineoplásico, para que não ocorresse interferência de outros fatores nos parâmetros estudados. Os dados dos pacientes foram coletados pela aplicação de um questionário realizado semanalmente nos hospitais.

Os indivíduos controle foram indivíduos saudáveis atendidos no ambulatório de cabeça e pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia – AFECC de ambos os gêneros, grupos étnicos e faixa etária.

#### **3.2. Amostras**

As amostras de tumor e de tecido normal para este estudo foram obtidas de pacientes com CECP submetidos a cirurgia. Após a excisão, os tecidos foram imediatamente imersos em soluções de Invitrogen™ RNeasy™ (Carlsbad, Califórnia, EUA) e armazenados a 4 ° C durante 24 horas e em seguida à temperatura de -80 ° C até utilização, segundo protocolo.

As amostras de sangue foram coletadas no momento da inclusão do paciente no estudo. O sangue foi processado separando-se plasma, soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos, e posteriormente acondicionadas por 24 horas à 4 ° C e em seguida à -80 ° C até o uso.

### **3.3. Análise da expressão gênica por qPCR.**

Foi verificada a expressão do mRNA de Osteopontina e Serpina1 em tecido normal e tumoral através de qPCR conforme descrito abaixo.

#### **3.3.1. Extração de RNA total**

Os tecidos foram homogeneizados e o RNA total extraído utilizando TRI Reagent RNA Isolation Reagent (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA). Os tecidos foram solubilizados em trizol (1mL/100mg de tecido) com o uso de um homogeneizador elétrico por 30 segundos e o homogenato centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Foi adicionado clorofórmio (200µL/100mg tecido) ao sobrenadante, misturado por inversão por 15 segundos e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. A mistura foi então centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C. A fase aquosa foi recuperada e a esta adicionada isopropanol (500µL/100mg tecido) para a precipitação do RNA. Foi feita a centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos e o precipitado lavado com etanol 75% (1mL/100mg tecido) e centrifugado a 7500 x g por 5 minutos. O RNA foi ressuscitado em 40 µL de água deionizada, previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

A concentração e a qualidade do RNA extraído foram verificadas utilizando o equipamento NanoDrop™ (ThermoScientific, Wilmington, USA). Amostras com uma concentração de RNA total maior que 200 ng/µl razão 260/280 nm 1,8 foram consideradas adequadas para uso.

#### **3.3.2. Desenho de primers.**

Os primers utilizados foram desenhados com a ferramenta online Primer-BLAST

(NCBI) e adquiridos da Invitrogen(Carlsbad, Califórnia, EUA) (tabela 1).

Tabela 1 - Seqüência de primers SPP1, Serpina1 e  $\beta$ -Actina

Gene	Forward	Reverse
<b>SPP1</b>	5-TCTGATGAATCTGATGA ACTG-3	5-GATGTCCTCGTCTGTAGC-3
<b>Serpina1</b>	5-CACCGTGAAGGTGCCTATGATG-3	5-GGCATTGCCAGGTATTTTCATC-3
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	5'-AGTTCACAATGTGGCCGAGG-3'	5'-AGTGGGGTGGCTTTTAGGATG-3'

### 3.3.3. Síntese de cDNA.

A síntese de cDNA foi realizada com o kit iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad, CA, USA) usando o equipamento CFX96 Real Time PCR (Biorad, CA, USA), no Laboratório Multiusuário da Universidade Federal do Espírito Santo (LABIOM). Foi utilizado uma concentração de 2000 ng/ $\mu$ L, com volume final dependente da amostra. As condições da reação foram as seguintes: 25°C por 5 min., 42°C por 30min. e 85°C por 5 min, de acordo com o especificado pelo fabricante.

### 3.3.4. PCR quantitativo em tempo real.

As amostras de cDNA obtidas foram submetidas à reação de PCR em tempo real utilizando o equipamento CFX96 Real Time PCR (Biorad, CA, USA) e o kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad, CA, USA). Em suma, as reações foram preparadas em um volume total de 10 $\mu$ L contendo 5  $\mu$ L de SYBR Green Supermix 2x, 3,5  $\mu$ L de água purificada, 0,5 $\mu$ L de cada iniciador a 10 $\mu$ M e 0,5  $\mu$ L de cDNA. Foram realizados 45 ciclos após a desnaturação inicial (95°C, 2 minutos) de acordo com os seguintes parâmetros: 95°C (desnaturação) por 15s; 60°C (anelamento) por 30s e 72°C (amplificação) por 30s.

Para garantir a qualidade da reação, as amostras foram preparadas em triplicata, e para cada experimento foi incluído uma reação sem molde como controle negativo. Além disso, a ausência de contaminantes de DNA foi avaliada utilizando-se amostras RT-negativas e pela análise da curva de “melting” dos produtos

amplificados, que foi feita resfriando-se as amostras a 60°C e, em seguida, aumentando a temperatura para 95°C a 0,1°C/s. A especificidade das reações de PCR foi confirmada pela verificação da curva de melting. A quantificação relativa da expressão gênica foi feita pelo método  $\Delta\Delta C_t$  utilizando o gene  $\beta$ -Actina para normalização dos dados. A análise dos resultados foi realizada com o uso do software Bio-Rad CFX Manager (Biorad, CA, USA).

### 3.4. Western Blotting.

Foram determinados os níveis das proteínas Osteopontina e AAT em soro utilizando anticorpos específicos. A técnica do "Western blotting" é baseada na detecção da proteína de interesse do total das proteínas no tecido em avaliação. Foi utilizada a técnica do Western blot em lugar da Elisa porque, apesar de que este seja um método semi-quantitativo, permite avaliar especificamente a proteína de interesse segundo o peso molecular sem rico de inespecificidades, além de permitir trabalhar com volumes pequenos de amostra.

O resumo da técnica encontra-se na Figura 6.

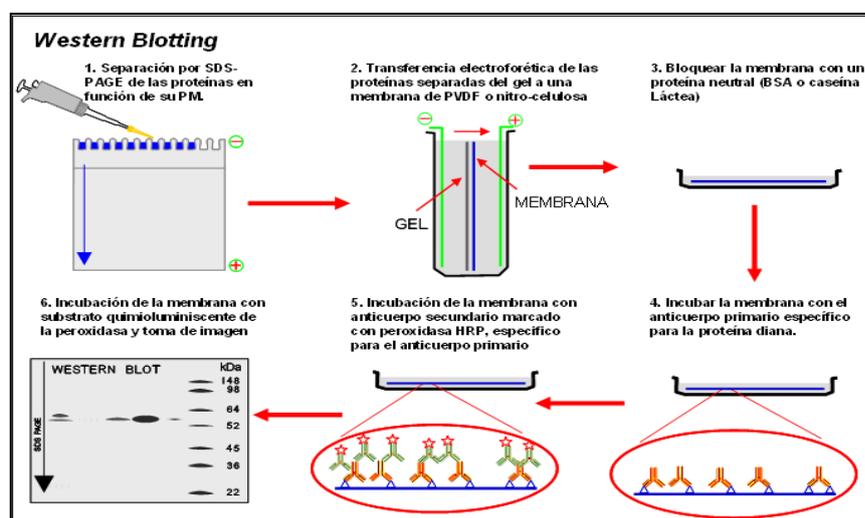


Figura 6 – Resumo do Western Blotting. Passos crucial no processo: transferência, bloqueio, hibridação com os anticorpos primários e secundários, e revelado. Disponível em: <http://bit.ly/2kNB7Jn>, acesso em 30/12/2016

### **3.4.1. Preparo das amostras.**

Foi desenvolvida uma nova e econômica metodologia para a remoção do excesso de albumina das amostras de soro que foram utilizadas no Western Blot, dado que esta albumina encontrava-se gerando bandas deformes e indeterminadas nas proteínas de interesse deste trabalho. Esta metodologia foi baseada na modificação do trabalho de Liu et al., (2014) de misturas de solventes orgânicos e não será descrita nesta dissertação, uma vez que se encontra sob processo de patenteamento (LIU et al., 2014).

### **3.4.2. Quantificação das Proteínas.**

A quantificação das proteínas presentes nas amostras no soro foi determinada utilizando-se o método de Bradford em placas de ELISA de 96 poços, com uma leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Primeiramente fez-se uma curva padrão de BSA (Albumina bovina Serum) partindo de uma concentração conhecida (1mg/mL), pipetada em diferentes volumes de água miliQ (pontos de 1 a 5) a fim de obter diferentes concentrações para obter a curva. Foram utilizados 2, 4, 8, 16, 32 e 40µL de BSA, completando sempre com água miliQ até um volume de 40 µl, gerando concentrações de 5, 10, 20, 40, 80 e 100%. Para o branco não é usado BSA e para as amostras foi usado um volume fixo de 2 µl de soro. As dosagens foram realizadas em triplicata.

Finalmente, todas as soluções foram incubadas com solução de Bradford e a absorbância foi medida a 595 nm no leitor de placas ELISA, ELx800 Absorbance Reader (Winooski, Vermont, EUA).

### **3.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).**

As proteínas de Soro tratado (submetido a remoção da albumina) foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

Os reagentes utilizados para a preparação dos géis foram:

- Água MiliQ
- Bis/Acrilamida: 30%

- TEMED: 100%
- Persulfato de amónio (APS): 10% em água MiliQ.
- Tampão de separação: Tris 1,5M – SDS (0,1%) pH 8,6
- Tampão de empilhamento: Tris 0,5M – SDS (0,1%) pH 6,8

Os géis foram preparados no sistema de montagem Tetra Mini Protean-célula (Biorad, CA, USA). Primeiro, se prepara o gel com 0,75mm de espessura, pela adição da mistura dos volumes dos reagentes na da tabela 2. A percentagem de bis/acrilamida no gel de separação foi de 12% e, a percentagem de bis/acrilamida no gel de empilhamento foi 4%.

Tabela 2 - Protocolo para a preparação de géis de SDS-PAGE. Volumes correspondentes a dois géis de 0,75mm de espessura.

	<b>Gel Concentrador (4%)</b>	<b>Gel Separador (12 %)</b>
<b>H<sub>2</sub>O miliQ</b>	3 mL	3,34 mL
<b>Tampão de separação</b>	---	2,5 mL
<b>Tampão de empilhamento</b>	1,5 mL	--
<b>Bis/Acrilamida 30%</b>	670 µL	3,96 mL
<b>APS 10%</b>	40 µL	70 µL
<b>TEMED</b>	8 µL	7 µL

Foi agregada a água miliQ, o tampão correspondente e a solução bis/acrilamida, em seguida, o TEMED junto com o APS. Foi agitada a rapidamente a mistura e colocada entre o espaço das duas vidraças. Para a polimerização foi colocado uma alíquota de etanol para prevenir a deformação do gel de separação. Após 30 minutos, o etanol foi removido e o gel de empilhamento foi adicionado, colocando o pente plástico para formar os poços.

Após de 30 minutos e uma vez polimerizado o gel, os vidros foram encaixados no suporte para cuba de eletroforese, que foi completada com o tampão de Corrida (Tris Base 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1%, água), e posteriormente o pente foi removido.

As amostras correspondentes foram misturadas segundo o volume calculado para 25µg de proteínas em soro, com um volume de água miliQ até 14µL e com 7µL de Tampão de Laemmli (2x: Tris 0,5M, SDS 0,1% pH 6,8 / SDS 10% / Glicerol / DTT / Azul de Bromofenol) e finalmente colocadas no aparelho de aquecimento a 95°C entre 5 e 10 minutos. Logo após, foram carregados os poços com todo o conteúdo das amostras, com um poço preenchido com o marcador de peso molecular.

A eletroforese foi feita com voltagem constante de 100V até que a frente da eletroforese penetre totalmente o gel inferior, logo 150V até o fim da eletroforese. O processo é desenvolvido a 4°C.

#### **3.4.4. Transferência de proteínas à membrana.**

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno, Immun-Blot PVDF, Biorad (Biorad, CA, USA). Posterior à transferência, as proteínas foram fixadas para a reação com os anticorpos. Antes deste passo, foi feita a ativação das membranas utilizando metanol durante 5 minutos, seguido do uso do tampão de transferência a 4 graus por 10 minutos na mesa agitadora. A transferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada pela electrotransferência molhada a 60V.

