ALEXANDRE BEZERRA DOS SANTOS

Carcinoma epidermoide da via aerodigestória alta
em pacientes com idade inferior a 40 anos:
análise clínica e molecular

Tese apresentada à Faculdade de

Medicina da Universidade de São Paulo

para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Pedro Michaluart Junior

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Alexandre Bezerra dos

Carcinoma epidermoide da via aerodigestória alta em pacientes com idade inferior a 40 anos : análise clínica e molecular / Alexandre Bezerra dos Santos. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientador: Pedro Michaluart Junior.

Descritores: 1.Neoplasias de cabeça e pescoço 2.Carcinoma de células escamosas 3.Adulto jovem 4.Hábito de fumar 5.Alcoolismo 6.Infecções por papillomavirus 7.Imunoistoquímica 8.Análise de sobrevida

USP/FM/DBD-172/13

Essa Tese é dedicada à memória do meu orientador
e querido amigo, Pedrão, vítima de semelhante doença
em idade jovem, muito jovem.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Michaluart Jr, grande exemplo de figura humana, por sua imensa capacidade técnica, por me receber em sua linha de pesquisa e, especialmente, por sua dedicação demonstrada mesmo em momentos de adversidade.

À amiga Dra. Raquel Ajub Moysés, que trilhou o meu caminho em absolutamente todos os passos desta pesquisa, portando-se como uma autêntica co-orientadora deste projeto.

À minha companheira, Dani, por sua compreensão em todos os momentos de privação do convívio social devido à dedicação que este trabalho exigiu.

À Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury que, além de responder por toda a análise histopatológica deste trabalho, ainda demonstrou talento em ensinar a arte da patologia com tamanha dedicação.

Ao Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, por abrir-me as portas do Laboratório do Departamento de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, possibilitando a realização de toda a parte prática desta pesquisa, bem como os biólogos Juvani Lago Saturno e Maria Elisa dos Santos pelos ensinamentos e preparo das reações de imunoistoquímica, e à pesquisadora Michella Bezerra Lima, pelos ensinamentos e preparo da extração de DNA e realização do PCR.

Ao Prof. José Eduardo Levi e à pesquisadora Luciana Reis Rosa, pela realização da pesquisa para o HPV, em caráter circunstancial.

Ao Prof. Dr. Vergilius Araujo Filho, e aos Drs. Fabio Luiz de Menezes Montenegro, Dr. Fabio Roberto Pinto, Dr. Gilberto de Castro Junior e Dra. Patricia Severino, por suas inestimáveis contribuições por ocasião da qualificação desta tese.

À Prof. Dra. Sheila Carvalho e Dra. Juliana Robba, bem como as técnicas Sandra e Esmeralda, do laboratório de Imuno da FMUSP, pelas reações do p16.

Ao Museu de Patologia da FMUSP, na figura do Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, e à técnica Ana Luiza Barreiros Silveira, pela digitalização das imagens histopatológicas.

À toda a Equipe GENCAPO, do qual este estudo é fruto, pela dedicação e esforço de todos os membros participantes, especialmente a ilustre figura da Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara, líder desse grupo e exemplo de atenção a todos; e à estatística Rossana Verônica López, por toda a atenção no decorrer de todas as análises.

Ao Prof. Lenine Garcia Brandão, Titular da nossa Disciplina, por seu exemplo e incentivo à constante busca do aperfeiçoamento de cada um.

À Dra. Marilia D'Elboux Guimarães Brescia, por sua cautelosa revisão deste trabalho.

Ao Dr. Leandro Luongo de Matos, por sua inestimável contribuição à revisão e conselhos acerca da metodologia e análise estatística desta tese.

Aos meus chefes, Dr. Marco Aurélio Valmondes Kulscar e Dra. Jossi Ledo Kanda, bem como meus colegas de trabalho Dr. Flavio Hojaij, Caio Plopper, Felipe Vanderlei, Renato Gotoda, e Christiana Vanni, pela eterna compreensão.

À minha família, sobretudo, meus pais, pelo constante e inabalável apoio.

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias / elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. – São Paulo : Divisão de Biblioteca e Documentação - DBD/FMUSP, 2011.

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

SUMARIO

Lista de Siglas e Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. CARCINOMA EPIDERMOIDE DE CABEÇA E PESCOÇO.....	4
3.1.1. EPIDEMIOLOGIA.....	4
3.1.2. FATORES DE RISCO.....	4
3.1.2.1. TABAGISMO.....	4
3.1.2.2. ETILISMO.....	5
3.1.2.3. HPV.....	6
3.1.2.4. OUTROS FATORES.....	10
3.2. MARCADORES MOLECULARES.....	11
3.2.1. O CICLO CELULAR.....	11
3.2.2. p53.....	13
3.2.3. Ki-67.....	15
3.2.4. p16.....	16
3.2.5. FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF).....	17
3.2.6. RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR).....	18
3.3. CARCINOMA EPIDERMOIDE EM PACIENTES COM IDADE INFERIOR A 40 ANOS.....	19
3.3.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	19

3.3.2. APRESENTAÇÃO CLÍNICA.....	20
3.3.3. ASPECTOS MOLECULARES.....	20
3.3.4. HPV.....	21
4. MÉTODOS.....	22
4.1. SELEÇÃO DE PACIENTES	22
4.2. ÉTICA.....	22
4.3. COLETA DE DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS.....	23
4.4. COMPARAÇÃO DE PACIENTES POR ANÁLISE POR PAREAMENTO.....	24
4.5. ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	24
4.6. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	25
4.7. IMUNOISTOQUÍMICA.....	25
4.7.1. ELABORAÇÃO DAS LÂMINAS.....	25
4.7.2. QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO.....	27
4.7.2.1. p53.....	28
4.7.2.2. Ki-67.....	28
4.7.2.3. p16.....	28
4.7.2.4. VEGF.....	29
4.7.2.5. EGFR.....	29
4.8. PESQUISA DO GENE DO PAPILOMAVIRUS HUMANO.....	29
4.8.1. EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO PARAFINADO.....	29
4.8.2. GRAU DE PUREZA E QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	31
4.8.3. PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO HPV.....	31
4.8.4. PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE CONTROLE.....	32
4.8.4.1. PCR CONVENCIONAL.....	32
4.8.4.2. PCR EM TEMPO REAL.....	32
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4.10. CASUÍSTICA.....	34
4.10.1. DESCRIÇÃO DA AMOSTRA TOTAL DE PACIENTES.....	34

4.10.2. DESCRIÇÃO DA AMOSTRA PAREADA.....	38
5. RESULTADOS.....	40
5.1. ANÁLISE DOS CASOS POR PAREAMENTO.....	40
5.1.2. DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS.....	40
5.1.3. MARCADORES BIOLÓGICOS.....	42
5.1.3.1. p53.....	42
5.1.3.2. Ki-67.....	43
5.1.3.3. p16.....	45
5.1.3.4. VEGF.....	46
5.1.3.5. EGFR.....	47
5.1.4. HPV.....	49
5.1.4.1. HPV16E7.....	49
5.1.4.2. HPV18E7.....	50
5.5. HÁBITOS.....	50
5.2. TABAGISMO.....	50
5.3. ETILISMO.....	52
5.4. SOBREVIDA.....	53
5.4.1 SOBREVIDA GLOBAL.....	53
5.4.1.2. SOBREVIDA GLOBAL POR LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA E FAIXA ETÁRIA.....	54
5.4.1.3. SOBREVIDA GLOBAL POR ESTÁDIO CLÍNICO E FAIXA ETÁRIA.....	56
5.4.2. SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA.....	58
5.4.2.1 SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA POR LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA E FAIXA ETÁRIA.....	60
5.4.2.2. SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA POR ESTÁDIO CLÍNICO E FAIXA ETÁRIA.....	62
5.4.3. REGRESSÃO DE COX.....	63
6. DISCUSSÃO.....	67
6.1. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	79
7. CONCLUSÕES.....	82

8. ANEXOS.....	83
9. REFERÊNCIAS.....	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

100x, 200x, 400x	Aumento de 100, 200, 400 vezes (Microscopia Óptica)
ADH	<i>Alcohol dehydrogenase</i> (álcool desidrogenase)
ALDH2	<i>Aldehyde dehydrogenase</i> (aldeído desidrogenase 2)
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP
cDNA	DNA complementar
CDK	<i>Cyclin-Dependent-Kinases</i> (Quinases Ciclina-Dependentes)
CECP	Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço
CECPs	Carcinomas Epidermoides de Cabeça e Pescoço
CKI	<i>Cyclin-dependant Kinase Inhibitor</i> (Inibidores de Quinases Ciclina-Dependentes)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAB	3,3 Diaminobenzina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora

E1,...E7	do inglês <i>Early</i> (genes “precoces” do HPV)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Epidérmico)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico)
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
G1	Fase G1, do inglês <i>Gap 1</i> (intervalo entre fases M e S)
G2	Fase G2, do inglês <i>Gap 2</i> (intervalo entre fases S e M)
GENCAPO	<i>Brazilian Head and Neck Genome Project</i>
GLOBOCAN	<i>Cancer Incidence and Mortality Worldwide</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo
HPV	<i>Human Papilloma Virus</i> (Papilomavirus Humano)
HPV+	positivos para o HPV
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
HR	<i>High Risk</i> (Alto Risco)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisas em Câncer)

IMC	Índice de Massa Corpórea
IMHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INK4	<i>Inhibitor of CDK4</i>
L1, L2	do inglês <i>Late</i> (genes “tardios” do HPV)
LR	<i>Low Risk</i> (baixo risco)
M	fase M, de Mitose
MDM2	<i>Murine Doble Minute 2</i>
MO	Microscopia Óptica
PBS	tampão fosfato de sódio
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de Polimerase em Cadeia)
PK	Proteinase K
pRb	Proteína do Retinoblastoma
Prof.	Professor
Profa.	Professora
Ref.	Referência
RDT	Radioterapia
RNA	Ácido Ribonucléico

S	Fase S, de Síntese
SEADE	Sistema Estadual de Análise de Dados
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
Taq polimerase	Polimerase de DNA, primariamente identificada em bactérias <i>Thermus aquaticus</i>
TNM	Sistema TNM de Classificação de Tumores Malignos
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
VADA	Via Aerodigestória Alta
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Endotelial)
VPF	<i>Vascular Permeability Factor</i> (Fator de Permeabilidade Vascular)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
<	menor que
≥	maior ou igual que
=	igual a
®	marca registrada
°C	graus Celsius
μL	microlitro
μm	micrômetro
kDa	kilodalton
M	mol
mL	mililitro
mM	milimol
ng	nanograma
p	nível descritivo
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
UI	unidades internacionais

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características sociodemográficas da amostra total de pacientes	35
Tabela 2.	Distribuição conforme hábitos na amostra total de pacientes.....	35
Tabela 3.	Características clínicas da amostra total de pacientes.....	36
Tabela 4.	Características patológicas da amostra total de pacientes.....	37
Tabela 5.	Dados raciais dos casos pareados.....	38
Tabela 6.	Localização e estadiamento dos casos pareados.....	39
Tabela 7.	Características anatomopatológicas dos casos pareados: tamanho, espessura, diferenciação e profundidade.....	40
Tabela 8.	Características anatomopatológicas dos casos pareados: invasão vascular, linfática e perineural; infiltrado inflamatório peritumoral.....	41
Tabela 9.	Comparação: p53, tumor e margem.....	42
Tabela 10.	Comparação: Ki67, tumor e margem não tumoral.....	43
Tabela 11.	Comparação: valor do p16.....	45
Tabela 12.	Comparação: VEGF tumor e margem.....	47
Tabela 13.	Comparação: EGFR tumor e margem.....	49
Tabela 14.	Distribuição dos casos segundo tabagismo e faixa etária.....	51
Tabela 15.	Carga de tabaco entre <40 e ≥40 anos.....	51
Tabela 16.	Distribuição dos casos segundo etilismo e faixa etária.....	52
Tabela 17.	Gramas de etanol/ano, entre <40 e ≥40 anos.....	52
Tabela 18.	Probabilidade de sobrevida global.....	53
Tabela 19.	Probabilidade de sobrevida global segundo localização do tumor e faixa etária.....	54
Tabela 20.	Cavidade oral: Probabilidade de sobrevida global segundo estágio clínico e faixa etária.....	56
Tabela 21.	Laringe: Probabilidade de sobrevida global segundo estágio clínico e faixa etária.....	57

Tabela 22.	Orofaringe: Probabilidade de sobrevida global segundo estágio clínico e faixa etária.....	57
Tabela 23.	Probabilidade de sobrevida livre de doença.....	58
Tabela 24.	Probabilidade de sobrevida livre de doença segundo localização do tumor e faixa etária.....	60
Tabela 25.	Cavidade oral: Probabilidade de sobrevida livre de doença segundo estágio clínico e faixa etária.....	62
Tabela 26.	Laringe: Probabilidade de sobrevida segundo estágio clínico e faixa etária.....	62
Tabela 27.	Orofaringe: Probabilidade de sobrevida segundo estágio clínico e faixa etária.....	63
Tabela 28.	Regressão de Cox univariada.....	64
Tabela 29.	Regressão de Cox múltipla.....	65

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Marcação nuclear pelo p53 em amostra tumoral (MO, 400x)	42
Fig. 2	Marcação nuclear pelo p53 em amostra não tumoral (MO, 200x).....	43
Fig.3	Representação do gráfico de caixas (<i>boxplot</i>) para o Ki-67 em tumor e margem entre pacientes com ≤ 40 de anos e >40 anos.....	44
Fig. 4.	Marcação nuclear pelo Ki-67 em amostra tumoral (MO, 100x).....	44
Fig. 5.	Marcação nuclear pelo Ki-67 em amostra não tumoral (MO, 400x).....	45
Fig. 6.	Marcação citoplasmática e nuclear pelo p16 (MO, 200x).....	46
Fig. 7.	Marcação citoplasmática pelo VEGF em amostra tumoral (MO, 100x).....	46
Fig. 8.	Marcação citoplasmática pelo VEGF em amostra não tumoral (MO, 200x).....	47
Fig. 9.	Marcação de membrana pelo EGFR em amostra tumoral (MO, 400x).....	48
Fig.10.	Marcação de membrana pelo EGFR em amostra não tumoral (MO, 100x).....	48
Fig. 11.	Curvas de Amplificação HPV16E7: Controle Positivo e Amostras.....	49
Fig. 12:	Curvas de Amplificação HPV18E7: Controle Positivo e Amostras.....	50
Fig.13.	Representação gráfica da curva de sobrevida global.....	53
Fig.14.	Representação gráfica da sobrevida global segundo faixa etária.....	54
Fig.15.	Representação gráfica das curvas de sobrevida global para cavidade oral e faixa etária.....	55
Fig. 16.	Representação gráfica das curvas de sobrevida global para laringe e faixa etária.....	55
Fig.17.	Representação gráfica da sobrevida global para orofaringe e faixa etária.....	56
Fig. 18.	Representação gráfica da sobrevida livre de doença.....	58
Fig. 19.	Representação gráfica das curvas de sobrevida livre de doença segundo faixa etária.....	59
Fig. 20.	Representação gráfica das curvas de sobrevida livre de doença no primeiro ano.....	59
Fig. 21.	Representação gráfica das curvas de sobrevida livre de doença para cavidade oral e faixa etária.....	60

Fig.22. Representação gráfica das curvas de sobrevida livre de doença para laringe e faixa etária.....	61
Fig.23. Representação gráfica das curvas de sobrevida livre de doença para orofaringe e faixa etária.....	61
Fig. 24. Representação gráfica das curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para faixa etária e estadiamento.....	66

RESUMO

Santos, AB. Carcinoma Epidermoide de Via Aerodigestória Alta em pacientes com idade inferior a 40 anos: Análise Clínica e Molecular. [tese]. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2013.

O carcinoma epidermoide da região da cabeça e pescoço (CECP) é uma doença de alta prevalência, no Brasil e no mundo, e com grande impacto na qualidade de vida dos pacientes. Mais frequentemente, ocorre em pacientes ao redor da sexta década de vida, com longo histórico de tabagismo e etilismo. Nota-se, porém, um importante aumento na sua incidência em uma população mais jovem, em geral sem histórico de exposição duradoura aos fatores de risco clássicos, o que nos faz questionar se não se trata de uma doença de características distintas. Os objetivos deste estudo foram avaliar aspectos demográficos, clínicos e anatomopatológicos de pacientes com CECP em uma faixa etária inferior a 40 anos, comparando-os com pacientes de maior idade, especialmente em relação à sobrevida, exposição a fatores de risco, expressão de marcadores biológicos em amostras tumorais e não tumorais (margens livres de doença), bem como a presença do Papilomavirus Humano (HPV). Realizou-se estudo transversal de pacientes com carcinomas de cavidade oral (exceto lábio), orofaringe, laringe e hipofaringe, prospectivamente incluídos em um banco de tumores de CECP no período de 2002 a 2010 pelo grupo de pesquisa GENCAPO. Foram coletados dados demográficos, clínicos e patológicos para ambos os grupos de doentes, e realizou-se uma análise por pareamento em relação aos marcadores imunoistoquímicos p53, Ki-67, EGFR, VEGF e p16, em amostras tumorais e de mucosas normais. As análises de sobrevida global e livre de doença, bem como as comparações entre o tabagismo e o

etilismo foram feitas com a população total da amostra. A incidência de tabagismo foi menor nos pacientes <40 anos ($p=0,048$), mas não a de etilismo ($p=0,079$), no entanto a carga tabágica foi menor entre os pacientes jovens ($p<0,0001$), bem como a carga etílica ($p=0,012$). As quantificações de imunoexpressão dos marcadores em amostras tumorais não foram diferentes entre os grupos para p53 ($p=0,535$), Ki-67 ($p=0,669$), EGFR ($p=0,074$), VEGF ($p=0,423$) e p16 ($p=0,125$). A análise de amostras não tumorais não mostrou diferença para os marcadores p53($p=0,570$), EGFR ($p=0,945$) e VEGF ($p=0,700$). A expressão de Ki-67 foi menor em pacientes <40 anos ($p=0,021$). O HPV tipo 16 foi positivo em um caso de orofaringe em uma paciente (entre cinco) <40 anos, e em nenhum caso de cavidade oral e de laringe. O HPV tipo 18 foi negativo em todos os casos, de ambos os grupos. Na análise de sobrevida, foi observado que a sobrevida global de toda a coorte não mostrou diferença entre os grupos ($p=0,754$), mesmo se estratificarmos para cavidade oral ($p=0,825$), laringe ($p=0,769$) e orofaringe ($p=0,891$). A sobrevida livre de doença também não foi diferente entre os grupos ($p=0,408$), mesmo em se estratificando para cavidade oral ($p=0,473$), laringe ($p=0,736$) e orofaringe ($p=0,510$) em cinco anos. No entanto, a sobrevida livre de doença foi menor em pacientes <40 anos no primeiro ano ($p=0,042$). Na análise univariada, o estágio avançado e o etilismo foram associados a maior risco de morte para todos os sítios ($p=0,010$) e, na análise multivariada, além do estágio avançado ($p=0,013$), o etilismo foi fator de maior risco de morte para os casos de câncer de Laringe ($p=0,024$). Assim, concluímos que o CECp em pacientes com idade <40 anos não foi diferente, em relação às características anatomopatológicas testadas, e à imunomarcagem para p53, Ki-67, EGFR, VEGF e p16 em relação aos CECps em pacientes ≥ 40 anos. O tabagismo e o etilismo foram menos intensos entre os pacientes <40 anos, e a positividade para o HPV foi muito baixa para todos os pacientes. A Sobrevida Global foi semelhante entre os

grupos, embora o paciente <40 anos tenha apresentado maior índice de recidivas precoces.

