**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

VIVIAN REGINA AFFONSO

**Análise dos fatores de risco no
carcinoma espinocelular de
cabeça e pescoço: tabagismo e
HPV**

**Ribeirão Preto
2016**

VIVIAN REGINA AFFONSO

**Análise dos fatores de risco no carcinoma
espinocelular de cabeça e pescoço: tabagismo e HPV**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do título de Doutor
em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Morfofisiologia de
Estruturas Faciais.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas

**Ribeirão Preto
2016**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Affonso, Vivian Regina

Análise dos fatores de risco no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço: tabagismo e HPV. Ribeirão Preto, 2016

89 f.: il.: 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Programa: Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço - Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Orientador: Freitas, Luiz Carlos Conti de

1.Papilomavírus humano; 2.Neoplasias de cabeça e pescoço; 3.Tabagismo; 4.Fatores de Risco; 5.Carcinoma de células escamosas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

AFFONSO, Vivian Regina

Análise dos fatores de risco no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço: tabagismo e HPV

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, Antonio e Marilene, que sempre acreditaram em mim e quem sem eles nada disso seria possível. Obrigada por tudo!

Ao meu amigo e marido, Rafael. Obrigada pela compreensão, carinho e apoio em todos os momentos, principalmente durante a elaboração desse trabalho!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas** pela orientação, atenção e apoio durante o processo de definição deste trabalho, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

Ao **Prof. Dr. Rui Celso Martins Mamede** pela valiosa contribuição na elaboração e na realização deste trabalho, sem a sua ajuda esse trabalho não teria sido concretizado.

A Banca examinadora, **Prof. Dr. Hilton Marcos Alves Ricz, Profa. Dra. Fernanda Maris Peria, Prof. Dr. José Raphael de Moura Campos Montoro, Prof. Dr. David Livingstone Alves Figueiredo**, pelos importantes comentários, sugestões e correções.

Ao **Prof. Dr. José Raphael de Moura Campos Montoro** que nos anos de convivência muito me ensina, contribuindo muito com minha formação intelectual, pelos incentivos e colaborações na elaboração e realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Sílvio Antonio Bertacchi Uvo** pela valiosa importância na minha formação.

Ao **Dr. Luiz Flávio de Azevedo Villela** pelos incentivos e pela colaboração na confecção desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Wilson Araujo da Silva Júnior, à Profa. Dra. Paula Rahal e ao Prof. Dr. Luciano Neder Serafini** pela valiosa

contribuição e apoio técnico para a realização deste trabalho, sem eles esta tese não seria possível.

Ao **Dr. Guilherme de Alencar de Medeiros** pela importância na recuperação das lâminas e dos blocos de parafina e pela ajuda na leitura das lâminas.

À **Ana Júlia Machry** pela importância na ajuda da preparação do material parafinado para extração do DNA.

À **Maria Cecília Onofre** pela paciência e ajuda durante todo o percorrer da pós-graduação.

Ao Projeto GENCAPO, por todo o apoio técnico-científico.

A todos os colegas e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho, o meu reconhecimento e gratidão.

Resumo

AFFONSO, V.R. **Análise dos fatores de risco no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço: tabagismo e HPV.** 89f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Introdução: O câncer de cabeça e pescoço vem aumentando sua incidência, sendo o quinto tipo de câncer mais comum e a sexta causa de morte por câncer no mundo, portanto é causa importante de morbimortalidade da população. O entendimento dos fatores de risco como tabagismo, etilismo e infecção pelo papilomavírus (HPV) é de fundamental importância, tanto para ações de prevenção e controle da doença, bem como avaliação de fatores prognósticos e terapêuticos. **Objetivos:** O presente estudo visa analisar as características clínicas, buscar o principal sítio anatômico tumoral e avaliar os fatores prognósticos entre os pacientes tabagistas ou não, e portadores ou não do HPV, que foram tratados cirurgicamente. **Casuística e Métodos:** Foram analisadas as variáveis clínicas e prognósticas dos grupos de pacientes tabagistas, não tabagistas, HPV negativo e HPV positivo. A amplificação do DNA viral, detecção e genotipagem do HPV se deu através da extração do DNA total a partir de blocos parafinados. **Resultados:** A amostra total foi composta por 399 pacientes, sendo que 266 eram tabagistas, 33 não tabagistas, e desses últimos, cinco eram HPV positivo. Houve diferença estatística em relação sexo, sendo que para o tabagista o predomínio foi do sexo masculino e para o HPV positivo foi o feminino. O paciente tabagista apresentou-se mais jovem (média 57,9 anos) que o não tabagista (média 64,1 anos). O sítio anatômico mais comum para os tabagistas foi a laringe e para o HPV positivo foi a cavidade oral e orofaringe. O tempo livre de doença foi de 63,6 meses para os tabagistas, 31,3 meses para os não tabagistas e 29,3 meses para os HPV positivo, havendo diferença quanto às curvas de sobrevidas livre da doença dos fumantes e não fumantes. Dos pacientes que foram á óbito pela neoplasia, o paciente HPV positivo foi o que apresentou menor tempo de sobrevida. Não houve diferença estatística entre os grupos quanto às curvas de sobrevidas global e da doença. **Discussão:** Apesar da literatura mostrar que o paciente não tabagista e o paciente HPV positivo geralmente serem mais jovens e apresentarem melhor prognóstico do que os típicos pacientes tabagistas, isso não foi observado nesse estudo, pois o paciente não tabagista apresentou-se com mais idade ao diagnóstico da doença e com pior prognóstico que o tabagista, e o paciente HPV positivo apresentou-se com menor tempo até o óbito pela doença quando comparado ao paciente tabagista. **Conclusões:** O câncer nos pacientes tabagistas acometeu mais o sexo masculino, localizou-se principalmente na laringe e apresentou melhor prognóstico quando comparado aos não tabagistas. O câncer nos pacientes HPV positivo acometeu mais o sexo feminino e localização tumoral foi principalmente a cavidade oral e a orofaringe.

Palavras chave: Neoplasias de cabeça e pescoço, papilomavírus humano, carcinoma de células escamosas.

Abstract

AFFONSO, V.R. **Analysis of risk factors in squamous cell carcinoma of head and neck: smoking and HPV.** 89f. Thesis (Doctoral) - Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Introduction: Head and Neck cancer has been increasing its incidence, and it is the fifth most common type of cancer and the sixth leading cause of cancer death in the world, so it is an important cause of morbidity and mortality of the population. Understanding the risk factors such as smoking, alcohol use and papillomaviruses (HPV) infection is of fundamental importance, both for prevention and control of disease like for assessment of prognostic and therapeutic factors. **Objectives:** This study aims to analyze the clinical, seek the main site anatomical of the tumor and evaluate the prognostic factors among smokers or not, with the presence or absence of the HPV, which were surgically treated. **Methods:** The variables clinical and prognostic were analyzed in the groups of smokers, nonsmokers, HPV negative and HPV positive. The amplification of viral DNA, detection and genotyping of the HPV were made through the extraction of total DNA from paraffin blocks. **Results:** The total sample consisted of 399 patients, 266 were smokers, 33 nonsmokers, and this latter group had five patients HPV positive. There was statistical difference regarding sex, for smokers the prevalence was male and for HPV positive was female. The smoker patient was younger (mean 57.9 years) than the non-smoker (mean 64.1 years). The most common anatomic site for the smokers was the larynx and for the HPV positive was the oral cavity and oropharynx. The disease-free interval was 63.6 months for smokers, 31.3 months for nonsmokers and 29.3 months for HPV positive, with difference between free disease survival curves of the smokers and nonsmokers. Of the patients who died by disease, HPV positive patient showed the shorter survival. There was no statistical difference between the groups in terms of overall survival curves and of the disease. **Discussion:** Although the literature show that the nonsmoker patient and HPV positive patients are generally younger and present a better prognosis than the typical smokers, this was not observed in this study because the nonsmoker patient presented with more age at diagnosis of disease and a worse prognosis than the smoker, and the HPV positive patient presented with shorter survival of the disease when compared to smoking patients. **Conclusions:** The cancer in smokers affected more males, was located mainly in the larynx and showed better prognosis when compared to nonsmokers. The cancer in patients positive HPV affected more females and tumor location was mainly oral cavity and oropharynx.

Keywords: head and neck neoplasms, human papillomavirus, squamous cell carcinoma.

Lista de Figuras

Figura 1. Estimativa do número de novos casos de câncer, excluindo o de pele não melanoma para o mundo, em 2020.....	22
Figura 2. Estimativa do número de novos casos de câncer, excluindo o de pele não melanoma para o Brasil, em 2020.....	22
Figura 3. Estimativa do número de novos casos de câncer em cavidade oral, faringe e laringe para o mundo, em 2020.....	23
Figura 4. Estimativa do número de novos casos de câncer em cavidade oral, faringe e laringe para o Brasil, em 2020.....	23
Figura 5. Estimativas de Kaplan-Meier para tempo livre de doença, em todos os grupos.....	56
Figura 6. Estimativas de Kaplan-Meier para tempo livre de doença em indivíduos com estadiamento avançado, em todos os grupos.....	57
Figura 7. Estimativas de Kaplan-Meier para tempo livre de doença em indivíduos com estadiamento inicial, em todos os grupos.....	58
Figura 8. Estimativas de Kaplan-Meier para tempo livre de doença em indivíduos com localização tumoral em cavidade oral, orofaringe e hipofaringe, em todos os grupos.....	59
Figura 9. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida global, em todos os grupos.....	60
Figura 10. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida global com estadiamento avançado, em todos os grupos.....	61
Figura 11. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida global com estadiamento inicial, em todos os grupos.....	61
Figura 12. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida global em indivíduos com localização tumoral em cavidade oral, orofaringe e hipofaringe, em todos os grupos.....	62
Figura 13. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida específica da doença, em todos os grupos.....	63
Figura 14. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida específica da doença com estadiamento avançado, em todos os grupos.....	64
Figura 15. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida específica da doença com estadiamento inicial, em todos os grupos.....	64

Figura 16. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida específica da doença em indivíduos com localização tumoral em cavidade oral, orofaringe e hipofaringe, em todos os grupos.....	65
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estadiamento TNM – UICC.....	25
Tabela 2. Descrição do número de indivíduos (N), média, mediana e desvio padrão (mínimo e máximo) das variáveis numéricas idade, tempo de recidiva e óbito, para a amostra total.....	41
Tabela 3. Frequência das variáveis clínicas da amostra total (n= 399) e dos grupos de tabagistas (n= 366) e de não tabagistas (n=33)	42
Tabela 4. Comparação das variáveis clínicas entre os grupos de tabagistas (n=366) e não tabagistas (n=33), seguido do teste de Qui-quadrado e exato de Fisher para independência.....	44
Tabela 5. Comparação das variáveis clínicas entre os grupos de pacientes não tabagistas HPV positivo (n=5) e HPV negativo (n=28), seguido do teste exato de Fisher para independência.....	46
Tabela 6. Descrição dentre os subtipos de HPV quanto à média e ao desvio padrão (mínimo e máximo) para idade, em anos, seguido do teste de Wilcoxon para amostras independentes.....	47
Tabela 7. Comparação das variáveis clínicas entre os grupos de tabagista (n=366) e não tabagista HPV positivo (n=5), seguido do teste exato de Fisher para independência.....	48
Tabela 8. Comparação das variáveis clínicas entre os grupos de tabagista (n=366) e não tabagista HPV negativo (n=28), seguido do teste de Qui-quadrado e exato de Fisher para independência.....	49
Tabela 9. Descrição dos valores extremos, mediana, média e o desvio padrão para a idade, em anos, tempo de recidiva, em meses, tempo de óbito geral (óbito por qualquer causa), em meses e tempo de óbito pela neoplasia, em meses, obtidos a partir da análise de prontuários médicos para o grupo de tabagistas (n=366), não tabagistas (n=33), HPV positivo (n=5) e HPV negativo (n=28), seguido do p-valor, utilizando-se do teste de Mann-Whitney para comparação entre as amostras.....	51
Tabela 10. Análise das variáveis indicadoras de recidiva, óbito geral, óbito pela neoplasia e estadiamento, para a amostra total (n=399), não tabagista (n=33), tabagista (n=366), HPV positivo (n=5) e HPV negativo (n=28), considerando a realização da radioterapia, seguido do teste de Qui-quadrado para independência.....	53

Tabela 11. Descrição dos valores extremos, mediana, média e o desvio padrão para o tempo de recidiva, em meses, tempo de óbito geral (óbito por qualquer causa), em meses e tempo de óbito pela neoplasia, em meses, obtidos a partir da análise de prontuários médicos para o grupo de tabagistas (n=366), não tabagistas (n=33), HPV positivo (n=5) e HPV negativo (n=28), considerando o tratamento radioterápico, seguido do p-valor, utilizando-se do teste de Mann-Whitney para comparação entre as amostras.....	54
Tabela 12. Tempo médio livre de doença, em meses, para os grupos tabagistas (n=366), não tabagistas (n=33), HPV positivo (n=5) e HPV negativo (n=28)	55
Tabela 13. Tempo médio de sobrevida global, em meses, para os grupos tabagistas (n=366), não tabagistas (n=33), HPV positivo (n=5) e HPV negativo (n=28)	60
Tabela 14. Tempo médio de sobrevida específica da doença, em meses, para os grupos tabagistas (n=366), não tabagistas (n=33), HPV positivo (n=5) e HPV negativo (n=28)	63