#### **3.4.5. Immunoblotting.**

Neste passo, a membrana foi recortada de acordo com o trecho de interesse baseado no peso molecular do padrão e das proteínas. Isto permitiu incubar a membrana com diferentes anticorpos segundo o peso molecular. Os reagentes utilizados neste ensaio foram:

- Tampão de lavagem TBS (1X): NaCl 20mM, Tris 150mM, pH 7,4.
- Tampão de lavagem TBS-T (1X): NaCl 100mM, Tris Base 10mM, Tween 20 0,1% pH 7,4.
- Solução de Bloqueio: TBS-T, e 5% de leite em pó desnatado (Molico).

Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes:

- a) Anti-Osteopontina, Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, EUA);
- b) Anti-Serpina1, Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EUA);

c) Anti-transferrina, Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EUA).

Após a transferência, foram bloqueadas as membranas com solução de bloqueio. A solução foi colocada cobrindo a membrana e mantida em agitação suave a temperatura ambiente durante 2:30 horas. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida com seis lavagens com TBS-T durante 5 minutos cada. Depois de remover as membranas do tampão de lavagem, estas foram incubadas com a solução do anticorpo primário, durante por 4 horas em temperatura ambiente. A transferrina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. As diluições dos anticorpos primários foi de 1:500 para anti-Osteopontina, anti-Serpina1 e anti-transferrina, em solução de BSA 5% em TBS-T.

Terminada a incubação, o anticorpo primário foi recuperado e armazenado a -20°C. As membranas foram lavadas 6 vezes com TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente. O tampão de lavagem foi removido e a solução de anticorpo secundário anti-rabbit - Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EUA), para os três anticorpos primários utilizados, se adicionou em diluições de 1:10000 em TBS-T e leite 5%. A incubação foi feita com agitação suave à temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, o anticorpo secundário é removido e foram realizadas 6 lavagens com TBS-T 5 minutos cada, e 3 lavados com TBS 10 minutos cada.

#### **3.4.6. Revelado e análise das membranas.**

As membranas foram incubadas, de 10 a 30 minutos, com solução de revelado BCIP/NBT kit, Invitrogen (Carlsbad, Califórnia, EUA), até o surgimento das bandas. Posteriormente, as membranas foram analisadas utilizando o aparelho ChemiDoc™ XRS+ System (Biorad, CA, USA) e a intensidade das bandas reativas quantificadas pelo software ImageLab 5.21 (Biorad, CA, USA).

#### **3.5. Análise Estatística.**

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando os programas StatisticPackage for SocialSciences (SPSS) versão 20.0 e GraphPadPrism 5. Para identificar diferenças estatísticas entre dois grupos foram realizadas análises através do Teste T-Student não-pareado. A análise de variância (ANOVA) de uma

via com pós-teste de Tukey foi realizada para avaliar diferenças estatísticas entre três ou mais grupos em experimentos com uma variável foi realizada. Todos os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD). O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo para todas as análises. As relações estatísticas nas tabelas são descritas através do teste de ANOVA, para as comparações entre os subgrupos e controle, e teste T-student para as comparações internas dos subgrupos. Para ambos os testes os resultados se encontram como valor de p. Os valores da média e o desvio padrão (SD) encontram-se baseados na porcentagem (%) do valor real para facilitar a visualização.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram incluídos 40 pacientes com CECP e 11 controles. A idade média dos pacientes analisados foi de 60,61 anos ( $\pm 10,22$ ) enquanto a idade média dos controles foi de 55,90 anos ( $\pm 9,05$ ). Tanto em pacientes como em controles o gênero majoritário foi o masculino com 82,5% e 81,8% de prevalência em ambos os grupos, respectivamente. Em relação aos hábitos dos pacientes, estes foram na maioria não tabagistas (52,5%) e não etilistas (52,5 %), os sítios anatômicos analisados foram cavidade oral (77,5%) e orofaringe (22,5 %). Na maioria não apresentavam metástases linfonodais (67,5 %), e o número de pacientes em estadiamento inicial e avançado foi equivalente (50%-50%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Características clínico-patológicas dos pacientes e controles

Variáveis	Pacientes N=40 (%)	Controles N=11 (%)
<b>Idade (Média <math>\pm</math>SD)</b>	60,61 $\pm$ 10,22	55,90 $\pm$ 9,05
<b>Gênero</b>		
Masculino	33 (82,5)	9 (81,8)
Feminino	7 (17,5)	3 (18,2)
<b>Tabagista</b>		
Sim	19 (47,5)	0 (0)
Não	21 (52,5)	11 (100)
<b>Etilista</b>		
Sim	19 (47,5)	0 (0)
Não	21 (52,5)	11 (100)
<b>Sítio anatômico</b>		
Cavidade oral	31 (77,5)	-
Orofaringe	9 (22,5)	-
<b>Linfonodos regionais (N)</b>		
N0	27 (67,5)	11 (100)
N+	13 (32,5)	0 (0)
<b>Estadiamento</b>		
I/II	20 (50,0)	-
III/IV	20 (50,0)	-

Legenda: N0= sem metástase em linfonodos regionais  
 N+= com metástase em linfonodos regionais  
 I/II= estadiamento inicial  
 III/IV= estadiamento avançado

As análises dados clínicos dos pacientes incluídos neste estudo mostrou que a maioria destes não fazia consumo de álcool e tabaco (52%), o que não era esperado, uma vez que segundo estudos realizados, os pacientes com câncer são na maioria etilistas e tabagistas (INCA, 2010).

Estudos têm mostrado que no CECP os homens são mais acometidos da doença, e a maioria são usuários de álcool e tabaco (BRAKENHOFF; WAGNER; KLUSSMANN, 2017; COLOMBO, 2009; LOTHAIRE et al., 2006). O álcool e o tabaco têm sido descritos como os principais fatores de risco para o desenvolvimento e progressão do câncer (BRAKENHOFF; WAGNER; KLUSSMANN, 2017; INCA, 2010). Os dados aqui apresentados mostram que numero de pacientes eram quase iguais quando divididos pelo habito de fumar e beber, o que favorece as análises bioquímicas uma vez que não há diferença significativa para estes fatores de risco. A amostra mostrou que a maioria eram homens e com predominância da cavidade oral como o mais acometido, o que tem sido amplamente descrito na literatura (LOTHAIRE et al., 2006).

#### **4.1 Expressão relativa do mRNA de Osteopontina e Serpina1 em tecido tumoral e tecido normal de pacientes com CECP**

Com a intenção de avaliar a expressão relativa do mRNA nos pacientes com CECP, foram realizados ensaios de qPCR, em amostras de tecido tumoral e normal.

As análises de expressão relativa do mRNA da Osteopontina e da Serpina1 foram realizadas com 12 amostras de tecido tumoral e 4 amostras de tecido normal. As amostras de tecido normal pertenceram aos pacientes de ambos os sexos, não fumantes nem etilistas, e sem desenvolvimento linfonodal. O número amostral para o tecido tumoral foi dependente da realização ou não de cirurgia nos pacientes, e do tamanho dos tumores disponíveis no armazenamento.

Os resultados obtidos permitiram realizar a análise geral entre os casos nos tecido normal e no tecido tumoral como mostrado na figura 7. Observamos que não houve diferença da expressão relativa do mRNA de OPN entre o tecido normal e tumoral, mas o da Serpina1 mostrou um aumento significativo ( $p=0,0014$ ) no tecido tumoral.

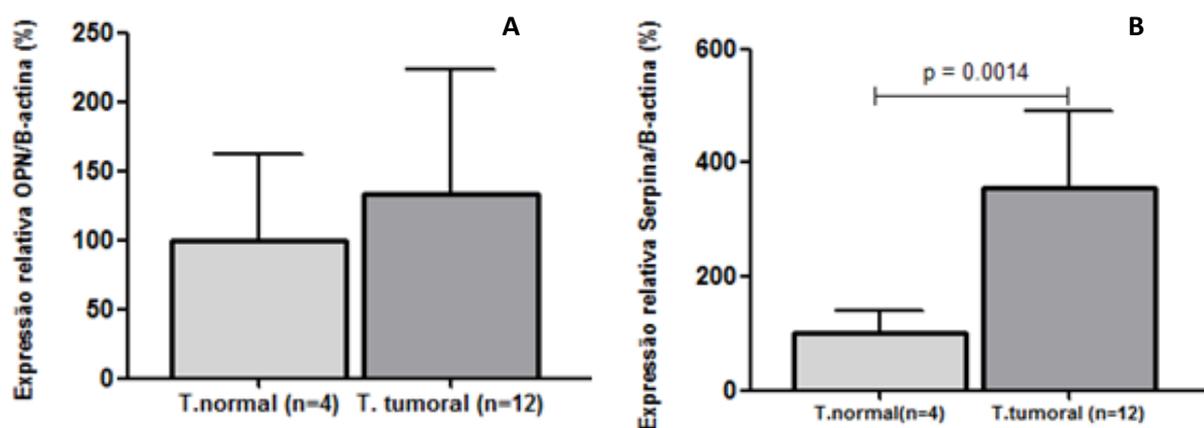


Figura 7 - Avaliação da expressão relativa do mRNA entre tecido normal e tecido tumoral. (A) Expressão relativa do mRNA de OPN. (B) Expressão relativa do mRNA de Serpina1. O n corresponde ao número de amostras por grupo. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SD.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Foi realizado o Teste t-student.

Estudos da OPN tem mostrado aumento significativo da expressão relativa do mRNA, no câncer de pulmão, mama, cólon e carcinoma de células escamosas orais (HUANG et al., 2015; RICH; SINGAL, 2014; SHEVDE; SAMANT, 2014). Esses dados devem ser analisados, pois esse aumento pode estar relacionado há vários fatores desde a amostra da população bem como o método utilizado.

Dado que tanto as amostras de tecido tumoral como as amostras de tecido normal pertencem aos pacientes com CECP, poderia estar acontecendo que o mRNA da OPN encontrasse aumentado até nos tecidos adjacentes ao local da cirurgia inclusive sem ter atividade neoplásica, podendo ser uma fonte de erro. No entanto, neste trabalho não foi possível coletar amostras de tecido normal de pessoas não afetadas com CECP. Outra possível causa da falta de significância com esta metodologia pode ser o número amostral reduzido.

Para Serpina1 o aumento significativo da expressão relativa do mRNA tem sido também relatado em outros estudos. Resultado semelhante foi encontrado no carcinoma de células escamosas cervicais, onde essa sobre-expressão encontrava-se associada a um pior prognóstico da doença (KLOTH et al., 2008) De fato um aumento da expressão de Serpina1 levaria a um aumento na mortalidade dos pacientes com câncer, mesmo sem conhecer ainda o mecanismo molecular em que esta atua.

Os resultados obtidos pela análise com qPCR também foram relacionados com o estadiamento, hábito de beber e fumar, presença de metástases linfonodais e sexo dos pacientes. Estes subgrupos podem ser comparados ou não com o grupo controle, como mostrado nas tabelas 4 e 5. As relações estatísticas nas tabelas são descritas como p ANOVA, para as comparações entre os subgrupos e controle, e p T-student para as comparações internas dos subgrupos; os valores da média e o desvio estándar (SD) encontram-se baseados na porcentagem (%) do valor real para facilitar a visualização.

As análises feitas para avaliar a expressão relativa do mRNA da Serpina1 em relação às características clinico-patológicas dos pacientes considerados neste estudo encontram-se resumidos na tabela 4 e na figura 8. Foram encontradas diferenças estatísticas em cada um dos subgrupos estabelecidos, e entre os subgrupos e os controles. Em relação ao gênero foi encontrada uma maior expressão do mRNA da Serpina1 em tecido tumoral de homens comparado com tecido normal ( $p=0.0001$ ), e em tecido tumoral de homens comparado com tecido tumoral de mulheres ( $p=0.0021$ ) como mostrado na tabela 4 e na figura 8A e B.