Descritores:

Neoplasias de Cabeça e Pescoço, Carcinoma de Células Escamosas, Adulto Jovem, Hábito de Fumar, Alcoolismo, Infecções por Papillomavirus, Imunoistoquímica, Análise de Sobrevida.

SUMMARY

Santos, AB. Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck in patients under 40 years: clinical and molecular analysis [thesis]. São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013.

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) is a major health problem, in Brazil and around the World, due to its prevalence and impact in the quality of life of these patients. It usually occurs in the 6th and 7th, with an intensive exposure to the tobacco and alcohol. However, an increasing number of patients under 40 years is being affected by these tumors, which raises the hypothesis of different features of the disease in younger patients. The objectives of this study were to test if demographic, clinical and pathological aspects of patients with HNSCC vary according to the age, by comparing them with older patients in terms of survival, alcohol and tobacco exposure, HPV positivity through polymerase chain reaction (PCR), and biomarkers in tumor and non-tumoral samples of the aerodigestive tract. We conducted a cross-sectional study of patients with oral cavity (lips excluded), oropharynx, hypopharynx and larynx prospectively included in a multi-institutional HNSCC tumor bank – GENCAPO, from February 2002 to March 2010. Demographic, clinical and pathological data were analyzed. Using matched-pair analysis, we compared young and older patients in relation to immunohistochemical staining of p53, Ki-67, EGFR, VEGF and p16 biomarkers in tumor and non-tumoral samples. Survival analyses, as well as exposition to tobacco and alcohol use, were performed taking into account the entire cohort. The incidence of tobacco use was lower in the young group ($p=0,048$), but not for alcohol use ($p=0,079$), and young patients had a lower lifelong cumulative exposure to tobacco ($p<0,0001$) and to alcohol ($p=0,012$). We found no differences in the staining of tumoral samples for p53 ($p=0,535$), Ki-67 ($p=0,669$), EGFR ($p=0,074$), VEGF ($p=0,423$) and p16 ($p=0,125$). The analysis of the non tumoral samples was not different for p53 ($p=0,570$), EGFR ($p=0,945$) and VEGF ($p=0,700$). Expression of Ki-67 was lower in the young group ($p=0,021$). Analysis of p16 in non tumoral sites was not performed. HPV type-16 was positive in one case (in five) of oropharynx tumor, and in none of the cases of oral cavity and larynx. HPV type-18 was negative in all cases. In the Survival Analysis, the global survival among groups was not different for the entire cohort ($p=0,754$), and considering the cases of oral cavity ($p=0,825$), larynx ($p=0,769$) and oropharynx ($p=0,891$). The Free-disease Interval in five years was also not different for the entire cohort ($p=0,408$), and in cases of oral cavity ($p=0,473$), larynx ($p=0,736$) and oropharynx ($p=0,510$). Nevertheless, the Free-disease survival in one year was lower in the young group ($p=0,042$, in the entire cohort. In the univariate analysis, the

late clinical stage was associated a risk for death in all of the sites ($p=0,010$). In the multivariated analysis, the late clinical stage was associated to higher risk for death ($p=0,013$) and, in the cases of tumors of larynx, the alcohol consume was associated to a higher risk for death ($p=0,024$). We conclude that the HNSCC in patients younger than 40 years was not different, in terms of histopathological aspects, immunoexpression for p53, Ki-67, EGFR, VEGF and p16, when compared with older patients. The tobacco and alcohol use was not so important among young patients, and the positivity for HPV was extremely low in both groups. The Overall Survive was similar among groups, although younger patients had a higher rate of early recurrence.

Descriptors: Head and Neck Neoplasms; Carcinoma, Squamous Cell, Young Adult; Human papillomavirus 16, Immunohistochemistry, Survival Analysis.

1. INTRODUÇÃO

O Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço (CECP) é uma doença neoplásica de linhagem epitelial que pode afetar diversos sítios anatômicos das Vias Aero-Digestórias Altas (VADA), com fatores etiológicos, epidemiológicos e terapêuticos em comum. Tem uma incidência global de mais de 500.000 casos por ano, sendo a quinta neoplasia maligna mais comum no mundo ¹. Em geral, acomete pacientes do sexo masculino, da sexta a oitava décadas de vida, com longa história de tabagismo e etilismo². No entanto, estudos tem mostrado um aumento da incidência em pacientes jovens³, onde a exposição ao álcool e ao tabaco muitas vezes não ocorre e, mesmo que ocorra, o faz com um tempo de exposição considerado demasiado curto para atingir a transformação maligna⁴. Assim, a falta de fatores de risco "clássicos" levou alguns autores a questionar se o CECP em pacientes jovens não se trata de uma entidade distinta⁵.

Desde o artigo original de Von Doersten⁶, que comparou a evolução de 155 pacientes portadores de CECP divididos por idade, muitos autores tem se dedicado ao tema. Porém, há muita discordância na literatura no que concerne ao prognóstico em pacientes jovens. Enquanto alguns autores encontraram prognóstico desfavorável para este grupo, com aumento da recidiva loco regional⁷ ou à distância⁸, outros observaram evolução semelhante⁹, e outros ainda encontraram maiores taxas de sobrevida¹⁰. Tamanha inconsistência entre esses resultados derivam de fato de esses estudos serem baseados em pequeno número de pacientes, e de não haver uma equivalência de tratamento entre os diferentes grupos, com uma tendência de maior agressividade no tratamento de pacientes em idade mais precoce¹¹.

Parte das discrepâncias entre esses estudos pode ser explicada pela crescente importância do Papillomavirus Humano (HPV-*Human Papilloma Virus*) no desenvolvimento do CECP. Observou-se, então, um novo perfil de pacientes, mais jovens, de maior status socioeconômico, menor tempo de exposição ao tabaco, maior número de parceiros sexuais e melhor prognóstico, mesmo em estádios mais avançados¹².

Diversos estudos tem se concentrado em fatores genéticos, relatando alterações de genes supressores de tumor em pacientes jovens¹³. A mutação do gene supressor tumoral p53 a alteração genética isolada mais frequentemente identificada em carcinomas¹⁴. Já em 1999, considerava-se que estudos genéticos seriam o próximo passo para esclarecer melhor os aspectos do CECP em paciente abaixo de quarenta anos¹⁵. Apesar de um significativo avanço no conhecimento da oncogenética desde então, ainda assim são escassos os estudos que relacionam o prognóstico de pacientes jovens com uma análise molecular de seus tumores.

A pesquisa de marcadores moleculares, mais especificamente os genes supressores de tumor p53 e p16, o marcador de proliferação Ki-67 e marcadores de invasividade e angiogênese EGFR e VEGF, associados à detecção do HPV através de pesquisa genética, formam o embasamento deste estudo que, associado a uma análise de sobrevida, tentarão fornecer informações relevantes a este subgrupo de doentes, cada vez mais acometidos pelo CECP.

2. OBJETIVOS

2.1. Comparar pacientes portadores de CECP em duas faixas etárias: abaixo de 40 anos, e com idade igual ou superior a 40 anos, em relação a:

2.1.1. Intensidade de Tabagismo e Etilismo

2.1.2. Características anatomopatológicas

2.1.3. Expressão dos marcadores imunoistoquímicos: p53, Ki-67, p16, EGFR e VEGF, em amostras neoplásicas e de tecidos não-tumorais

2.1.4. Positividade para o HPV

2.1.5. Sobrevidas Global e Livre de Doença

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

3.1.1. EPIDEMIOLOGIA

O câncer é a doença que mais causa óbitos no mundo, segundo a WHO (*World Health Organization*). No Brasil, segundo a estimativa do INCA (Instituto Nacional do Câncer) para o ano de 2012, o câncer de cavidade oral é o sétimo tipo mais incidente (excetuando-se pele não-melanoma), com mais de 14.000 casos novos, sendo mais de 8.000 apenas no estado de São Paulo. Na região Sudeste, é o quinto tipo mais comum em homens, e o nono entre mulheres. No estado de São Paulo, a incidência de câncer de cavidade oral é de 17,71 casos/100.000 pessoas do sexo masculino, e de 5,91 casos/100.000 pessoas do sexo feminino, sendo que, apenas na capital, essas taxas são de 15,38 e 5,81, respectivamente, o que significa uma projeção de aproximadamente 1.330 casos novos de carcinoma de cavidade oral em 2012, apenas na cidade de São Paulo.

3.1.2. FATORES DE RISCO

3.1.2.1. TABAGISMO

O tabagismo é praticado por mais de um bilhão de pessoas ao redor do mundo. Segundo a WHO, o uso do tabaco é o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer, causando 22% do total de mortes por esta doença. Desde o clássico estudo de Doll e Hill¹⁶, que mostrou estreita relação do tabagismo com o câncer de pulmão, muitos outros estudos mostraram associação com mais de 20 outros tipos de neoplasias malignas, segundo a Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (IARC – International Agency for Research on Cancer)¹⁷. Interessante ressaltar que a ocorrência

do tabagismo passivo, estudado desde a década de 1930, está bem demonstrada desde o pioneiro estudo epidemiológico prospectivo conduzido pelo Instituto de Pesquisa do Centro Nacional do Câncer do Japão, que demonstrou incidência de câncer de pulmão quase duas vezes maior em esposas de tabagistas¹⁸.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e do INCA, em um inquérito realizado em 2008 (Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios), constatou-se que 17,2% da população brasileira faz uso regular de tabaco, o que equivale a um total de 25 milhões de pessoas¹⁹. Nota-se, ainda, maior prevalência do tabagismo em populações de mais baixa renda.

Felizmente, observa-se redução do tabagismo no Brasil a partir de 1989, em todas as faixas etárias, em especial nos mais jovens, abaixo dos 45 anos nos homens e dos 35 anos nas mulheres²⁰.

3.1.2.2. ETILISMO

Ao longo dos séculos, o álcool é a substância capaz de causar dependência mais aceita em todas as sociedades. Seu uso leve e controlado apresenta benefícios, não apenas na esfera social, mas como cardiovasculares²¹. Porém, seu uso crônico e indiscriminado leva seus usuários a diversas doenças físicas e mentais de grande gravidade, com profundo impacto econômico e social.

Especificamente sobre potencial carcinogênico, há vasta documentação científica que comprova seu papel como fator de risco em diversos sítios do corpo humano, o que inclui a cavidade oral, laringe e faringe²². Vários mecanismos tem sido propostos para explicar esse potencial carcinogênico como: efeitos locais nas mucosas do trato gastrointestinal superior, efeito de solvente para o tabaco e outros carcinógenos,

indução de enzimas microssomais implicadas na carcinogênese, geração de radicais livres e produtos da peroxidação de lipídeos, deficiências nutricionais, em especial de vitaminas e minerais, e imunossupressão²³.

Do ponto de vista metabólico, o etanol é eliminado do corpo através de oxidação, inicialmente para acetaldeído, através da enzima álcool desidrogenase (do inglês, *alcohol dehydrogenase*, ADH), e depois para acetato, no fígado, através da enzima aldeído desidrogenase 2 (do inglês, *Aldehyde dehydrogenase*, ALDH2)²⁴. O acetaldeído interage com o DNA humano, e tem um potencial carcinogênico amplamente demonstrado em estudos experimentais²⁵. O gene da enzima ALDH2 pode apresentar um polimorfismo, de modo que o alelo mutante, o ALDH2*2, codifica uma subunidade enzimaticamente inativa²⁶. Como resultado, há uma diminuição da metabolização do acetaldeído, e seu consequente acúmulo. Deste modo, mostrou-se forte associação deste genótipo com o desenvolvimento de câncer de esôfago²⁷ e do CECP²⁸, embora o modo como essas alterações determinam a susceptibilidade individual ao desenvolvimento do câncer é desconhecida. A associação do genótipo ALDH2 foi fortemente associada a carcinomas de cavidade oral e orofaringe²⁹, principalmente em homens etilistas severos³⁰. Existem, ainda, diferenças no impacto deste genótipo nas diferentes localizações dos carcinomas, sendo a cavidade oral menos susceptível do que a faringe, o que provavelmente significa que outros fatores de risco, em especial o tabagismo, são preponderantes³¹.

3.1.2.3. HPV

A associação entre a infecção por HPV e o desenvolvimento de CECP foi sugerido há quase trinta anos³², e evidências posteriores mostram uma associação ainda mais clara na carcinogênese da orofaringe, em especial lojas tonsilares³³.

Diferentemente, porém, do câncer de colo uterino, a presença isolada do HPV não é necessária, tampouco suficiente, para justificar todos os casos, embora seja notável que, apesar de declínio do tabagismo da população em geral, tem havido aumento da incidência do Carcinoma de Orofaringe relacionado ao HPV (ou HPV+) ³⁴.

Os tumores HPV+ apresentam, ainda, características histopatológicas distintas, uma vez que a queratinização do epitélio escamoso, tão comum em pacientes com longo histórico de exposição ao tabaco e ao álcool, podem não estar presentes, o que justificou a caracterização de um fenótipo distinto de Carcinoma Espinocelular não-queratinizante³⁵³⁶. Além disso, diversos estudos mostram um comportamento biológico distinto dos tumores HPV +³⁷³⁸, em geral, mostrando melhor resposta aos tratamentos quimio e radioterápicos³⁹⁴⁰, radioterápicos isolados⁴¹⁴², ou cirúrgicos, seguidos ou não de radioterapia⁴³⁴⁴, mesmo com apresentações em estádios mais avançados e com envolvimento linfonodal⁴⁵.

Numerosos estudos sobre a incidência do HPV em casos de CECs de cabeça e pescoço mostram índices de positividade com uma variação de 0% a 100%, numa média de incidência oscilando entre 20 e 40%⁴⁶⁴⁷. A explicação para essa variância reside em dois fatores: diferenças na distribuição epidemiológica do HPV em regiões distintas do planeta, e diferenças de metodologia aplicada para a detecção da presença de Vírus⁴⁸⁴⁹.

A presença do HPV é mais frequente na orofaringe do que na cavidade oral⁵⁰, provavelmente devido à justaposição entre o epitélio neoplásico e tecido linfático que, à semelhança do trato genital feminino, apresenta criptas invaginantes que promovem uma grande superfície não queratinizada que facilita a penetração do vírus nas células basais⁵¹.

O HPV é um vírus pequeno, que se replica no núcleo das células escamosas. Seu DNA contém de 8.000 pares de bases, organizados em dupla-hélice contida em uma proteína esférica (cápside). Diferentemente de outros DNA-vírus, ele não cresce em culturas, e não se consegue isolá-los em pacientes infectados⁵². É altamente prevalente, e suas lesões podem permanecer subclínicas por longos períodos. Em alguns casos, no entanto, eles se ativam e produzem lesões epiteliais hiperproliferativas. Mais de 120 genótipos diferentes já foram isolados, sequenciados e filogeneticamente classificados, sendo que cada genótipo apresenta uma diferença de mais de 10%, em termos de sequência de DNA, comparados com os outros⁵³. Os chamados alfa-papilomavirus infectam os tratos ano-genital e aerodigestório alto, e são objetos de intensa pesquisa, uma vez que são sexualmente transmissíveis e estão relacionados a diversas doenças. São ainda classificados em duas categorias: os não-oncogênicos (ou *low risk, LR*), como os HPV tipo 6 e tipo 11, e os de potencial oncogênico (ou *High Risk, HR*), como os HPV tipo 16 e tipo 18⁵⁴.

Seu genoma pode ser dividido em duas regiões distintas: uma região “precoce” (*early*, ou E), que engloba as proteínas virais necessárias para a replicação, regulação transcricional e transformação celular; e uma região “tardia” (*late*, ou L), que engloba as proteínas do cápside viral⁵⁵. Duas regiões precoces, E6 e E7, são regularmente expressas nos casos de cânceres HPV+, contribuindo para a transformação celular por se ligar, interagirem e inativarem as proteínas p53 (E6) e proteína do Retinoblastoma (E7), contribuindo, assim, para a progressão da carcinogênese^{56,57}. Com efeito, a função mais conhecida da oncoproteína E6 é a sua capacidade de degradar a maior proteína supressora tumoral, a p53, que monitora e garante a integridade do genoma através de interrupção do ciclo celular, reparo do DNA ou indução de senescência e apoptose. Já a

oncoproteína E7 desestabiliza as proteínas p130 e proteína do Retinoblastoma (Rb), que controlam a entrada dos ciclos celulares (fase S), permitindo tanto que os queratinócitos mantenham-se em divisão, como a atuação do maquinário genômico viral. Tal fenômeno ocorre por degradação (fosforilação) da proteína do Rb, por inibição do gene p16-INK4A, também um regulador negativo do ciclo de progressão celular.

Nos carcinomas epidermóides não relacionados ao HPV, o gene supressor de tumor p16 é inativado através de alterações genéticas, de modo que sua expressão é perdida, diminuída ou limitada às regiões nucleares das células tumorais⁵⁸. Já a integração do HR-HPV ao genoma do hospedeiro gera um aumento do produto do gene p16, tanto nuclear como citoplasmática, nas células tumorais infectadas⁵⁹. O fato da proteína do p16 poder ser detectada através de métodos de imunoistoquímica faz com que ela seja um importante marcador indicativo de infecção por HPV⁶⁰.

Porém, os métodos mais utilizados para o diagnóstico do HPV baseiam-se em achados moleculares da presença do vírus. O PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*, ou Reação de Polimerase em Cadeia), é um método de amplificação de um alvo, pelo qual oligonucleotídeos alvo-específicos (os ditos *primers*) são utilizados para amplificação de uma determinada sequência de ácidos nucleicos, no caso partes conhecidas do DNA viral, e posterior detecção através de diversos métodos. Os *primers* são específicos para os subtipos que se procura, e tem sido muito utilizado para avaliação de presença e subtipagem do HPV em estudos populacionais⁶¹.