Lista de Abreviaturas

Lista de Abreviaturas

CCP	Câncer de cabeça e pescoço
CECCP	Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotídeo
FFPE	Formalin-fixed and paraffin-embedded
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
GSTP	Glutathionas-S-transferases
HCRP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HIS	Hibridização in situ
HPV	Papilomavírus Humano
H&E	Hematoxilina e eosina
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pRb	Proteína do retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucléico
UICC	International Union Against Cancer
UNESP	Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Epidemiologia do câncer.....	21
1.2. O câncer de cabeça e pescoço.....	23
1.3. Fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço.....	26
1.4. Papilomavírus humano.....	27
1.5. Papilomavírus humano e câncer de cabeça e pescoço.....	29
1.6. Justificativa.....	30
2. OBJETIVOS.....	31
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	33
3.1. Tipo de estudo.....	34
3.2. Casuística.....	34
3.2.1. Critérios de inclusão.....	34
3.2.2. Critérios de exclusão.....	34
3.2.3. Caracterização da amostra.....	35
3.3. Estudo histopatológico.....	36
3.4. Extração do DNA total.....	36
3.5. Amplificação do DNA viral e genotipagem do HPV.....	37
3.6. Análise estatística.....	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Análise das variáveis clínicas.....	43
4.2. Comportamento e evolução da doença.....	49
4.3. Análise das variáveis prognósticas.....	54
4.3.1. Tempo livre de doença.....	55
4.3.2. Sobrevida global.....	59
4.3.3. Sobrevida específica da doença.....	62
5. DISCUSSÃO.....	66
6. CONCLUSÕES.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
8. ANEXOS.....	86

1. Introdução

As neoplasias malignas de cabeça e pescoço, incluindo as localizadas em cavidade oral, faringe e laringe, apresentam como principais fatores de risco, o tabaco e o álcool, e apesar do álcool poder não apresentar efeito independente sobre o risco desses tumores, os dois juntos possuem efeito multiplicativo (SARTOR et al., 2007; RADOI et al., 2015; LEE; HASHIBE, 2014). O modelo de um homem idoso, tabagista e etilista com câncer de boca e orofaringe tem mudado devido à provável associação dessas neoplasias com outros fatores de risco, como o papilomavirus humano (HPV). O paciente com câncer de cabeça e pescoço (CCP) tem se apresentado mais jovem e sem história de tabagismo e etilismo (MATOS; MIRANDA; CERNEA, 2015; KHOT; DESHMANE; CHOUDHARI, 2016).

1.1. Epidemiologia do câncer

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o câncer é um problema de saúde pública, estimando-se para o ano 2030 a incidência de 27 milhões de casos, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas com câncer, ocorrendo o efeito desse aumento principalmente em países de baixa e média rendas. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2015), nas próximas décadas o impacto do câncer na população corresponderá a mais de 20 milhões de casos novos. E segundo a International Agency for Research on Cancer (IARC), em 2020 a incidência mundial de câncer, excluindo o de pele não melanoma, será de aproximadamente 17 milhões (Figura 1), e no Brasil será de aproximadamente 550 mil casos novos (Figura 2).

Figura 1. Estimativa do número de novos casos de câncer, excluindo o de pele não melanoma para o mundo, em 2020 (Fonte: IARC, 2012)

Figura 2. Estimativa do número de novos casos de câncer, excluindo o de pele não melanoma para o Brasil, em 2020 (Fonte: IARC, 2012)

O câncer de cabeça e pescoço é um termo coletivo definido por bases anatomotopográficas, incluindo os tumores malignos do trato aéreo digestivo superior, como a cavidade oral, a faringe e a laringe (DOBROSSY, 2005). Esse câncer tem sua incidência em ascensão, sendo o quinto tipo de câncer mais comum em todo o mundo (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015) e a sexta causa de morte por câncer no mundo (CAMPANA; GOIATO, 2013), sendo diagnosticados 600 mil novos casos por ano, acometendo principalmente o sexo masculino (JEMAL et al., 2011). Em relação ao CCP com localização em cavidade oral, faringe e laringe a incidência mundial será de aproximadamente

830 mil em 2020 (Figura 3), e no Brasil será de aproximadamente 30 mil (Figura 4).

Figura 3. Estimativa do número de novos casos de câncer em cavidade oral, faringe e laringe para o mundo, em 2020 (Fonte: IARC, 2012)

Figura 4. Estimativa do número de novos casos de câncer em cavidade oral, faringe e laringe para o Brasil, em 2020 (Fonte: IARC, 2012)

1.2. O câncer de cabeça e pescoço

Em cabeça e pescoço, 80% dos tumores são de origem epitelial da via aérea digestiva superior, e o carcinoma de células escamosas é o mais frequente, ocorrendo em 95% dos casos dos tumores dessa região. Ele pode originar-se em qualquer sítio da via aérea superior, desenvolvendo-se desde a

cavidade oral (língua, assoalho de boca, gengiva, mucosa bucal, área retromolar e palato duro), orofaringe (amígdalas, base da língua, palato mole, úvula), laringe, hipofaringe, até o esôfago superior (INCA, 2011; SOUZA; GONÇALVES, 2009), e sua incidência tem aumentado nas últimas três décadas, principalmente na Europa, centro-sul da Ásia e Austrália (MANNARINI et al., 2009; RINGSTRON et al., 2002). Cerca de 40% das neoplasias malignas de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral, 25% na laringe, 15% na faringe e o restante nos demais sítios remanescentes (RUIZ et al., 2006, ALVARENGA et al., 2008; COLOMBO; RAHAL, 2009).

O CCP é mais prevalente no sexo masculino e em pacientes com idade superior a 40 anos, associando-se principalmente com o consumo de tabaco e álcool. O prognóstico dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço está diretamente relacionado à área comprometida pela neoplasia e ao estadiamento tumoral (SOMMERFELD et al., 2012).

A fim de se obter informações à respeito do prognóstico da doença e, consequentemente, realizar o planejamento terapêutico, utiliza-se o estadiamento da neoplasia. O sistema de estadiamento mais utilizado para o CCP é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, no qual T corresponde a extensão anatômica da doença, considerando as características do tumor primário, N corresponde às características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza e M relaciona-se com a presença ou ausência de metástases à distância, recebendo as graduações T0 a T4, N0 a N3 e M0 a M1. E ainda, as categorias T, N e M são agrupadas em combinações distribuindo-se em estádios, que variam de I a IV (INCA, 2011) (Tabela 1).

Tabela 1. Estadiamento TNM – UICC

Estádio	Tumor	Linfonodo	Metástase
I	T1	N0	
II	T1	N1	
	T2	N0, N1	
III	T1, T2	N2	
	T3	N0, N1, N2	
IV	IV A T4	N0, N1, N2	
	IV B Qualquer T	N3	
	IV C Qualquer T	Qualquer N	M1

O comprometimento linfonodal, ou seja, a metástase cervical é o fator mais importante para o prognóstico do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECCP), sendo capaz de reduzir em 50% a sobrevida dos pacientes (MONTORO et al., 2008; SHAH; CANDELA; PODDAR, 1990). E ainda, o estadio da doença também afeta a sobrevida em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, sendo que os pacientes com estadios iniciais (I ou II) têm um índice de sobrevida livre de doença em cinco anos que varia de 70 a 90%, e naqueles com estadios mais avançados (III e IV) os índices variam de 15 a 67% (MARUR; FORASTIERE, 2008). As recidivas em carcinomas epidermóides de boca e orofaringe são mais frequentes em pacientes com doença em estadio avançado, e impactam de maneira negativa a sobrevida (AGRA, 2007).

Os tratamentos para os tumores em estadio inicial são a cirurgia ou a radioterapia. A terapêutica adotada para os tumores avançados é a ressecção cirúrgica tumoral e radioterapia adjuvante, com ou sem quimioterapia. Entretanto, apesar do tratamento agressivo da terapia combinada, estima-se que 20 - 36% dos pacientes sofrerão recidiva dentro de três a cinco anos, e ainda,

aproximadamente metade dos pacientes morrerão da doença (SAHU; GRANDIS, 2011; KEARNEY et al, 2011). Dessa forma, o prognóstico de tumores de cabeça e pescoço permanece ruim, e o tratamento agressivo impacta a qualidade de vida do paciente.

1.3. Fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço

Os fatores de risco estão associados ao aumento da probabilidade de se desenvolver uma doença, e podem ser ambientais ou hereditários. Os fatores ambientais estão associados a 80% - 90% de todos os casos de câncer, relacionados, por exemplo, com cigarro, uso de bebidas alcoólicas, irradiação e infecção por alguns vírus. Em relação aos fatores hereditários, é raro o câncer causado exclusivamente pelo fator genético, estando na maioria das vezes associados aos fatores externos. O envelhecimento do ser humano também aumenta a suscetibilidade celular à transformação maligna, possibilitando a formação de células cancerígenas (INCA, 2011; LEWIS et al., 2015; LEE; HASHIBE, 2014).

Com o CCP não é diferente, ele também recebe influências ambientais. As neoplasias malignas com essa localização podem estar relacionadas com hábitos pessoais, atividades profissionais e nutrição (ALVARENGA et al., 2008). Os principais fatores de risco para esses tumores são o consumo de álcool e de tabaco, responsáveis por aproximadamente 80% do câncer de cavidade oral, orofaringe e laringe. Estudos mostram sinergismo entre o consumo do tabaco e da bebida alcoólica, aumentando o risco de carcinoma de cabeça e pescoço (FERREIRA ANTUNES et al., 2013, MAASLAND et al., 2014; BISHT; BIST, 2011).

Os agentes mutagênicos e carcinogênicos do cigarro são a nicotina, o alcatrão, a amônia, o monóxido de carbono, o dióxido de carbono, o formaldeído, a acroleína, a acetona, os benzopirenos, a hidroxiquinona, o óxido de azoto e o cádmio. Essas substâncias podem afetar a resposta imune inata. O consumo de álcool também pode contribuir para a carcinogênese e pode causar supressão da resposta imune. O etanol, principal constituinte das bebidas alcoólicas, é oxidado em acetaldeído. O acetaldeído apresenta ação cancerígena

e mutagênica, comprovado em modelos animais. (KUMAR et al., 2015)

Outros fatores são dieta pobre em fibras e vitaminas (na forma de frutas e vegetais frescos), má higiene oral, irritação crônica traumática da mucosa bucal, desnutrição, imunossupressão, predisposição e suscetibilidade genética, poluição ambiental, infecção pelo Epstein Barr e recentemente vem sendo citada a infecção pelo HPV, principalmente pelos subtipos 16 e 18 (COLOMBO; RAHAL, 2009; CHEN et al., 2008; MAMEDE, 2006; GALBIATTI et al., 2013).

Há aproximadamente 35 anos, foi identificada a relação do HPV com o câncer de colo uterino, cuja relação está hoje bem estabelecida e, muito provavelmente, essa relação deva estar presente também com o carcinoma de células escamosas de outros sítios do corpo humano, incluindo a região de cabeça e pescoço (LOHAVANICHBUTR et al., 2008).

O fator de risco do HPV para o CECCP, principalmente de orofaringe e cavidade oral, foi descrito primeiramente por Syrjänen et al. (1983), que associou a neoplasia com pacientes mais jovens (idade menor que 50 anos). Essa associação entre o HPV e o CECCP foi reconhecida pela IARC, em 2007. Os tumores com a presença do HPV geralmente tem bom prognóstico e sua transmissão mostra relação com o comportamento sexual oral. (KUMAR et al., 2015; DALIANIS, 2014; ALVARENGA et al., 2008).

1.4. Papilomavírus humano

O HPV pertence à família *Papillomaviridae*, são vírus de ácido desoxirribonucleico (DNA), com um tropismo específico para epitélio escamoso e replicam seus genomas dentro do núcleo das células do hospedeiro. Possui pelo menos seis genes com expressão precoce (E-early) e dois com expressão tardia (L-late). Logo após a infecção, há a expressão da região E, que codifica as proteínas envolvidas na regulação da síntese de DNA sendo formada pelos genes E1 (replicação viral), E2 (transcrição e replicação), E4 (maturação viral e alteração da matriz intracelular), E5, E6 e E7 (transformação celular). A região L

se expressa em estágios posteriores da infecção, codificando as proteínas do capsídio icosaédrico viral, sendo formada pelos genes L1 e L2. A proteína L1 é expressa após a L2 no ciclo de replicação viral e medeia a montagem dos vírions (partículas virais completas) do HPV. O papilomavírus é classificado em baixo risco e em alto risco, de acordo com as variações genotípicas da sequência de base do DNA do E6 e E7. Os de baixo risco incluem HPV 6,11,42,43,44 e os de alto risco abrangem HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58,16 e 18. O potencial oncogênico do HPV de alto risco é atribuído à sua habilidade de inserir fragmentos específicos de DNA (genes E6 e E7) dentro do genoma celular, integrando-se ao genoma do hospedeiro. Como resultado dessa integração, diversas funções dos genes supressores tumoral (p53 e pRb - proteína do retinoblastoma) são alteradas. Os produtos dos genes E6 e E7 se ligam e degradam o p53, comprometendo a integridade do DNA replicado, causando instabilidade cromossomal, immortalização e proliferação anormal das células transformadas, favorecendo o desenvolvimento do tumor. A proteína E7 inibe a atividade do pRB, e essa inativação do pRB aumenta a proliferação celular e resulta na liberação do fator de transcrição E2F, resultando no aumento da expressão da proteína p16, sendo considerada um marcador para infecção do HPV de alto risco. (FERRARO et al., 2011; JI et al., 2008; TERMINE et al., 2008; MANNARINE et al., 2009; SAHEB JAMEE et al., 2009; WESTRA, 2009; CAMPISI; GIOVANNELLI, 2009; HÜBBERS; AKGÜL, 2015; FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012).