Os hábitos de fumar e ingerir álcool também mostraram diferenças estatisticamente significativas, tanto comparadas dentro dos subgrupos como comparadas entre subgrupos e controle. Foi encontrada uma maior expressão do mRNA da serpina1 em tecido tumoral de pacientes não tabagistas ( $p=0.0001$ ) e não etilistas ( $p=0.0001$ ), como encontrado na tabela 4 e na figura 8C e D. Em relação ao estadiamento, os tecidos tumorais de pacientes no estágio inicial foram os que mostraram maior expressão do mRNA da serpina1 ( $p=0.0001$ ) (tabela 4 e figura 8E). Os tecidos tumorais dos pacientes sem desenvolvimento de metástase linfonodal também mostraram uma maior expressão do mRNA, em relação com tecido normal e tecidos de pacientes com linfonodos regionais ( $p=0.0024$ ) (tabela 4 e figura 8F). Como mencionado, a maioria dos pacientes nos estágios iniciais do CECP são ao mesmo tempo não etilistas, não tabagistas e não apresentam linfonodos regionais, porém a elevada expressão do mRNA da serpina1 em pacientes no estágio inicial do desenvolvimento do CECP que apresentem as características clínicas mencionadas, poderia ser um biomarcador prognóstico precoce desta doença.

Diferentes estudos tem mostrado uma expressão relativa do mRNA elevada da

Serpina1 em amostras de pacientes com diversos carcinomas. No carcinoma de células escamosas cervicais (KLOTH et al., 2008), no carcinoma de células escamosas cutâneas (FARSHCHIAN et al., 2011) e no carcinoma papilar de tireoide (VIERLINGER et al., 2011).

No entanto, a abordagem realizada neste trabalho em relação ao aumento da expressão do mRNA da Serpina1 comparada aos subgrupos (sexo, hábito de fumar, hábito de beber, estadiamento e presença linfonodal) e os controles não foi feita ou publicada por outros pesquisadores, gerando dados moleculares novos em relação com as características clínico-patológicas dos pacientes com CECP.

Tabela 4 - Avaliação da expressão relativa do mRNA de Serpina1 em relação aos dados clínico-patológicos dos pacientes tecido tumoral (TT) (N= 12) e tecido normal (TN) (N=4).

Características	N (TT) = 12 N (TN) = 4	Serpina1 Média (%) $\pm$ SD	p ANOVA	p T-student
<b>Gênero</b>				
Masculino (TT)	9	385.89 $\pm$ 123.70	--	0.0021*
Feminino (TT)	3	100.00 $\pm$ 82.93		
Masculino (TT)	9	820.51 $\pm$ 123.70	--	< 0.0001*
Masculino (TN)	2	100.00 $\pm$ 124.80		
Feminino (TT)	3	76.99 $\pm$ 71.82	--	0.3603
Feminino (TN)	2	100.00 $\pm$ 45.04		
<b>Tabagista</b>				
Sim (TT)	5	132.05 $\pm$ 50.42	< 0.0001*	< 0.0001*
Não (TT)	7	514.99 $\pm$ 115.90		
Tecido normal	4	100.00 $\pm$ 76.48		
<b>Etilista</b>				
Sim (TT)	6	193.70 $\pm$ 84.19	< 0.0001*	0.0002*
Não (TT)	6	517.17 $\pm$ 126.30		
Tecido normal	4	100.00 $\pm$ 76.48		
<b>Estadiamento</b>				
I/II (TT)	7	547.24 $\pm$ 104.20	< 0.0001*	< 0.0001*
III/IV (TT)	5	86.91 $\pm$ 62.80		
Tecido normal	4	100.00 $\pm$ 76.48		
<b>Linfonodos Regionais</b>				
N0 (TT)	10	411.86 $\pm$ 125.10	0.0004*	0.0024*
N+ (TT)	2	73.31 $\pm$ 73.31		
Tecido normal	4	100.00 $\pm$ 76.48		

Legenda: ANOVA de uma via vias com pós-teste de Tukey para comparar médias de subgrupos com controle (p ANOVA). Teste T de Student para comparar médias entre subgrupos (p T student). Valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Os valores da média e o desvio padrão (SD) encontram-se baseados na porcentagem (%) do valor real para facilitar a visualização.

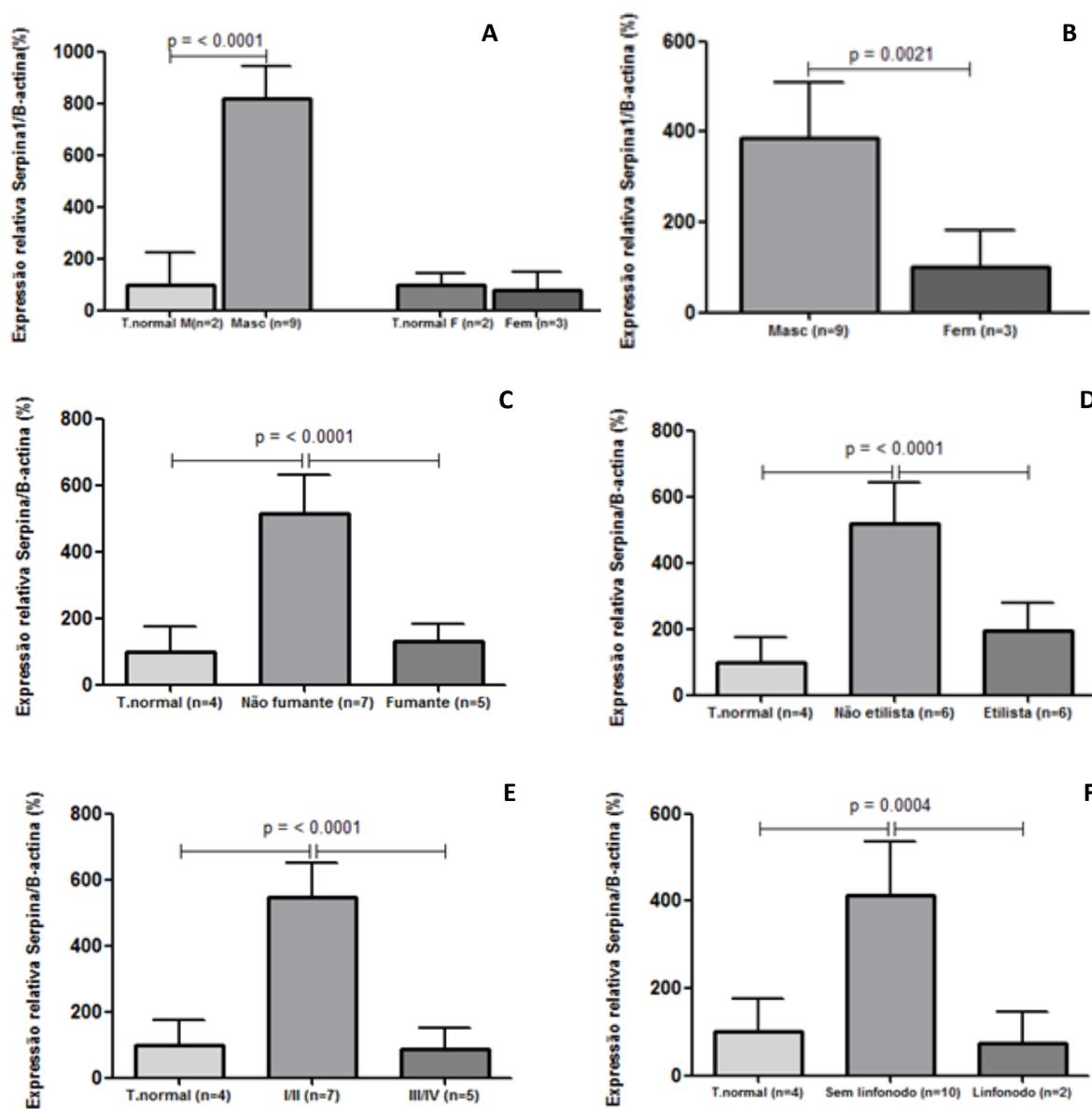


Figura 8 - Avaliação da expressão relativa do mRNA da Serpina1 entre subgrupos (de tecido tumoral) e tecido normal. (A) Expressão relativa do mRNA entre tecido normal e tecido tumoral de pacientes do sexo masculino e feminino. (B) Expressão relativa do mRNA do tecido tumoral entre pacientes do sexo masculino e feminino. (C) Expressão relativa do mRNA entre tecido normal e tecido tumoral de pacientes fumantes e não fumantes. (D) Expressão relativa do mRNA entre tecido normal e tecido tumoral de pacientes etilistas e não etilistas. (E) Expressão relativa do mRNA tecido normal e tecido tumoral de pacientes de estadiamento inicial e avançado. (F) Expressão relativa do mRNA entre tecido normal e tecido tumoral pacientes com e sem metástase linfonodal. O n corresponde ao número de amostras por grupo. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SD.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Foram realizadas análises estatísticas de T-student (A,B) e ANOVA (C,D,E,F).

As análises feitas para avaliar a expressão relativa do mRNA da OPN em relação às características clínico-patológicas dos pacientes se encontram resumidas na tabela 5

e na figura 9. Não foi encontrada diferença significativa da expressão do mRNA da OPN entre os subgrupos de tecido tumoral e tecido normal. No entanto, entre alguns dos subgrupos estabelecidos observou-se alteração no nível da expressão. Em relação ao gênero foi encontrada uma expressão significativamente maior do mRNA da OPN em tecido tumoral de mulheres comparado ao tecido normal ( $p=0.0018$ ) (Tabela 5 e Figura 9A). Já em tecido tumoral de mulheres comparado ao tecido tumoral de homens, foi encontrada uma tendência a aumentar a expressão mRNA como mostrado na tabela 5 e na figura 9B. Não foram encontrados dados na literatura que mostrarem comparações da expressão do mRNA em relação com o gênero dos pacientes, porém resulta uma abordagem nova que deve ser realizada com um número maior de amostras.

O hábito de fumar e ingerir álcool tampouco mostrou diferenças estatisticamente significativas na expressão do mRNA da OPN, quando comparadas entre subgrupos e controle (Tabela 5 e Figura 9C e D). Os tecidos tumorais de pacientes tabagistas mostraram uma maior expressão do mRNA da OPN em relação aos tecidos tumorais de pacientes não tabagistas ( $p=0.0492$ ) (Tabela 5). Resultados similares foram encontrados no estudo feito em tecidos tumorais de pacientes com câncer oral comparados aos tecidos normais que mostraram aumento da expressão relativa do mRNA de OPN em pacientes com o hábito de mascar tabaco (CHAKRABARTI et al., 2015), apesar de ser necessários estudos adicionais, tem sido relato que os indivíduos com outros tipos de câncer (como o câncer gástrico) tabagistas tem uma menor sobrevida e isso pode ser devido um aumento dos níveis de OPN e aos danos celulares promovidos pelo tabaco (CHEN et al., 2014).

Em relação ao estadiamento, foi encontrada uma tendência ao aumento da expressão do mRNA da OPN no estágio inicial e ainda maior no estágio avançado comparado com tecido normal, mas sem diferenças significantes (tabela 5 e figura 9E). Os tecidos tumorais dos pacientes sem desenvolvimento de metástase linfonodal também mostraram uma maior expressão do mRNA, em relação ao tecido normal e tecidos de pacientes com linfonodos regionais mas sem significância estatística (tabela 5 e figura 9F). Entre estes resultados pode-se ressaltar a tendência a aumentar a expressão do mRNA da OPN conforme avançada a doença, mas o número amostral pequeno usado na análise não permitiu perceber diferenças significativas para estabelecer relações.

Tabela 5 - Avaliação da expressão relativa do mRNA da Osteopontina em relação aos dados clínico-patológicos dos pacientes em tecido tumoral (TT) (N= 12) e tecido normal (TN) (N=4).