3.1.2.4. OUTROS FATORES

Embora seja indiscutível que o álcool e o tabaco, em especial em ação sinérgica, são os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CECP, há outros fatores implicados na origem desses tumores além do HPV.

Na Índia e no Sudeste da Ásia, o consumo constante de betel, uma espécie de goma de mascar com efeito estimulante, usada ocasionalmente em conjunto com tabaco ou outras especiarias, está claramente associado à fibrose submucosa em cavidade oral, e ao aparecimento de lesões pré-malignas, e do CECP⁶². Já na América do Sul, o consumo de bebidas quentes parece ter papel na carcinogênese, em especial o mate, embora a magnitude do efeito exato seja ainda desconhecida⁶³.

O uso de maconha, mais comum entre jovens, em tese poderia conferir risco para o desenvolvimento de CECP, uma vez que contém quantidades de carcinógenos semelhantes ao cigarro comum. Como o seu uso está muito associado ao próprio tabagismo, estudos populacionais tem dificuldade em separá-lo como fator de risco isolado. De maneira geral, considera-se que o uso esporádico não confere risco aumentado, porém sua associação com o tabagismo e o etilismo pode implicar em um risco aumentado para o câncer⁶⁴.

Fatores dietéticos tem ganhado importância crescente como fator etiológico para CECP, em especial a baixa ingestão de frutas e vegetais⁶⁵, ou o uso de produtos em conserva, gordura animal e laticínios⁶⁶.

Em se tratando de exposição ocupacional, diversos carcinógenos tem papel muito bem definido (asbesto e sílica para câncer de pulmão, níquel para câncer de cavidade nasal, ácido sulfúrico e gás mostarda para laringe e faringe, entre outros),

enquanto outros carcinógenos tem papel provável (como formaldeído para carcinomas de nasofaringe e seios paranasais), e outros tem papel ainda questionáveis (como o acetaldeído)⁶⁷.

Má higiene oral e doenças periodontais apresentam correlação modesta com o desenvolvimento de CECs⁶⁸, bem como uso de próteses mal adaptadas⁶⁹. História familiar positiva para CEC também confere aumento de risco⁷⁰, o que sugere uma susceptibilidade genética⁷¹.

3.2. MARCADORES MOLECULARES

3.2.1. O CICLO CELULAR

É o processo através do qual uma célula eucariótica duplica seu material genético para reparti-lo igualmente às células-filhas. É didaticamente dividido em duas fases: a Intérfase, onde ocorre a duplicação do DNA e preparação para a fase seguinte, e a Mitose propriamente dita.

A intérfase é dividida em quatro fases: G0, G1, S e G2, onde “G” deriva do inglês *gap*, ou pausa, uma vez que, nesses períodos, não se observam atividades específicas do ciclo celular. A fase G0 é a de repouso, onde não há preparação para a divisão. Neurônios, por exemplo, estão permanentemente nesta fase. Na fase G1, onde se encontra a imensa maioria das células diferenciadas dos organismos, após estímulo à replicação, irá haver a produção de enzimas necessárias para a síntese de DNA. Na fase S ocorre a síntese de DNA, onde cada cromossomo será formado por duas cromátides-irmãs geneticamente idênticas. Na fase G2, ou período pré-mitótico, ocorre a síntese de RNA e proteínas necessárias para o início da divisão celular.

A progressão do ciclo é mediada por ativação de uma família de proteínas-quinases, as Quinases-Dependentes de Ciclina (em inglês, CDK, de *cyclin-dependent-kinases*). As quinases são enzimas que transferem um grupo fosfato de moléculas doadoras de alta energia como, por exemplo, o ATP, para moléculas-alvo específicas, os substratos, causando sua fosforilação, o que irá causar sua ativação ou inativação. Já as ciclinas são uma família de proteínas cujas quantidades variam periodicamente durante o ciclo celular, daí os seus nomes, sintetizadas apenas em fases específicas (para a ligação com as CDKs), sendo posteriormente inativadas. Elas são divididas em duas classes principais: as “Ciclinas de Fase G1” (C, D1-3 e E) e as “Ciclinas de Fase G2”, ou Mitóticas (A e B). A ligação das ciclinas com as CDKs irá causar a fosforilação, e consequente inativação, da Proteína do Retinoblastoma, ou pRb.

A pRb teve seu gene clonado em 1986 ao se analisarem tumores de retinoblastoma, onde descobriu-se que, se ambos os alelos encontram-se mutados, em um momento muito precoce da vida (tenra infância) há o desenvolvimento do Retinoblastoma, um tipo de câncer da retina, daí o seu nome⁷². A pRb detém a progressão do ciclo celular, entre G1 e S, e normalmente encontra-se na forma ativa, ligada ao fator E2F⁷³. Sua fosforilação, e consequente inativação, libera o E2F, uma proteína de regulação gênica, que promove a transcrição de diversos genes cujos produtos são necessários à progressão para a fase S⁷⁴.

Porém todo esse mecanismo necessita de uma regulação, um modo de conter a atividade dos complexos Ciclina/CDK, e isso se faz através de proteínas inibidoras atuantes sobre várias fases específicas. Duas grandes famílias de Inibidoras de CDK, as CKIs (sigla, em inglês, de *cyclin-dependant kinase inhibitor*) são descritas. A Família de inibidores KIP/CIP (do inglês *CDK inhibiting protein*) é constituída das proteínas

p21, p27 e p57 são ditas inespecíficas, por terem a propriedade de inibir grande parte dos complexos ciclina/CDK. Já as proteínas da Família INK4 (de *Inhibitor of CDK4*) p15, p16, p18 e p19, por sua vez, inibem especificamente o complexo CDK4/6. Quaisquer dessas proteínas são codificadas por um único gene e são as principais reguladoras da pRb, aquela que, uma vez inativada, promove uma irreversível entrada às outras fases do ciclo.

3.2.2. p53

Quando descoberta, em 1979, atribuíam-se à fosfoproteína p53 (que tem uma massa molecular de 53 kD) “um papel crucial na modulação do estado transformado”⁷⁵. Diversos estudos demonstraram sua importância como principal modulador da resposta celular a agressões endógenas ou exógenas, uma vez que ele controla a expressão de uma vasta gama de genes com funções distintas, influenciando eventos como regulação do ciclo celular, senescência, apoptose, reparo de DNA e regulação de stress oxidativo.

O gene TP53, considerado um gene supressor tumoral, é encontrado normalmente em modo latente. Contudo, em resposta a estresses celulares, sofre modificações pós-translacionais que causam sua estabilização e acúmulo no núcleo. Esta ativação depende de diversos mecanismos como: dano ao DNA, hipóxia, ativação de oncogenes, replicação viral e depleção de nucleotídeos. As vias pelas quais o TP53 é ativado dependem das diferentes formas de estresse e, do ponto de vista molecular, de qual quinase é ativada⁷⁶.

A ativação resulta em aumento dos níveis de proteína p53 por dois motivos: o primeiro é a redução da degradação proteolítica dependente do MDM-2 (*murine double minute 2*), um importante regulador negativo do p53; e o segundo é um aumento da

afinidade do p53 pelo DNA, ocasionado por alterações (acetilação de lisina ou fosforilação da serina) na extremidade carboxi-terminal, o que promove sua ligação com o DNA⁷⁷. Como consequência, ocorrem alterações em outros grupos de genes, com diferentes efeitos biológicos causados por suas expressões⁷⁸.

Os fatores que determinam as alterações individuais que ocorrerão não são totalmente compreendidos. No entanto, sabe-se que existem variações de atividade entre sequências responsivas de grupos diferentes de genes⁷⁹. Por exemplo, genes responsáveis pela regulação do ciclo celular contêm regiões promotoras com alta identidade com a sequência ligante do p53 ao DNA, podendo ser ativadas por níveis relativamente baixos de p53. Por outro lado, muitos genes indutores de apoptose requerem maiores níveis de p53, ou de proteínas resultantes de sua ativação, devido à menor identidade com seus elementos.

Em tumores relacionados a vírus, pode haver uma interação com proteínas da cápside viral, como a interação do p53 com a proteína E6 dos HPVs “oncogênicos”, resultando em um aumento da proteólise do p53 dependente de ubiquitina, uma proteína que se liga a proteínas “indesejadas”, por exemplo, com algum erro de configuração, degradando-as. Como resultante, os tumores HPV+ tendem a não expressar o p53, enquanto que, contrariamente, tumores HPV- o expressam em uma frequência maior⁸⁰.

Não se sabe exatamente em que estágio da carcinogênese do CECP ocorre a mutação do p53. Um importante estudo com análises seriadas de biópsias de lesões orais de pacientes que progrediram para carcinomas detectaram uma prevalência de mutações muito mais acentuada em carcinomas invasivos do que em displasias, sugerindo uma ação mais tardia, associada à progressão de um fenótipo não invasivo para um invasivo⁸¹.

A alta frequência de anormalidades relacionadas ao p53 no CECF fez com que ele se tornasse um bom candidato a estudos de diagnóstico e prognóstico para esses tumores. A imunomarcção de p53 suprabasal, em áreas imediatamente adjacentes a carcinomas de cavidade oral, relaciona-se a displasia severa⁸² e pode ser preditiva de futura recorrência local⁸³.

Do ponto de vista clínico, mutações do p53 estão associadas a uma diminuição da radiosensibilidade, ocasionando maiores taxas de recidiva loco-regional se o tratamento primário for radioterápico⁸⁴, mas não apresentaram diferenças de prognóstico se considerados os tratamentos combinados⁸⁵.

3.2.3. Ki-67

Foi originalmente definido como “protótipo monoclonal de anticorpo Ki-67”, gerado ao se imunizar ratos com núcleos de células de linfomas de Hodgkin⁸⁶. O nome deriva da cidade de origem, Kiel, e o número corresponde ao ninho do clone original na microplaca de 96 furos. Uma vez que o antígeno não tinha sido imediatamente caracterizado, foi originalmente chamado de “*antígeno Ki-67*”. Porém, sua posterior caracterização como proteína, diferente de outros polipeptídeos com função inicial desconhecida, e o fato de estrutura primária poder ter sido deduzida a partir do DNA complementar (*cDNA*) correspondente, fizeram com que se mantivesse o nome original, simplesmente sendo denominada proteína Ki-67⁸⁷.

Estudos posteriores revelaram um padrão interessante: o anticorpo era reativo com uma estrutura nuclear presente exclusivamente em células proliferativas. Uma análise mais detalhada revelou que o antígeno se encontrava nos núcleos celulares das fases G1, S, e G2, e nas mitoses, mas não nas células quiescentes ou em fase G0⁸⁸. Esta

presença característica em células proliferativas, normais ou tumorais, fez com que se tornasse evidente sua importância como caracterização da taxa de proliferação de populações celulares, o que a tornou alvo de pesquisas clínicas e métodos diagnósticos, embora seu uso como valor prognóstico em CECp não tenha sido claramente demonstrado⁸⁹.

3.2.4. p16

Identificada em 1993, a proteína p16 é um inibidor de quinase dependente de ciclina (CKI) que interage com as CDKs 4 e 6⁹⁰. Funciona como um regulador negativo da progressão do ciclo celular, uma vez que inibe o complexo CDK4/6, causando o bloqueio da fosforilação da pRb e mantendo o ciclo no ponto de restrição entre as fases G1 e S⁹¹. Através de fenômenos como perda de heterozigosidade, hipermetilação, deleção ou mutação, esse gene é frequentemente inativado em lesões epiteliais pré-cancerígenas ou cancerígenas. Na presença do HPV, as oncoproteínas E6 e E7 estimulam a proliferação celular ativando as ciclinas E e A, e inativam as proteínas do Retinoblastoma e p53, levando a uma hiperexpressão de p16INK4a (p16+)⁹².

Sua relação com o HPV é bem estabelecida, em especial devido ao fato de que a oncoproteína viral E7 é capaz de ligar e inativar a pRb, influenciando diretamente sua expressão, o que o torna um biomarcador específico para os HR-HPV⁹³. Desta forma, a realização de imunoistoquímica pode ser utilizada para a determinação do HPV biologicamente ativo nestas neoplasias⁹⁴. Trata-se de um método simples e de interpretação relativamente fácil, que tem sido considerado um marcador confiável do carcinoma relacionado ao HPV, em especial em orofaringe⁹⁵. Explica-se assim sua inclusão nos algoritmos de diagnóstico (mas não do tratamento) dos principais centros

americanos⁹⁶. Além disso, a positividade para o p16 tem sido associada a um maior intervalo livre de doença⁹⁷ e melhor prognóstico, independente do status do HPV^{98 99}.

Porém, apesar de diversos estudos terem demonstrado que a sensibilidade do p16 para predizer tumores HPV+ chega a 100%, a especificidade é de 80%¹⁰⁰. Diversas hipóteses têm sido sugeridas para explicar discrepâncias entre a expressão de p16 e o status do HPV. Por exemplo, diferenças entre os subtipos populacionais com índices muito díspares de positividade do HPV apresentam valores diferentes de sensibilidade para o p16¹⁰¹, assim como diferenças nas localizações anatômicas dos tumores podem alterar a acurácia do exame¹⁰². Além disso, o p16 poderia estar ativo por outras vias que causem inativação da proteína do retinoblastoma, ou mesmo uma metilação alterada ou mutação do próprio gene do p16¹⁰³. Outro mecanismo descrito para explicar casos discordantes seria a presença de outros subtipos de HPV que não o tipo-16¹⁰⁴, o mais pesquisado na maioria dos protocolos de PCR. Por último, a correlação entre o p16 e o HPV parece ser menor em pacientes com idade inferior a 40 anos¹⁰⁵.

3.2.5. FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF)

O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF*) foi inicialmente caracterizado como um fator de crescimento, ligado à heparina, com alta especificidade para células endoteliais¹⁰⁶. Outra proteína relacionada é o Fator de Permeabilidade Vascular (VPF, do inglês *Vascular Permeability Factor*) que promove extravasamento de proteínas resultantes da neoangiogênese tumoral¹⁰⁷. Posteriormente, notou-se que tanto o VPF como o VEGF são codificados pelo mesmo gene VEGF, responsável por várias isoformas¹⁰⁸. Em seguida, caracterizaram-se os receptores específicos para VEGF, com presença de sete domínios em sua porção extracelular, o que significava uma nova subfamília de receptores tirosina-quinase¹⁰⁹.

Desde então, outros avanços foram feitos na detecção do papel do VEGF, como sua expressão espacial e temporal ligada a eventos fisiológicos *in vivo*¹¹⁰, ou a inibição de sua atividade por anticorpos neutralizadores, resultando em regressão tumoral¹¹¹, o que suporta a ideia de que o VEGF seja um importante iniciador do processo de angiogênese, principalmente ao se considerar que sua expressão é potencializada em áreas hipóxicas de tumores sólidos¹¹².

Em um contexto clínico, a expressão aumentada do VEGF pode ser considerada um preditor de mau prognóstico em pacientes com CECPs¹¹³, em especial no que tange à maior possibilidade de disseminação linfática¹¹⁴, em especial em casos precoces¹¹⁵, e hematogênica¹¹⁶.

3.2.6. RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR)

No decorrer de uma série de estudos sobre efeitos neuronais a partir de proteínas filtradas de glândulas submandibulares de ratos, Stanley Cohen injetou, em 1962, extratos purificados de glândulas salivares em ratos recém-nascidos e notou alterações anatômicas importantes, como abertura precoce das pálpebras e erupção precoce dos dentes¹¹⁷. Tratava-se de uma proteína, originalmente chamada de “fator eruptor de dente” (tradução livre de “*tooth-lid factor*”), posteriormente rebatizada de EGF (do inglês, *Epidermal Growth Factor*, ou Fator de Crescimento Epitelial), uma vez que este fator estimulava a proliferação de células epiteliais. Em 1975, demonstrou-se que havia um sitio específico para sua ligação na superfície de fibroblastos, que é o Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico, ou EGFR (do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor – EGFR*)¹¹⁸. Trata-se de uma família de receptores expressa nas membranas citoplasmáticas da maioria das células, em especial as de origem ectodérmica. Possuem um sitio de ligação externo, um segmento lipofílico transmembrana, e um domínio

citoplasmático¹¹⁹, sendo o domínio da tirosina-quinase a parte essencial de sua função¹²⁰. Sua ativação leva a mudanças conformacionais (dimerização), seguido de autofosforilação dos domínios da tirosina quinase¹²¹, o que desencadeia uma complexa cascata de vias sinalizadoras que transcrevem genes responsáveis por crescimento celular, angiogênese, adesão celular, inibição de apoptose, motilidade celular e invasão, aumentando o potencial maligno de células que o expressam¹²²¹²³.

A hiperexpressão do EGFR tem sido relatada em 80 a 90% dos CECPs, comparados com mucosas normais de pacientes sem câncer, e também é aumentada em áreas displásicas¹²⁴, sugerindo que sua ativação representa um evento precoce na carcinogênese. Expressão de EGFR em mucosas histologicamente normais podem explicar a tendência ao desenvolvimento de segundos tumores primários e não estar necessariamente relacionadas ao tabagismo e ao etilismo¹²⁵.

A maioria das séries com análise multivariada mostrou piora da sobrevida global em pacientes que apresentavam aumento da sua expressão¹²⁶, sendo até considerado um marcador independente de prognóstico desfavorável para carcinomas da cavidade oral e orofaringe¹²⁷.

3.3. CARCINOMA EPIDERMÓIDE EM PACIENTES COM IDADE INFERIOR A 40 ANOS

3.3.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Neste estudo, considerou-se a data de corte de idade em 40 anos, por ser este o valor mais citado na literatura, o que facilitaria comparações entre os diferentes estudos. A incidência de CECP em pacientes com menos de 40 anos varia de 0,4 a 3,6%¹²⁸. Muitos estudos tem demonstrado aumento da incidência ao longo das últimas

décadas¹²⁹, em especial no subcontinente indiano¹³⁰, mas também em estudos norte-americanos¹³¹. Nota-se também aumento da incidência em mulheres¹³² e em pacientes não tabagistas e não etilistas¹³³.

3.3.2. APRESENTAÇÃO CLÍNICA

A apresentação clínica dos CECp em pacientes com menos de 40 anos não difere. Em relação ao prognóstico, há muita discordância na literatura. Enquanto alguns autores encontraram prognóstico desfavorável para este grupo, com aumento da recidiva loco-regional¹³⁴ ou à distância¹³⁵, outros demonstraram achados divergentes, com melhor prognóstico entre os jovens¹³⁶.