Mais de 200 tipos de HPV já foram identificados, porém nem todos estão relacionados com o câncer. De acordo com International Human Papillomavirus Reference Center (2016), foram identificados 210 tipos de HPV até o ano de 2016. Esse vírus pode ser encontrado no trato anogenital, uretra, pele, laringe, mucosa traqueobrônquica, cavidade nasal, seio paranasal e cavidade oral. Possui a capacidade de infectar tanto as mucosas como os tecidos cutâneos e infectam preferencialmente células epiteliais escamosas. Todos os tipos desse vírus podem causar doença, mas os de alto risco estão associados com doença maligna, principalmente os subtipos 16 e 18, sendo que o subtipo 16 é o mais encontrado nos tumores de cabeça e pescoço (CASTRO;

BUSSOLOTI, 2006; RINGSTRON et al., 2002, ALVARENGA et al., 2008; MICHL et al., 2010; MATOS; MIRANDA; CERNEA, 2015, KHOT; DESHMANE; CHOUDHARI, 2016).

Para o diagnóstico do HPV podem ser utilizadas as técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e de Hibridização in situ (HIS). A HIS fornece evidência de genomas virais através do ácido ribonucleico (RNA) ou DNA, presentes nos núcleos dos tumores e apresenta boa especificidade, apesar de ser menos sensível que a PCR, e ainda, esse método não faz distinção entre genomas integrados e não integrados (LARSEN et al., 2014). A PCR foi descrita por Saiki et al. (1985) e possui alta especificidade e aplicabilidade, sendo capaz de amplificar cópias de DNA ou de RNA, esse último a partir do DNA complementar. Com o advento da PCR e com o avanço nos métodos de extração e purificação do DNA se fez possível a extração do DNA a partir de material parafinado. (MESQUITA et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2003).

1.5. Papilomavírus humano e câncer de cabeça e pescoço

O Papilomavírus humano infecta a pele e as mucosas, podendo induzir a formação de tumores epiteliais benignos e malignos. A infecção se inicia quando o vírus penetra no novo hospedeiro, através de microtraumatismos. A progressão da fase de incubação para a de expressão ativa depende de três fatores: permissividade celular, tipo de vírus e estado imunológico do hospedeiro (AGRAWAL et al., 2008).

Os fatores de risco tradicionais para o CECCP tem sido superados por outros fatores relacionados com o comportamento sexual, história de sexo oral-genital e oral-anal, sendo um importante transmissor de HPV para a cavidade oral (MOORE; MEHTA, 2015), e as condições que alteram a imunidade antitumoral são importantes na transformação maligna de uma infecção oral por HPV (MICHL et al., 2010).

O carcinoma de orofaringe HPV positivo apresenta características distintas, ou seja, esses tumores podem ser não queratinizados, apresentar pouca diferenciação e ter um padrão morfológico basalóide. Microscopicamente as células neoplásicas são geralmente monomórficas, ovais ou fusiformes, com

núcleo basofílico hipercromático, com citoplasma escasso e bordas celulares mal definidas. O tumor com a presença desse vírus pode ser distinguido do tumor HPV negativo através de características moleculares, como alterações na expressão de genes, mutações, amplificações e deleções, e ainda, o tumor com esse vírus pode apresentar a expressão da proteína p16, que pode desempenhar papel na resposta imune. Esses tumores podem apresentar maior agressividade e melhor resposta ao tratamento, podendo ser mais sensível à radioterapia (EL-MOFTY, 2007; SAINI et al., 2009; MOORE; MEHTA, 2015; GALBIATTI et al., 2013; LARSEN et al., 2014; PARFENOF et al., 2014; TRIBIUS; HOFFMANN, 2013).

A sobrevida em cinco anos para o carcinoma orofaríngeo HPV positivo é estimada em 79 - 82%, enquanto que para os tumores HPV negativo o índice de sobrevida é de 46%, assim, o prognóstico desse câncer HPV positivo tem se mostrado favorável (HARRIS et al, 2011). Apesar dessa associação prognóstica do câncer de orofaringe HPV positivo, a relação do prognóstico entre os demais CECCP e a infecção pelo HPV não mostram relação (RAGIN; TAIOLI, 2007; KRUGER et al., 2014).

1.6. Justificativa

Esse estudo busca mostrar as relações entre os indivíduos portadores de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço que tem o hábito de fumar ou não. E ainda, busca analisar a presença da infecção pelo HPV em pacientes que não tem o hábito de fumar. O tabaco, o álcool e o HPV são fatores de risco importantes associados a esse tipo de neoplasia, e que podem exercer sinergismos entre eles, resultando em mudanças na terapêutica e em diferentes prognósticos. Assim, há a importância do conhecimento dos fatores de risco, com o monitoramento da morbimortalidade desses tumores, e consequente estabelecimento de ações de prevenção e controle da doença. A terapêutica da neoplasia causada por tal vírus pode ser modificada, visto que esses tumores são menos diferenciados, quando comparados aos tumores associados a outros fatores, como o tabaco e o álcool.

2. Objetivos

Dentre os portadores de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, submetidos ao tratamento cirúrgico, estudar o comportamento da doença, de modo a:

1. Analisar as características clínicas como idade, sexo e localização tumoral nos pacientes tabagistas e não tabagistas.
2. Analisar as características prognósticas, como tempo livre da doença, sobrevida global e sobrevida específica da doença, comparando os pacientes tabagistas e os não tabagistas.
3. Relacionar o prognóstico com o tratamento cirúrgico combinado à radioterapia.
4. Dentre os pacientes não fumantes buscar a presença do HPV, determinando a área anatômica mais acometida pelo tumor associado a esse vírus, bem como analisar as características clínicas e prognósticas desse grupo.

3. Casuística e Métodos

3.1. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional, longitudinal e quantitativo. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), processo HCRP nº 5724/2011 (ANEXO1).

3.2. Casuística

Foram analisados os tumores de pacientes submetidos à cirurgia no período de janeiro de 2002 a janeiro de 2010, no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMRP-USP, e esses pacientes autorizaram (sob consentimento livre e esclarecido) o armazenamento de fragmentos tumorais no "Banco de Amostras da Cirurgia de Cabeça e Pescoço" do projeto Genoma Clínico (Gencapo) (ANEXO 2). Os dados clínicos e prognósticos da amostra foram obtidos através da revisão dos prontuários médicos e através das informações armazenadas no banco de dados do projeto Gencapo, financiado pela FAPESP e pelo Ludwig Institute for Cancer Research (NY) - <http://www.genomaclinico.fsp.usp.br/>. Todos pacientes apresentavam diagnóstico de carcinoma espinocelular de laringe (incluindo supraglote, glote e subglote), faringe (orofaringe e hipofaringe) ou cavidade oral (língua, assoalho de boca, gengiva, mucosa bucal, área retromolar e palato duro) e foram submetidos a tratamento cirúrgico com intuito curativo.

3.2.1. Critérios de inclusão

- ✓ Localização tumoral em cavidade oral, faringe e laringe;
- ✓ Diagnóstico histopatológico de carcinoma espinocelular;
- ✓ Consentimento do paciente em participar do estudo (mediante a assinatura do Termo de Consentimento).

3.2.2. Critérios de exclusão

- ✓ Perda do seguimento clínico;
- ✓ Ausência de precisão quanto à localização tumoral;

- ✓ Dados clínicos indisponíveis ou incompletos (descrição do tabagismo, estadiamento, recidiva, óbito);
- ✓ Material histológico não representativo e/ou insuficiente.

3.2.3. Caracterização da amostra

De acordo com os critérios de seleção da amostra, foram incluídos neste estudo 399 pacientes com diagnóstico de CECCP, após a análise de 452 registros. Os pacientes foram divididos em indivíduos que eram fumantes (tabagistas) e em indivíduos que nunca fumaram ou que cessaram o hábito de fumar há mais de 10 anos (não tabagistas). Os pacientes que não fumavam foram classificados em HPV positivo e HPV negativo, de acordo com o acometimento ou não pelo papilomavírus humano. Os indivíduos que cessaram o tabagismo há mais de 10 anos foram considerados não fumantes, pois estudos mostram que o fator de risco do tabaco diminui consideravelmente após 10 anos de cessado (BLOT et al., 1988; LA VECHIA et al., 1991).

Grupo tabagista $\longleftrightarrow$ Amostra total $\rightleftharpoons$ Grupo não tabagista $\left\{ \begin{array}{l} \text{HPV positivo} \\ \text{HPV negativo} \end{array} \right.$

As características clínicas dos grupos foram analisadas pelas variáveis amostrais sexo, raça, idade, sítio anatômico, presença de acometimento linfonodal regional, estadiamento da doença, realização de radioterapia, presença de recidiva tumoral e o óbito geral e pela neoplasia.

As características prognósticas foram analisadas pelas curvas de sobrevida referente ao tempo livre da doença, sendo o período logo após o tratamento (cirurgia com a realização ou não de radioterapia) até a reincidência da doença; à sobrevida global, sendo o período logo após o tratamento da doença até o óbito por qualquer causa; e à sobrevida específica da doença, sendo o período após o tratamento da doença até o óbito causado pela neoplasia (MAROTTI, 2007).

3.3. Estudo histopatológico

A partir dos blocos parafinados foram obtidos fragmentos, que foram submetidos aos cortes histológicos com a espessura de 5 μ m e, posteriormente, foram corados com hematoxilina e eosina (H&E). Então, esses cortes foram avaliados para verificar se havia área representativa da neoplasia. Os casos foram revistos em conjunto por dois patologistas cirúrgicos com experiência na área, sem o conhecimento da identificação do paciente e do respectivo laudo anatomopatológico. A seguir, foram escolhidos os blocos com as áreas mais representativas da neoplasia.

Os estudos histopatológicos foram realizados no Laboratório de Neuropatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

3.4. Extração de DNA total

Inicialmente as amostras foram desparafinadas, sendo submetidas à quatro lavagens com xilol, seguidas por duas lavagens com etanol 100%.

Em seguida, a extração de DNA total foi realizada utilizando-se *Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit*, que é utilizado para a purificação do DNA a partir de amostras fixadas em formalina e embebidos em parafina (FFPE) com cortes de 5 μ m. O DNA purificado é adequado para aplicações de amplificações, incluindo o PCR.

Para maximizar a quantidade de DNA purificado a partir de tecidos FFPE, utilizou-se a proteinase K e, dessa forma, preparou-se o tampão de digestão de proteinase K, adicionando-se 500 μ l de água nuclease-free a cada tubo de proteinase K liofilizada e agitou-se suavemente para sua dissolução. A concentração final de proteinase K foi de 20 mg/ml.

A seguir o tecido de FFPE foi colocado em um microtubo e centrifugado. Acrescentou-se 20 μ L de solução de Proteinase K e 180 μ l de tampão de incubação, fechou-se o tubo e incubou-se a amostra a 70° C durante uma noite. Então, foi realizada a extração do DNA utilizando o *Instrumento LEV Maxwell® 16*.

A desparafinização das amostras e a extração do DNA foram realizadas no Centro de Medicina Genômica do HCFMRP-USP, no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática.

3.5. Amplificação do DNA viral e detecção e genotipagem de HPV

O DNA extraído foi submetido à reação em cadeia de polimerase utilizando-se os primers endógenos GSTP1 e GSTP2 (Glutathionas-S-transferases). A PCR foi realizada com solução tampão (Buffer 10X), MgCl₂ (25mM), DMSO, dNTP (2mM), 2,5l de primers GSTP1/GSTP2 (10mM), 1,0 l (1U) de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 1,0 l de DNA diluído (100ng/l) e água Mili-Q q.s.p. 30 µL de volume final de reação. As condições de ciclagem foram: 1 ciclo de 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, finalizando com 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e observados sob luz ultravioleta.

As amostras que amplificaram o fragmento do gene foram submetidas a PCR para a detecção de DNA viral. Para essa amplificação foi utilizado o conjunto de primers MY09: 5'CGTCCMAARGGAWACTGATC3' e MY11: 5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG3', que amplifica especificamente um fragmento do gene L1 de HPV, gerando um fragmento de aproximadamente 450pb. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL, sendo composta por Buffer (10X), MgCl₂ (25mM), 1,5 µL de primers PGMY09/11 (25mM), dNTP (2mM), 0,5 µL (1U) de Taq DNA Polymerase, 1,0 µL de DNA diluído (100ng/l) e água Mili-Q q.s.p. 25 µL de volume final de reação. O perfil de termociclagem consistiu em uma incubação inicial de 95°C por 9 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizando 1 ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras amplificadas foram colocadas em 2 µL de Loading Buffer contendo ficoll 15%, aplicadas em gel de agarose 1% e observadas sob luz ultravioleta.

As amostras que não amplificaram o fragmento de 450pb referente a um fragmento do gene L1 do vírus de HPV, foram submetidas a uma PCR com

o conjunto de primers genéricos GP5+ (5' TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC) e GP6+ (5' GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C). A reação de amplificação foi composta por solução tampão (buffer 10X), MgCl₂ (25mM), dNTP (2mM), 1,2 µL de primersGP5/GP6 (10Mm), 0,5 µL (1U) de Taq Dna Polymerase, 1,0 µL de DNA diluído (100ng/l) e água Mili-Q q.s.p. completando 21 µL de volume final de reação. As condições de ciclagem foram: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 45 segundos, 45°C por 30 segundos, 72°C por 90 segundos, finalizando com 72°C por 8 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.

Para a genotipagem foi utilizado o teste de genotipagem *Linear Array HPV (Genotyping Test, Roche Molecular Diagnostics, Alameda, CA)* que foi realizada por metodologia de hibridização reversa: o produto da PCR foi desnaturado com uma solução de NaOH a 1,6%. Após a desnaturação, o material foi aplicado em uma tira de nylon contendo sondas imobilizadas para duas concentrações diferentes de β -globina, 18 genótipos de HPV de alto risco oncogênico (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82 e 83) e 9 tipos de HPV de baixo risco oncogênico (6, 11, 40, 42, 53, 54, 57, 66 e 84). A presença de híbridos na tira foi visualizada por um sistema de precipitação de cor nas linhas contendo sondas específicas para os diferentes genótipos do HPV, após a adição de um conjugado de estreptavidina-peroxidase e o respectivo substrato.