Características	N (TT) = 12 N (TN) = 4	Osteopontina Média (%) $\pm$ SD	p ANOVA	p T-student
<b>Gênero</b>				
Masculino (TT)	8	40.97 $\pm$ 85.13	--	0.1303
Feminino (TT)	4	100.00 $\pm$ 69.77		
Masculino (TT)	8	59.55 $\pm$ 85.13	--	0.2692
Masculino (TN)	2	100.00 $\pm$ 1.414		
Feminino (TT)	4	456.79 $\pm$ 69.77	--	0.0018*
Feminino (TN)	2	100.00 $\pm$ 60.61		
<b>Tabagista</b>				
Sim (TT)	6	89.92 $\pm$ 84.73	0.1591	0.0492*
Não (TT)	6	177.55 $\pm$ 81.83		
Tecido normal	4	100.00 $\pm$ 62.07		
<b>Etilista</b>				
Sim (TT)	6	167.24 $\pm$ 79.74	0.3570	0.1206
Não (TT)	6	100.24 $\pm$ 104.9		
Tecido normal	4	100.00 $\pm$ 62.07		
<b>Estadiamento</b>				
I/II (TT)	7	108.99 $\pm$ 82.08	0.3865	0.1350
III/IV (TT)	5	168.38 $\pm$ 93.58		
Tecido normal	4	100.00 $\pm$ 62.07		
<b>Linfonodos Regionais</b>				
N0 (TT)	10	411.86 $\pm$ 125.10	0.1959	0.0615
N+ (TT)	2	73.31 $\pm$ 73.31		
Tecido normal	4	100.00 $\pm$ 76.48		

Legenda: ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para comparar médias de subgrupos com controle (p ANOVA). Teste T de Student para comparar médias entre subgrupos (p T student). Valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Os valores da média e o desvio padrão (SD) encontram-se baseados na porcentagem (%) do valor real para facilitar a visualização.

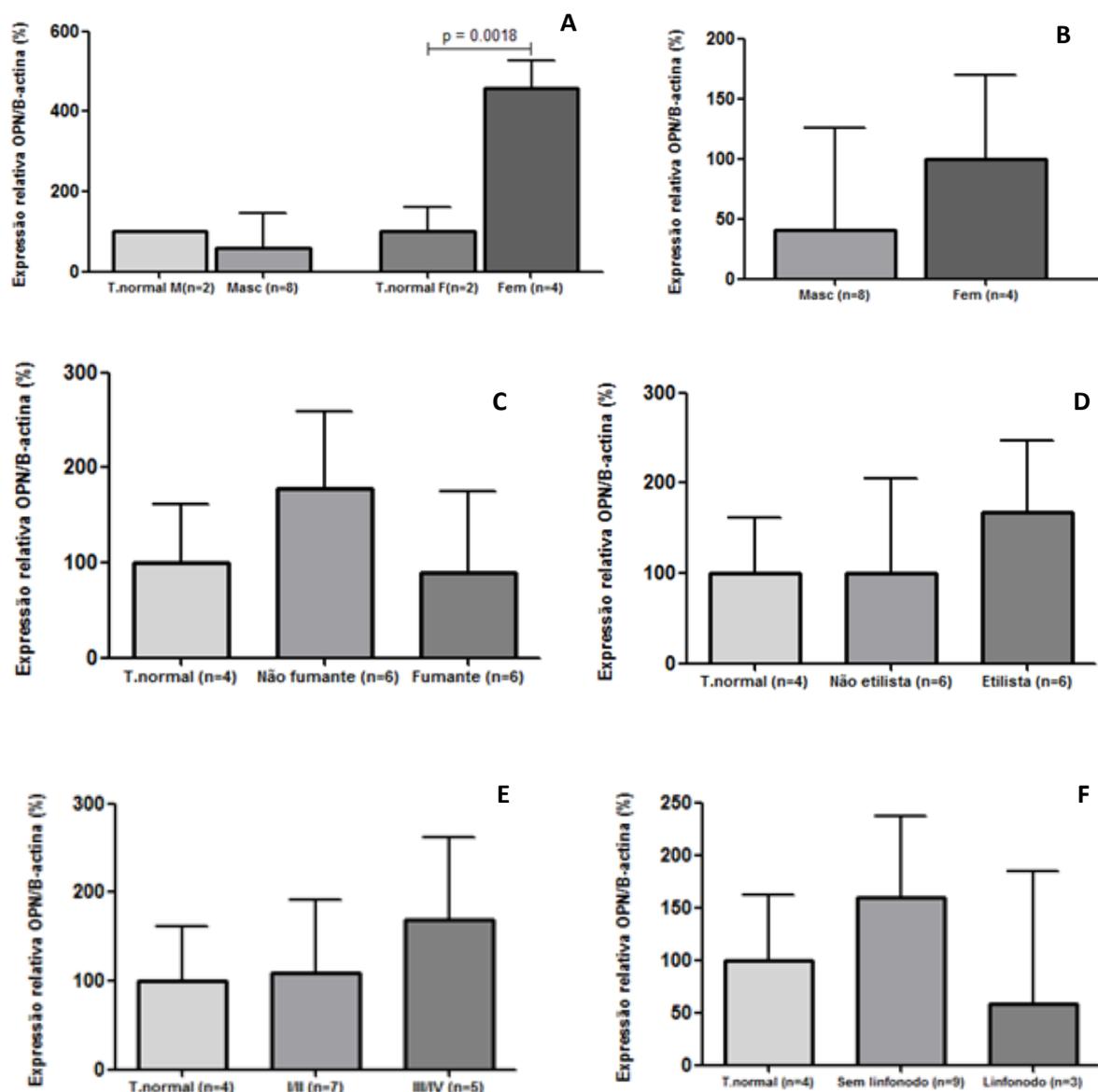


Figura 9 - Avaliação da expressão relativa do mRNA da OPN entre subgrupos (de tecido tumoral) e tecido normal. (A) Expressão relativa do mRNA entre tecido normal e tecido tumoral de pacientes do sexo masculino e feminino. (B) Expressão relativa do mRNA do tecido tumoral entre pacientes do sexo masculino e feminino. (C) Expressão relativa do mRNA entre tecido normal e tecido tumoral de pacientes fumantes e não fumantes. (D) Expressão relativa do mRNA entre tecido normal e tecido tumoral de pacientes etilistas e não etilistas. (E) Expressão relativa do mRNA tecido normal e tecido tumoral de pacientes de estadiamento inicial e avançado. (F) Expressão relativa do mRNA entre tecido normal e tecido tumoral pacientes com e sem metástase linfonodal. O n corresponde ao número de amostras por grupo. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SD.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Foram realizadas análises estatísticas de T-student (A,B) e ANOVA (C,D,E,F).

Foram esperados comportamentos similares na expressão do mRNA e as proteínas estudadas, no entanto foram encontradas diferenças neste comportamento, como mostrado a continuação.

## **4.2. Análise da expressão protéica de Osteopontina e Serpina1 em soro sanguíneo de pacientes com CECP e controles**

Com a intenção de avaliar a expressão relativa das proteínas representantes dos possíveis biomarcadores propostos neste estudo, foi realizada uma análise com o uso da técnica de Western Blot em amostras de soro sanguíneo de pacientes com CECP e pessoas saudáveis (controles). Assim, foram avaliados os dois possíveis biomarcadores de interesse neste estudo, Osteopontina e Serpina1, usando pares de anticorpos específicos para cada proteína.

A técnica de western blot permitiu complementar e comparar os resultados obtidos pela análise da expressão relativa dos mRNA de interesse, mas não se conseguiram comportamentos idênticos nos resultados, possivelmente devido a regulação da expressão das proteínas em diferentes níveis celulares. Além disso, o WB permitiu trabalhar com amostras de fluidos corporais, como o soro, podendo ser uma ferramenta de diagnóstico não invasivo pela facilidade da obtenção do material biológico.

As análises de expressão relativa das proteínas Osteopontina e AAT (Serpina1) foram realizadas com 51 amostras de soro sanguíneo pertencentes a 40 pacientes com CECP e 11 pessoas saudáveis (controles). Nas amostras de soro sanguíneo foi realizada uma metodologia de remoção do excesso da albumina que permitiu obter bandas com maior qualidade no Western blot realizado (LIU et al., 2014). O procedimento não será explicado, mas o resultado da limpeza pode ser observado na figura 10.

Inicialmente, as análises foram realizadas com amostras de soro sem processamento que geraram borrões indeterminados na membrana de PVDF, já o uso da metodologia de remoção do excesso da albumina no soro permitiu a geração de bandas nítidas e precisas, tornando o uso desta metodologia completamente necessário para dar continuidade a nosso trabalho.

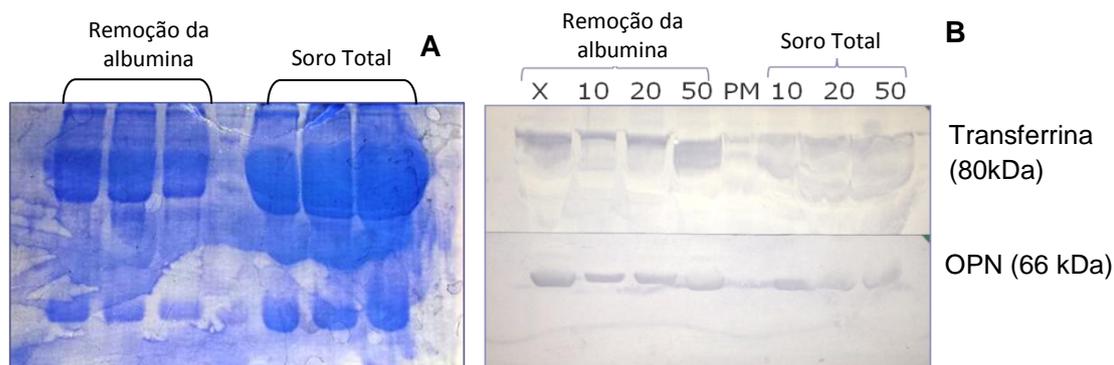


Figura 10 – Remoção da albumina das amostras de soro. (A) Gel de poliacrilamida: os primeiros 3 poços apresentam amostras de soro tratadas para a remoção da albumina, os últimos 3 poços apresentam amostras de soro total. Cada poço apresenta 50ug de proteínas. (B) Western blotting para transferrina e OPN: Os primeiros 4 poços apresentam amostras soro tratadas para a remoção da albumina a diferentes concentrações (10ug, 10ug, 20ug e 50ug), os últimos 3 poços apresentam amostras de soro total a diferentes concentrações (10ug, 20ug, 50ug).

A figura 11 representa o resultado do Western Blot para cada proteína analisada. A proteína Serpina1 foi reconhecida a 55kDa, como esperado, em relação ao controle interno em soro transferrina, reconhecia a 80kDa (Figura 11A). A proteína Osteopontina foi detectada em várias bandas a diferentes pesos moleculares, representando a OPN nativa (66kDa e 40kDa) e a OPN clivada (32kDa e 34kDa), em relação ao controle interno em soro transferrina, reconhecia a 80kDa (Figura 11B). Os resultados das diferentes bandas para OPN foram esperados, dado que esta proteína apresenta diferentes sítios alvos de clivagem para várias proteínas com presença em soro e plasma sanguíneo. Estudos têm mostrado que OPN apresenta um sítio de clivagem pela proteína trombina e, que a OPN clivada apresenta maior adesão e espalhamento sobre diversas linhas celulares que a OPN não clivada, mostrando que a trombina permite uma maior acessibilidade do domínio RGD a receptores da superfície celular (SENGER; PERRUZZI, 1994). OPN também pode ser clivada pela Caspase-8, o que gera o aumento da OPN clivada com a porção C-terminal que atua através de p53 regulando a morte celular programada (KIM et al., 2009). Também têm sido encontrados diversos sítios de clivagem da OPN relacionados à progressão metastática do carcinoma hepatocelular (HCC), reconhecidos por diferentes metaloproteases da matriz como a metaloprotease-9 (MMP-9) que geram OPN menores, por exemplo, a OPN-5kDa, provavelmente relacionados à invasão e metástase (TAKAFUJI et al., 2007).

A OPN-5kDa não foi identificada com o uso da técnica do WB, possivelmente porque foi perdida na separação eletroforética, podendo gerar uma fonte de erro na somatória das bandas que foram consideradas na análise devido a uma possível diminuição dos valores esperados nas intensidades destas bandas. A separação eletroforética obrigatoriamente teve que ser realizada em um tempo de corrida elevado, que não evitou a perda de proteínas de baixo peso molecular, devido à necessidade de separar perfeitamente a OPN da transferrina para realizar a metodologia de revelado colorimétrico que inclui o corte da membrana de PVDF. As alternativas para evitar estes resultados podem ser o uso de géis de corrida com diferentes concentrações ou o uso de técnicas alternativas como a Elisa.