Ao analisar pacientes com idade entre 20 e 44 anos, um estudo epidemiológico norte-americano mostrou que, além da incidência crescente, os subsítios mais frequentemente acometidos foram a língua oral, base de língua e tonsila palatina, enquanto que outras localizações não mostraram tal associação entre os jovens¹³⁷.

3.3.3. ASPECTOS MOLECULARES

Análises específicas de marcadores moleculares em pacientes jovens são incomuns na literatura, exceto os estudos específicos para o HPV. No estudo recente mais importante em pacientes com idade entre 18 e 39 anos com pesquisas moleculares, encontrou-se forte associação entre a expressão de p16 e prognóstico favorável para sobrevida livre de doença ($p=.01$), e sobrevida global ($p=.05$), embora não tenha havido correlação com a presença do HPV (por PCR e Hibridização *in situ* -HIS); as expressões de p53, EGFR e outros marcadores não demonstrou nenhuma correlação com o prognóstico¹³⁸.

3.3.4. HPV

O HPV não parece se relacionar a tumores da cavidade oral em jovens. Um estudo com HIS e um novo método de detecção do DNA (chip eletroquímico de DNA amplificado) não identificou o vírus em nenhum de 32 casos estudados; já a imunomarcção pelo p16, contudo, foi positiva em 19% desses casos. Pode-se sugerir, assim, que a correlação entre o HPV e a imunomarcção pelo p16 pode não ser tão intensa em pacientes jovens.¹³⁹.

O mesmo não acontece na orofaringe, onde a influência do HPV é mais estabelecida, especialmente em uma faixa etária mais jovem, em pacientes do sexo masculino, ocasionalmente sem história de tabagismo¹⁴⁰.

4. MÉTODOS

4.1. SELEÇÃO DE PACIENTES

Em 2001 foi criado o Projeto Genoma Clínico, com suporte da FAPESP e do Instituto Ludwig, a partir do qual surgiu o projeto temático “Marcadores de Agressividade em Tumores de Cabeça e Pescoço”. A partir deste último, formou-se um grupo multi-institucional e multidisciplinar intitulado GENCAPO que, desde 2001, coleta rotineiramente dados clínicos e epidemiológicos de pacientes com CECp oriundos das diversas instituições, das quais as seguintes foram contempladas neste estudo: Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho, Hospital Heliópolis e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os pacientes deste estudo são provenientes deste projeto, no período de Setembro de 2002 a Março de 2010.

A partir deste banco de dados, foram avaliados pacientes portadores de carcinomas epidermóides de cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe, consecutivamente inseridos e identificados. Os casos de carcinomas de nasofaringe, cavidade nasal e seios paranasais, bem como os casos de tumores primários ocultos e pele, incluindo lábios, não foram considerados, uma vez que não guardam relação epidemiológica e clínica com o escopo deste estudo.

4.2. ÉTICA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do HCFMUSP, como subprojeto do Protocolo de Pesquisa inscrito sob o número 0511/07, intitulado “Busca de marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço”, previamente aprovado pela mesma

instituição (APÊNDICE 1), bem como nos respectivos comitês de ética de cada instituição participante. Pacientes que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, no momento de suas inclusões, foram considerados para estudo.

4.3. COLETA DE DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS

No momento da inclusão dos pacientes ao GENCAPO, eles participam de uma entrevista, realizada por entrevistadores especificamente treinados que aplicam questionários padronizados. São coletadas informações pessoais, profissionais, antecedentes familiares e de hábitos, como etilismo ou tabagismo (APÊNDICE 2). Dados clínicos são preenchidos por cirurgiões responsáveis pelos atendimentos ambulatoriais (APÊNDICE 3), e dados anatomopatológicos são consultados nos laudos respectivos (APÊNDICE 4).

Para o cálculo da carga tabágica de cada caso, foi considerado que cada cigarro contém 1g de tabaco, e que cada cachimbo contém 3g¹⁴¹. Uma vez calculado o consumo diário médio em gramas, dividiu-se por 20 (quantidade de tabaco, em gramas, de um maço de cigarros), para obtenção do valor de maços-ano.

Para o cálculo da dose acumulada de álcool, considerou-se que a cerveja contém 5% de álcool, o vinho 12%, e a aguardente e outros destilados, 41%. Assim, as quantidades, em litros de álcool, foram transformadas em gramas, considerando-se que cada litro de álcool contém 798g de etanol. Multiplicando-se o resultado, em gramas, pela quantidade de anos acumulados, chegamos ao valor de gramas-ano de etanol¹⁴².

Os pacientes foram, então, divididos em dois grupos: o grupo com idade menor que 40 anos (<40); e o grupo com idade igual ou maior que 40 anos (≥ 40).

4.4. COMPARAÇÃO DE PACIENTES POR ANÁLISE POR PAREAMENTO

O método eleito para comparação de dados biológicos foi o Sistema de Amostra por Pares. Para cada paciente com idade <40 anos, foram selecionados por sorteio simples dois pacientes com idade ≥ 40 anos, portadores de carcinoma nos mesmos sítios (cavidade oral, orofaringe, laringe e hipofaringe), com idêntico estágio clínico, segundo o TNM. Essa estratégia é análoga à utilizada em estudos de caso-controle, em que se considera como “casos” os pacientes <40 anos, e como “controles” os pacientes ≥ 40 anos.

Devido à dificuldade de obtenção de material biológico para todos os pacientes, em algumas situações o mesmo paciente ≥ 40 anos foi utilizado para comparação com mais de um paciente <40 anos. Em uma situação só foi possível a obtenção de um par. No total foram pareados 25 casos.

4.5. ANÁLISE DE SOBREVIDA

Para a análise de sobrevida, foram avaliados todos os pacientes passíveis de análise incluídos nestes serviços durante o período do estudo. Comparou-se os pacientes <40 anos com os ≥ 40 anos. Os dados referentes aos hábitos de tabagismo e etilismo, bem como os antecedentes familiares de câncer também foram obtidos a partir da amostra global de pacientes.

Os dados de seguimento foram obtidos no decorrer das próprias consultas ambulatoriais de rotina, de forma sistemática, em formulários padronizados (APÊNDICE 5).

As sobrevidas foram calculadas, em meses, a partir das datas dos tratamentos (cirurgia, ou término da radioterapia para os casos não operados inicialmente), e as datas dos diagnósticos dos eventos: recidivas locais ou regionais, ou metástases à distância.

Em casos de perda de seguimento, foram realizadas tentativas de contato telefônico, ou carta, pela equipe de epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, responsáveis pela vigilância desses dados. Também são pesquisadas informações de óbitos a partir dos sistemas de verificação de óbitos do estado de São Paulo, fornecidos anualmente pela Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (SEADE).

4.6. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Os blocos de parafina provenientes de biópsias ou, preferencialmente, de ressecções cirúrgicas, foram obtidos junto aos Serviços de Anatomia Patológica de cada Instituição. A seleção dos blocos foi realizada considerando-se os mais representativos de cada caso, com avaliação do tumor e de margens não tumorais, quando possível.

4.7. IMUNOISTOQUÍMICA

Os anticorpos foram adquiridos através do Projeto temático "Fatores ambientais, clínicos, histopatológicos e moleculares associados ao desenvolvimento e ao prognóstico de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço", FAPESP 10/51168-0.

4.7.1. ELABORAÇÃO DAS LÂMINAS

A partir dos blocos selecionados, foram obtidas lâminas silanizadas, que inicialmente foram imersas no produto Trilogy (Cell Marque, catalog 920P-07), diluído

em água destilada 1:100), que combina os três seguintes passos: desparafinização , rehidratação e recuperação antigênica, em dois banhos consecutivos, de trinta e de dez minutos, em banho-maria a 95°C, seguidos de lavagem com água corrente.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, foram realizados dois banhos de H₂O₂ (0,3%), de quinze minutos cada, seguidos de três banhos com água destilada, de cinco minutos cada.

Procedeu-se, então, a aplicação dos anticorpos primários em cada lâmina, de acordo com as especificações dos fabricantes e protocolos do próprio serviço, a saber:

- Anti-p53 monoclonal de camundongo, clone DO-7 (Ref. 453M-95, Cell Marque, California–EUA) na concentração de 0,63 µg/mL;
- anti-Ki67 monoclonal de coelho, clone SP6 (Ref. 275R-16, Cell Marque, California–EUA) na concentração de 0,96 µg/mL;
- Anti VEGF monoclonal de coelho, clone SP28 (NeoMarks, California–EUA) pronto para uso;
- Anti-EGFR monoclonal de camundongo, clone SP9 (Ref. MA1-39556, Thermo Scientific, California–EUA), pronto para uso;
- Anti-p16 monoclonal de camundongo antiZ2117 (p16INK4a, clone G175-405, Zeta, California–EUA), pronto para uso.

Após a incubação nos anticorpos primários, as lâminas foram lavadas em tampão TRIS salino, pH 7.4 0.1M seguida da aplicação do anticorpo secundário conjugado a um sistema de detecção com polímero (Ref. 954D-30, Cell Marque, California–EUA). A incubação no anticorpo anti-camundongo e anti-coelho ocorreu por

15 minutos, seguida de 3 lavagens em tampão Tris salino pH7.4 0.1M com posterior incubação por mais 15 minutos no sistema de detecção por peroxidase com polímero conjugado.

Na etapa seguinte os cortes foram lavados novamente com tampão Tris salino pH7.4 0.1M por 3 vezes e ocorreu a revelação da reação com uma solução de diaminobenzidina-DAB (Ref. 975D-3, Cell Marque, California–EUA), com posterior contra-coloração dos núcleos por hematoxilina, desidratação num gradiente crescente de concentração de álcool etílico, diafanização em xilol e montagem das lâminas. Todas essas reações foram efetuadas com uso de Sistema de automatização em Imunoistoquímica (Dako Autostainer; Universal Staining System), com confecção de 48 lâminas simultaneamente.

A montagem das lâminas foi feita através de um sistema automatizado com filme de polipropileno 24mm (Tissue-Tek Coverslipping Film, Sakura).

Os controles externos negativos foram submetidos a todos os passos do processo, exceto a aplicação do anticorpo. Os controles positivos foram realizados em cortes de amostras teciduais sabidamente positivas para os anticorpos: câncer de mama (p53, e Ki-67), angiossarcoma (EGFR e VEGF) e carcinoma de orofaringe positivo para o p16.

4.7.2. QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO

A leitura das lâminas que correspondiam a marcadores citoplasmáticos (VEGF e EGFR) foi realizada em microscópio óptico (Nikon ECLIPSE E200, Tóquio, Japão), sob aumento de 100,200 e 400x, sempre por dois examinadores, cegos aos dados clínicos.

Para os anticorpos de marcação nuclear (p53, p16 e Ki-67), as lâminas foram digitalizadas através do aparelho Panoramic SCAN (3DHISTECH), com objetiva Zeiss PlanaApocromática de 20x, para posterior avaliação através do software Panoramic Viewer Version 1.15.2 (3DHISTEC Ltd., 11/04/2012)

4.7.2.1. p53

Selecionaram-se as melhores áreas de representação tumoral e de margem não tumoral, quando possível, para cada caso. Em aumento de 400x, procedeu-se a contagem manual de 500 células em campos consecutivos, das áreas tumorais e das margens livres. O valor de positividade de células marcadas, em um total de 500, foi utilizado para fins de análise.

4.7.2.2. Ki-67

Como a imunomarcação nuclear deste anticorpo assemelha-se à do p53, usou-se a mesma metodologia para sua quantificação.

4.7.2.3. p16

A imunomarcação pelo p16 pode ser nuclear e citoplasmática. Ainda há muita discussão a respeito de que valores de corte deveriam ser usados para sua marcação, que estariam associados à presença do HPV transcrito e, subsequentemente, com implicação prognóstica. Valores mais recentemente utilizados variam entre 50, 70 ou 75% de imunomarcação, para determinar se a amostra seria positiva ou negativa¹⁴³. Esses valores, aparentemente altos, se explicam pelo fato de que, uma vez que o HPV é transcrito, a expressão da proteína E7 causa efetiva degradação da pRb, com perda da supressão da transcrição da proteína p16, causando altos níveis de sua expressão¹⁴⁴. Estudos que compararam a imunoexpressão de p16 com dados de pesquisa do RNA

viral por *hibridização in situ*¹⁴⁵ contribuíram para a caracterização do valor de 75% para determinação de positividade do p16, que foi o valor escolhido para a finalidade deste estudo. O mesmo critério foi utilizado para avaliação das margens livres.

4.7.2.4. VEGF

O VEGF apresenta marcação predominantemente citoplasmática. A expressão foi avaliada em tecido tumoral e de margens não tumorais, para cada lâmina. Como não há um padrão na literatura, optou-se por uma graduação semi-quantitativa em níveis:

1. Até 10% de marcação
2. Marcação entre 10 e 40%
3. Marcação entre 40 e 70%
4. Marcação superior a 70%

4.7.2.5. EGFR

Apesar de tratar-se de um marcador de membrana celular, apresenta características semelhantes de imunoexpressão e quantificação em relação ao VEGF, de modo que optou-se por quantificá-lo da mesma maneira.

4.8. PESQUISA DO GENE DO PAPILOMAVIRUS HUMANO

O método de escolha de detecção do HPV foi a pesquisa de DNA por PCR.

4.8.1. EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO PARAFINADO

Foram realizados 10 cortes de 10 µm de cada bloco de parafina selecionado, com o emprego de micrótomo histológico, com antisepsia entre cada bloco (álcool 70%) para evitar contaminação. Os cortes foram acondicionados em microtubos de polipropileno (Eppendorf®. Hamburgo, Alemanha) de 1,5 mL, e identificados.

Para desparafinização de cada amostra, foram realizadas duas ou três incubações com solução de Xilol em banho-maria a 37°C por 30 minutos cada. Cada incubação foi seguida por centrifugação a 14.000 rpm por cinco minutos, com posterior remoção do sobrenadante, até completa remoção de parafina do corte de tecido.

Para reidratação do tecido desparafinado, foram realizados sucessivos banhos, de cinco minutos em temperatura ambiente, em soluções de etanol a 100%, 95% e 70%, água mili-Q (Millipore, Bedford, Massachusetts-EUA), e por último tampão Tris-EDTA (TE, Tris 10 mM e EDTA 1mM, pH 7,8), intercalados por centrifugação a 14.000 rpm por cinco minutos e descarte de sobrenadante.

Para purificação do DNA genômico foram testadas duas metodologias: QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) e método fenol clorofórmio. O método em que foi utilizado o kit comercial foi desenvolvido de acordo com as instruções do fabricante. O método fenol-clorofórmio foi realizado de acordo com a descrição a seguir: após a desparafinização, foram acrescentados 200 µL de tampão de lise - Tris-HCl 10 mM, pH8, 0 ; NaCl 100 mM ; EDTA 2,5 mM, pH 8,0 ; SDS 0,5%, Proteinase K (PK, Life Technologies) com concentração final de 500µg/ml.

Os tubos foram mantidos à temperatura de 55°C (Banho-maria - Precision) para a digestão enzimática por 1-3 dias, com adição de PK para concentração final de 250ug/ml, em intervalos de 24 horas. Após completa lise tecidual, a PK foi inativada com incubação a 95°C durante 10 minutos. Posteriormente foi adicionado 1mL de fenol tamponado em pH 7,8 (Invitrogen) e foi feita centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para tubo eppendorf de 2mL e adicionado 1 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, Invitrogen), seguido de centrifugação por

10 minutos a 13.000 rpm e transferência do sobrenadante para outro tubo eppendorf de 2ml.

Para precipitar o DNA genômico, adicionou-se 2 a 3 volumes de etanol absoluto gelado (20°C) e 1/10 do volume de acetato de amônio 7M, e incubou-se a -20°C *overnight*. Posteriormente, centrifugou-se o tubo a 14.000 rpm por 20min, e descartou-se o sobrenadante.

O precipitado foi lavado com etanol a 70% e deixado em temperatura ambiente para evaporação do álcool. O precipitado resultante foi ressuspenso em 50 uL de tampão TE.

4.8.2. GRAU DE PUREZA E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A quantidade de DNA genômico e a pureza das amostras foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts-EUA). O grau de pureza foi determinado pela aplicação da relação de absorbâncias obtidas a 260 e 280 nm (A260/A280), sendo considerados os valores de 1,7 a 2,0 como aceitáveis para realização dos ensaios seguintes. As amostras foram então armazenadas a -20°C até a realização da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

4.8.3. PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO HPV

A pesquisa do HPV por PCR foi realizada no Instituto de Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Utilizou-se o sistema TaqMan®, que é baseado no uso de oligonucleotídeos lineares (sondas) que são marcados com uma molécula fluorescente (*reporter*) na ponta 5' e uma molécula bloqueadora (*quencher*) na ponta 3'. Quando estas duas moléculas estão próximas em solução, o sinal do *reporter* é

seqüestrado pelo *quencher* e o instrumento não detecta nenhum aumento da fluorescência. Por outro lado, quando existe a presença da sequência de DNA alvo, a sonda hibridiza e, após a hibridização dos iniciadores, a nova fita de DNA é estendida pela Taq DNA polimerase. A enzima usada nesse sistema possui atividade 5' nuclease e ao encontrar com a sonda durante a extensão da nova fita de DNA, cliva a sonda, que resulta na separação do *reporter* do *quencher* e emissão de fluorescência pelo *reporter*. A emissão de fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado e, podendo ser usado como método para determinação da carga viral.

4.8.4. PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE CONTROLE

4.8.4.1. PCR CONVENCIONAL

Para verificar a possibilidade de se amplificar as amostras de DNA extraídas, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene constitutivo da Beta-globina, a partir de 100ng de DNA com os iniciadores PCO3 e PCO4. Após a realização da PCR, os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2% (Agarose Ultrapure™ – Invitrogen Life Technologies) em tampão TAE 1X [DNA Typing Grade TAE Buffer – GIBCO – Invitrogen Corporation (2mM Tris-Acetato e 50mM de ácido etilenodiaminotetracético- EDTA)], corado com SYBR Safe™ 1X (Invitrogen, USA). Os produtos da amplificação e o padrão de tamanho molecular de 100pb (Invitrogen, EUA) foram aplicados no gel de agarose e submetidos a uma corrente constante de 90 amperes por 50 minutos, e visualizadas em luz ultra-violeta (UV).