Esses procedimentos foram realizados no departamento de biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de São José do Rio Preto.

3.6. Análise estatística

Foram utilizados os testes exato de Fisher, Qui-quadrado, Mann-Whitney, Log-rank e a análise da curva de Sobrevida de Kaplan-Meier. Para a análise estatística utilizou-se o programa SAS versão 9 (SAS Institute Inc.) (LEHMANN, 1975; COLOSISMO, 2006).

A análise das características clínicas de todos os grupos (amostra total, tabagista, não tabagista, HPV positivo e HPV negativo) foi realizada pelo

teste exato de Fisher e pelo teste Qui-quadrado. As variáveis quantitativas (idade, tempo até a recidiva e tempo até o óbito) foram analisadas pelo teste de Man-Whitney.

A sobrevida referente ao tempo livre de doença, a sobrevida global e a sobrevida específica da doença foram calculadas considerando os tempos médios e os intervalos de confiança até a ocorrência do evento (recidiva, óbito geral e óbito por neoplasia), utilizando-se a análise de Kaplan-Meier com Log-rank, afim de determinar a significância estatística.

Todos os testes de hipóteses desenvolvidos nesse trabalho consideraram uma significância de 5%, isto é, a hipótese nula foi rejeitada quando p -valor foi menor ou igual a 0,05.

4. Resultados

Do total de 399 pacientes com CECCP, 349 (87%) eram homens e 50 (13%) mulheres, com idade média de 58,4 anos (mínimo de 27 anos e máximo de 87 anos), 346 eram da raça branca, em 175 (44%) a localização tumoral foi a laringe, 140 (35%) a cavidade oral, 50 (13%) a hipofaringe e 34 (9%) a orofaringe. Em relação ao estadiamento patológico, 264 (66%) apresentaram estadiamento avançado (III e IV) e 135 (34%) estadiamento inicial (I e II). Quanto à presença de metástases linfonodal regional, 208 (52%) não apresentaram metástases (N0) e 191 (48%) apresentaram metástases (N1, N2, N3). Do total, 221 (55%) foram submetidos à radioterapia. Quanto à recidiva tumoral e ao óbito, 168 (42%) apresentaram recidiva tumoral, 176 (44%) foram à óbito e 153 (38%) foram à óbito pela neoplasia, sendo que o tempo médio para recidiva (somente para quem teve recidiva) foi de 17,3 meses e o tempo médio para óbito geral (somente para quem foi a óbito) foi de 18,3 meses (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Descrição do número de indivíduos (N), média, mediana e desvio padrão (mínimo e máximo) das variáveis numéricas idade, tempo de recidiva e óbito, para a amostra total

Variável	N	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	399	58.4	58	10.7	27	87
Recidiva (meses)	168	17.3	11	16.8	1	96
Óbito geral (meses)	176	18.3	12.5	18.1	0.1	98

Tabela 3: Frequência das variáveis clínicas da amostra total (n= 399) e dos grupos de tabagistas (n= 366) e de não tabagistas (n=33)

Variável	Categoria	Amostra Total		Tabagista		Não tabagista	
		N	%	N	%	N	%
Sexo	Feminino	50	13	35	10	15	45
	Masculino	349	87	331	90	18	55
Raça	Amarela	1	0	0	0	1	3
	Branca	346	87	316	86	30	91
	Negra	14	4	13	4	1	3
	Parda	38	10	37	10	1	3
Localização	Cav. oral	140	35	120	33	20	61
	Hipofaringe	50	13	47	13	3	9
	Laringe	175	44	169	46	6	18
	Orofaringe	34	9	30	8	4	12
Tumor (T)	T1	64	16	61	17	3	9
	T2	155	39	141	39	14	42
	T3	73	18	67	18	6	18
	T4	107	27	97	27	10	30
Linfonodo regional (N)	N0	208	52	193	53	15	45
	N1	59	15	56	15	3	9
	N2	120	30	106	29	14	42
	N3	12	3	11	3	1	3
Linfonodo regional (N)	Negativo	208	52	193	53	15	45
	Positivo	191	48	173	47	18	55
Estadiamento	I	45	11	43	12	2	6
	II	90	23	81	22	9	27
	III	81	20	75	20	6	18
	IV	183	46	167	46	16	48
Estadiamento	Avançado	264	66	242	66	22	67
	Inicial	135	34	124	34	11	33
Radioterapia	Não	178	45	165	45	13	39
	Sim	221	55	201	55	20	61
Recidiva tumoral	Não	231	58	217	59	14	42
	Sim	168	42	149	41	19	58
Óbito	Não	223	56	204	56	19	58
	Sim	176	44	162	44	14	42
Óbito pela neoplasia	Não	246	62	226	62	20	61
	Sim	153	38	140	38	13	39

Dentro da amostra total, 366 (92%) pacientes tinham o hábito de fumar e 33 (8%) não fumavam. Dessa forma, a amostra dividiu-se em dois grupos, um grupo com pacientes tabagistas e outro com não tabagistas.

No grupo de pacientes tabagistas, composto por 366 pacientes, 331 (90%) eram homens e 35 (10%) mulheres, com média de idade de 57,9 anos (mínimo de 27 anos e máximo de 87 anos) e 316 (86%) eram da raça branca. O sítio anatômico tumoral mais comum foi a laringe, sendo encontrado em 169 (46%) pacientes, seguido pela cavidade oral, observada em 120 (33%), depois pela hipofaringe em 47 (13%) e finalmente, pela orofaringe em 30 (8%). Em relação ao estadiamento patológico, 242 (66%) tiveram estadiamento avançado (III e IV) e 124 (34%) estadiamento inicial (I e II). Quanto à presença de metástases linfonodal regional, 193 (53%) não apresentaram metástases (N0) e 173 (47%) apresentaram metástases (N1, N2, N3). Foram submetidos à radioterapia 201 (55%) pacientes. Em relação à recidiva tumoral e ao óbito, 149 (41%) apresentaram recidiva tumoral, 162 (44%) foram à óbito e 140 (38%) foram à óbito pela neoplasia (Tabela 3).

No grupo de não tabagista, composto por 33 pacientes, 18 (55%) eram homens e 15 (45%) mulheres, com média de idade de 64,1 anos (mínimo de 36 anos e máximo de 85 anos) e 30 (91%) eram da raça branca. Em relação ao sítio tumoral, em 20 pacientes a localização foi a cavidade oral, em 6 a laringe, em 4 a orofaringe e em 3 a hipofaringe. Quanto ao estadiamento patológico, 22 (67%) tiveram estadiamento avançado (III e IV) e 11 (33%) estadiamento inicial (I e II). Em relação à presença de metástases linfonodal regional, 15 (45%) não apresentaram metástases (N0) e 18 (55%) apresentaram metástases (N1, N2, N3). Foram submetidos à radioterapia 20 (61%) pacientes. Quanto à recidiva tumoral e ao óbito, 19 (58%) apresentaram recidiva tumoral, 14 (42%) foram à óbito e 13 (39%) foram à óbito pela neoplasia (Tabela 3).

4.1. Análise das variáveis clínicas

A comparação entre as variáveis dos grupos tabagista e não tabagista mostrou significância da variável sexo (p -valor <0.0001), dessa forma entre os tabagistas houve maior predomínio de homens, e entre os não fumantes o

Resultados

predomínio do sexo feminino foi maior quando comparado ao sexo feminino do grupo dos fumantes. A variável localização tumoral também mostrou relação estatística (p -valor 0.0029), sendo que no grupo dos tabagistas a laringe teria maior probabilidade de ser o principal sítio anatômico tumoral e no grupo dos não tabagistas, seria a cavidade oral. A variável recidiva também foi estatisticamente significativa (p -valor 0.0246), sendo que o grupo dos tabagistas apresentou menores chances de ter recidiva do que o grupo dos não tabagistas (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação das variáveis clínicas entre os grupos de tabagistas (n=366) e de não tabagistas (n=33), seguido do teste de Qui-quadrado e exato de Fisher para independência

Variável	Categoria	Tabagista		Não tabagista		Total	p -valor
		N	%	N	%		
Sexo	Feminino	35	10	15	45	50	<.0001
	Masculino	331	90	18	55	349	
Raça	Amarela	0	0	1	3	1	0.0659
	Branca	316	86	30	91	346	
	Negra	13	4	1	3	14	
	Parda	37	10	1	3	38	
Localização	Cavidade oral	120	33	20	61	140	0.0029
	Hipofaringe	47	13	3	9	50	
	Laringe	169	46	6	18	175	
	Orofaringe	30	8	4	12	34	
Linfonodo regional (N)	Negativo	193	53	15	45	208	0.4228
	Positivo	173	47	18	55	191	
Estadiamento	Avançado	242	66	22	67	264	0.9493
	Inicial	124	34	11	33	135	
Radioterapia	Não	165	45	13	39	178	0.5290
	Sim	201	55	20	61	221	
Recidiva tumoral	Não	218	60	13	39	231	0.0246
	Sim	148	40	20	61	168	
Óbito geral	Não	204	56	19	58	223	0.8386
	Sim	162	44	14	42	176	
Óbito pela neoplasia	Não	226	62	20	61	246	0.8971
	Sim	140	38	13	39	153	

O grupo dos não tabagistas foi dividido no subgrupo com a presença do HPV (n=5), denominado HPV positivo, e no subgrupo com ausência do HPV (n=28), denominado HPV negativo. No subgrupo do HPV positivo, 60% eram do sexo feminino e 40% do sexo masculino, com média de idade de 63,8 anos, 100% da raça branca, 40% apresentaram localização tumoral em cavidade oral, 40% em orofaringe e 20% em hipofaringe. Em relação ao estadiamento

patológico, 60% tiveram estadiamento avançado (III e IV) e 40% estadiamento inicial (I e II). Em relação à presença de metástases linfonodal regional, 40% não apresentaram metástases (N0) e 60% apresentaram metástases (N1, N2, N3). A radioterapia foi realizada em 60% dos pacientes. Quanto à recidiva tumoral e ao óbito, 20% apresentaram recidiva tumoral, 40% foram à óbito e 40% foram à óbito pela neoplasia. No subgrupo do HPV negativo, 57% eram do sexo masculino e 43% do sexo feminino, com média de idade de 64,1 anos, 89% da raça branca, 64% apresentaram localização tumoral em cavidade oral, 21% em laringe, 7% em orofaringe e 7% em hipofaringe. Em relação ao estadiamento patológico, 68% tiveram estadiamento avançado (III e IV) e 32% estadiamento inicial (I e II). Em relação à presença de metástases linfonodal regional, 46% não apresentaram metástases (N0) e 54% apresentaram metástases (N1, N2, N3). Foram submetidos à radioterapia 61% dos pacientes. Quanto à recidiva tumoral e ao óbito, 64% apresentaram recidiva tumoral, 43% foram à óbito e 39% foram à óbito pela neoplasia. Não houve significância quanto às variáveis clínicas ($p>0,05$) ao comparar os grupos HPV positivo e HPV negativo (Tabela 5).

Tabela 5: Comparação das variáveis clínicas entre os grupos de pacientes não tabagistas HPV positivo (n=5) e HPV negativo (n=28), seguido do teste exato de Fisher para independência

		HPV					
		Não		Sim			
Variável	Categoria	N	%	N	%	Total	p-valor
Sexo	Feminino	12	43	3	60	15	0.6390
	Masculino	16	57	2	40	18	
Raça	Amarela	1	4	0	0	1	1.0000
	Branca	25	89	5	100	30	
	Negra	1	4	0	0	1	
	Parda	1	4	0	0	1	
Localização	Cavidade oral	18	64	2	40	20	0.1234
	Hipofaringe	2	7	1	20	3	
	Laringe	6	21	0	0	6	
	Orofaringe	2	7	2	40	4	
Linfonodo regional (N)	Negativo	13	46	2	40	15	1.0000
	Positivo	15	54	3	60	18	
Estadiamento	Avançado	19	68	3	60	22	1.0000
	Inicial	9	32	2	40	11	
Radioterapia	Não	11	39	2	40	13	1.0000
	Sim	17	61	3	60	20	
Recidiva tumoral	Não	9	32	4	80	13	0.0657
	Sim	19	68	1	20	20	
Óbito geral	Não	16	57	3	60	19	1.0000
	Sim	12	43	2	40	14	
Óbito pela neoplasia	Não	17	61	3	60	20	1.000
	Sim	11	39	2	40	13	

Dentre os indivíduos com a presença do vírus do HPV encontrou-se em dois pacientes o subtipo 16, em dois o subtipo 6 e em um o subtipo 58. Em relação ao sexo, os pacientes com HPV 16 eram mulheres, com HPV 58 era homem e com HPV 6 um era mulher e o outro era homem. Somente a raça branca foi observada nesses pacientes. Quanto à localização tumoral, a cavidade oral foi observada no HPV 16, a orofaringe no HPV 58, e no HPV 6, observou-se a hipofaringe e a orofaringe. Em relação ao estadiamento patológico, o estadiamento avançado (III e IV) foi encontrado no HPV 58, e tanto o estadiamento avançado e quanto o inicial foram encontrados nos HPV 6 e 16. A presença de metástases linfonodal regional foi observada no HPV 58, em um paciente com HPV 16 e em um com HPV 6. A recidiva tumoral ocorreu no HPV 58 e 6, e em um paciente com HPV 16. O óbito ocorreu em um paciente com HPV 16 e em um com HPV 6. A idade média foi de 72 anos para HPV 16, 53

anos para HPV 58 e 76 anos para HPV 6, não havendo relação estatística com a idade (p -valor 0,3012) (Tabela 6).