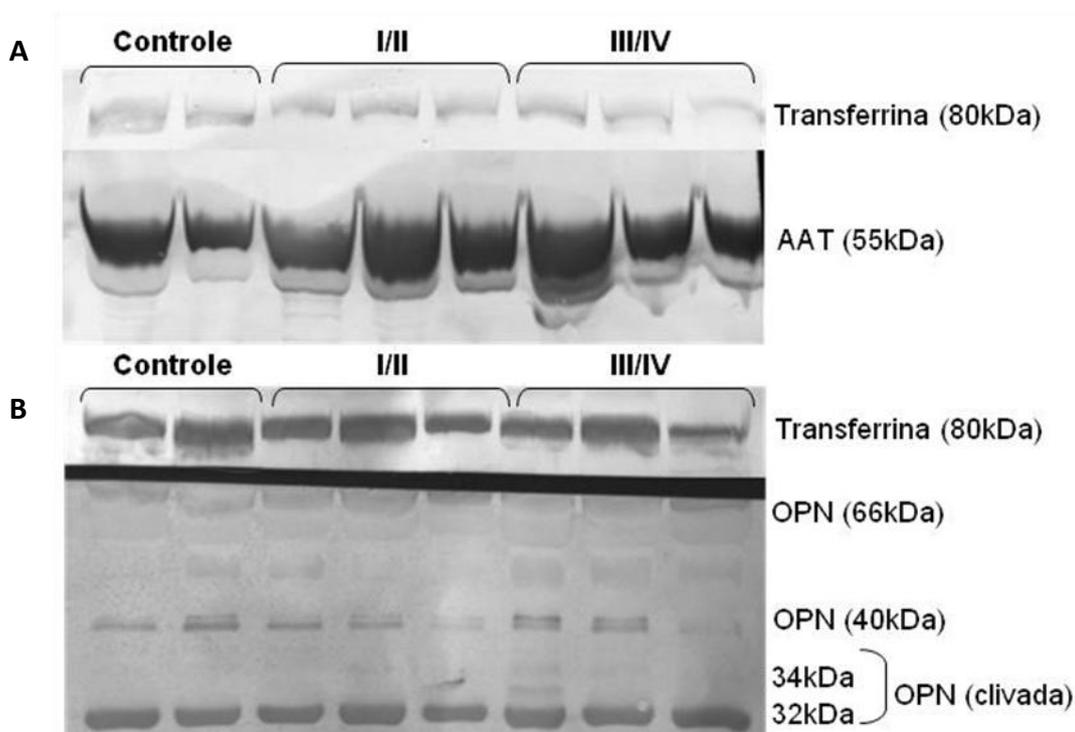


Figura 11 – Western blot para a análise das proteínas de interesse. (A) Proteína Serpina1(AAT) em relação com o controle interno transferrina. (B) Proteína OPN clivada e não clivada em relação com o controle interno transferrina.

Com base na literatura e na presença de formas clivadas da OPN em outros carcinomas, foi estudada a intensidade da proteína clivada OPN-32kDa além da somatória das bandas (OPN-total) para determinar possíveis diferenças na presença destas formas de OPN no soro de pacientes com CECP, em relação às características clínico-patológicas.

Os resultados obtidos o western blot permitiram realizar a análise geral entre controles e casos (pacientes com CECp) como mostrado na figura 12, onde se encontraram diferenças estatísticas significantes entre casos e controles somente para a expressão relativa da proteína serpina1.

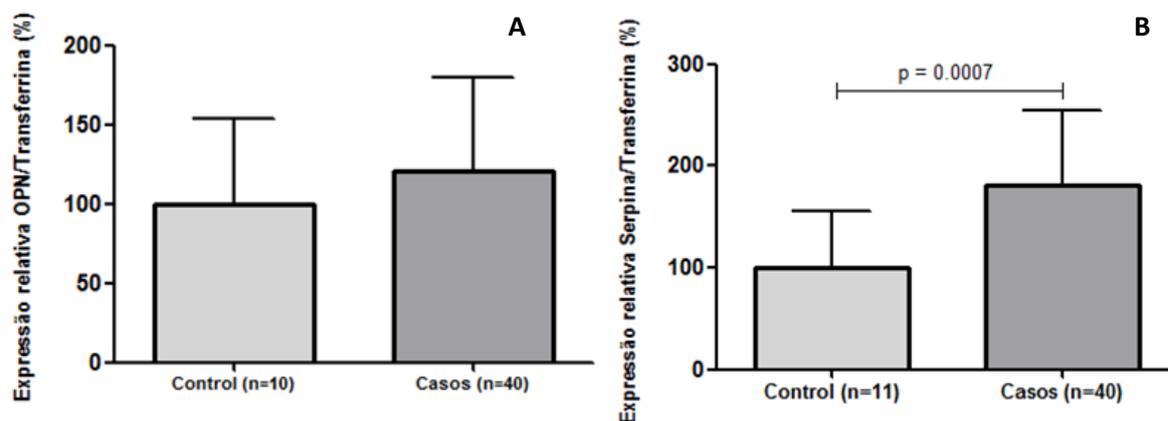


Figura 12 - Avaliação da expressão relativa das proteínas de interesse entre casos e controles. (A) Expressão relativa da OPN total. (B) Expressão relativa da Serpina1. O n corresponde ao número de amostras por grupo. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SD.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Foi realizado o Teste t-student.

Para OPN foi encontrada uma tendência ao aumento da expressão protéica, mas não significativa. Em discordância com estes resultados, diferentes estudos em outros tipos de câncer tinham mostrado diferenças estatísticas para a expressão da OPN em pacientes afetados. Por exemplo, pacientes com adenocarcinoma do pâncreas mostraram altos níveis de OPN em soro sanguíneo avaliados por método do ensaio Elisa, significativamente correlacionados com a redução da sobrevivência (PORUK et al., 2013). Outro estudo realizado para o carcinoma de células escamosas orais por meio de técnicas imunohistoquímicas mostrou uma maior expressão de OPN em tecidos tumorais em relação com tecidos normais (HUANG et al., 2014).

Estes resultados diferentes aos esperados podem ser causados pela possível perda da banda correspondente a OPN-5kDa, como mencionado anteriormente. O uso da técnica de Elisa poderia gerar uma alternativa mais eficiente à análise da OPN devido a que evita a perda das proteínas de baixo peso molecular além de

apresentar um valor mais econômico na prática clínica, no entanto é necessária uma maior quantidade de amostra que aquela disponível para este estudo.

Já para *Serpina1* foi encontrado um aumento significativo da expressão protéica ( $p=0.0007$ ) concordando com ambos os resultados obtidos na análise da expressão relativa dos mRNA respectivos (Figura 7 e 12). Resultados similares foram encontrados no carcinoma de células escamosas cervicais (KLOTH et al., 2008), carcinoma de células escamosas cutâneas (FARSHCHIAN et al., 2011), mostrando-se um comportamento similar da expressão da *Serpina1* em cânceres de tipo epidermoide.

Os resultados obtidos pela análise do Western Blot também foram relacionados com o estadiamento, hábito de beber e fumar, presença de metástases linfonodais e sexo dos pacientes. Estes subgrupos podem ser comparados ou não com o grupo controle, tal qual foi feito no qPCR, como mostrado nas tabelas 6 e 7. As relações estatísticas nas tabelas são descritas como p ANOVA, para as comparações entre os subgrupos e controle, e p T-student para as comparações internas dos subgrupos.

As análises feitas para avaliar a expressão relativa da proteína da *Serpina1* (AAT) em relação às características clinico-patológicas dos pacientes considerados neste estudo encontram-se resumidas na tabela 6 e na figura 13. Foram encontradas diferenças estatísticas em quase todos os subgrupos estabelecidos, e entre os subgrupos e os controles. Em relação ao gênero foi encontrada uma expressão maior da *Serpina1* em homens comparado com mulheres, mas sem significância; já entre mulheres e homens em relação aos seus respectivos controles foi encontrada uma expressão significativamente maior da *Serpina1*, como mostrado na tabela 6 e na figura 13A e B. Não foram encontrados dados na literatura que mostrarem comparações da expressão do AAT em relação com o gênero dos pacientes, porém resulta uma abordagem nova a considerar em pacientes homens.

As características clinico-patológicas dos pacientes relacionadas com o hábito de fumar e ingerir álcool também mostraram diferenças significativas, tanto comparadas dentro dos subgrupos como comparadas entre subgrupos e controle. Foi encontrada uma maior expressão da *Serpina1* em pacientes tabagistas ( $p=0.0004$ ) e etilistas

( $p=0.0004$ ), como apresentado na tabela 6 e na figura 13C e D, mostrando uma tendência oposta aos resultados obtidos para o mRNA. Dados similares não foram encontrados na literatura, dificultando a validação dos achados deste estudo.

Em relação ao estadiamento, os pacientes no estágio avançado foram os que mostraram maior expressão da serpina1 ( $p=0.0005$ ) (tabela 6 e figura 13E). Os pacientes com desenvolvimento de metástase linfonodal também mostraram uma maior expressão da Serpina1, em relação aos controles e pacientes sem linfonodos regionais metastáticos ( $p=0.0030$ ) (tabela 6 e figura 13F). Como conhecido e em contraste aos resultados obtidos na expressão relativa do mRNA da Serpina1, a maioria dos pacientes nos estágios avançados do CECP são ao mesmo tempo etilistas, tabagistas e apresentam linfonodos regionais, porém os resultados da maior expressão da serpina1 encontram-se relacionados em estes casos.

Em câncer gástrico foi encontrado que a sobre-expressão da Serpina1 aumentou a migração e invasão de celular, e é significativamente associada ao aumento de tamanho do tumor, estadiamento avançado, invasão perineural, invasão linfática, metástases em linfonodos, e menor sobrevida global (KWON et al., 2014), como encontrado em algumas características avaliadas nesta pesquisa. Observa-se um aumento contínuo da concentração da Serpina1 conforme o desenvolvimento da doença. Diferenças nas concentrações em cada caso poderiam ajudar a propor a serpina1 como um biomarcador do CECP precoce.

Tabela 6 - Avaliação da expressão relativa da proteína Serpina1 em relação aos dados clínico-patológicos dos pacientes (N=40) e os controles (N=11).

Características	N casos = 40 N controle = 11	Serpina1 Média (%) ±SD	p ANOVA	p T-student
<b>Gênero</b>				
Masculino	33	100.00 ± 72.12	--	0.2464
Feminino	7	78.61 ± 84.49		
Masculino	33	157.45 ± 72.12	--	0.0360*
Masculino (Controle)	6	100.00 ± 53.65		
Feminino	7	193.93 ± 84.49	--	0.0243*
Feminino (Controle)	5	100.00 ± 45.27		
<b>Tabagista</b>				
Sim	19	211.95 ± 67.90	0.0004*	0.0166*
Não	21	153.73 ± 78.03		
Controle	11	100.00 ± 55.23		
<b>Etilista</b>				
Sim	19	211.95 ± 67.90	0.0004*	0.0166*
Não	21	153.73 ± 78.03		
Controle	11	100.00 ± 55.23		
<b>Estadiamento</b>				
I/II	20	154.63 ± 73.59	0.0005*	0.0125*
III/IV	20	208.14 ± 71.40		
Controle	11	100.00 ± 55.23		
<b>Linfonodos Regionais</b>				
N0	27	171.11 ± 76.09	0.0030*	0.1079
N+	13	202.71 ± 70.46		
Controle	11	100.00 ± 55.23		

Legenda: ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para comparar médias de subgrupos com controle (p ANOVA). Teste T de Student para comparar médias entre subgrupos (p T student). Valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Os valores da média e o desvio padrão (SD) encontram-se baseados na porcentagem (%) do valor real para facilitar a visualização.