4.8.4.2. PCR EM TEMPO REAL

Após a determinação, por PCR convencional, da qualidade das amostras extraídas pela amplificação da Beta-globina (PCO3/PCO4), a reação de PCR em tempo

real foi realizada utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix 1x (Applied Biosystems, Inc., EUA), 200nM da mistura de iniciadores HPV16 E7 (Walboomers et al, 1999), 200nM da sonda específica para HPV16 e água *DNAse RNase free* (Gibco/BRL, Life Technologies, EUA) para volume final de 25µL. Como fita molde foram utilizados 5µL de DNA extraído de cada amostra.

Todas as reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no instrumento ABI Prism® 7300 HT SDS (Applied Biosystems, Inc., EUA). A amplificação foi realizada segundo o protocolo: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de (95°C por 15 segundos, 52°C por 1 minuto e 60°C por 1 minuto). A sequência dos iniciadores utilizados na PCR em tempo real foi:

Iniciador Sequência (5'-3')

HPV16E7.667	-GATGAAATAGATGGTCCAGC
HPV16E7.774	-GCTTTGTACGCACAACCGAAGC

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos pelo estudo de cada variável quantitativa foram descritos através da média e do desvio padrão e também representados pela mediana e seus valores mínimos e máximos. Para as qualitativas foram utilizadas frequências absolutas e relativas. As distribuições foram definidas como paramétricas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

A análise de variáveis dependentes foi realizada pela aplicação dos testes de McNemar para a comparação de variáveis qualitativas e de “t” pareado para comparação de médias. Quanto à comparações de variáveis independentes, foi aplicado o teste de qui-quadrado na análise de variáveis qualitativas e o teste “t” de Student para comparação de médias.

A análise de sobrevida global e livre de doença foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier com comparações pelo teste de *Log-Rank* e regressão logística uni e multivariada por regressão de Cox sendo calculado os valores de *hazard ratio* e intervalo de confiança 95%. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SPSS® versão 17.0 (SPSS® Inc; Ilinois, EUA) e foi considerado como significância estatística o risco menor a 5% de cometer o erro α ou tipo I ($p < 0,05$).

4.10. CASUÍSTICA

4.10.1. DESCRIÇÃO DA AMOSTRA TOTAL DE PACIENTES

De outubro de 2002 a março de 2010, foram incluídos no banco de dados do projeto 2063 pacientes. Aplicando-se os critérios previamente expostos, foram identificados 1857 pacientes elegíveis para análise. Os dados sociodemográficos, clínicos e patológicos dos 1857 pacientes selecionados para o estudo constam nas tabelas abaixo.

A média de idade foi de 57,78 anos (DP=10,64), com idades mínima de 21 anos, e máxima de 93 anos. A média de idade dos pacientes <40 anos foi de 34,77 anos, enquanto no outro grupo foi de 59,59 anos.

As características sociodemográficas estão descritas na Tabela 1, onde nota-se uma predominância do CECp em homens, brancos, e com baixo grau de escolaridade.

Tabela 1- Características sociodemográficas da amostra total de pacientes

Característica		N=1857 (%)	
Gênero	Feminino	260	(14,0)
	Masculino	1597	(86,0)
Raça	Branca	1289	(69,6)
	Parda	288	(15,5)
	Preta	167	(8,9)
	Amarela	17	(0,9)
	Indígena	6	(0,3)
	S/I	90	(4,8)
Escolaridade	Alfabetizado	70	(3,8)
	Primário incompleto	584	(31,4)
	Primário completo	512	(27,6)
	Secundário incompleto	143	(7,7)
	Secundário completo	227	(12,2)
	Técnico	36	(1,9)
	Superior	56	(3,0)
	S/I	229	(12,4)

S/I: sem informação

Em relação a hábitos de vida, nota-se uma grande maioria de tabagistas e etilistas, como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2- Distribuição conforme hábitos na amostra total de pacientes

Característica		N=1857 (%)	
Consumo de tabaco	Nunca fumou	134	(7,2)
	Somente no passado	430	(23,2)
	Ainda fuma	1279	(68,9)
	S/I	14	(0,7)
Consumo de álcool	Nunca bebeu	251	(13,5)
	Somente no passado	691	(37,2)
	Ainda bebe	894	(48,2)
	S/I	20	(1,1)

S/I: sem informação

Em relação à topografia, nota-se uma predominância de casos de cavidade oral, principalmente ao se considerar os casos de invasão conjunta da orofaringe. A laringe aparece como segunda localização desses tumores, e a orofaringe em terceiro lugar, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3- Características clínicas da amostra total de pacientes

Característica		N=1857 (%)	
Sítio anatômico	Cavidade oral	566	(30,5)
	Cavidade oral+faringe	158	(8,5)
	Orofaringe	322	(17,3)
	Laringe	459	(24,7)
	Hipofaringe	146	(7,9)
	Vários sítios	206	(11,1)
cT*	1, 1a, 1b	182	(9,8)
	2, r2	441	(23,8)
	3, r3	415	(22,3)
	4, 4a, 4b	761	(41,0)
	S/I	58	(3,1)
cN*	0	868	(46,7)
	1	262	(14,1)
	2a, 2b, 2c	570	(30,7)
	3, r3	128	(6,9)
	S/I	29	(1,6)
cM*	0	1761	(94,8)
	1	13	(0,7)
	S/I	83	(4,5)
Estádio clínico*	I	132	(7,1)
	II	286	(15,4)
	III	235	(12,6)
	IV	1004	(54,1)
	S/I	200	(10,8)

S/I: sem informação, *estádio clínico conforme sistema TNM

Na Tabela 4, nota-se uma predominância de casos avançados, sendo quase a metade já em estágio IV.

Tabela 4- Características patológicas da amostra total de pacientes

Característica		N=1857 (%)	
pT*	0, <i>is</i> , R <i>is</i> , R1	21	(1,1)
	1, 1a, 1b	191	(10,3)
	2, r2	373	(20,0)
	3, r3	255	(13,7)
	4a, 4b	641	(34,5)
	S/I	376	(20,3)
pN*	0	663	(35,8)
	1	172	(9,3)
	2a, 2b, 2c	547	(29,5)
	3, r3	60	(3,2)
	S/I	413	(22,2)
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	603	(32,4)
	Mod. diferenciado	876	(47,3)
	Pouco diferenciado	151	(8,1)
	S/I	227	(12,2)
Invasão sanguínea	Ausente	1233	(66,4)
	Presente	174	(9,4)
	S/I	450	(24,2)
Invasão linfática	Ausente	854	(46,0)
	Presente	509	(27,4)
	S/I	494	(26,6)
Invasão perineural	Ausente	808	(43,5)
	Presente	613	(33,0)
	S/I	436	(23,5)
Estádio patológico*	0	8	(0,4)
	I	98	(5,2)
	II	174	(9,4)
	III	179	(9,6)
	IV	882	(47,5)
	S/I	516	(27,9)

S/I: sem informação, *estádio patológico conforme sistema TNM

4.10.2. DESCRIÇÃO DA AMOSTRA PAREADA

Vinte e cinco casos de pacientes <40 anos, que apresentavam material biológico disponível, foram pareados para a análise de dados anatomopatológicos, de imunoistoquímica e de positividade para HPV. A idade média do grupo de pacientes <40 anos foi de 34,9 anos (DP = 4,77), com mediana de 37 anos (mínima de 24 anos, máxima de 39 anos), enquanto que, no grupo de pacientes ≥40 anos, a idade média foi de 59,5 anos (DP = 8,04), com mediana de 59 anos (mínima de 44 anos, máxima de 72 anos). Os dados raciais dos dados pareados estão na tabela 5.

Tabela 5- Dados raciais dos casos pareados

Raça	Pacientes com tumores de cabeça e pescoço	
	<40 anos	≥40 anos
Branca	14 (56,0%)	36 (73,5%)
Parda	6 (24,0%)	6 (12,2%)
Preta	3 (12%)	6 (12,2%)
Amarela	1 (4,0%)	0
Índigena	1 (4,0%)	1 (2,0%)

Em relação à localização, novamente nota-se predominância em casos de cavidade oral, seguido de orofaringe. Apenas quatro casos eram de carcinomas de laringe, e um único caso de hipofaringe.

Tabela 6- Localização e estadiamento dos casos pareados

Localização do Tumor	Pacientes com CECp	
	<40 anos	≥40 anos
Cavidade oral	15 (60,0%)	30 (61,2%)
Hipofaringe	1 (4,0%)	2 (4,1%)
Laringe	4 (16,0%)	7 (14,3%)
Orofaringe	5 (20,0%)	10 (20,4%)
<i>Estadiamento TNM</i>		
T1N0	2 (8,0%)	4 (8,2%)
T1N1	1 (4,0%)	2 (4,1%)
T1Nx	1 (4,0%)	2 (4,1%)
T2N0	2 (8,0%)	4 (8,2%)
T2N1	3 (12,0%)	6 (12,3%)
T2N2b	1 (4,0%)	2 (4,1%)
T2N2c	1 (4,0%)	2 (4,1%)
T2N2c	1 (4,0%)	2 (4,1%)
T3N1	1 (4,0%)	2 (4,1%)
T4aN0	1 (4,0%)	2 (4,1%)
T4aN2c	1 (4,0%)	2 (4,1%)
T4N0	2 (8,0%)	4 (8,2%)
T4N1	1 (4,0%)	2 (4,1%)
T4N2b	3 (12,0%)	5 (10,2%)
T4N2c	4 (16,0%)	8 (16,3%)

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DOS CASOS POR PAREAMENTO

5.1.2. DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

No que tange às características anatomopatológicas, nota-se que não foram encontradas diferenças significativas entre os tamanhos máximos das neoplasias, bem como de suas espessuras, e graus de diferenciação, como discriminado na Tabela 7.

Tabela 7- Características anatomopatológicas dos casos pareados: tamanho, espessura, diferenciação e profundidade de invasão

Característica	Pacientes com CECp		Valor de p
	<40 anos	≥40 anos	
Tamanho máximo ¹			0,818¶
Mediana (mín-máx)	3,50 (0,6-7,0)	3,00 (1,0-8,0)	
Espessura ²			0,339¶
Mediana (mín-máx)	1,85 (0,10-5,0)	1,50 (0,4-5,5)	
Diferenciação ³			0,649†
Pouco diferenciado	1 (4,5%)	3 (6,3%)	
Moderadamente	11 (50,0%)	25 (52,1%)	
Bem diferenciado	8 (36,4%)	18 (37,5%)	
Não avaliável	2 (9,1%)	2 (4,2%)	
Profundidade da invasão ⁴			NA
Cartilagem	0	4 (8,7%)	
Lâmina própria	1 (4,5%)	4 (8,7%)	
Microinvasivo	0	1 (2,2%)	
Plano muscular	17 (77,3%)	30 (65,2%)	
Outras estruturas	2 (9,1%)	7 (15,2%)	
Não avaliável	2 (9,1%)	0	

¹Quatro casos sem informação. ²Quatorze casos sem informação. ³Quatro casos sem informação. ⁴Seis casos sem informação. ¶ Teste t de amostras pareadas. † Teste McNemar. NA: não avaliável. Mín-máx: mínimo – máximo. DP: desvio padrão.

No caso das invasões vascular, linfática e perineural, bem como características dos infiltrados inflamatórios e avaliação de margens, nota-se que suas ocorrências não foram diferentes entre os grupos, como demonstrado na tabela 8.

Tabela 8- Características anatomopatológicas dos casos pareados: invasão vascular, linfática e perineural; infiltrado inflamatório peritumoral

Característica	Pacientes com CEC		Valor de p
	<40 anos	≥40 anos	
Invasão vascular ¹			0,180††
Ausente	18 (81,8%)	36 (76,6%)	
Presente	1 (4,5%)	8 (17,0%)	
Não avaliável	3 (13,6%)	3 (6,4%)	
Invasão linfática ²			0,454†
Ausente	12 (57,1%)	24 (55,8%)	
Presente	6 (28,6%)	16 (37,2%)	
Não avaliável	3 (14,3%)	3 (7,0%)	
Invasão perineural ³			0,804†
Ausente	10 (43,5%)	23 (47,9%)	
Presente	10 (43,5%)	25 (52,1%)	
Não avaliável	3 (13,0%)	0	
Infiltrado inflamatório ⁴			NA
Ausente	0	1 (2,6%)	
Escasso	10 (50,0%)	15 (39,5%)	
Intenso	7 (35,0%)	15 (39,5%)	
Moderado	1 (5,0%)	7 (18,4%)	
Não avaliável	2 (10,0%)	0	
Margens comprometidas ⁵			1††
Livres	17 (77,3%)	42 (89,4%)	
Comprometidas	3 (13,6%)	5 (10,6%)	
Não avaliável	2 (9,1%)	0	

¹Cinco casos sem informação. ²Dez casos sem informação. ³Três casos sem informação.

⁴Dezesseis casos sem informação. ⁵Cinco casos sem informação. † Teste McNemar. ††

Teste McNemar considerando as categorias: ausente e presente.

5.1.3. MARCADORES BIOLÓGICOS

5.1.3.1. p53

Não se encontrou diferenças estatisticamente significativas entre os valores de p53 em amostras tumorais e não tumorais, como demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9- Comparação: p53, tumor e margem

p53	<40 anos	≥40 anos	Valor de p ¹
Tumor	N=40	N=43	
Mediana (mín-máx)	285,50 (0-471)	240,00 (0-500)	0,535
Margem	N=18	N=22	
Mediana (mín-máx)	21,00 (0-122)	21,00 (0-316)	0,570

¹ Teste de t pareado. Mín-máx: mínimo – máximo. DP: desvio padrão.

Nas figuras 1 e 2 há exemplos de marcação nuclear pelo p53 em amostras tumorais e não tumorais, respectivamente.

Fig. 1: marcação nuclear pelo p53 em amostra tumoral (MO, 400x)

Fig. 2: marcação nuclear pelo p53 em amostra não tumoral (200x)

5.1.3.2. Ki-67

Não foram encontradas diferenças significativas na expressão deste imunomarcador, ao se comparar 40 pares de amostras tumorais, entre os dois grupos. Na análise das amostras não tumorais, nota-se que o grupo de pacientes ≥ 40 anos apresentou maior expressão do Ki-67, conforme exposto na tabela 10 e no gráfico da Figura 3.

Tabela 10- Comparação: Ki67, tumor e margem não tumoral

Ki-67	Nº pares	<40 anos	≥ 40 anos	Valor de p [†]
Tumor				
Média (DP)	40	237,54 (140,51)	225,40 (124,55)	0,669
Margem				
Média (DP)	22	53,88 (59,54)	104,66 (96,01)	0,021

[†] Teste t Pareado.

Fig.3: representação do gráfico de caixas (*boxplot*) para o Ki-67 em tumor e margem entre pacientes com ≤ 40 de anos e >40 anos

Nas figuras 4 e 5, temos exemplos de marcação nuclear pelo Ki-67 em amostras tumorais e não tumorais.

Fig. 4: marcação nuclear pelo Ki-67 em amostra tumoral (MO, 100x)

Fig. 5: marcação nuclear pelo Ki-67 em amostra não tumoral (MO, 400x)

5.1.3.3. p16

Foram passíveis de análise 25 casos com até 2 controles por caso, e para somente um dos casos obteve-se um único controle. Não houve diferença de sua expressão na comparação entre os grupos, conforme a Tabela 11. A análise do p16 foi realizada apenas em amostras tumorais.

Tabela 11- Comparação: valor do p16

		<40	≥40	
P16				Valor de p [†]
	Negativo	32 (78,0%)	1 (2,4%)	0,125
	Positivo	6 (14,6%)	2 (4,9%)	

[†] Teste McNemar.

Na figura 6, temos exemplos de marcação nuclear pelo p16 em amostra tumoral.

Fig. 6: marcação citoplasmática e nuclear pelo p16 (MO, 200x)

5.1.3.4. VEGF

Foram passíveis de análise 28 pares de amostras tumorais, e 17 pares de amostras de margens. As figuras 7 e 8 exemplificam casos de marcação citoplasmática em amostra tumoral, e de margens.

Fig. 7: marcação citoplasmática pelo VEGF em amostra tumoral (MO, 100x)

Fig. 8: marcação citoplasmática pelo VEGF em amostra não tumoral (MO, 200x)

A imunoexpressão não foi diferente entre os grupos, como exposto na tabela 12.

Tabela 12- Comparação: VEGF tumor e margem

VEGF	Valor dos controles	Nº de pares	Valores dos casos				Valor de p†
			<10%	10-40%	40-70%	>70%	
Tumor		28					0,423
	<10%		1(3,6%)	1 (3,6%)	2 (7,1%)	6(21,4%)	
	10-40%		0	0	0	1 (3,6%)	
	40-70%		0	1 (3,6%)	0	2 (7,1%)	
	>70%		3 (10,7%)	3 (10,7%)	2 (7,1%)	6 (21,4%)	
Margem		17					0,700
	<10%		5(29,4%)	1 (5,9%)	3(17,6%)	2(11,8%)	
	10-40%		1 (5,9%)	0	0	0	
	40-70%		1 (5,9%)	1 (5,9%)	0	0	
	>70%		2(11,8%)	1 (5,9%)	0	0	

† Teste McNemar.

5.1.3.5. EGFR

No caso do EGFR, foram passíveis de análise 36 pares de amostras tumorais, e 29 pares de amostras de margens. Nas figuras 9 e 10, vemos exemplos de casos de marcação de membrana em amostra tumoral e em amostra não tumoral.

Fig. 9: marcação de membrana pelo EGFR em amostra tumoral (MO, 400x)

Fig. 10: marcação de membrana pelo EGFR em amostra não tumoral (MO, 100x)

A imunexpressão não foi diferente entre os grupos, conforme a Tabela 13.

Tabela 13- Comparação: EGFR tumor e margem

EGFR	Valor dos controles	Nº de pares	Valores dos casos				Valor de p [†]
			<10%	10-40%	40-70%	>70%	
Tumor		36					0,074
	<10%		2 (5,6%)	0	0	3 (8,3%)	
	10-40%		0	0	1 (2,8%)	3 (8,3%)	
	40-70%		0	1 (2,8%)	0	2 (5,6%)	
	>70%		0	2 (5,6%)	10 (27,8%)	12 (33,3%)	
Margem		29					0,945
	<10%		7 (24,1%)	3 (10,3%)	1 (3,4%)	0	
	10-40%		2 (6,9%)	7 (24,1%)	1 (3,4%)	1 (3,4%)	
	40-70%		3 (10,3%)	1 (3,4%)	0	1 (3,4%)	
	>70%		0	1 (3,4%)	1 (3,4%)	0	

[†] Teste McNemar.

5.1.4. HPV

5.1.4.1. HPV16E7

A pesquisa de HPV tipo 16 por PCR mostrou positividade em apenas um caso, em uma paciente <40 anos portadora de CEC de orofaringe, conforme a Figura 11.