Tabela 6: Descrição dentre os subtipos de HPV quanto à média e ao desvio padrão (mínimo e máximo) para idade, em anos, seguido do teste de Wilcoxon para amostras independentes

HPV	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	p -valor
HPV16	2	65	10	58	72	0.3012
HPV58	1	53	.	53	53	
HPV6	2	68	11	60	76	

Foram associadas as variáveis da amostra do grupo não tabagista HPV positivo com o grupo tabagista. Observou-se associação quanto ao sexo (p -valor 0.0086), sendo que o paciente não tabagista HPV positivo apresentou maior chance de pertencer ao sexo feminino, e o paciente fumante apresentou maior probabilidade de ser do sexo masculino. Também houve relação estatística quanto à localização tumoral (p -valor 0.0201), sendo que o grupo tabagista apresentou maior probabilidade de apresentar localização tumoral na laringe do que o grupo HPV positivo, e esse, por sua vez, apresentou maior probabilidade da localização ser na orofaringe e na cavidade oral (Tabela 7).

Tabela 7: Comparação das variáveis clínicas entre os grupos de tabagista (n=366) e não tabagista HPV positivo (n=5), seguido do teste exato de Fisher para independência

Variável	Categoria	Tabagista		Não tabagista HPV+		Total	p-valor
		N	%	N	%		
Sexo	Feminino	35	10	3	60	38	0.0086
	Masculino	331	90	2	40	333	
Raça	Branca	316	86	5	100	321	1.0000
	Negra	13	4	0	0	13	
	Parda	37	10	0	0	37	
Localização	Cavidade oral	120	33	2	40	122	0.0201
	Hipofaringe	47	13	1	20	48	
	Laringe	169	46	0	0	169	
	Orofaringe	30	8	2	40	32	
Linfonodo regional (N)	Negativo	193	53	2	40	195	0.6713
	Positivo	173	47	3	60	176	
Estadiamento	Avançado	242	66	3	60	245	1.0000
	Inicial	124	34	2	40	126	
Radioterapia	Não	165	45	2	40	167	1.0000
	Sim	201	55	3	60	204	
Recidiva tumoral	Não	218	60	4	80	222	0.6521
	Sim	148	40	1	20	149	
Óbito geral	Não	204	56	3	60	207	1.0000
	Sim	162	44	2	40	164	
Óbito pela neoplasia	Não	226	62	3	60	229	1.000
	Sim	140	38	2	40	142	

Com a análise de associação das variáveis do grupo não tabagista HPV negativo e do grupo tabagista houve relação estatística da variável sexo (p -valor < 0.0001), sendo o grupo dos não tabagistas HPV negativo apresentou maior chance de ser do sexo feminino quando comparado ao grupo dos fumantes, e por sua vez os tabagistas apresentaram maior possibilidade de ser do sexo masculino. Observou-se também significância quanto a localização (p -valor 0.0095), sendo que os indivíduos do grupo dos tabagistas apresentaram maior probabilidade do tumor localizar-se na laringe do que os indivíduos do grupo não tabagista HPV negativo, e esses apresentaram a cavidade oral como a maior possibilidade de sítio anatômico. A variável recidiva também foi estatisticamente significativa (p -valor 0.0047), sendo que o grupo dos tabagistas apresentou menores chances de ter recidiva do que o grupo dos não tabagistas HPV negativo (Tabela 8).

Tabela 8: Comparação das variáveis clínicas entre os grupos de tabagista (n=366) e não tabagista HPV negativo (n=28), seguido do teste de Qui-quadrado e exato de Fisher para independência

Variável	Categoria	Tabagista		Não tabagista HPV -		Total	p-valor
		N	%	N	%		
Sexo	Feminino	35	10	12	43	47	<.0001
	Masculino	331	90	16	57	347	
Raça	Branca	316	86	25	89	341	0.0793
	Amarela	0	0	1	4	1	
	Negra	13	4	1	4	14	
	Parda	37	10	1	4	38	
Localização	Cavidade oral	120	33	18	64	138	0.0095
	Hipofaringe	47	13	2	7	49	
	Laringe	169	46	6	21	175	
	Orofaringe	30	8	2	7	32	
Linfonodo regional (N)	Negativo	193	53	13	46	206	0.5198
	Positivo	173	47	15	54	188	
Estadiamento	Avançado	242	66	19	68	261	0.8514
	Inicial	124	34	9	32	133	
Radioterapia	Não	165	45	11	39	176	0.5521
	Sim	201	55	17	61	218	
Recidiva tumoral	Não	218	60	9	32	227	0.0047
	Sim	148	40	19	68	167	
Óbito geral	Não	204	56	16	57	220	0.8853
	Sim	162	44	12	43	174	
Óbito pela neoplasia	Não	226	62	17	61	243	0.9136
	Sim	140	38	11	39	151	

4.2. Comportamento e evolução da doença

A variável idade apresentou relação estatística entre os fumantes e os não fumantes (p -valor 0.0018), sendo que os que fumavam apresentaram média de idade menor do que os não fumantes. Também houve significância de idade entre a comparação do grupo não tabagista HPV negativo e o grupo tabagista (p -valor 0.0039), sendo que a idade média do HPV negativo foi maior do que a dos fumantes. Dessa forma, os fumantes eram mais jovens do que os não fumantes no momento do diagnóstico da doença. O tempo até a recidiva e o tempo até o óbito foram analisados considerando os indivíduos que apresentaram recidiva e óbito, respectivamente. Observou-se relação estatística do óbito pela neoplasia entre o grupo não tabagista HPV positivo e o grupo

Resultados

tabagista (p -valor 0.0483), sendo que o tempo até o óbito foi maior no grupo dos tabagistas (Tabela 9).

Tabela 9: Descrição dos valores extremos, mediana, média e o desvio padrão para a idade, em anos, tempo de recidiva, em meses, tempo de óbito geral (óbito por qualquer causa), em meses e tempo de óbito pela neoplasia, em meses, obtidos a partir da análise de prontuários médicos para o grupo de tabagistas (n=366), não tabagistas (n=33), HPV positivo (n=5) e HPV negativo (n=28), seguido do p-valor, utilizando-se do teste de Mann-Whitney para comparação entre as amostras

Característica/ Amostra	Idade			Recidiva			Óbito geral			Óbito neoplasia		
	Média	Mediana	Desvio padrão	Média	Mediana	Desvio padrão	Média	Mediana	Desvio padrão	Média	Mediana	Desvio padrão
Tabagista	57.9	57.0	10.5	17.8	11.0	17.3	18.8	13.0	18.6	18.4	12.0	18.5
Não tabagista	64.1	63.0	11.3	13.3	9.5	11.8	13.0	11.0	10.8	13.2	12.0	11.2
HPV positivo	63.8	60.0	9.8	3.0	3.0	.	2.3	2.3	2.5	2.3	2.3	2.5
HPV negativo	64.1	63.0	11.7	13.8	10.0	11.9	14.8	13.0	10.6	15.2	14.0	11.0
Tabagista x não tabagista <i>p</i> -valor	0.0018			0.2440			0.3826			0.4526		
HPV positivo x HPV negativo <i>p</i> -valor	0.8801			0.3087			0.0769			0.0849		
HPV positivo x tabagista <i>p</i> -valor	0.1986			0.1385			0.0512			0.0483		
HPV negativo x tabagista <i>p</i> -valor	0.0039			0.3813			0.8657			1.0000		

Realizou-se associação entre as variáveis recidiva tumoral, óbito geral, óbito pela neoplasia e estadiamento com a variável radioterapia, para cada grupo. Observou-se que tanto para a amostra total, quanto para as amostras de tabagista, não tabagista e não tabagista HPV negativo, houve associação estatística entre radioterapia e o estadiamento patológico da doença (p -valor <0.0001 , <0.0001 , 0.0056 , e 0.0104 , respectivamente), somente não foi observada essa relação entre radioterapia e estadiamento no grupo de pacientes acometidos pelo HPV. E ainda, houve associação estatística entre radioterapia e óbito pela neoplasia na amostra total (p -valor 0.0031) e no grupo tabagista (p -valor 0.002), sendo que o paciente fumante submetido à radioterapia apresentou menor possibilidade de óbito pela neoplasia (55% não foram a óbito) (Tabela 10).

Resultados

Tabela 10: Análise das variáveis indicadoras de recidiva, óbito geral, óbito pela neoplasia e estadiamento, para a amostra total (n=399), não tabagista (n=33), tabagista (n=366), HPV positivo (n=5) e HPV negativo (n=28), considerando a realização da radioterapia, seguido do teste de Qui-quadrado para independência

		Amostra Total				Não tabagista				Tabagista				HPV positivo				HPV negativo			
		Radioterapia				Radioterapia				Radioterapia				Radioterapia				Radioterapia			
		Não		Sim		Não		Sim		Não		Sim		Não		Sim		Não		Sim	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Recidiva tumoral	Não	108	61	123	56	5	38	8	40	103	62	115	57	2	100	2	67	3	27	6	35
	Sim	70	39	98	44	8	62	12	60	62	38	86	43	0	0	1	33	8	73	11	65
p-valor		0.3129				0.9296				0.312				1.000				1.000			
Óbito geral	Não	109	61	114	52	8	62	11	55	101	61	103	51	1	50	2	67	7	64	9	53
	Sim	69	39	107	48	5	38	9	45	64	39	98	49	1	50	1	33	4	36	8	47
p-valor		0.0536				0.7104				0.056				1.000				0.7047			
Óbito neoplasia	Não	124	70	122	55	8	62	12	60	116	70	110	55	1	50	2	67	7	64	10	59
	Sim	54	30	99	45	5	38	8	40	49	30	91	45	1	50	1	33	4	36	7	41
p-valor		0.0031				0.9296				0.002				1.000				1.000			
Estadiamento	Avançado	82	46	182	82	5	38	17	85	77	47	165	82	1	50	2	67	4	36	15	88
	Inicial	96	54	39	18	8	62	3	15	88	53	36	18	1	50	1	33	7	64	2	12
p-valor		<.0001				0.0056				<.0001				1.000				0.0104			

Foram feitas comparações entre os grupos quanto ao tempo até a recidiva tumoral e quanto ao tempo até o óbito geral ou pela neoplasia, considerando o tratamento radioterápico. Houve associação do tempo até o óbito pela doença com a realização de radioterapia na amostra total (p -valor 0.0404), sendo que o indivíduo com CECCP que foi submetido à radioterapia apresentou maior tempo até o óbito pela neoplasia, quando comparado ao indivíduo que não fez radioterapia (Tabela 11).

Tabela 11: Descrição dos valores extremos, mediana, média e o desvio padrão para o tempo de recidiva, em meses, tempo de óbito geral (óbito por qualquer causa), em meses e tempo de óbito pela neoplasia, em meses, obtidos a partir da análise de prontuários médicos para o grupo de tabagistas ($n=366$), não tabagistas ($n=33$), HPV positivo ($n=5$) e HPV negativo ($n=28$), considerando o tratamento radioterápico, seguido do p -valor, utilizando-se do teste de Mann-Whitney para comparação entre as amostras

Amostra	Radioterapia	Recidiva			Óbito geral			Óbito pela neoplasia		
		Média	Mediana	Desvio padrão	Média	Mediana	Desvio padrão	Média	Mediana	Desvio padrão
Total	Não	16	10	18	17	10	20	17	10	20
	Sim	18	12	16	19	14	17	19	14	17
p -valor		0.1765			0.0809			0.0404		
Tabagista	Não	17	11	18	18	11	20	18	11	20
	Sim	18	12	17	19	14	17	19	14	17
p -valor		0.2246			0.1136			0.0625		
Não tabagista	Não	12	8	11	9	10	6	9	10	6
	Sim	14	10	13	15	12	13	15	12	13
p -valor		0.5935			0.5157			0.4777		
HPV negativo	Não	12	8	11	11	12	4	11	12	4
	Sim	15	10	13	17	13	13	17	13	13
p -valor		0.4643			0.6783			0.5824		
HPV positivo	Não	.	.	.	1	1	.	1	1	.
	Sim	3	3	.	4	4	.	4	4	.
p -valor		-			-			-		

4.3. Análise das variáveis prognósticas

Calculou-se o tempo de sobrevida médio e seu intervalo de confiança até a ocorrência do evento (recidiva, óbito geral e óbito pela neoplasia), bem como o teste do log-rank comparando as amostras quanto a curva de sobrevida e a análise gráfica.

4.3.1. Tempo livre de doença

O tempo médio livre de doença foi de 61,9 meses para a amostra total, 28,5 meses para o grupo de não tabagista HPV negativo, 29,3 meses para o grupo de não tabagista HPV positivo, 31,3 meses para a amostra não tabagista e 63,6 meses para a amostra tabagista, sendo que todos os tempos estavam dentro do intervalo de confiança 95% (Tabela 12).

Tabela 12: Tempo médio livre de doença, em meses, para os grupos tabagistas (n=366), não tabagistas (n=33), HPV positivo (n=5) e HPV negativo (n=28)

Grupo	Tempo médio	Erro padrão	95% IC	
Amostra Total	61.9	3.4	55.1	68.6
HPV negativo	28.5	5.2	18.4	38.6
HPV positivo	29.3	7.6	14.4	44.1
Não tabagista	31.3	5.1	21.3	41.4
Tabagista	63.6	3.6	56.6	70.7

As curvas de sobrevida referentes ao tempo livre de doença mostraram diferença estatística entre a amostra total e a não tabagista (p -valor 0.0342), entre a amostra total e a não tabagista HPV negativo (p -valor 0.0115), entre a amostra tabagista e a não tabagista (p -valor 0.0185) e entre a amostra tabagista e a não tabagista HPV negativo (p -valor 0.0058). Portanto, o tempo livre de doença foi maior nos grupos com indivíduos que fumavam, quando comparada a do indivíduo não tabagista, HPV positivo ou negativo (Figura 5).