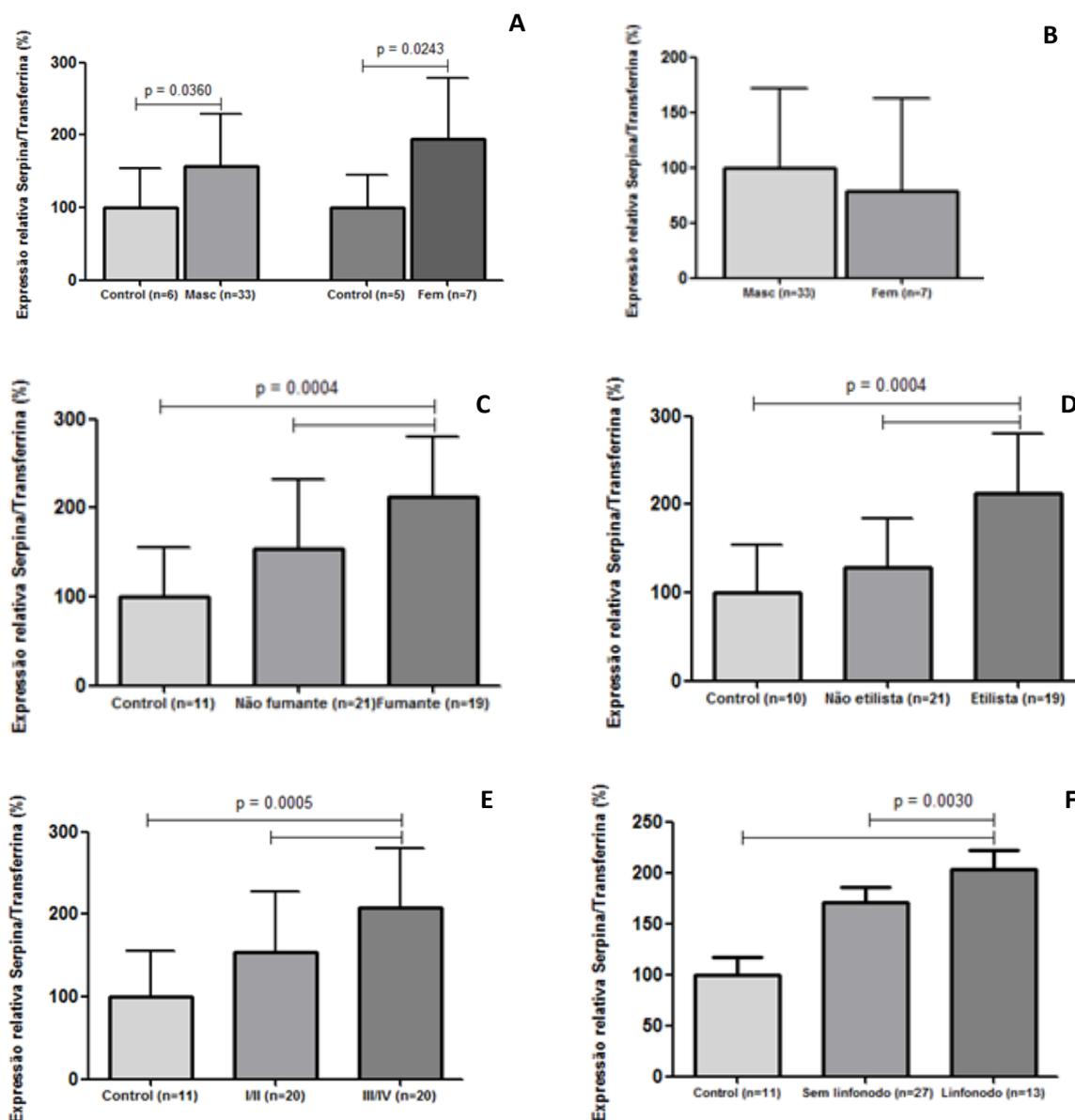


Figura 13 - Avaliação da expressão relativa da proteína da Serpina1 entre subgrupos e controles. (A) Expressão relativa entre controles e pacientes do sexo masculino e feminino. (B) Expressão entre pacientes do sexo masculino e feminino. (C) Expressão relativa entre controles e pacientes fumantes e não fumantes. (D) Expressão relativa entre controles e pacientes etilistas e não etilistas. (E) Expressão relativa entre controles e pacientes de estadiamento inicial e avançado. (F) Expressão relativa entre controles e pacientes com e sem metástase linfonodal. O n corresponde ao número de amostras por grupo. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SD.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Foram realizadas análises estatísticas de T-student (A,B) e ANOVA (C,D,E,F).

Com base na literatura e na presença de formas clivadas da OPN em outros carcinomas, foi estudada a intensidade da proteína clivada OPN-32kDa além da somatória das bandas (OPN-total) para determinar possíveis diferenças na presença destas formas de OPN no soro sanguíneo de pacientes com CECP, em relação às

características clínico-patológicas.

As análises feitas para avaliar a intensidade relativa das bandas correspondentes as proteínas OPN-Total e OPN-32kDa, em relação às características clínico-patológicas dos pacientes considerados neste estudo, encontram-se resumidas na tabela 7. Como observado nesta tabela, não foram encontradas diferenças entre os resultados obtidos para Osteopontina-Total e Osteopontina-32kDa, mostrando que OPN-32kDa não possui um comportamento diferente àquele obtido para a somatória das bandas de OPN (OPN-total). Por este motivo a análise foi feita somente com a avaliação da OPN-total.

Em relação ao gênero foi encontrada uma expressão significativamente maior da OPN em mulheres comparado com homens ( $p=0.0004$ ); já entre mulheres e homens em relação aos seus respectivos controles não foi observado diferença, como mostrado na tabela 7 e na figura 14A e B. Não foram encontrados dados na literatura que mostrarem comparações da expressão da OPN em relação com o gênero.

O hábito de fumar e ingerir álcool não mostrou diferenças estatisticamente significativas, tanto comparadas dentro dos subgrupos como comparadas entre subgrupos e controle (tabela 7 e figura 14C e D). Em relação ao estadiamento, os pacientes no estágio avançado foram os que mostraram maior expressão da OPN ( $p=0.0130$ ) (tabela 7 e figura 14E). Os pacientes com desenvolvimento de metástase linfonodal também mostraram uma maior expressão da OPN, em relação aos controles e pacientes sem linfonodos regionais ( $p=0.0362$ ) (tabela 7 e figura 14F). Os resultados significantes foram encontrados para o estadiamento da doença e a presença de linfonodos metastáticos. Observa-se um aumento contínuo na concentração da OPN conforme o aumenta a gravidade da doença e diferenças nas concentrações em cada caso poderiam ajudar a propor a OPN como um biomarcador do CECP precoce em estágios iniciais. No entanto, como comentado anteriormente os resultados pouco significantes poderiam ter mostrado que o Western Blot não é a técnica indicada para a análise das concentrações de OPN em soro.

Muitos dos resultados obtidos neste estudo não foram comparados a trabalhos anteriores por serem biomarcadores pouco avaliados, como no caso da Serpina1,

e/ou porque provavelmente os estudos feitos com estes marcadores em diversos tipos de câncer, que não mostraram significância estatística não estão disponíveis em revistas científicas, dificultando assim as possíveis comparações para a discussão.

Tabela 7 - Avaliação da expressão relativa da proteína OPN Total e OPN-32kDa em relação aos dados clínico-patológicos dos pacientes (N=40) e dos controles (N=11).

Características	N caso = 40 N controle=11	OPN Total Média (%) ±SD	p ANOVA	p T-student	OPN-32kDa Média (%) ± SD	p ANOVA	p T-student
<b>Gênero</b>							
Masculino	33	23.49 ± 48.54		0.0004*	78.61 ± 58.16		0.1900
Feminino	7	100 ± 62.07	--		100 ± 62.72	--	
Masculino	33	123.67 ± 43.89		0.1282	122.35 ± 58.16		0.2183
Masculino (Controle)	5	100 ± 32.35	--		100 ± 66.94	--	
Feminino	7	110.61 ± 62.07		0.3762	156.41 ± 62.72		0.0608
Feminino (Controle)	5	100 ± 44.98	--		100 ± 47.02	--	
<b>Tabagista</b>							
Sim	19	121.38 ± 49.78			112.58 ± 64.25		
Não	21	122.41 ± 44.34	0.3970	0.1216	127.89 ± 56.28	0.4450	0.3010
Controle	10	100 ± 36.89			100 ± 53.88		
<b>Etilista</b>							
Sim	19	121.38 ± 49.78			112.58 ± 64.25		
Não	21	122.41 ± 44.34	0.3970	0.1216	127.89 ± 56.28	0.4450	0.3010
Controle	10	100 ± 36.89			100 ± 53.88		
<b>Estadiamento</b>							
I/II							
III/IV	20	104.67 ± 41.52			96.96 ± 49.70		
Controle	20	139.18 ± 45.69	0.0181*	0.0130*	144.27 ± 58.13	0.0175*	0.0269*
	11	100 ± 36.89			100 ± 53.88		
<b>Linfonodos Regionais</b>							
N0	27	112.72 ± 45.31			116.26 ± 58.04		
N+	13	141.05 ± 45.66	0.0695	0.0362*	129.67 ± 63.04	0.4898	0.2549
Controle	11	100 ± 36.89			100 ± 53.88		

Legenda: ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para comparar médias de subgrupos com controle (p ANOVA). Teste T de Student para comparar médias entre subgrupos (p T student). Valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Os valores da média e o desvio padrão (SD) encontram-se baseados na porcentagem (%) do valor real para facilitar a visualização.

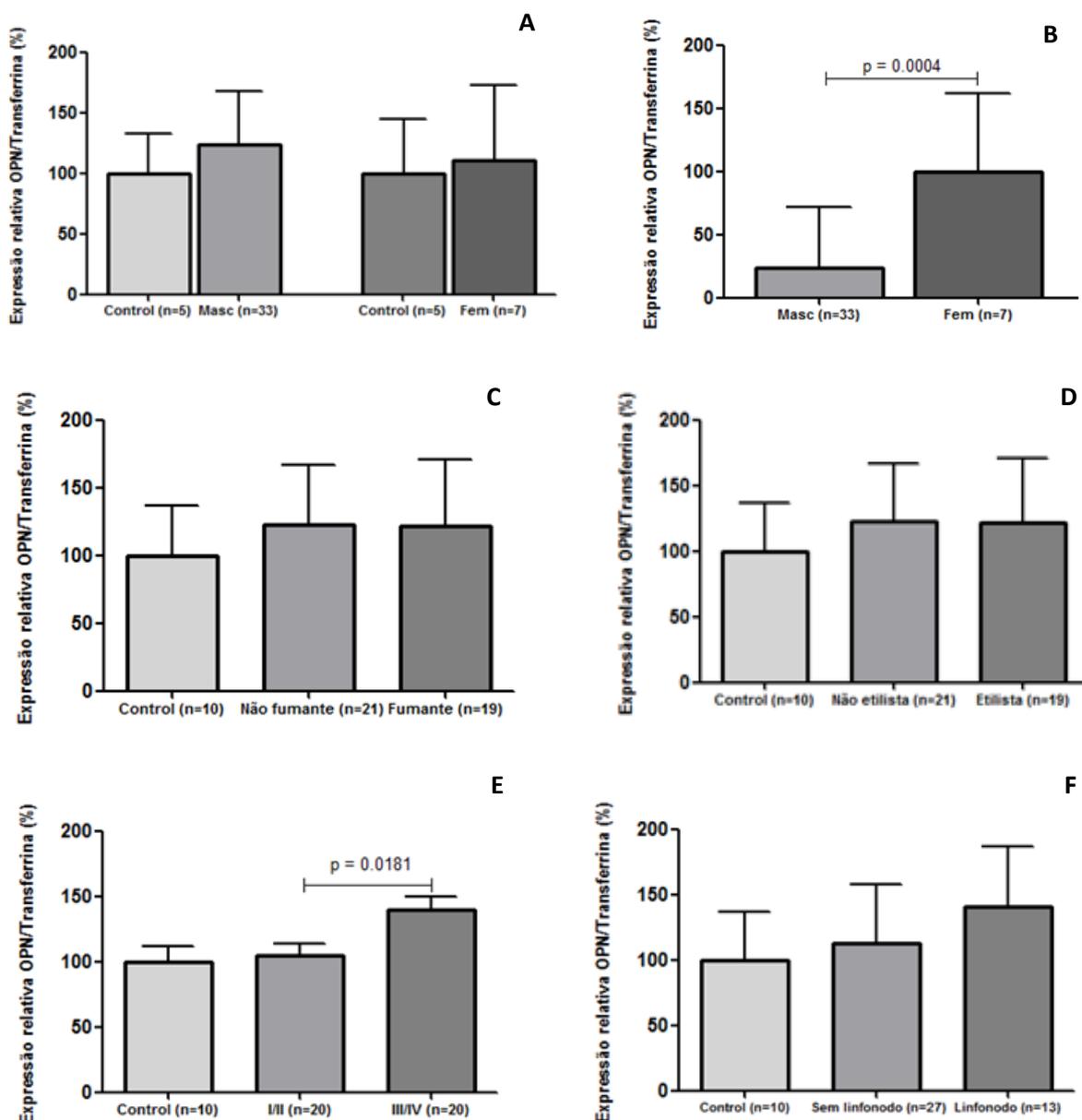


Figura 14 - Avaliação da expressão relativa da proteína da Osteopontina Total entre subgrupos e controles. (A) Expressão relativa entre controles e pacientes do sexo masculino e feminino. (B) Expressão entre pacientes do sexo masculino e feminino. (C) Expressão relativa entre controles e pacientes fumantes e não fumantes. (D) Expressão relativa entre controles e pacientes etilistas e não etilistas. (E) Expressão relativa entre controles e pacientes de estadiamento inicial e avançado. (F) Expressão relativa entre controles e pacientes com e sem metástase linfonodal. O n corresponde ao número de amostras por grupo. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SD.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Foram realizadas análises estatísticas de T-student (A,B) e ANOVA (C,D,E,F).