Fig. 11: Curvas de Amplificação HPV16E7: Controle Positivo e Amostras

5.1.4.2. HPV18E7

A pesquisa de HPV tipo 18 foi negativa em todos os casos, em ambos os grupos, conforme mostra a Figura 12.

Fig. 12: Curvas de Amplificação HPV18E7: Controle Positivo e Amostras

5.5. HÁBITOS

5.2. TABAGISMO

A tabela 16 mostra a distribuição dos casos de tabagismo segundo as faixas etárias. Há associação estatisticamente significativa entre o hábito de fumar e a faixa etária, sendo que a maioria dos pacientes ≥ 40 anos era tabagista, ou ex-tabagista, no momento de entrevista (93%), enquanto que no grupo < 40 anos essa proporção foi de 82,3%, como demonstrado na Tabela 14.

Tabela 14- Distribuição dos casos segundo tabagismo e faixa etária

Tabagismo	Faixa etária		Total N=541 n (%)	Valor de p ¹
	<40 anos N=30	≥40 anos N=511		
	n (%)	n (%)		
Não tabagista	6 (17,6)	46 (6,7)	52 (7,3)	
Tabagista atual	22 (64,7)	468 (68,5)	490 (68,3)	0,048
Ex-tabagista	6 (17,6)	169 (24,7)	175 (24,4)	

¹ Teste de associação qui-quadrado.

Ao se comparar a carga de tabaco entre tabagistas e ex-tabagistas, tanto nos grupos de pacientes <40 anos e ≥40 anos, nota-se que a carga tabágica entre os pacientes <40 anos foi significativamente menor, se comparada à carga dos pacientes ≥40 anos, conforme demonstrado na Tabela 15.

Tabela 15- Carga de tabaco entre <40 e ≥40 anos

Carga de Tabaco (Maços- Ano)			Valor de p ¹
	<40	≥40	
Média (DP)	15,6 (14,6)	44,4 (32,2)	<0,0001

¹ Teste t de Student.

5.3. ETILISMO

Ao compararmos o etilismo entre os grupos, nota-se que no grupo de pacientes <40 anos, a proporção de não etilistas foi de 20,6% no grupo <40 anos, e de 12,5% no grupo ≥ 40 anos, no entanto não se encontraram diferenças estatisticamente significativas, conforme exposto na tabela 16.

Tabela 16- Distribuição dos casos segundo etilismo e faixa etária

Etilismo	Faixa etária		Total	Valor de p ¹
	<40 anos	≥ 40 anos	N=541	
	N=30 n (%)	N=511 n (%)	n (%)	
Não etilista	7 (20,6)	85 (12,5)	92 (12,8)	0,079
Etilista atual	20 (58,8)	334 (49,0)	354 (49,4)	
Ex-etilista	7 (20,6)	263 (38,6)	270 (37,7)	

¹ Teste de associação qui-quadrado.

Em relação à quantidade acumulada, em termos de gramas de etanol/ano, nota-se que os pacientes <40 anos apresentaram valores significativamente menores, conforme demonstrado na tabela 17.

Tabela 17- Gramas de etanol/ano, entre <40 e ≥ 40 anos

Carga Etílica (gramas de etanol/ano)			Valor de p ¹
	<40	≥ 40	
Média (DP)	1717,6 (2212,9)	5170,6 (7865,6)	0,012

¹ Teste t de Student.

5.4. SOBREVIDA

Para o cálculo da sobrevida, tanto global como livre de doença, dados do toda a coorte foram analisados, o que resultou em um total de 1109 pacientes com dados de seguimento passíveis de análise. Deste total, 34 casos eram de pacientes <40 anos.

Devido a um único paciente <40 anos possuir CEC de Hipofaringe, os dados desse subsítio não foram analisados.

5.4.1 SOBREVIDA GLOBAL

Na tabela 18 estão discriminadas as probabilidades de sobrevida global para o total de pacientes segundo a faixa etária.

Tabela 18- Probabilidade de sobrevida global

	Probabilidade de sobrevida				
	1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos
Sobrevida Global	75%	61%	53%	50%	46%
≤40 anos	79%	60%	53%	53%	53%
>40 anos	75%	61%	53%	50%	46%

A curva de sobrevida global está discriminada na Figura 13, e a de sobrevida global por faixa etária está discriminado na Figura 14.

Fig.13: representação gráfica da curva de sobrevida global

Fig. 14: representação gráfica da sobrevida global segundo faixa etária

5.4.1.2. SOBREVIDA GLOBAL POR LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA E FAIXA ETÁRIA

Na tabela 19, estão as probabilidades de sobrevida global para os casos de cavidade oral, laringe e orofaringe.

Tabela 19- Probabilidade de sobrevida global segundo localização do tumor e faixa etária

Sobrevida Global		Probabilidade de sobrevida				
		1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos
Cavidade oral	≤40 anos	83%	60%	54%	54%	54%
	>40 anos	76%	63%	56%	52%	47%
Laringe	≤40 anos	71%	56%	56%	56%	56%
	>40 anos	81%	69%	61%	59%	54%
Orofaringe	≤40 anos	71%	57%	41%	41%	41%
	>40 anos	65%	49%	41%	36%	34%

As curvas de sobrevida global para cavidade oral conforme faixa etária estão discriminadas na Figura 15, onde nota-se não haver diferenças estatísticas entre elas.

Fig. 15: representação gráfica das curvas de sobrevida global para cavidade oral e faixa etária

As curvas de sobrevida global para laringe conforme faixa etária está discriminado na Figura 16. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Fig. 16: representação gráfica das curvas de sobrevida global para laringe e faixa etária

O gráfico com as curvas de sobrevida global para orofaringe conforme faixa etária está discriminado na Figura XX, onde não se observou diferenças entre elas.

Fig. 17: representação gráfica da sobrevida global para orofaringe e faixa etária

5.4.1.3. SOBREVIDA GLOBAL POR ESTÁDIO CLÍNICO E FAIXA ETÁRIA

Foram realizadas análises de sobrevida por estágio clínico, com comparações entre as diferentes faixas etárias. Uma tabela com as probabilidades de sobrevida global, em função dos estádios clínicos e da faixa etária, está discriminada na tabela 20.

Tabela 20- Cavidade oral: Probabilidade de sobrevida global segundo estágio clínico e faixa etária

Sobrevida Global		Probabilidade de sobrevida				
		1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos
EC I	≤40 anos	100%	100%	100%	100%	100%
	>40 anos	90%	80%	68%	68%	63%
EC II	≤40 anos	67%	67%	67%	67%	67%
	>40 anos	88%	80%	74%	70%	68%
EC III	≤40 anos	100%	64%	64%	64%	64%
	>40 anos	87%	71%	65%	59%	45%
EC IV	≤40 anos	70%	40%	30%	30%	30%
	>40 anos	64%	50%	40%	38%	35%

A tabela 21 mostra as probabilidades de sobrevida global nos casos de neoplasias de laringe, comparando-se as faixas etárias. Os casos de Estádio Clínico I não foram relacionados, por não haverem casos entre os pacientes <40 anos.

Tabela 21- Laringe: Probabilidade de sobrevida global segundo estágio clínico e faixa etária

Sobrevida Global		Probabilidade de sobrevida				
		1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos
EC I	≤40 anos	-	-	-	-	-
	>40 anos	91%	82%	76%	76%	70%
EC II	≤40 anos	100%	100%	100%	100%	-
	>40 anos	96%	94%	85%	85%	85%
EC III	≤40 anos	100%	0%	-	-	-
	>40 anos	75%	62%	56%	54%	46%
EC IV	≤40 anos	60%	60%	60%	60%	60%
	>40 anos	76%	61%	51%	49%	46%

A tabela 22 mostra as probabilidades de sobrevida global segundo Estádio Clínico dos casos de orofaringe. Os casos de Estádio Clínico I não foram relacionados, uma vez que não havia nenhum caso entre os pacientes <40 anos.

Tabela 22- Orofaringe: Probabilidade de sobrevida global segundo estágio clínico e faixa etária

Sobrevida Global		Probabilidade de sobrevida				
		1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos
EC I	≤40 anos	-	-	-	-	-
	>40 anos	100%	88%	88%	75%	60%
EC II	≤40 anos	50%	50%	50%	50%	50%
	>40 anos	92%	85%	68%	68%	68%
EC III	≤40 anos	100%	100%	100%	-	-
	>40 anos	72%	66%	55%	49%	46%
EC IV	≤40 anos	75%	50%	25%	25%	25%
	>40 anos	56%	35%	28%	24%	24%

5.4.2. SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

Na tabela 23 estão discriminadas as probabilidades de sobrevida livre de doença para o total de pacientes.

Tabela 23- Probabilidade de sobrevida livre de doença

	Probabilidade de sobrevida				
	1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos
Sobrevida livre de doença	80%	70%	66%	63%	61%
≤40 anos	68%	64%	61%	61%	61%
>40 anos	80%	70%	66%	63%	61%

A curva de Sobrevida livre de doença está na Figura 18, e a Figura 19 mostra a curva de sobrevida livre de doença segundo faixa etária, onde nota-se não haver diferença estatisticamente significativa entre elas.

Fig: 18: representação gráfica da sobrevida livre de doença

Fig. 19: representação gráfica das curvas de sobrevida livre de doença segundo faixa etária

Apesar de não se observar diferença a longo prazo, na análise das tabuas de vida e das curvas de sobrevida isoladas do primeiro ano de seguimento, nota-se que a sobrevida livre de doença é pior nos pacientes <40 anos precocemente, conforme demonstrado na Figura 20 ($p=0,042$).

Fig. 20: representação gráfica das curvas de sobrevida livre de doença no primeiro ano

5.4.2.1 SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA POR LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA E FAIXA ETÁRIA

Na tabela 24, estão as probabilidades de sobrevida livre de doença para os casos de cavidade oral, laringe e orofaringe, segundo faixa etária.

Tabela 24- Probabilidade de sobrevida livre de doença segundo localização do tumor e faixa etária

	Sobrevida livre de doença	Probabilidade de sobrevida				
		1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos
Cavidade oral	≤40 anos	64%	59%	59%	59%	59%
	>40 anos	80%	70%	65%	61%	60%
Laringe	≤40 anos	85%	85%	85%	85%	85%
	>40 anos	88%	79%	76%	74%	71%
Orofaringe	≤40 anos	57%	57%	34%	34%	34%
	>40 anos	70%	57%	54%	50%	50%

As curvas de sobrevida livre de doença para cavidade oral conforme faixa etária está discriminado na Figura 21, onde nota-se não haver diferenças estatísticas entre elas.

Fig. 21: representação gráfica das curvas de sobrevida livre de doença para cavidade oral e faixa etária

As curvas de sobrevida livre de doença para laringe conforme faixa etária está discriminado na Figura 22, onde nota-se não haver diferenças estatísticas entre elas.

Fig. 22: representação gráfica das curvas de sobrevida livre de doença para laringe e faixa etária

As curvas de sobrevida livre de doença em casos de orofaringe estão demonstradas na Figura 23, sem diferenças estatísticas entre os grupos.

Figura 23: representação gráfica das curvas de sobrevida livre de doença para orofaringe e faixa etária

5.4.2.2. SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA POR ESTÁDIO CLÍNICO E FAIXA ETÁRIA

Foram realizadas análises de sobrevida livre de doença por estágio clínico, com comparações entre as diferentes faixas etárias. As probabilidades de sobrevida livre de doença, em função dos estádios clínicos e faixa etária, estão discriminadas na tabela 25.

Tabela 25- Cavidade oral: Probabilidade de sobrevida livre de doença segundo estágio clínico e faixa etária

Sobrevida livre de doença		Probabilidade de sobrevida				
		1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos
EC I	≤40 anos	100%	100%	100%	100%	100%
	>40 anos	97%	85%	85%	85%	78%
EC II	≤40 anos	67%	67%	67%	67%	67%
	>40 anos	86%	76%	75%	73%	73%
EC III	≤40 anos	67%	67%	67%	67%	67%
	>40 anos	79%	66%	65%	55%	53%
EC IV	≤40 anos	47%	36%	36%	36%	36%
	>40 anos	74%	67%	57%	53%	52%

A tabela 26 mostra as probabilidades de sobrevida livre de doença nos casos de neoplasias de laringe. Não havia casos de Estádio Clínico I entre jovens.

Tabela 26- Laringe: Probabilidade de sobrevida segundo estágio clínico e faixa etária

Sobrevida livre de doença		Probabilidade de sobrevida				
		1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos
EC I	≤40 anos	-	-	-	-	-
	>40 anos	97%	87%	87%	87%	87%
EC II	≤40 anos	100%	100%	100%	100%	-
	>40 anos	96%	94%	91%	88%	88%
EC III	≤40 anos	100%	100%	-	-	-
	>40 anos	84%	76%	73%	69%	66%
EC IV	≤40 anos	78%	78%	78%	78%	78%
	>40 anos	84%	73%	68%	68%	63%

Na Tabela 27 estão as probabilidades de sobrevida segundo Estádio Clínico dos casos de orofaringe. Os casos de Estádio Clínico I não foram relacionados, uma vez que não havia nenhum caso entre os pacientes jovens.

Tabela 27- Orofaringe: Probabilidade de sobrevida segundo estágio clínico e faixa etária

		Probabilidade de sobrevida				
	Sobrevida Livre de doença	1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos
EC I	≤40 anos	-	-	-	-	-
	>40 anos	89%	78%	78%	78%	78%
EC II	≤40 anos	50%	50%	50%	50%	50%
	>40 anos	92%	69%	69%	59%	59%
EC III	≤40 anos	100%	100%	100%	-	-
	>40 anos	85%	72%	70%	61%	61%
EC IV	≤40 anos	50%	50%	0%	-	-
	>40 anos	60%	48%	44%	42%	42%

5.4.3. REGRESSÃO DE COX

Na regressão de Cox univariada, calculamos o risco de morte para todos os sítios, bem como para cada sítio isoladamente. As variáveis que entraram no modelo foram o gênero, a faixa etária, o sítio, o estágio clínico, tabagismo e etilismo. Observou-se que, no caso dos carcinomas de orofaringe, o estágio avançado (independente do sítio) e o etilismo (em casos de tumores de cavidade oral e laringe) estiveram associados a risco de morte aumentado quando analisados isoladamente. Os dados estão compilados na Tabela 28.

Tabela 28- Regressão de Cox univariada

Variável	Geral HR (IC95%)	Valor de p	Cavidade oral HR (IC95%)	Valor de p	Laringe HR (IC95%)	Valor de p	Orofaringe HR (IC95%)	Valor de p
Gênero		0,208		0,199		0,275		0,603
Fem	1,00		1,00		1,00		1,00	
Masc	1,23 (0,89-1,70)		1,32 (0,87-2,00)		1,59 (0,69-3,63)		0,84 (0,43-1,64)	
Faixa Etária		0,481		0,640		0,885		0,796
<40	1,00		1,00		1,00		1,00	
≥40	0,84 (0,52-1,36)		0,86 (0,47-1,60)		0,90 (0,22-3,67)		0,89 (0,36-2,21)	
EC1 ¹		<0,001		<0,001		0,001		0,010
I-II	1,00		1,00		1,00		1,00	
III-IV	2,43 (1,84-3,21)		2,26 (1,56-3,28)		2,27 (1,38-3,72)		3,30 (1,32-8,21)	
Tabagismo		0,197		0,794		0,235		0,281
sim	1,00		1,00		1,00		1,00	
não	1,34 (0,86-2,07)		1,09 (0,62-1,91)		1,85 (0,67-5,09)		1,75 (0,63-4,86)	
Etilismo		0,012		0,326		0,026		0,564
sim	1,00		1,00		1,00		1,00	
não	1,63 (1,11-2,40)		1,28 (0,78-2,10)		2,26 (1,10-4,64)		1,42 (0,43-4,61)	

¹Estádio Clínico

No caso da regressão multivariada, as mesmas variáveis incluídas na regressão univariada foram usadas para o ajuste da estimativa de risco de morte. Novamente o estágio avançado e o etilismo (apenas para os casos de CEC de laringe) foram preditores de pior sobrevida global. Esses dados estão demonstrados na tabela 29.

Tabela 29. Regressão de Cox múltipla

Variável	Geral	Valor	Cavidade oral	Valor	Laringe	Valor	Orofaringe	Valor
	HR (IC95%)	de p	HR (IC95%)	de p	HR (IC95%)	de p	HR (IC95%)	de p
Gênero		0,969		0,350		0,936		0,282
Feminino	1,00		1,00		1,00		1,00	
Masculino	0,99 (0,67-1,47)		1,31 (0,74-2,33)		1,04 (0,42-2,59)		0,64 (0,29-1,44)	
Faixa etária		0,704		0,912		0,909		0,540
≤40 anos	1,00		1,00		1,00		1,00	
>40 anos	0,91 (0,56-1,48)		0,97 (0,52-1,80)		0,92 (0,20-4,16)		0,73 (0,27-1,98)	
EC ¹		<0,001		<0,001		0,001		0,013
I-II	1,00		1,00		1,00		1,00	
III-IV	2,37 (1,78-3,16)		2,16 (1,48-3,17)		2,45 (1,45-4,14)		3,22 (1,28-8,15)	
Tabagismo		0,608		0,516		0,861		0,353
sim	1,00		1,00		1,00		1,00	
não	0,87 (0,52-1,47)		0,77 (0,35-1,70)		1,10 (0,36-3,35)		2,13 (0,43-10,56)	
Etilismo		0,082		0,896		0,024		0,768
sim	1,00		1,00		1,00		1,00	
não	1,53 (0,95-2,45)		1,05 (0,48-2,30)		2,55 (1,13-5,73)		0,77 (0,13-4,39)	

¹Estádio Clínico

A Fig. 24 mostra as curvas de sobrevida para ambos os grupos, de acordo com o estágio clínico.

Fig. 24: representação gráfica das curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para faixa etária e estadiamento

6. DISCUSSÃO

A maior motivação para a realização deste estudo é a investigação de uma doença que, apesar de relativamente comum na população, apresenta uma prevalência nitidamente crescente em pacientes jovens. O câncer na região da cabeça e pescoço é uma doença que causa profundo impacto na qualidade de vida de seus portadores e de todos os seus familiares e, quando acomete pessoas na faixa dos trinta anos, uma idade altamente produtiva em termos de perspectivas pessoais, torna-se ainda mais preocupante. Apesar disso, há poucos estudos que compararam especificamente grupos de pacientes em diferentes faixas etárias, com avaliação de diferentes marcadores moleculares. Isso se deve à ainda raridade dessa apresentação, com consequente necessidade de grandes séries de casos para obter um número significativo de pacientes em idade mais precoce. Há que se notar, ainda, a uniformidade da coleta de dados, bem como do tratamento instituído, uma vez que, apesar de tratar-se de estudo multi-institucional, a quase totalidade dos pacientes nesta série foi submetida a tratamento cirúrgico, seguido de radioterapia.