Figura 5. Estimativas de Kaplan-Meier para tempo livre de doença, em todos os grupos

Analizou-se, em todos os grupos, a sobrevida quanto ao tempo livre de doença dos indivíduos com estadiamento avançado (estadio III e IV), e as curvas mostraram significância ao comparar a amostra total e a não tabagista (p -valor 0.0174), a amostra total e a não tabagista HPV negativo (p -valor 0.0169), tabagista e não tabagista (p -valor 0.0081), e tabagista e não tabagista HPV negativo (p -valor 0.0079), sendo que os tabagistas apresentaram maior tempo até a recidiva, em todos esses casos (Figura 6).

Figura 6. Estimativas de Kaplan-Meier para tempo livre de doença em indivíduos com estadiamento avançado, em todos os grupos

Em relação às curvas de sobrevida referentes ao tempo livre de doença dos indivíduos com estadiamento inicial, não apresentaram resultados significantes, portanto, não houve diferença entre os grupos quanto ao tempo livre de doença no estadiamento inicial (I e II) (Figura 7).

Figura 7. Estimativas de Kaplan-Meier para tempo livre de doença em indivíduos com estadiamento inicial, em todos os grupos

E ainda, foram traçadas curvas de sobrevida quanto ao tempo livre de doença, considerando as localizações orofaringe, hipofaringe e cavidade oral, localizações encontradas nos pacientes acometidos pelo HPV sem o hábito de fumar. Observou-se diferença estatística entre a amostra não tabagista HPV negativo e com a amostra total (p -valor 0.0379) e com a amostra tabagista (p -valor 0.0240), sendo que os pacientes que fumavam apresentaram maior tempo livre de doença, do que os que não fumavam e que não eram acometidos pelo HPV (Figura 8).

Figura 8. Estimativas de Kaplan-Meier para tempo livre de doença em indivíduos com localização tumoral em cavidade oral, orofaringe e hipofaringe, em todos os grupos

4.3.2. Sobrevida global

A sobrevida global foi de 66,1 meses para a amostra total, 51,4 meses para a amostra não tabagista HPV negativo, 23,7 meses para a amostra não tabagista HPV positivo, 51,8 meses para a amostra não tabagista e 66,6 meses para a amostra tabagista. Todos esses tempos encontraram-se dentro do intervalo de confiança 95% (Tabela 13).

Resultados

Tabela 13: Tempo médio de sobrevida global, em meses, para os grupos tabagistas (n=366), não tabagistas (n=33), HPV positivo (n=5) e HPV negativo (n=28)

Grupo	Tempo médio	Erro padrão	95% IC	
Amostra Geral	66.1	3.2	59.9	72.4
HPV negativo	51.4	7.9	35.8	66.9
HPV positivo	23.7	7.8	8.3	39.1
Não tabagista	51.8	7.4	37.3	66.4
Tabagista	66.2	3.3	59.8	72.7

Na comparação das curvas de sobrevida global entre as amostras, quanto ao óbito geral, ao estadiamento e à localização tumoral, não foi observada diferença estatística (Figuras 9, 10, 11 e 12).

Figura 9. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida global, em todos os grupos

Figura 10. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida global com estadiamento avançado, em todos os grupos

Figura 11. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida global com estadiamento inicial, em todos os grupos

Figura 12. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida global em indivíduos com localização tumoral em cavidade oral, orofaringe e hipofaringe, em todos os grupos

4.3.3. Sobrevida específica da doença

A sobrevida específica da doença foi de 71,1 meses para a amostra total, 53,6 meses para a amostra não tabagista HPV negativo, 23,7 meses para a amostra não tabagista HPV positivo, 53,8 meses para a amostra não tabagista e 72 meses para a amostra tabagista. Todos esses tempos encontraram-se dentro do intervalo de confiança 95% (Tabela 14).

Tabela 14: Tempo médio de sobrevida específica da doença, em meses, para os grupos tabagistas (n=366), não tabagistas (n=33), HPV positivo (n=5) e HPV negativo (n=28)

Grupo	Tempo médio	Erro padrão	95% IC	
Amostra Geral	71.7	3.3	65.2	78.2
HPV negativo	53.6	8.0	37.8	69.3
HPV positivo	23.7	7.8	8.3	39.1
Não tabagista	53.8	7.5	39.1	68.5
Tabagista	72.0	3.4	65.3	78.7

Na comparação das curvas de sobrevida da doença entre as amostras, quanto ao óbito pela neoplasia, ao estadiamento e à localização tumoral, não foi observada diferença estatística (Figuras 13, 14, 15 e 16).

Figura 13. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida específica da doença, em todos os grupos

Resultados

Figura 14. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida específica da doença com estadiamento avançado, em todos os grupos

Figura 15. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida específica da doença com estadiamento inicial, em todos os grupos

Figura 16. Estimativas de Kaplan-Meier para sobrevida específica da doença em indivíduos com localização tumoral em cavidade oral, orofaringe e hipofaringe, em todos os grupos

5. Discussão

Frente à importância dos fatores de risco tabaco e HPV, o atual trabalho comparou os grupos de pacientes tabagistas (92%) com os não tabagistas (8%), e ainda considerou a importância do HPV nos pacientes não fumantes. Os principais fatores de risco para o CECCP são o tabaco e o álcool que possuem efeito multiplicativo. Em seu trabalho, Hashibe et al. (2009) mostraram esse efeito, sendo que para a cavidade oral o efeito multiplicativo foi de 3,08, para faringe foi de 1,90 e para laringe foi de 1,62, portanto o efeito da associação desses fatores é maior, do que quando são considerados individualmente. E ainda, a literatura mostra que o CECCP com a presença do HPV pode apresentar comportamento mais agressivo, mas com boa resposta ao tratamento radioterápico e melhor prognóstico (KHODE et al., 2014; KUMAR et al., 2015). Sabe-se que o hábito de fumar pode aumentar o risco de infecção e o efeito carcinogênico do HPV. O tabaco e o álcool podem exercer atividade imunossupressora, o que pode contribuir para essa infecção pelo HPV. E ainda, o tabaco e o HPV podem agir inativando os genes supressores de tumor do hospedeiro (COMBES; CHEN; FRANCESCHI, 2014; HÜBBERS; AKGÜL, 2015; SETHI et al., 2012).

Os tabagistas apresentaram como sítio mais acometido pela neoplasia a laringe e os não tabagistas a cavidade oral. Isso mostrou que o principal sítio anatômico da neoplasia nos pacientes fumantes é a laringe, com provável relação da agressão desse órgão com inalação dos componentes do cigarro, tais como hidrocarbonetos policíclicos, aminas aromáticas e nitrosaminas (KUMAR et al., 2015). Desde a década de 50, o tabaco foi considerado o fator de risco mais importante para o câncer de laringe, havendo relação dose-resposta, ou seja, quanto mais cigarro é consumido, maior a chance que o indivíduo tem em desenvolver essa neoplasia. Se o consumo de tabaco fosse eliminado levaria à prevenção de 86% do câncer de laringe (SARTOR et al., 2007; MENEZES et al., 2002). Entretanto, estudos mostram que a principal localização tumoral do CCEP em geral, não considerando os fatores de risco isoladamente, é a cavidade oral, e a laringe encontra-se em segundo

lugar, seguida pela faringe (RUIZ et al., 2006; ALVARENGA et al., 2008; COLOMBO; RAHAL, 2009). Os pacientes não tabagistas apresentaram como principal sítio a cavidade oral, o que está de acordo com a literatura.

A incidência de câncer em orofaringe vem aumentando, principalmente na América do Norte e Europa, tendo provável relação com a infecção pelo HPV (SETHI et al., 2012). Em sua revisão, Kreimer et al. (2004) mostraram maior prevalência do câncer de orofaringe na América do Norte em comparação com a Europa e Ásia e quando considerou a presença do HPV, a prevalência foi maior na Ásia e na América do Norte do que na Europa. Assim, a epidemiologia do carcinoma de orofaringe varia com a presença do papilomavírus, devendo-se considerar os hábitos e cultura inerente a cada país. Dessa forma, ao não se considerar o hábito de fumar, o presente estudo descreveu a orofaringe (40%) e cavidade oral (40%) como as principais localizações tumorais em pacientes não tabagistas com CECCP HPV positivo. Esse resultado é semelhante ao estudo descrito por Khode et al. (2014) que reuniu 26 países com 5046 casos de CCP, no qual 26% dos casos eram HPV positivo, e a o sítio anatômico mais acometido foi a orofaringe (36%), a cavidade oral (23%) e a laringe (24%). O favorecimento do acometimento da orofaringe pode ser devido à presença de tecido linfóide encontrado nas amígdalas e base de língua, semelhante ao tecido encontrado na junção escamo-colunar do colo de útero, local acometido pelo câncer genital feminino com a presença do HPV. A localização em orofaringe, bem como também em cavidade oral, é favorecida pela presença de células epiteliais, mais susceptíveis a infecção pelo HPV (LEWIS et al., 2015; KUMAR et al., 2015).

Dentre os indivíduos com a presença do papilomavírus, foram encontrados os subtipos 58, 16 e 6. Portanto, o grupo com CECCP HPV positivo, apresentou acometimento pelos HPV de alto risco (16 e 58) como o de baixo risco (6). O CCP tem relação com o HPV de alto risco, e o HPV 16 é o principal,

acometendo principalmente orofaringe e cavidade oral (KHODE et al., 2014; SETHI et al., 2012; RITCHIE et al, 2003). Isso está de acordo com os resultados encontrados, visto que a cavidade oral foi acometida quando houve a presença do HPV 16 e a orofaringe quando HPV 58 esteve presente. Entretanto, o HPV 6 foi observado em tumores localizados em orofaringe e hipofaringe. Apesar da literatura não trazer muitas associações do HPV 6 com neoplasia maligna de orofaringe, o estudo de Schwartz et al (1998) também observou a presença do HPV 6 em câncer de orofaringe. Como a amostra de HPV foi pequena, não se pode afirmar a relação do HPV de baixo risco com CECCP, necessitando de mais estudos, para verificar a presença ou não de tal associação.

O sexo masculino foi o mais acometido pela neoplasia nos indivíduos tabagistas e não tabagistas, mostrando que os homens tem maior acometimento pelo CECCP. Já os pacientes com CECCP sem o hábito de fumar tiveram a maior probabilidade de pertencerem ao sexo feminino. A maior proporção de tumor no sexo masculino pode ser justificada pelo maior número de usuários de cigarro e de álcool entre os homens, e também o maior consumo quanto à quantidade dessas substâncias. E ainda, com a associação do álcool e do tabaco o homem pode tornar-se mais vulnerável à infecção pelo HPV, pois a prevalência de infecção oral pelo HPV é maior em homens do que em mulheres, assim, a associação desses três fatores de risco pode aumentar a incidência desse tumor no sexo masculino (COMBES; CHEN; FRANCESCHI, 2014; HASHIBE et al., 2009; HÜBBERS; AKGÜL, 2015). Entre as mulheres, vem aumentando o consumo de álcool e tabaco, que ainda é menor quando comparado ao sexo masculino. A incidência desse câncer vem apresentando aumento no sexo feminino, o que deve ser reflexo da mudança dos hábitos de tabagismo e etilismo e pode estar diretamente associado ao HPV (KHODE et al., 2014; ALVARENGA et al., 2008). No presente estudo, considerando o grupo com pacientes não tabagistas com a presença do papilomavírus, o CECCP foi mais prevalente no sexo feminino. Em contraste, a maioria dos estudos trazem a maior prevalência do CECCP HPV positivo no sexo masculino, entretanto, não consideram os fatores de risco de forma isolada, consideram a presença do HPV como fator de risco, que pode ou não estar associado a outros fatores, como o tabaco (MICHL

et al., 2010).

De acordo com a literatura, a incidência do CCP aumenta com a idade, sendo raro em indivíduos com menos de 40 anos, mas não considera a interferência dos fatores de risco (ALVARENGA et al., 2008; HASHIBE et al., 2009). Da mesma forma, a amostra total do atual estudo apresentou média de idade acima de 40 anos (58,4 anos), sendo que o grupo de não tabagistas apresentou média de 64,1 anos e o grupo de tabagistas 57,9 anos. Entretanto, os pacientes tabagistas mostraram-se ligeiramente mais jovens quando desenvolveram a neoplasia do que os que nunca fumaram. Esse resultado se contradiz com de outros estudos, que mostram que pacientes com CCP são mais jovens no momento do diagnóstico quando há menor exposição aos principais fatores de risco, tabaco e álcool, podendo apresentar outros fatores, como susceptibilidade genética, infecção por HPV e fatores nutricionais (HASHIBE et al., 2009; NAZ et al., 2015).

O CECCP HPV positivo acomete pacientes mais jovens, com idade entre 40 e 55 anos (TRIBIUS; HOFFMANN, 2013; MICHL et al., 2010; KHOT; DESHMANE; CHOUDHARI, 2016, LEWIS et al., 2015; BISHIT; BIST, 2011). E isso não foi observado nesse estudo, no qual a média de idade dos pacientes portadores de HPV foi de 63,8 anos, sendo que os subtipos 16 e 6 apresentaram média de idade acima de 60 anos, somente o subtipo 58, apresentou a idade de 53 anos.