Resumidamente, a análise da Serpina1 como biomarcador mostrou, pela primeira vez no CECP, diferenças significativas nas duas técnicas avaliadas (qPCR em tecido tumoral e normal e Western blot em soro) sugerindo sua possível utilização no

diagnostico. Nos pacientes com CECP a expressão relativa do mRNA da Serpina1 foi maior em tecido tumoral, em homens, não fumantes, não etilistas, sem desenvolvimento linfonodal e estadiamento inicial da doença (I/II). A expressão protéica da Serpina1 em soro de pacientes com CECP comparada aos indivíduos saudáveis foi significativamente maior, a expressão elevada também foi encontrada em pacientes fumantes, etilistas, com linfonodos regionais e de estadiamento avançado da doença (III/IV).

As diferenças encontradas nos níveis de mRNA da Serpina1 indicam que a sua presença não está relacionada com os fatores de risco para o desenvolvimento do CECP, portanto constitui um biomarcador independente e confiável. Todavia, na análise do soro, esse aumento foi encontrado em pacientes que estavam submetidos aos fatores de risco e estadiamento avançado, assim esta análise do soro poderá ser usada como um marcador de prognóstico desses pacientes.

O estudo nesta doença e em outros tipos de câncer deve ser desenvolvido para estabelecer o mecanismo molecular pelo qual atua, além de estabelecer parâmetros de medida no diagnóstico do CECP.

A análise da Osteopontina como biomarcador não mostrou diferenças significativas na expressão relativa do mRNA entre os tecidos normal e tumoral de pacientes com CECP. A expressão protéica da Osteopontina em soro de pacientes com CECP foi maior somente no parâmetro estadiamento avançado da doença (III/IV). A sua eficiência como um biomarcador no CECP deve ser analisada nos estádios avançados desta doença onde poderia ser estabelecido um mecanismo de ação, pois estudos tem mostrado que seus níveis aumentados está diretamente relacionado a menor sobrevida de pacientes com tumores de pulmão, da mama e do cólon (RICH; SINGAL, 2014), colo de útero (HUANG et al., 2015), carcinoma de células escamosas orais (HUANG et al., 2014). A sobrevida reduzida dos pacientes com CECP é um dos grandes desafios atuais que tem levado a busca de formas possíveis de melhorar a qualidade de vida dos doentes. Novos estudos são necessários para avaliar o porquê do comportamento diferencial da OPN no CECP em relação com outros tipos de câncer, dado que este se apresenta como um biomarcador bastante comum em estudos feitos com técnicas distintas ao Western Blot.

O uso da técnica de Elisa em lugar ao WB poderia gerar resultados mais rápidos e com um gasto econômico menor na avaliação de algumas proteínas, mas por ser menos específica que o WB deve ser uma alternativa a ser fortemente padronizada para evitar erros de reconhecimento. Por isso, deve ser considerada no uso da prática clínica e os resultados devem ser confirmados com o uso de outras metodologias como o WB.

Como mencionado ainda não foi estabelecido um grupo de biomarcadores para o estudo do CECP, no entanto alguns oncogenes como EGFR, Ciclina1 e COX-2, genes supressores tumorais como p53, p16, p21, p27, genes envolvidos na angiogênese como VEGF e, genes envolvidos na metástase como MMPs e uPA, são os mais considerados até o momento (COLOMBO, 2009).

Os marcadores sugeridos neste estudo (OPN e Serpina1) apresentam a vantagem de ambos serem proteínas secretadas, o qual permite o estudo e avaliação destes biomarcadores em amostras de plasma, soro ou saliva, gerando alternativas menos invasivas para o diagnóstico ou tratamento do CECP.

## 5. CONCLUSÕES

O uso de soro para avaliação de biomarcadores de CECP mostrou resultados úteis no desenvolvimento de possíveis técnicas de análise menos invasivas.

Foi sugerido que a Serpina1 no soro e no tecido tumoral é um potencial biomarcador do CECP.

Este trabalho mostrou pela primeira vez que os níveis da Serpina1 estão aumentados nos pacientes com CECP e podem ser detectados tanto no tecido tumoral (mRNA da Serpina1) como no sangue (AAT), o que pode facilitar sua aplicação no prognóstico da doença.

Já o uso da OPN como biomarcador precisa ser melhor estudada, principalmente com uma avaliação maior de pacientes e outras metodologias.

Um novo método efetivo e barato foi estabelecido para a remoção da albumina do soro. A remoção da albumina do soro, permitiu uma melhor resolução das análises da OPN e Serpina1 pela técnica de Western Blot.

## 6. REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, R. et al. Osteopontin , a Novel Substrate for Matrix Metalloproteinase-3 ( Stromelysin-1 ) and Matrix Metalloproteinase-7 ( Matrilysin ). **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 30, p. 28261–28267, 2001.
- ALPER, Ö.; BOWDEN, E. T. Novel Insights Into c-Src. **Current Pharmaceutical Desing**, v. 11, p. 1119–1130, 2005.
- ARUFFO, A. et al. CD44 Is the Principal Cell Surface Receptor for Hyaluronate. **Cell**, v. 61, n. June, p. 1303–1313, 1990.
- ASHKAR, S. et al. Eta-1 (Osteopontin): An Early Component of Type-1 (Cell-Mediated) Immunity. **Science**, v. 287, n. 5454, p. 860–864, 2000.
- ATKINSON A.J., J. et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89–95, mar. 2001.
- BACCARANI-CONTRI, M.; TAPARELLI, F.; PASQUALI-RONCHETTI, I. Osteopontin is a constitutive component of normal elastic fibers in human skin and aorta. **Matrix Biology**, v. 14, n. 7, p. 553–560, 1995.
- BECK, G. R.; ZERLER, B.; MORAN, E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 15, p. 8352–8357, 2000.
- BRAKENHOFF, R. H.; WAGNER, S.; KLUSSMANN, J. P. Molecular Patterns and Biology of HPV-Associated HNSCC. In: [s.l: s.n.]. p. 37–56.
- BRISTOW, C. L.; MERCATANTE, D. R.; KOLE, R. HIV-1 preferentially binds receptors copatched with cell-surface elastase. **Immunobiology**, v. 102, n. 13, p. 4479–4487, 2003.
- BRISTOW, C. L.; PATEL, H.; ARNOLD, R. R. Self Antigen Prognostic for Human Immunodeficiency Virus Disease Progression. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 8, n. 5, p. 937–942, 2001.
- CAMELIER, A. A. et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency: diagnosis and treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 7, p. 514–527, 2008.
- CHABAS, D. et al. The Influence of the Proinflammatory Cytokine, Osteopontin, on Autoimmune Demyelinating Disease. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1731–1735, 23 nov. 2001.
- CHAKRABARTI, S. et al. Whole genome expression profiling in chewing-tobacco-associated oral cancers: a pilot study. **Medical oncology (Northwood, London, England)**, v. 32, n. 3, p. 60, 2015.

CHEN, T. et al. Serum OPN expression for identification of gastric cancer and atrophic gastritis and its influencing factors. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–14, 2014.

CHOI, S.; MYERS, J. N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. **Journal of dental research**, v. 87, n. 1, p. 14–32, jan. 2008.

CLARK, E. A; BRUGGE, J. S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, n. 5208, p. 233–239, 1995.

COLOMBO, J. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço Genetic Changes in Head and Neck Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 2, p. 165–174, 2009.

COX, D. **The Metabolic Basis of Inherited Disease. Vol. IV. (8th ed.)**. [s.l: s.n.].

COX, D. W. New variants of alpha 1-antitrypsin: comparison of Pi typing techniques. **American journal of human genetics**, v. 33, n. 3, p. 354–65, maio 1981.

CROSBY, A. H. et al. Genomic organization of the human osteopontin gene: exclusion of the locus from a causative role in the pathogenesis of dentinogenesis imperfecta type II. **Genomics**, v. 27, n. 1, p. 155–60, 1 maio 1995.

CRYSTAL, R. The alpha 1-antitrypsin gene and its deficiency states. **Trends in genetics**, v. Dec, n. 5(12), p. 411–417, 1989.

CRYSTAL, R. G. Alpha 1-antitrypsin deficiency, emphysema, and liver disease. Genetic basis and strategies for therapy. **The Journal of clinical investigation**, v. 85, n. 5, p. 1343–52, maio 1990.

DAS, R.; MAHABELESWAR, G. H.; KUNDU, G. C. Osteopontin stimulates cell motility and nuclear factor kappaB-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in breast cancer cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 31, p. 28593–606, 2003.

DÖBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer metastasis reviews**, v. 24, n. 1, p. 9–17, jan. 2005.

EZASHI, T.; DAS, P.; ROBERTS, R. M. Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 13, p. 4783–8, 29 mar. 2005.

FARSHCHIAN, M. et al. Serpin peptidase inhibitor clade A member 1 (SerpinA1) is a novel biomarker for progression of cutaneous squamous cell carcinoma. **The American journal of pathology**, v. 179, n. 3, p. 1110–9, 2011.

FEDELE, S. Diagnostic aids in the screening of oral cancer. **Head & neck oncology**, v. 1, p. 5, 2009.

GRAF, K. et al. Myocardial osteopontin expression is associated with left ventricular hypertrophy. **Circulation Research**, v. Nov, n. 96(9), p. 3063–71, 1997.

HAFEEZ, W.; CILIBERTO, G.; PERLMUTTER, D. H. Constitutive and modulated expression of the human alpha 1 antitrypsin gene. Different transcriptional initiation

sites used in three different cell types. **The Journal of clinical investigation**, v. 89, n. 4, p. 1214–22, abr. 1992.

HILDENBRAND, R. et al. The urokinase-system--role of cell proliferation and apoptosis. **Histology and histopathology**, v. 23, n. 2, p. 227–236, 2008.

HOOD, J. D.; CHERESH, D. A. Role of Integrins in Cell Invasion and Migration. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 2, p. 91–100, 2002.

HUANG, C. et al. Prognostic and predictive values of SPP1 , PAI and caveolin-1 in patients with oral squamous cell carcinoma. v. 7, n. 9, p. 6032–6039, 2014.

HUANG, X. et al. Aberrant Expression of Osteopontin and E-Cadherin Indicates Radiation Resistance and Poor Prognosis for Patients with Cervical Carcinoma. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 63, n. 2, p. 88–98, 2015.

INCA. Instituto Nacional do Câncer - Estimativa Incidência de Câncer no Brasil, 2010. 2010.

KAHLES, F.; FINDEISEN, H. M.; BRUEMMER, D. Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. **Molecular Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 384–393, 2014.

KIM, H.-J. et al. Intracellular cleavage of osteopontin by caspase-8 modulates hypoxia/reoxygenation cell death through p53. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 15326–15331, 2009.