Do ponto de vista de avaliação de diversas raças, não houve diferença de apresentação entre elas, o que significa que o CECp em jovens não apresentou preferência por populações distintas, quando comparados ao grupo de pacientes ≥ 40 anos, mantendo-se uma predominância de incidência da população branca em ambas as populações estudadas. Em um amplo estudo populacional nos Estados Unidos utilizando-se de dados do SEER, Shantz *et al.* também não encontraram diferenças de distribuição em termos de diferentes grupos étnicos, embora notaram que, no período entre 1985 e 1997, em comparação com o período 1973-1984, houve melhora em 20% nos dados de sobrevida em cinco anos para pacientes jovens e brancos, o que não foi

visto na população negra, sugerindo uma influência socioeconômica como explicação¹⁴⁶. Importante ressaltarmos que, devido à miscigenação tão característica na população brasileira, a divisão em raças pode se tornar controversa. No GENCAPO, os entrevistadores perguntam aos pacientes como eles próprios se classificam em termos de raça, e qual a raça de seus antepassados, e acabam por defini-la.

Um dado que chama a atenção é a relação entre homens e mulheres nas duas faixas etárias, com 23,1% dos casos em pacientes femininas no grupo <40 anos (relação homem/mulher 6,14/1), contra 13,5% no grupo ≥40 anos (relação homem/mulher 3,12/1). Mallet *et al.*, em um estudo envolvendo dados de 10 instituições francesas, viram que a relação Homem/Mulher em casos de câncer de língua em pacientes abaixo de 35 anos foi de 1,88/1¹⁴⁷, enquanto a relação habitual naquele mesmo país gira em torno de 10/1. Acreditamos que isso ocorra devido à influência dos hábitos de tabagismo e etilismo na etiologia do CECP nas duas faixas etárias. Conforme pudemos observar em nossos dados, o tabagismo e o etilismo não são tão frequentes em pacientes <40 anos. Como, para o paciente ≥40 anos, esses hábitos devem ser os fatores etiológicos preponderantes, espera-se que haja um predomínio mais marcante de população masculina.

Em relação à distribuição de neoplasias de acordo com as diversas localizações, nota-se que os pacientes jovens apresentaram uma proporção maior de casos em cavidade oral, se comparados com a população global. Em contrapartida, a proporção de casos em laringe e, principalmente, em hipofaringe, é menor entre os jovens. A maioria dos casos, em diversas séries, é de tumores em cavidade oral, em especial na língua oral, considerado o sítio “responsável” pelo crescimento do CECP em pacientes jovens¹⁴⁸, assim como no nosso estudo. Importante ressaltar que, no GENCAPO,

tumores muito avançados, onde não se consegue definir com exatidão o sítio primário, são classificados em outra categoria, a fim de tentar se evitar erros de categorização. Isso ocorreu de forma mais pronunciada em pacientes com tumores que envolviam tanto a cavidade oral como a orofaringe.

A menor incidência de tabagistas no grupo de pacientes jovens ($p=0.048$), bem como a menor carga de tabaco acumulada, vai de encontro com a percepção de que tal fator de risco não desempenha um papel tão preponderante na etiologia desses tumores, como no estudo de Harris *et al.* que, em 78 pacientes portadores de CECP entre 18 e 39 anos, tinham 28 não tabagistas, e não etilistas¹⁴⁹. Já em relação ao etilismo, a proporção de etilistas não foi diferente entre os grupos, mas a carga de etanol acumulada ao longo da vida foi estatisticamente menor entre os jovens. De qualquer forma, a maior proporção de pacientes não expostos aos clássicos fatores de risco sugere a possibilidade de outros fatores associados ao CECP neste grupo de pacientes, tanto do ponto de vista epidemiológico como genético, fato este amplamente debatido por outros autores que estudaram o tema.

Em relação a dados de anatomia patológica, nossos achados de tamanho do tumor, espessura, grau de diferenciação, bem como de invasões vascular, linfática e perineural, além de infiltrado inflamatório, não mostram diferenças entre os grupos, o que nos sugere que esses tumores não apresentam padrões de crescimento e invasibilidade diferentes dos seus pares em pacientes de maior idade. Dados histológicos em geral não são citados em estudos que comparam as duas populações em questão, com exceção das diferenças histológicas em tumores HPV+, como ausência de queratinização e aspecto basalóide³⁵, mas como nossa positividade para o HPV foi muito baixa, de qualquer forma tal achado não seria esperado. Independente da

negatividade para o HPV, esses achados sugerem que, pelo menos do ponto de vista histológico, os CECP em pacientes jovens não representariam uma categoria diferente de neoplasias, o que poderia, em parte, explicar por que os dois grupos não apresentaram evoluções diferentes a longo prazo.

Em relação aos estudos moleculares, optou-se pela realização de imunoistoquímica por tratar-se de técnica acessível, bastante consolidada e de grande aplicabilidade clínica, não só como método diagnóstico, mas por sua relação com prognóstico em muitos casos. No entanto, há que se ressaltarem alguns aspectos práticos relacionados ao método, em especial a integridade do material a partir das formas convencionais de processamento e armazenagem. Além disso, trata-se de um processo de várias etapas, que devem ser cuidadosamente monitorizadas, afim de se evitar interferências. Especial atenção também deve ser dada à sua correta interpretação, sempre por patologista experiente em relação ao padrão de marcação de cada anticorpo, bem como sua localização, se nuclear ou citoplasmática. Além disso, há alguma controvérsia em relação aos próprios critérios de positividade; em geral considera-se a porcentagem de células marcadas frente ao total. Há alguns programas de imagem que podem facilitar essa marcação, através de contagem de células marcadas em grandes áreas da lâmina, bem como a intensidade da marcação de cada célula. Esse método chegou a ser testado nos casos deste estudo, uma vez que as lâminas foram confeccionadas de modo automatizado, mas devido ao grande pleomorfismo característico dos carcinomas epidermóides da região, considerou-se que tal avaliação não seria de todo adequada, uma vez que seria extremamente laboriosa a determinação exata de quais células, incluindo tamanho e intensidade de marcação, deveriam ser analisadas para cada caso.

Sobre a escolha de cada anticorpo, procurou-se, dentro do contexto do projeto Busca de Marcadores de Agressividade em tumores de Cabeça e Pescoço, buscar aqueles que melhor reflitam atividades importantes na oncogênese, como proliferação celular e neoangiogênese.

De maneira geral, os marcadores p53 e Ki-67 não guardam relação estreita com o prognóstico no CECP, em diversos trabalhos relacionados ao tema. Até o presente momento, não foi encontrada nenhuma referência específica à diferença de marcação tumoral para o Ki-67 entre pacientes jovens, do mesmo modo que o nosso estudo não demonstra qualquer alteração de imunomarcação entre os dois grupos.

Atula *et al.*, em 1996, encontrou mutações do p53 em 51,5% (17/33) de pacientes <40 anos portadores de CECs de língua, e notou tendência à maior indiferenciação nesses casos ($p=0.09$), sendo que, neste mesmo trabalho, a indiferenciação foi fator de mau prognóstico ($p=0.01$), embora o trabalho não tenha feito comparações com o grupo ≥ 40 anos¹⁵⁰. O p53 pode ainda ser influenciado pela presença do HPV uma vez que sua via pode ser inibida pela proteína viral E6, de modo que tumores HPV+ tenderiam a expressar menos o p53¹⁵¹. Ainda assim, estudos que tentaram relacionar o status do p53 baixo a um eventual melhor prognóstico falharam ao encontrar associação direta, do mesmo modo que não se demonstrou diferenças entre a marcação do p53 em pacientes jovens ou não. Nossos dados vão de encontro a essas observações.

Em relação ao marcador de proliferação vascular VEGF, nosso estudo demonstra que os valores de marcação não são diferentes para os dois grupos de pacientes, bem como observou-se que os pacientes que apresentaram metástase distante não apresentaram marcação acentuada. Os estudos que sugeriram que pacientes jovens

podem apresentar metástases distantes com mais frequência¹¹⁶ não fizeram a imunomarcção de VEGF, e em muitos desses casos as neoplasias primárias eram da nasofaringe, sítio este que não foi contemplado neste estudo por razões já citadas.

O marcador EGFR tem sido muito pesquisado na prática clínica, por sua importância prognóstica e em relação à terapia-alvo, porém ainda há poucos estudos que comparam especificamente sua relação com faixa etária. Ao estudar 62 casos de CECs em pacientes entre 18 e 40 anos, Thomas *et al.* viram que, no seguimento em cinco anos, a sobrevida específica foi de 100% em pacientes com baixa expressão de EGFR, contra 81% em pacientes com alta expressão ($p=0,046$), no entanto, não houve comparação com outro grupo de diferente faixa etária. A incidência de positividade por HPV nesta série foi de 4,4%¹⁵². No entanto, esse achado não foi confirmado por Harris *et al.*, provavelmente porque, na sua coorte, praticamente todos os pacientes jovens apresentaram altas expressões deste marcador, mas o autor reconhece haver uma falta de consenso para a definição de escores, bem definidos, com valores de corte bem determinados, o que dificulta comparações¹⁵³. Na nossa casuística, os valores de EGFR também foram igualmente elevados, não apenas em jovens, mas como em ambas as populações.

A maior motivação para o estudo das margens é a sua importância na prática clínica. Considera-se haver dois mecanismos biológicos que explicam o surgimento de metástases precoces. Um deles é a presença de nichos de células tumorais remanescentes após a ressecção, o chamado tumor residual mínimo; outro é a presença de alteração pré-maligna, que pode ser visto à microscopia convencional como uma área displásica, mas pode ser mais bem analisada por mecanismos moleculares¹⁵⁴. A combinação desses fatores pode explicar o clássico modelo de “campo de cancerização”

proposto por Slaughter em 1953¹⁵⁵, de um modo mais moderno, valendo-se de estudos genéticos¹⁵⁶. De qualquer modo, a implicação da displasia na margem cirúrgica ainda é discutível. Apesar de alguns autores terem reportado maior taxa de recidiva local na presença de displasia em margem¹⁵⁷, esse achado não foi reproduzido por outros autores¹⁵⁸. Do ponto de vista histológico, a positividade histológica das margens não diferiu entre os grupos, bem como a análise dos marcadores, com exceção do Ki-67, que foi menos intenso entre os pacientes com mais de 40 anos. Farshadpour *et al.* analisaram margens não tumorais de pacientes não tabagistas e não etilistas, e encontraram uma maior expressão de p53 em não tabagistas e não etilistas, mas uma expressão similar de Ki-67¹⁵⁹. Mesmo em se considerando que o tabagismo e o etilismo foi menor entre os jovens, o desenho deste estudo difere do nosso, de modo que comparações seriam inadequadas. De qualquer forma, a menor expressão de Ki-67 em pacientes com mais de 40 anos, que sugere uma menor proliferação, não pode ser explicada sem outros estudos mais específicos.

Em relação ao HPV, a metodologia a ser abordada pode variar muito conforme a tecnologia e material disponíveis. Considera-se o padrão ouro a pesquisa de RNA viral, uma vez que seu achado implica na interação do vírus com a maquinaria genômica do hospedeiro, e não apenas a sua simples presença. Porém, trabalhar com RNA exigiria amostras a fresco ou congeladas especificamente para esta finalidade, tendo em vista sua facilidade de degradação. Nosso estudo usa material parafinado, que é a rotina de armazenamento das amostras na maioria dos serviços, a partir do qual fizemos a pesquisa do HPV. Para material parafinado, hoje em dia o método mais importante é o INNO-Lipa, um teste imunogenético altamente sensível e capaz de detectar diversos

tipos de HPV. No entanto, trata-se de um método extremamente custoso, e de maior importância na área genital, em especial ao se pesquisar uma flora polivirótica.

O HPV tipo 16 é o agente mais importante na etiologia do CECP, em especial na orofaringe, correspondendo a aproximadamente 95% dos casos¹⁶⁰. Apesar disso, também realizamos testes específicos para o HPV tipo 18, mas ainda assim encontramos um número bastante reduzido de positividade. A incidência encontrada em nosso estudo parece ser inesperadamente mais baixa do que a de outros estudos em pacientes jovens, mas precisamos considerar que não dispomos da real incidência do HPV em casos de cavidade oral e orofaringe no nosso meio. Em um amplo estudo multi-institucional envolvendo países da Europa Central e América Latina, a positividade para HPV, por PCR encontrada também foi baixa, com 3,1 % do total (3/196), incluindo 4,4% na orofaringe (3/68), 3,8% na hipofaringe/laringe (3/78) e 0% em 50 casos de cavidade oral¹⁶¹. Porém, os achados de Kaminagakura *et al.* são bastante diferentes, mesmo em se tratando de uma população brasileira¹⁶². Ao comparar 47 casos de pacientes < 40 anos com 67 pacientes > 50 anos, num total de 114 casos passíveis de realização de PCR, a positividade geral foi de 19,2% (22/114). Ao compararmos os grupos, chegamos 68,2% de casos HPV+ em pacientes <40 anos, contra 31,8% em >50, uma diferença significativa ($p = 0.01$). Ainda assim, esse estudo ainda mostra que 66,3% dos pacientes com tumores HPV+ eram tabagistas, mostrando que o HPV isoladamente não é suficiente para explicar a transformação maligna, fato comprovado em outras séries¹⁶³.

Muitos estudos sugerem que o fenômeno HPV como causador de uma incidência crescente de carcinoma, em especial de orofaringe, está relacionado a uma população predominantemente masculina, com melhores condições sociais e graus mais elevados de escolaridade, o que não representa o universo nos pacientes contemplados neste

estudo. Nas entrevistas do GENCAPO, a categoria correspondente ao menor nível de escolaridade é a de alfabetizado, definido como aquele que se diz capaz de escrever o próprio nome. Na nossa casuística, 62,8% da população tem, no máximo, o primário completo, demonstrando uma baixa escolaridade que supostamente poderia ajudar a explicar a baixa positividade pelo HPV. O estudo de Kaminagakura *et al.* não menciona o nível de escolaridade dos pacientes, mas por tratar-se de serviço com preponderância de atendimento à saúde suplementar, pressupõe-se que o nível de escolaridade seja maior.

Mas ainda há outra questão a se considerar. Kreimer *et al.*, em uma revisão sistemática com 2.642 casos de CECP em 60 estudos de 26 países diferentes; os autores ressaltam as diferenças de positividade em áreas distintas do globo e especula que um dos fatores possivelmente relacionado a essa discrepância seria metodologia inadequada de preservação de amostras biológicas, levando a resultados falsos negativos¹⁶⁴. Na nossa casuística, em aproximadamente dois terços dos casos estudados, não foi possível a obtenção de material genético de boa qualidade, a julgar pela não amplificação da beta-globina. Problemas relacionados às técnicas de fixação, como demora em incluir as peças cirúrgicas em formol, ou mesmo formol de baixa qualidade, ou o armazenamento de material em condições não ideais, podem explicar esse fenômeno.

Diferentemente do que ocorre na orofaringe, o papel do HPV parece ainda não ser bem estabelecido na cavidade oral. Gillison *et al.* viram que, nos casos de carcinomas não orofaríngeos, a sobrevida e o uso de álcool e tabaco não foram estatisticamente diferentes entre os pacientes HPV+ e HPV-, achados muito diferentes se comparados à orofaringe¹⁶⁵. Kabeya *et al.*, em 2010, não encontraram positividade para o HPV em nenhum dos seus 32 casos de carcinomas de língua “móvel”, sendo 10

casos em pacientes com menos de 40 anos, mesmo valendo-se de duas metodologias diferentes, a saber, Hibridização *in situ*, e um novo sistema de genotipagem que utiliza material fresco congelado. Contudo, encontraram uma frequência de 19% de positividade para o p16, sendo dois em dez pacientes com menos de 40 anos¹⁶⁶. Além disso, esse mesmo autor encontrou aumento de expressão de p53 em 67% dos casos positivos para p16, o que sugere que sua expressão não tem relação com o HPV no subsítio estudado, de modo que o aumento da incidência em pacientes jovens ainda tem um mecanismo incerto.

Harris *et al.*, de maneira análoga, mostraram que, apesar da positividade do p16 estar relacionada a melhores sobrevidas global ($p=0,05$) e livre de doença ($p=0,01$), ela não se mostrou um preditor confiável de positividade para o HPV em pacientes jovens, uma vez que foi positivo em 11 / 25 casos, enquanto o HPV foi positivo em 2/25 casos, por PCR, e em nenhum caso, por HIS¹⁶⁴. No já citado estudo de Kaminagakura *et al*, foi investigada a expressão de p16 por IMHQ, comparando-se populações de pacientes jovens e tradicionais. Não se verificou diferenças entre ambos os grupos ($p = 0,48$). Em 21 casos HPV+, 10 (47,6%) eram p16+, e nos 78 casos HPV-, 66 (84,6%) também foram p16-; no entanto, no grupo dos pacientes <40 anos, 50% dos casos HPV+ foram negativos para o p16. Nossos dados mostraram uma positividade de 7 casos para o p16, dos quais quatro em orofaringe, dois em cavidade oral e um em laringe. Não foram vistas diferenças entre ambas as faixas etárias, mas em apenas um caso a pesquisa de HPV foi positiva, de modo que não podemos afirmar que o p16 é um bom preditor para a positividade do HPV em pacientes jovens.

Já na orofaringe, o papel do HPV é muito bem estabelecido, com considerável aumento em sua incidência, em especial em pacientes jovens¹⁶⁵, e notável melhora de

sobrevida nos casos HPV+¹⁶⁶. Nosso único caso positivo em cinco casos de CEC de orofaringe (incidência de 20%) apresentava pescoço positivo à apresentação inicial, e alta expressão do EGFR. O tumor era positivo para o p16 e, na avaliação do p53, aproximadamente 50% das células o expressavam. Apresentou evolução bastante favorável, com dois anos sem evidência de recidiva, de acordo com trabalhos que sugerem que os casos HPV+ e p16+ tem boa evolução. Weinberger *et al.* classificaram os carcinomas de orofaringe em três classes: Classe I (HPV-/p16-); Classe II (HPV+/p16-) e Classe III (HPV+/p16+), com taxas de sobrevida significativamente diferentes entre elas (18, 20 e 79%, respectivamente; $p=0,0095$)¹⁶⁷.