Estudos mostram que 85% dos pacientes com CCP possuem a pele de cor branca (ALVARENGA et al., 2008; MICHL et al., 2010), e essa característica foi a mais observada em todos os grupos (tabagista ou não, HPV positivo ou negativo), mas a mesma não mostrou interferência na incidência da neoplasia.

O principal tratamento para CECCP é a cirurgia, que pode ser associado à radioterapia e à quimioterapia, principalmente em doenças avançadas, entretanto, esse tratamento combinado pode resultar numa maior morbimortalidade, resultando em impacto na qualidade de vida e no aumento

dos custos referentes ao cuidado aos pacientes (CHEN; LIN; CHEN, 2015). A radioterapia no presente estudo esteve associada ao estadiamento avançado, e ainda, o paciente com CCP que realizou a radioterapia apresentou maior tempo até o óbito pela doença. O grupo dos tabagistas mostrou menor número de mortes causadas pela neoplasia quando submetidos a esse tratamento, o que não foi observado nos pacientes que não fumam, incluindo os pacientes HPV positivo, pois não houve relação significativa entre óbito e radioterapia nesse último grupo. O paciente acometido pelo HPV não mostrou relação prognóstica quando submetido ao tratamento radioterápico, provavelmente isso é decorrente do número da amostra e também pelo tratamento cirúrgico antes da radioterapia. De acordo com outros estudos, o paciente HPV positivo tem melhor resposta clínica e controle local da doença com o tratamento radioterápico, com melhor resultado prognóstico, e isso pode ser devido às características celulares e moleculares dos tumores com a presença desse vírus, tornando-os mais radiosensíveis, e consequentemente apresentando melhor sobrevida e melhor qualidade de vida (DALIANIS, 2014; KHODE et al., 2014; KECK et al., 2015; TRIBIUS; HOFFMANN, 2013; RITCHIE et al, 2003; SETHI et al., 2012).

A metástase linfonodal é um importante fator prognóstico, e quando um linfonodo está comprometido pela neoplasia representa um fator prognóstico ruim, podendo levar a diminuição da sobrevida (CHEN; LIN; CHEN, 2015; GREENE et al, 2002). No estudo de MONTORO et al. (2008) a metástase cervical esteve presente em 57,7% dos pacientes com câncer de cavidade oral e foi o fator mais importante para o prognóstico, o qual diminuiu a sobrevida da sua amostra em 50%. No nosso estudo, houve presença de metástase linfonodal regional em mais da metade dos pacientes não tabagistas, tanto HPV positivo ou negativo, enquanto que em mais da metade dos pacientes tabagistas não apresentaram comprometimento linfonodal. Entretanto, não houve diferença estatística prognóstica ao comparar os grupos entre si, apesar de a maior porcentagem de metástases linfonodais ter sido encontrada nos pacientes não tabagistas, incluindo os pacientes com a presença do HPV. Os tumores HPV positivo podem apresentar maior tendência a comprometer os linfonodos regionais, devido ao seu comportamento biológico mais agressivo, mas apesar

disso apresentam melhor prognóstico quando comparados a tumores HPV negativo (KHODE et al., 2014; MICHL et al., 2010). Quanto ao estadiamento, também não foi observada diferença entre os grupos, sendo que o estadio avançado foi observado em mais da metade de todos os pacientes. O estadiamento é um fator prognóstico, e pacientes com câncer de boca e orofaringe mostram maior incidência de recidiva tumoral, quando em estadio avançado, exercendo impacto negativo na sobrevida (AGRA, 2007).

Quanto à recidiva, observou-se relação estatística entre os pacientes fumantes e não fumantes, sendo que o grupo dos tabagistas apresentou recidiva da doença somente em 40% dos seus pacientes, enquanto o grupo dos não tabagistas apresentou recidiva em 61% dos seus pacientes. Assim, o grupo de pacientes não fumantes apresentaram pior prognóstico em relação à recidiva tumoral do que os pacientes fumantes. Entretanto, a ocorrência de recidiva no grupo dos pacientes HPV positivo foi de 20%, mas não houve relação estatística quando comparada à recidiva nos grupos dos tabagistas e HPV negativo.

E ainda, o tempo livre de doença foi maior para os indivíduos que fumavam, sendo de aproximadamente cinco anos, enquanto esse tempo para os não fumantes, tanto com a presença ou ausência do HPV, foi de aproximadamente dois anos e meio. Portanto, o paciente tabagista apresentou menor taxa de recidiva e maior tempo livre da doença, já o paciente não tabagista apresentou resultados contrários, maior taxa de recidiva e menor tempo livre de doença. Dessa forma, esse último grupo apresentou um prognóstico mais sombrio, ao considerar os fatores recidiva e tempo livre de doença. O paciente HPV positivo apresentou menor tempo livre da doença e baixa ocorrência de recidiva tumoral, mas não apresentou significância quando comparado aos outros grupos, de tabagista e de HPV negativo. A literatura considera os tumores HPV positivo com melhor prognóstico do que os tumores HPV negativo (SEIWERT et al., 2014; BISHIT; BIST, 2011; ANG et al, 2010), entretanto, isso não foi confirmado no nosso trabalho. Um estudo americano (WEINBERGER et al., 2006) comparou as características prognósticas dos tumores com a presença

e com a ausência do HPV, mostrando que os tumores HPV positivo apresentaram melhor tempo de sobrevida (75% contra 15% dos tumores HPV negativo), apresentaram menor taxa de recidiva local (14% contra 45% dos tumores HPV negativo) e sobrevida de cinco em 79% dos casos.

Considerando dentro dos grupos apenas os pacientes com estadiamento avançado, os indivíduos que fumavam mostraram-se mais uma vez maior tempo livre de doença, do que os que não fumavam. Assim, os pacientes tabagistas com doença avançada apresentaram melhor prognóstico com maior tempo livre de doença quando comparados aos pacientes não fumantes. Nessa amostra, os pacientes fumantes apresentaram um efeito positivo em relação ao prognóstico, pois o indivíduo fumante apresentou maior tempo entre o tratamento da doença e a recidiva da neoplasia. Entretanto, sabe-se que o tabagismo pode exercer interferência negativa na sobrevida do paciente com CCP. Isso porque o cigarro pode aumentar a probabilidade do surgimento de segundo sítios tumorais acometendo principalmente a região de cabeça e pescoço e pulmão, e ainda, pode causar alterações do epitélio do trato aéreo digestivo superior, predispondo à alterações genéticas e pré-cancerígenas, conforme descrita pela teoria do campo de cancerização proposto por Slaughter em 1953. Sethi et al. (2012) mostraram a influência da associação do tabagismo e do HPV na sobrevida, com melhor sobrevida aos pacientes com câncer de orofaringe HPV positivo e não tabagista, pior sobrevida entre aos HPV negativo e tabagistas, e sobrevida intermediária aos HPV positivo e tabagistas e aos HPV negativo e não tabagistas. De acordo com Ang et al. (2010), o tabaco pode alterar o comportamento biológico de um tumor HPV positivo, com alterações genéticas induzidas por agentes cancerígenos associados ao tabaco, podendo tornar o tumor HPV positivo menos sensível à terapia. E Ritchie et al. (2003) descreveram um possível efeito protetor do tabaco sobre a infecção pelo HPV na cavidade oral e na orofaringe, possivelmente devido ao aumento da queratinização nas superfícies das mucosas, tornando-as mais resistentes a pequenos traumas.

A avaliação dos pacientes com estadiamento inicial não mostrou diferença estatística quanto às curvas de sobrevida referentes ao tempo livre de doença entre os grupos, portanto, apenas o estadiamento avançado mostrou apresentar interferência no prognóstico dos pacientes.

Os sítios anatômicos observados nos pacientes não fumantes e acometidos pelo HPV foram a cavidade oral, orofaringe e hipofaringe. Reunindo-se os pacientes que apresentavam localização tumoral nesses sítios anatômicos dentro dos grupos, observou-se que a sobrevida relacionada ao tempo livre de doença foi maior no grupo de pacientes tabagistas quando comparados aos HPV negativo. A relação da recidiva entre os demais grupos, considerando o sítio anatômico da neoplasia, não apresentou diferença estatística. Dessa forma, o sítio anatômico não interferiu no prognóstico dos pacientes HPV positivo quando comparados aos pacientes tabagistas. Salazar et al. (2013), descreveram associação prognóstica da doença com a localização tumoral apenas em orofaringe, e também não mostraram associação com outros sítios anatômicos. Eles descreveram 89% de melhora na sobrevida dos pacientes HPV positivo com localização tumoral em orofaringe. Ang et al. (2010) também mostraram melhor prognóstico aos paciente com CECCP HPV positivo acometendo a orofaringe, relacionando com um maior controle locorregional da doença nesses pacientes, devido provavelmente à maior sensibilidade intrínseca à radiação. E, ainda, na amostra deles os pacientes com a presença do HPV foram menos expostos ao tabagismo e apresentaram menor frequência da presença de segundo tumor, mostrando que o comportamento biológico de um tumor HPV positivo pode ser alterado pelo uso do tabaco, no entanto, a taxa de morte foi semelhante nos pacientes HPV positivo e negativo. Já Ritchie et al. (2003) não encontraram diferenças significativas na sobrevida quando consideradas as localizações de tumores HPV positivo em cavidade oral e em orofaringe.

No presente estudo, a sobrevida global foi maior para os pacientes tabagistas, com aproximadamente cinco anos e meio, contra aproximadamente quatro anos para os não tabagista e aproximadamente dois anos para os HPV

positivo. A sobrevida específica da doença também foi maior para os tabagistas, com aproximadamente seis anos de sobrevida, para os não tabagistas a sobrevida específica foi de aproximadamente quatro anos e meio e para os HPV positivo foi de aproximadamente dois anos. Houve relação estatística ao considerar o tempo até o óbito pela neoplasia entre os tabagistas e HPV positivo, assim, o paciente com a presença do HPV que foi á óbito pela neoplasia apresentou menor intervalo de tempo desde o tratamento até o óbito, portanto, pior prognóstico em relação aos pacientes tabagistas. Esse resultado confronta com a literatura, a qual descreve o CCP HPV positivo com melhor prognóstico. Sabe-se que o tumor HPV positivo é uma neoplasia mais indiferenciada, que responde melhor ao tratamento radioterápico e pode apresentar prognóstico mais favorável (EL-MOFTY, 2007; SAINI et al., 2009). Entretanto, no nosso trabalho todos os pacientes foram submetidos ao tratamento cirúrgico, e nem todos foram submetidos ao tratamento radioterápico, e esse fator pode ter interferido nesse resultado prognóstico.

O óbito, tanto pela neoplasia ou por qualquer causa, ocorreu em menos da metade de todos os pacientes e também não houve diferença estatística entre os grupos. Também não houve diferença de sobrevida, global ou específica da doença, em relação ao estadiamento e ao sítio anatômico tumoral. Apesar de não ter sido observada diferença nas curvas de sobrevidas global e específica da doença entre os grupos HPV positivo e HPV negativo, estudos mostram que os pacientes acometidos pelo HPV apresentam melhor prognóstico, incluindo a sobrevida global e a sobrevida livre de doença (SEIWERT et al., 2014). Ritchie et al. (2003) encontrou relação significativa quanto a sobrevida global considerando a presença do HPV em CCP de cavidade oral e orofaringe, mas não encontrou diferença quanto à sobrevida específica da doença.

O atual estudo mostra que o indivíduo com CECCP que não fuma apresenta um prognóstico mais reservado, podendo atribuir esse prognóstico aos pacientes HPV positivo. Entretanto, mais estudos com amostra mais significativa deverão contribuir com esses achados, pois, a maior parte dos

trabalhos até o momento compara apenas os pacientes HPV positivo e negativo, mas não excluem outros fatores de risco, como o cigarro.

6. Conclusões

Esse estudo do CECCP comparando os pacientes tabagistas, não tabagistas e HPV positivo concluiu:

- Os tumores dos pacientes fumantes, acometeram mais o sexo masculino, esses pacientes apresentaram-se mais jovens que os não fumantes no momento do diagnóstico da doença, e o sítio anatômico tumoral foi principalmente a laringe nos pacientes tabagistas, e nos não tabagistas, foi a cavidade oral.

- Os pacientes tabagistas com CECCP possuem melhor prognóstico quando comparados aos não tabagistas. Apresentaram menor taxa de recidiva tumoral, maior tempo livre de doença e maior tempo de vida até o óbito pela doença ou por outra causa.

- Os pacientes tabagistas apresentaram menor possibilidade de óbito pela neoplasia quando submetidos ao tratamento combinado de cirurgia com radioterapia. E ainda, os pacientes HPV positivo apresentaram resposta menos satisfatória ao tratamento cirúrgico e radioterápico, quando comparados ao restante da amostra, tabagistas e HPV negativo.

- Os pacientes HPV positivo apresentaram menor tempo entre o tratamento da doença até o óbito pela neoplasia do que os tabagistas, a localização tumoral foi principalmente a cavidade oral e a orofaringe e o tumor acometeu mais o sexo feminino. Não foi possível estabelecer relação prognóstica desse grupo com os demais, pois as curvas de sobrevida não mostraram diferença.

7. Referências Bibliográficas

AGRA, I. M. Recidiva local de carcinomas epidermóides da boca e orofaringe: estudo de variáveis anatomopatológicas e de marcadores biológicos associados ao prognóstico em pacientes submetidos a cirurgia de resgate. *Radiol. Bras.*, v. 40, n. 5, p. 354, 2007.

AGRAWAL, Y. et al. Oral HPV infection before and after treatment for HPV16-positive and negative head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, v. 1, n.14, p.7143-7150, 2008.

ALVARENGA, M.L. et al. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, v. 74, n. 1, p. 68-73, 2008.

ANG, K.K. et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New Engl. J. Medicine*, v. 363, p. 24-35, 2010.