KIM, H. J. et al. Erk pathway and activator protein 1 play crucial roles in FGF2-stimulated premature cranial suture closure. **Developmental Dynamics**, v. 227, n. 3, p. 335–346, 2003.

KIM, J.-H. et al. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. **JAMA**, v. 287, n. 13, p. 1671–9, 3 abr. 2002.

KLOTH, J. et al. Elevated expression of SerpinA1 and SerpinA3 in HLA-positive cervical carcinoma. **The Journal of Pathology**, v. 215, n. 3, p. 222–230, jul. 2008.

KOHRI, K. et al. Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 20, p. 15180–4, 15 jul. 1993.

KURACHI, K. et al. Cloning and sequence of cDNA coding for alpha 1-antitrypsin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 11, p. 6826–30, nov. 1981.

KWON, C. H. et al. Serpin peptidase inhibitor clade A member 1 is a biomarker of poor prognosis in gastric cancer. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 10, p. 1993–2002, 2014.

LI AW, L. et al. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). **The Journal of clinical investigation**, v. 101, n. 7, p. 1468–1478, 1998.

LIEBERMAN, J.; BORHANI, N.; FEINLEIB, M. alpha1-Antitrypsin deficiency in twins

and parents-of-twins. **Clinical genetics**, v. Jan, n. 15(1), p. 29–36, 1979.

LIU, G. et al. A novel and cost effective method of removing excess albumin from plasma/serum samples and its impacts on LC-MS/MS bioanalysis of therapeutic proteins. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 16, p. 8336–8343, 2014.

LONG, G. L. et al. Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant. **Biochemistry**, v. 23, n. 21, p. 4828–37, 9 out. 1984.

LOTHAIRE, P. et al. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. **Head & neck**, v. 28, n. 3, p. 256–269, 2006.

MCGURK, M. et al. Delay in diagnosis and its effect on outcome in head and neck cancer. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 4, p. 281–284, 2005.

MISHRA, R. Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application. **Oral Oncology**, v. 48, n. 7, p. 578–584, 2012.

MORIMOTO, I. et al. Identification of the osteopontin gene as a direct target of TP53. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 33, n. 3, p. 270–8, mar. 2002.

MORO, L. Integrin-induced Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Activation Requires c-Src and p130Cas and Leads to Phosphorylation of Specific EGF Receptor Tyrosines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 11, p. 9405–9414, 2001.

NICHOLSON, K. M.; ANDERSON, N. G. The protein kinase B / Akt signalling pathway in human malignancy. **Cellular Signalling**, v. 14, p. 381–395, 2002.

NIH. **National Cancer Institute Head and Neck Cancer - Head and Neck Cancer, 2014.**

NUKIWA, T. et al. Characterization of the Gene and Protein of the Common al-Antitrypsin Normal M2 Allele. **American journal of human genetics**, v. 43, n. 3, p. 322–330, 1988.

OGBUREKE, K. U. E.; FISHER, L. W. SIBLING expression patterns in duct epithelia reflect the degree of metabolic activity. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 55, n. 4, p. 403–9, abr. 2007.

OMS. **Organización Mundial de la Salud. Nota descriptiva N°297. 2015.**

PERLINO, E.; CORTESE, R.; CILIBERTO, G. The human alpha 1-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes. **The EMBO journal**, v. 6, n. 9, p. 2767–71, set. 1987.

PETRIK, D. et al. Plasma osteopontin is an independent prognostic marker for head and neck cancers. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 24, n. 33, p. 5291–5297, 2006.

PORUK, K. E. et al. Serum Osteopontin and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1

as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Pancreatic Adenocarcinoma. **Pancreas**, v. 42, n. 2, p. 193–197, mar. 2013.

PRINCE, C. W. et al. Isolation , Characterization , and Biosynthesis of a Phosphorylated Glycoprotein from Rat Bone \*. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, n. 6, p. 2900–2907, 1987.

RANGASWAMI, H.; BULBULE, A.; KUNDU, G. C. Nuclear Factor-inducing Kinase Plays a Crucial Role in Osteopontin-induced MAPK / IκBα Kinase-dependent Nuclear Factor κB-mediated Promatrix Metalloproteinase-9 Activation \*. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 37, p. 38921–38935, 2004.

RANGASWAMI, H.; BULBULE, A.; KUNDU, G. C. Osteopontin: Role in cell signaling and cancer progression. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 2, p. 79–87, 2006.

REINHOLT, F. P. et al. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 12, p. 4473–5, jun. 1990.

RENAULT, M. A. et al. AP-1 is involved in UTP-induced osteopontin expression in arterial smooth muscle cells. **Circulation Research**, v. 93, n. 7, p. 674–681, 2003.

RICH, N.; SINGAL, A. G. Hepatocellular carcinoma tumour markers: Current role and expectations. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 28, n. 5, p. 843–853, 2014.

SENGER, D. R.; PERRUZZI, C. A. Adhesive Properties of Osteopontin : Regulation by a Naturally Occurring Thrombin-Cleavage in Close Proximity to the GRGDS Cell-binding Domain. **Molecular Biology of the Cell**, v. 5, n. May, p. 565–574, 1994.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. **Nature Cell Biology**, v. 4, p. 131–136, 2002.

SHEVDE, L. A; SAMANT, R. S. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 37, p. 131–41, 2014.

SHIMADA, Y. et al. Clinical significance of osteopontin in esophageal squamous cell carcinoma: Comparison with common tumor markers. **Oncology**, v. 68, n. 2–3, p. 285–292, 2005.

SONG, J. et al. Hepatic stellate cells activated by acidic tumor microenvironment promote the metastasis of hepatocellular carcinoma via osteopontin. **Cancer Letters**, v. 356, n. 2, p. 713–720, 2015.

STAAL, A et al. Distinct conformations of vitamin D receptor/retinoid X receptor-alpha heterodimers are specified by dinucleotide differences in the vitamin D-responsive elements of the osteocalcin and osteopontin genes. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 10, n. 11, p. 1444–56, 1996.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. **Journal of Pathology**, v. 200, p. 448–464, 2003.

SUGATANI, T.; ALVAREZ, U.; HRUSKA, K. A. PTEN Regulates RANKL- and

Osteopontin-stimulated Signal Transduction during Osteoclast Differentiation and Cell Motility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 7, p. 5001–5008, 2003.

TAKAFUJI, V. et al. An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 26, n. 44, p. 6361–71, 2007.

TERAMOTO, H. et al. Autocrine activation of an osteopontin-CD44-Rac pathway enhances invasion and transformation by H-RasV12. **Oncogene**, v. 24, n. 3, p. 489–501, 2005.

TETI, A. et al. Activation of MMP-2 by human GCT23 giant cell tumour cells induced by osteopontin, bone sialoprotein and GRGDSP peptides is RGD and cell shape change dependent. **International Journal of Cancer**, v. 93, n. November 1997, p. 82–93, 1998.

THOMAS, G. R.; NADIMINTI, H.; REGALADO, J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Exp Pathol**, v. 86, n. 6, p. 347–363, 2005.

TURLEAU, C. et al. Two patients with interstitial del (14q), one with features of Holt-Oram syndrome. Exclusion mapping of PI (alpha-1-antitrypsin). **Annales de génétique**, v. 27, n. 4, p. 237–40, 1984.

VAIDYA, V. S.; BONVENTRE, J. V. **Biomarkers: In Medicine, Drug Discovery, and Environmental Health**. 1st Editio ed. [s.l.] Wiley, 2010.

VIERLINGER, K. et al. Identification of SERPINA1 as single marker for papillary thyroid carcinoma through microarray meta analysis and quantification of its discriminatory power in independent validation. **BMC medical genomics**, v. 4, n. 1, p. 30, 2011.

VIGNESWARAN, N.; WILLIAMS, M. D. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 123–141, 2014.

WANG, Y.-D. et al. Correlation between ovarian neoplasm and serum levels of osteopontin: a meta-analysis. **Tumor Biology**, v. 35, n. 12, p. 11799–11808, 2014.

WARNAKULASURIYA, K. A. A. S.; RALHAN, R. Clinical, pathological, cellular and molecular lesions caused by oral smokeless tobacco--a review. **Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 36, n. 2, p. 63–77, 2007.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4–5, p. 309–316, 2009.

WEBER, G. F. et al. Receptor-Ligand Interaction Between CD44 and Osteopontin (Eta-1). **Science**, v. 271, n. 5248, p. 509–512, 1996.

WEBER, G. F. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1552, n. 2, p. 61–85, 2001.

YOKOSAKI, Y. et al. The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition

sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. **J Biol Chem**, v. 274, n. 51, p. 36328–36334, 1999.

YOUNG, M. et al. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). **Genomics**, v. Aug, n. 7(4), p. 491–502, 1990.

ZDUNIAK, K. et al. Nuclear osteopontin-c is a prognostic breast cancer marker. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 4, p. 729–738, 2015.

## 7. ANEXOS



**Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS**  
**CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE**  
**Unimed Vitória**

Vitória, 27 de junho de 2011.  
Projeto No: 318/2011  
Parecer: 21/2011  Inicial  Conclusão

**Título:** Estudo de Câncer de Cabeça e Pescoço no Brasil  
**Instituição:** Hospital Santa Rita de Cássia  
**Pesquisador:** José Roberto V de Podestá  
**Grupo e Área Temática Especial:** IA

**Prezado Pesquisador**

Após o recebimento e apreciação do projeto e das respostas as pendências formuladas, seguem as observações deste Comitê:

1. Adequar os objetivos de acordo com hipóteses formuladas em linha com a justificativa do projeto.  
**Parecer do CEP:** pendência atendida
2. Incluir, na metodologia os critérios de seleção (inclusão e exclusão) amostral assim como características outras que sejam pertinentes. Explicitar, ainda na metodologia, o estudo piloto, e sua metodologia.  
**Parecer do CEP:** Pendência atendida. O estudo piloto não foi contemplado na metodologia, mas é citado na página 17.
3. Justificar ausência do cálculo amostral  
**Parecer do CEP:** Pendência atendida. É citado na página 10 (metodologia) que a amostra será de conveniência.
4. Adequar o TCLE à CNS 347/05 de Janeiro 2005 e incluir campos para identificação de quem aplicou o TCLE. É direito inalienável do sujeito de pesquisa saber ou não querer saber sobre seus resultados de exames realizados em sua propriedade biológica, tenha ou não aplicabilidade clínica. Pode-se, portanto, para rever a informação sobre o tema no TCLE.  
**Parecer do CEP:** pendência atendida. TCLE devidamente adequado e, sob nossa avaliação, dentro dos critérios éticos e alinhados com a resolução 196/1996 e suas complementares.

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CIAS Unimed Vitória  
Av. Lúcio de Silva, 2311, Bairro Santa Vitória (33) CEP: 29047-575 – Fone: 27 3325-0346 E-mail: [cepa@unimedvi.com.br](mailto:cepa@unimedvi.com.br)

Página 7 de 7



Comitê de Ética em Pesquisa - CIAS  
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE  
Unimed Vitória

5. Corrigir o cronograma

**Parecer do CEP:** pendência atendida. Cronograma corrigido.

6. Incluir Declarações de Infraestrutura de todas as instituições hospitalares participantes, inclusive a do Hospital que assina a Folha de Rosto.

**Parecer do CEP:** pendência atendida. Declarações entregues.

7. Informar no dossiê se as amostras biológicas permanecerão identificadas e no país ou se serão exportadas e/ou desvinculadas dos respectivos sujeitos.

**Parecer do CEP:** pendência atendida.

#### CONCLUSÃO

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa acima citado, foi considerado:

### APROVADO

É parecer desse comitê que o referido projeto e demais documentos apresentados, **atende** aos aspectos da Resolução **CNS 196/96** e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Estamos aguardando o parecer final da CONEP.

Foram aprovados os seguintes documentos:

- Projeto de pesquisa versão de 1º de abril de 2011;
- Declaração de infraestrutura versão 27 de abril de 2011;
- Respostas as pendências versão 27 de abril de 2011;

O primeiro relatório de andamento do projeto deverá ser encaminhado a este CEP até o dia 27 de dezembro de 2011.

Atenciosamente,

  
Dr. Álvaro Amador Garvalho de Moraes  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CIAS