BISHT, M.; BIST, S.S. Human papilloma virus: a new risk factor in a subset of head and neck cancers. *J. Cancer Res. Ther.*, v. 7, n. 3, p. 251-255, 2011.

BLOT, W.J. et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.*, v. 48, n. 11, p. 3282-3287, 1988.

CAMPANA, I.G.; GOIATO, M.C. Tumores de cabeça e pescoço: epidemiologia, fatores de risco, diagnóstico e tratamento. *Rev. Odontol.*, v. 34, n. 1, p. 20-26, 2013.

CAMPISI, G.; GIOVANNELLI, L. Controversies surrounding human papilloma virus infection, head & neck vs oral cancer, implications for prophylaxis and treatment. *Head & Neck Oncology*, v.1, n.8, 2009.

Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, v. 517, p. 576-582, 2015.

CASTRO, T.P.P.G.; BUSSOLOTI, I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, v. 72, n. 2, p. 272-282, 2006.

CHEN, C.C.; LIN, J.C.; CHEN, K.W. Lymph node ratio as a prognostic factor in head and neck cancer patients. *Radiation Oncology*, v. 10, p. 181, 2015.

CHEN, X. et al. Combined effects of the p53 codon 72 and p73 G4C14-to-A4T14 polymorphisms on the risk of HPV 16 – associated oral câncer in never-smokers. *Carcinogenesis*, v. 29, n. 11, p. 2120-2125, 2008.

COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações Genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Rev. Brasileira de Cancerologia*, v. 55, n.2, p. 165-174, 2009.

COLOSISMO, E. A. Análise de Sobrevida Aplicada, 2006.

Referências Bibliográficas

COMBES, J.D.; CHEN, A.A.; FRANCESCHI, S. Prevalence of Human Papillomavirus in Cancer of the Oropharynx by Gender. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 23, n. 12, p. 2954-2958, 2014.

DALIANIS, T. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (Review). *J. Oncology*, v. 44, n. 6, p. 1799-1805, 2014.

DOBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer and Metastasis Rev.*, v. 24, p. 9-17, 2005.

EL-MOFTY, S. K. Human papillomavirus (HPV) related carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Head and Neck Pathol*, v. 1, p. 181-185, 2007.

FERRARO, C.T.L. et al. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v.47, n.4, 2011.

FERRAZ, L.C; SANTOS, A.B.R.; DISCACCIATI, M.G. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. *J Health Sci. Inst.*, v. 30, n. 2, p. 107-111, 2012.

FERREIRA ANTUNES, J. L. et al. Joint and independent effects of alcohol drinking and tobacco smoking on oral cancer: a large case-control study. *PLoS One*, v. 8, n.7, 2013.

GALBIATTI, A.L.S. et al. Câncer de cabeça e pescoço: causas, prevenção e tratamento. *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, v. 79, n. 2, 2013.

GREENE, F.L. et al. *AJCC Cancer Staging Handbook*, ed. 6, New York: Springer; p. 17-47, 2002.

HASHIBE, M. et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 18, p. 541-550, 2009.

HÜBBERS, C.U.; AKGÜL, B. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence*, v. 6, n. 3, p. 244-248, 2015.

IARC – Globocan 2012. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em (<http://globocan.iarc.fr/>). Acesso em 10/09/2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer/Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, INCA, 2011. Disponível em (http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf). Acesso em 10/09/2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro, INCA, 2015. Disponível em

(<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>). Acesso em 10/09/2016.

INTERNACIONAL HUMAN PAPILLOMAVIRUS REFERENCE CENTER, 2016. Disponível em (<http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>). Acesso em 10/09/2016.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics.CA. Cancer Journal for Clinicians, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.

Jl, X. et al. P53 codon 72 polymorphism associated with risk of human papillomavirus-associated squamous cell carcinoma of the oropharynx in never-smokers. Carcinogenesis, v. 29, n. 4, p. 875-879, 2008.

KEARNEY, et al. Salvage Resection for Isolated Local and/or Regional Failure of Head/Neck Cancer Following Definitive Concurrent Chemoradiotherapy Case Series and Review of the Literature.Mcgill J Med., v. 13, n, 2, p.29, 2011.

KECK, M.K. et al. Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. Clin. Cancer Res., v. 21, n. 4, p. 870-881, 2015.

KHODE, S.R. et al. Exploring the link between human papilloma virus and oral and oropharyngeal cancers. J. Cancer Res. Therapeutics, v. 10, n. 3, p. 492-498, 2014.

KHOT, K.P.; DESHMANE, S.; CHOUDHARI, S. Human Papilloma Virus in Oral Squamous Cell Carcinoma - The Enigma Unravalled. Chin. J. Dent. Res., v. 19, n. 1, p. 17-23, 2016.

KREIMER, A.R. et al. Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. J. Infect. Dis., v. 189, p 686-698, 2004.

KRUGER, M. et al. The prevalence of human papilloma virus (HPV) infections in oral squamous cell carcinomas: a retrospective analysis of 88 patients and literature overview. J Craniomaxillofac. Surg., v. 42, n. 7, p. 1506-1514, 2014.

KUMAR, R. et al. Alcohol and tobacco increases risk of high risk HPV infection in head and neck cancer patients: study from north-east region of India. PLoS One, v. 10, n. 10, 2015.

LARSEN, C.G. et al. Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. British Journal of Cancer, v. 110, p. 1587-1594, 2014.

LA VECCHIA, C. et al. Smoking and cancer with emphasis on Europe. Eur. J. Cancer, v. 27, n. 1, p. 94-104, 1991.

LEE, Y.C.; HASHIBE, M. Tobacco, alcohol, and cancer in low and high income countries. Annals of Global Health, v. 80, n. 5, p. 378-383, 2014.

LEHMANN, E. L. Nonparametrics: Statistics methods based on ranks, 1975.

LEWIS, A. et al. The new face of head and neck cancer: the HPV epidemic. *J. Oncology*, v. 29, n.9, p. 616-626, 2015.

LOHAVANICHBUTR, P. et al. Genome-wide gene expression profiles of HPV-positive and HPV negative oropharyngeal cancer: potential implications for treatment choices. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, v. 135, n. 2, p. 180-188, 2008.

MAASLAND, D. H. et al. Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*, v. 14, p. 187, 2014.

MANNARINI, L. et al. Human Papilloma Virus (HPV) in head and neck region: review of literature. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, v. 29, p. 119-126, 2009.

MAROTTI, M. Quais são os objetivos clínicos que determinam a eficácia dos tratamentos em oncologia? *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 53, n. 6, 2007.

MARUR, S.; FORASTIERE, A.A. Head and Neck Cancer: Changing Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin.Proc.*, v. 83, p. 489-501, 2008.

MATOS, L.L.; MIRANDA, G.A.; CERNEA, C.R. Prevalence of oral and oropharyngeal human papillomavirus infection in Brazilian population studies: a systematic review. *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, v. 81, p. 554-567, 2015.

MENEZES, A.M.B. et al. Risco de câncer de pulmão, laringe e esôfago atribuível ao fumo. *Rev. Saúde Pública*, v.36, n.2, 2002.

MESQUITA, R.A. et al. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica de PCR. *Pesqui. Odontol. Bras.*, v. 15, n. 4, p. 314-319, 2001.

MICHL, P. et al. Human Papillomavirus in the Etiology of Head and Neck Carcinomas. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub.*, v. 154, n. 1, p. 9-12, 2010.

MOORE, K.M.; MEHTA, V. The Growing Epidemic of HPV-Positive Oropharyngeal Carcinoma: A Clinical Review for Primary Care Providers. *J. Am. Board Fam. Med.*, v. 28, n. 4, p. 498-503, 2015.

MONTORO, J.R.M.C. et al. Fatores prognósticos no carcinoma espinocelular de cavidade oral. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, v. 74, n. 6, p. 861-866, 2008.

NASCIMENTO, E.M. et al. Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 39, n. 3, 2003.

NAZ, S. et al. Head and neck squamous cell carcinoma - comparative evaluation of pathological parameters in young and old patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, v. 16, n. 9, p. 4061-4063, 2015.

PARFENOV, M. et al. Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, p. 43, 2014.

RADOI, L. et al. Population attributable risks of oral cavity cancer to behavioral and medical risk factors in France: results of a large population-based case-control study, the ICARE study. *BMC Cancer*. v. 15, p. 827, 2015.

RAGIN, C.C.; TAIOLI, E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer*., v.121, p. 1813-1820, 2007.

RINGSTRÖM, E. et al. Human Papillomavirus Type 16 and Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clinical Cancer Research*, v. 8, p. 3187-3192, 2002.

RITCHIE, J.M. et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Internacional J. Cancer*, v. 104, n. 3, p. 336-344, 2003.

RUIZ, T.M. et al. Epidemiologia e biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço. *Arq. Ciênc. Saúde*, v. 13, n. 1, p. 34-38, 2006.

SAHEB JAMEE, M. et al. Human papillomavirus in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 1, n. 14, p. 525-528, 2009.

SAHU, N.; GRANDIS, J. R. New advances in molecular approaches to head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Drugs*, v. 22, p. 656-664, 2011.

SAIKI, R.K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAINI, R. et al. Single-tube seminested PCR assay for detecting human papillomavirus in clinical samples. *The Open Microbiology Journal*, v. 3, p. 106-112, 2009.

SALAZAR, C.R. et al. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma survival: a comparison by tumor site and initial treatment. *Head and Neck Pathol.*, v. 8, n. 1, p. 77-87, 2014.

SARTOR, S. G. et al. Riscos ocupacionais para o câncer de laringe: um estudo caso-controle. *Cad. Saúde Pública*, v. 23, n. 6, p. 1473-1481, 2007.

SCHWARTZ, S.M., et al. O risco de câncer oral em relação à história sexual e evidência de infecção pelo papilomavírus humano. *J Natl. Cancer Inst.*, v. 90, p. 1626-1636, 1998.

SEIWERT, T.Y. et al. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clinical Cancer Res.*, v. 21, n. 4, p. 870-881, 2014.

SETHI, S. et al. Characteristics and survival of head and neck cancer by HPV status: a cancer registry-based study. *Internacional J. Cancer*, v. 131, n. 5, p. 1179-1186, 2012.

SHAH, J. P.; CANDELA, F. C., PODDAR, A, K. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer.*, v. 66, p. 109-113, 1990.

SOMMERFELD et al., C. E. et al. Qualidade de vida em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. *Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço*, v. 41, n. 4, p. 172-177, 2012.

SOUZA, T.R.B.; GONÇALVES, A.J. Papilomavirus humano e a detecção do DNA viral no carcinoma espinocelular de cavidade oral. *Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço*, v. 38, n. 1, p. 62-66, 2009.

SYRJÄNEN, K. et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*, v. 12, n. 6, p. 418-24, 1983.

TERMINE, N. et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: meta-analysis (1988-2007). *Annals of Oncology, Italy*, v. 19, p. 1681-1690, 2008.

TRIBIUS, S.; HOFFMANN, M. Human papilloma virus infection in head and neck cancer. *Dtsch. Arztebl. Int.*, v. 110, n. 11, p. 184-190, 2013.

WEINBERGER, P.M. et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus–associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J. Clinical Oncology*, v. 24, p. 736-747, 2006.

WESTRA, W. H. The Changing Face of Head and Neck Cancer in the 21st Century: The Impact of HPV on the Epidemiology and Pathology of Oral Cancer. *Head and Neck Pathol*, v.3, p.78-81, 2009.

8. Anexos

ANEXO 1 - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

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

www.hcrp.usp.br

Ribeirão Preto, 06 de julho de 2011

Ofício nº 2330/2011
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado "ATRIBUIÇÃO DO GENÓTIPO DO HPV EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO: ESTUDO EM NÃO FUMANTES" foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 327ª Reunião Ordinária realizada em 04/07/2011 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 5724/2011.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS datada de 21 de março de 2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente,

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

VIVIAN REGINA AFFONSO

PROF. DR. RUI CELSO MARTINS MAMEDE (Orientador)

Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA - 0000 2733; IRB - 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO 2 - Termo de Consentimento

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

Campus Universitário - Monte Alegre
Fone/Fax: (16) 602-2353

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**“Marcadores Moleculares no Carcinoma Espinocelular de Cabeça e Pescoço”**

Eu _____, abaixo-assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que tratam do Projeto de pesquisa intitulado “Marcadores Moleculares no Carcinoma Espinocelular de Cabeça e Pescoço”, especialmente no que diz respeito aos objetivos da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. Após a cirurgia com a retirada do tumor, o mesmo (o tumor) fará parte de uma pesquisa que tem como objetivo procurar alterações nas células dos tumores.
2. A cirurgia será realizada independentemente da sua participação na pesquisa, e a pesquisa não influenciará de modo algum o tipo de tratamento. Após a retirada do tumor nós retiraremos apenas 0,5 cm do tumor para estudar estas alterações. Também serão coletados 5ml (1 colher de sopa) de sangue de sua veia durante a cirurgia.
3. Não haverá riscos nem desconforto para você, pois retiraremos o pedaço do tumor somente após a cirurgia e o sangue será coletado enquanto você estiver anestesiado.
4. Com esta pesquisa esperamos encontrar alterações que possam ajudar no diagnóstico e tratamento dos tumores de cabeça e pescoço.
5. Não haverá despesas para você.
6. Você será acompanhado das maneiras normais no serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMRP, independentemente da participação ou não na pesquisa.
7. A pesquisa não oferece danos a você e comprometemos que será mantido total sigilo sobre sua identidade e que em qualquer momento poderá desistir que estes dados sejam utilizados na presente pesquisa.

Paciente ou Responsável

Ribeirão Preto, ____/____/____.