Ao analisarmos os dados de sobrevida, há que se observarem alguns pontos em especial. Nas análises que incluíam ambas as populações em estudo, nota-se que não só não há diferenças nas curvas de sobrevida, porém houve diferenças nas taxas de recidiva precoces entre jovens. O maior índice de recidiva precoce, mas não de sobrevida em cinco anos, é intrigante. Imaginamos que a maior explicação para este achado é a eventual capacidade que o paciente jovem teria de suportar um tratamento de resgate mais agressivo. Se as menores cargas tabágica e etílica também poderiam ajudar a explicar tal ocorrência, é fato que desconhecemos.

Na nossa série, em todos os casos de tumores precoces de cavidade oral, não houve recidivas, não confirmando a impressão de alguns autores de que, em jovens, a taxa de recidivas é maior, mesmo em tumores menos avançados¹⁶⁸. Além disso, a taxa de recidiva em casos mais avançados, classificados como T4, não foi estatisticamente diferente em relação à de pacientes ≥ 40 anos, também não confirmando o achado de que, em pacientes jovens, os casos avançados tem maior incidência de recidiva¹⁶⁸. Nos casos de orofaringe, o achado de que as sobrevidas não foram estatisticamente

diferentes pode ter outra explicação, que é a baixíssima incidência de positividade para o HPV. Inúmeras séries demonstram melhores taxas de sobrevida em pacientes HPV+, o que desvia a curva de sobrevida dos jovens para cima. No entanto, nossos dados vão de acordo com estudos com populações com baixa prevalência de HPV¹⁴⁸. Entre nossos pacientes, a exceção em termos de sobrevida foi a do caso 25, onde um paciente de 32 anos, com CEC de orofaringe T2N0 apresentou recidiva em 14 meses, e óbito em 31 meses.

Em relação aos casos de laringe, a evolução não foi diferente entre os grupos. Mesmo em se considerando que 3 em 4 casos foram T4, a recidiva em paciente jovem ocorreu no único caso de pescoço positivo. Dados de literatura são mais pobres em caracterizar a laringe como sítio frequente de carcinomas em pacientes jovens, e a presença do HPV parece não ter tamanha influência.

Curiosamente, o único caso que tivemos de CEC de hipofaringe não apresentou recidivo em 64 meses, dado não habitualmente observado em tumores nesta localização, que em geral se apresentam em estágios avançados. De qualquer forma, a ocorrência de casos de acometimento de hipofaringe em jovens é tão rara, que frequentemente nem chega a ser citada na maioria dos estudos.

Como limitações desse estudo, podemos primeiramente citar as limitações inerentes a estudos de caráter exploratório, que realizam múltiplas análises. Resultados falsos positivos, ao acaso, podem advir de estudos em que são testadas diversas hipóteses. De forma oposta, pelo fato do CECP ser raro em pacientes jovens, podemos também estar diante de resultados falsos negativos, devido a número limitado de casos. Como em muitos projetos que lidam com amostras biológicas que são finitas, não

conseguimos obter material biológico de todos os pacientes. Acreditamos, contudo, que isso não configurou um erro sistemático de amostragem.

6.1. PERSPECTIVAS FUTURAS

O CECP é o resultado final de um processo que envolve múltiplas etapas ao longo de anos¹⁶⁹. No entanto, o notável aumento de sua incidência entre jovens, muitos não tabagistas, nos faz questionar se os mesmos modelos de alterações genéticas seriam suficientes para explicar sua ocorrência. A instabilidade genética, um importantíssimo mecanismo molecular em CECP, tem sido extensivamente estudada, de modo que há alto nível de conformidade entre padrões específicos de perdas, ou ganhos, de DNA, e sua ocorrência. Por exemplo, perda nos genes 3 e 9p, bem como ganhos dos genes 3, 5, 8 e 11q, tem sido relacionados¹⁷⁰, assim como a perda da região cromossômica 3p¹⁷¹, ou da região 9p21, encontrada em 70-80% dos CECPs¹⁶⁹. No entanto, são muito raros os estudos que analisam alterações genéticas especificamente em pacientes jovens. Toner et al¹⁵⁸ usou hibridização genômica comparativa em uma coorte de pacientes não tabagistas com menos de 40 anos portadores de CEC de cavidade oral (N=10) e a comparou com outra coorte de pacientes tabagistas com idade superior, e encontrou alterações genéticas distintas entre os dois grupos, especificamente em alguns pontos distintos. O primeiro diz respeito à perda da região 3p, um fenômeno que ocorreu em 2/10 pacientes jovens, e em todos os pacientes com idade superior a 40 anos. O segundo refere-se à região 9p21, que não apresentou absolutamente nenhuma alteração em pacientes jovens, porém é consistentemente alterada em pacientes com idade superior.

No entanto, a alteração mais importante refere-se à região de interesse 11q13, que expressa diversos genes relacionados ao CECP. Suas alterações, em especial a amplificação, são eventos mais comuns em pacientes tabagistas, e foram observadas em 60% dos pacientes jovens não tabagistas, contra 80% em pacientes >40 anos, o que sugere que esta alteração pode ter outro fator causal em jovens¹⁵⁹.

Ao estudar a região 7p12, relacionada ao EGFR, Toner encontrou alteração em 50% dos casos, tanto em pacientes jovens como em >40 anos. No entanto, dois terços dos casos positivos para EGFR ocorreram em pacientes não tabagistas, de acordo com outros estudos que mostram aumento de sua expressão em não tabagistas¹⁶⁰.

Estudos prévios envolvendo o p53 em pacientes jovens não tabagistas encontraram que sua hiperexpressão não está relacionada com a clássica mutação nos Exons 5-9¹⁷⁰; além disso, sua expressão pode estar diminuída em pacientes HPV+¹⁷¹, como já previamente comentado.

Em relação ao p16, Toner *et al.* mostraram que a alteração que levou à sua ativação foi a metilação em pacientes <40 anos, em contraste com a deleção, em pacientes > 40 anos¹⁶⁸. Interessante notar que, neste estudo, a pesquisa do HPV foi por mRNA, e a positividade ocorreu em 4 pacientes, apenas um com idade < 40 anos, e todos em topografia de base de língua, o que faz com que o autor conclua que não houve fator causal entre o HPV e o desenvolvimento do CECP nas suas coortes.

Em outras palavras, sugere-se que o CECP em pacientes jovens, em especial não tabagistas, é um grupo distinto, do ponto de vista genético, e não apenas um espectro da doença, impressão esta que demanda novos estudos para averiguação. O simples fato de uma doença ocorrer em faixa etária antecipada em duas décadas, e ainda assim com

incidência crescente, sugere que alguma característica está diferente do padrão, seja uma mudança genética não elucidada, algum outro fator de risco não contemplado, ou alguma tendência não notada. Se o nosso estudo não encontrou diferenças de acordo com a hipótese inicial, há que se empregarem novas abordagens metodológicas, para que consigamos entender melhor não só o CECP em pacientes jovens, mas como as neoplasias em geral.

7. CONCLUSÕES

Nesse estudo, a evolução do CECp em pacientes <40 anos não foi diferente dos pacientes ≥ 40 anos, submetidos aos mesmos padrões de tratamento, tanto em relação à sobrevida global como em relação à sobrevida livre de doença em cinco anos. Já quanto à sobrevida livre de doença, observou-se que pacientes jovens apresentaram recidivas mais precocemente do que os ≥ 40 anos, diferença essa não observada a longo prazo.

As seguintes características anatomopatológicas: tamanho máximo do tumor, invasão vascular, linfática e perineural, bem como a positividade de margens livres, não foram diferentes entre os grupos.

O hábito do tabagismo foi menor em pacientes <40 anos, e a carga tabágica também o foi. O hábito do etilismo não foi diferente entre os grupos, mas a carga de exposição ao etanol foi menor entre os pacientes <40 anos.

As imunoexpressões dos marcadores p53, p16, VEGF e EGFR também não foram diferentes entre os grupos em amostras tumorais e de amostras não tumorais. A imunoexpressão do Ki-67 em amostra tumoral não foi diferente entre os grupos, mas foi mais intensa entre os pacientes ≥ 40 anos.

A positividade para o HPV tipo 16 foi baixa, mesmo em jovens, em apenas um caso de CEC de orofaringe em paciente <40 anos, e negativa para todos os pacientes ≥ 40 anos. A pesquisa de HPV tipo 18 foi negativa em todos os casos, em ambos os grupos.

8. ANEXOS

Anexo 1 – Tabela comparando diferentes estudos

Autor	ano	país	Sítio	Idade	N	Sobrevida Comparada	Tabagismo	Etilismo	HPV %	p16 (%)	p53 (%)	Ki-67	EGFR	VEGF	Observação
Byers	1975	EUA	Lingua oral	30	11		menos	menos	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
Amsterdam	1982	EUA	Cav Oral	35	12	desfavorável		N	N	N	N	N/A	N/A	N/A	
McGregor	1983	Canada	Cav Oral	40		favorável	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	predominancia em mulheres
Son	1985	EUA	Cav Oral / OF		27	desfavorável	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	sugestão de tratamento mais agressivo
Cusumano	1988	EUA	Cav Oral / OF	40	23	N/A	menos	menos	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	maior incidencia em mulheres
Jones	1989	EUA	Lingua	40	11	desfavorável	N/A	N/A	N/A	N/A	N	N/A	N/A	N/A	
Sarkaria	1994	EUA	Lingua oral	40	6	desfavorável	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	sugestão de tratamento mais agressivo
Atula	1996	Finlandia	Lingua	40	34	semelhante	N/A	N/A	N/A	N/A	51	N/A	N/A	N/A	p53+ -tendência a maior indiferenciação
Martin-Granizo	1997	Espanha	Cav Oral	40	24	N/A	igual	igual	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	descrição da coorte
Sorensen	1997	EUA	Lingua	40	11		NT	NE	N/A	N/A	menor	N/A	N/A	N/A	estudo entre NT, NE, p53+
Friedlander	1998	India	Lingua	40	36	semelhante	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	maior taxa de recorrência entre jovens
Myers	2000	EUA	Lingua	40	4%	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	estudo populacional, aumento na incidência
Pitman	2000	EUA	Lingua	40	28	semelhante	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	comparação entre duas coortes
Sisk	2000	EUA	CECP	50	14	semelhante	N/A	N/a	50%/44%	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	melhor sobrevida em HPV+
Iype	2001	India	Cav Oral	35	264	N/A	menos	menos	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	incluiu outros tipos de neoplasia
Schantz	2002	EUA	Lingua	40	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	estudo populacional, aumento na incidência
Popovtzer	2004	Israel	Lingua oral	30		semelhante	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	dois cursos em jovens: agressivos e indolentes
Shiboski	2005	EUA	Cav Oral / OF	44	###	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	estudo populacional, aumento na incidência
Chun	2005	EUA	Cav Oral	40		desfavorável	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
Goldstein	2005	Canada	CECP	45		N/A	menos	menos	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	tendencia a maior recidiva regional
Liao	2006	China	Lingua	40	76	desfavorável	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	maior taxa de metástase distante
Chitapanarux	2006	Tailandia	Cav Oral	45	20	desfavorável	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	recomenda tratamento mais agressivo
Mallet	2009	França	Lingua oral	35	52	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	10 hospitais, razão H/M 1.88/1
Kabeya	2010	Japão	língua "móvel"	40	10	semelhante	38 / 24	34%	zero	19	80	N/A	N/A	N/A	baixa incidência de HPV na lingua
Harris	2010	EUA	Lingua oral	39	25	N/A	48 TE	48 TE	zero / 8	44	60	N/A	84	N/A	baixa incidência de HPV na lingua
Harris	2010	EUA	CECP	39	78	semelhante	menos	menos	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	predominancia em mulheres
Nguyen	2010	EUA	Tonsila	40	226	favorável	N/A	N/A	91% (11/10)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
Monsjou	2011	Holanda	Cav Oral / OF	40	45	N/A	60	67	60(OF)/5(CO)	31	39	N/A	N/A	N/A	alta incidência de HPV em orofaringe
Kaminagakura	2011	Brasil	Cav Oral / OF	40	47	semelhante	igual	igual	68,2/31,8%	43/57	N/A	N/A	N/A	N/A	em jovens, 50% HPV+ foram p16-
Thomas	2011	EUA	Cav Oral	40	62	favorável	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	nota	N/A	sobrevida: EGFR baixo-100%; EGFR alto-86%
Udeabor	2012	Alemanha	Cav Oral / OF	40	38	melhor para jovens	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
Santos	2013	Brasil	CECP	40	26	semelhante	menos	igual	20(OF)/0(CO)	não difere	não difere	não difere	não difere	não difere	compara marcadores entre grupos

Anexo 2 – tabela de casos – parte 1

Id Caso	idade	tabagista	etilista	sítio	TNM	RDT	QT	recidiva	metástase	óbito	SG	SLD
Caso 1	37	Sim	Sim	Cav Oral	T4N2b	Sim	Não	Não	Não	Sim*	58	58
Cont 1a	53	Sim	Sim	Cav Oral	"	Sim	Não	Não	Não	Sim	18	11
Cont 1b	49	Sim	Ex	Cav Oral	"	Sim	Sim	Não	Não	Não	44	44
Caso 2	39	Sim	Sim	Cav Oral	T4N2c	Não	Não	Sim	Não	Sim	12	6
Cont 2a	53	Sim	Sim	Cav Oral	"	Sim	Não	Sim	Não	Sim	26	19
Cont 2b	50	Sim	Sim	Cav Oral	"	Não	Não	Sim	Não	Sim	26	10
Caso 3	29	Ex	Ex	Cav Oral	T2N2c	Sim	Não	Não	Não	Não	98	98
Cont 3a	57	Sim	Sim	Cav Oral	"	Sim	Não	Sim	Não	Sim	19	11
Cont 3b	51	Sim	Sim	Cav Oral	"	Sim	Sim	Não	Não	Não	65	65
Caso 4	39	Não	Não	Laringe	T4N0	Sim	Sim	Não	Não	Não	64	64
Cont 4a	68	Sim	Não	Laringe	"	Não	Não	Não	Não	Não	30	30
Cont 4b	65	Ex	Ex	Laringe	"	Não	Não	Não	Não	Não	4	4
Caso 5	24	Sim	Sim	Orofaring	T4N2c	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	8	6
Cont 5a	50	Sim	Ex	Orofaring	"	Não	Não	Não	Não	Não	6	6
Cont 5b	48	Sim	Sim	Orofaring	"	Sim	Não	Sim	Não	Sim	5	0
Caso 6	37	Sim	Sim	Orofaring	T4N1	Não	Sim	Não	Não	Sim*	2	2
Cont 6a	55	Sim	Sim	Orofaring	"	Sim	Não	Não	Não	Sim	8	6
Cont 6b	69	Sim	Sim	Orofaring	"	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	44	40
Caso 7	34	Sim	Sim	cav oral	T4N2b	Não	Não	Sim	Não	Sim	6	5
Cont 7a	53	Sim	Sim	Cav Oral	"	Sim	Não	Sim	Não	Não	18	3
Cont 7b	49	Sim	Ex	Cav Oral	"	Sim	Sim	Não	Não	Não	44	44
Caso 8	38	Ex	Ex	Cav Oral	T4N0	Sim	Não	Não	Não	Não	86	86
Cont 8a	58	Sim	Não	Cav Oral	"	Sim	Não	Não	Não	Não	4	4
Cont 8b	60	Sim	Ex	Cav Oral	"	Sim	Não	Sim	Não	Sim	17	4
Caso 9	37	Sim	Sim	Cav Oral	T4N2c	Sim	Não	Sim	Não	Sim	13	4
Cont 9a	56	Ex	Sim	Cav Oral	"	Sim	Não	Não	Não	Não	11	11
Cont 9b	72	Sim	Sim	Cav Oral	"	Não	Não	Sim	Não	Não	6	6
Caso 10	39	Sim	Sim	Cav Oral	T4a N2c	Sim	Não	Sim	Não	Sim	13	11
Cont 10a	65	Sim	Ex	Cav Oral	"	Sim	Não	Sim	Não	Sim	18	13
Cont 10b	47	Sim	Sim	Cav Oral	"	Sim	Não	Não	Não	Não	55	55
Caso 11	38	Sim	Sim	Cav oral	T2N1	Sim	Não	Não	Não	Não	17	17
Cont 11a	70	Sim	Não	Cav Oral	"	Não	Não	Não	Não	Não	74	74
Cont 11b	62	Não	Não	Cav Oral	"	Sim	Não	Não	Não	Não	74	74
Caso 12	39	Sim	sim	Cav oral	T2N1	Não	Não	Sim	Não	Sim	11	6
Cont 12a	70	Sim	Não	Cav Oral	"	Não	Não	Não	Não	Não	74	74
Cont 12b	62	Não	Não	Cav Oral	"	Sim	Não	Não	Não	Não	74	74

Anexo 2 – tabela de casos – parte 2

Id Caso	Ki-67 Tu	Ki-67 Mg	VEGF Tu	VEGF Mg	EGFRTu	EGFR Mg	P53 Tu	P53 Mg	P16 Tu	HPV
Caso 1	393	48	1	4	3	1	293	48	-	-
Cont 1a	331	125	4	1	4	1	297	97	-	n/d
Cont 1b										-
Caso 2	214	n/d	4	n/d	3	n/d	444	n/d	-	-
Cont 2a	345	316	4	2	4	4	345	316	-	-
Cont 2b	194	n/d	4	2	4	0	294	78	-	-
Caso 3	421	19	0	2	4	0	421	19	-	-
Cont 3a	199	160	1	0	2	0	0	0	-	n/d
Cont 3b	367	250	4	3	4	3	0	n/d	-	-
Caso 4	325	n/d	3	3	4	3	0	0	-	-
Cont 4a	325	204								n/d
Cont 4b	359	52	0	n/d	4	4	0	n/d	-	-
Caso 5	471	n/d	4	2	4	n/d	471	n/d	-	-
Cont 5a	236	155	4	4	4	2	470	20	-	n/d
Cont 5b	282	181			3	0	73	60	-	-
Caso 6	367	n/d	4	n/d	4	n/d	327	99	-	-
Cont 6a							480	220		n/d
Cont 6b	431	0	3	n/d	3	n/d	469	n/d	-	n/d
Caso 7	247	170	4	3	4	0	448	80	-	-
Cont 7a	331	125	4	1	4	1	297	90	-	-
Cont 7b										n/d
Caso 8	99	n/d	3	1	3	n/d	272	90	-	-
Cont 8a	185	63	4	3	4	3	454	10	-	-
Cont 8b	383	92	4	4	4	3	0	0	-	n/d
Caso 9	42	n/d	2	n/d	2	1	141	122	-	-
Cont 9a	50	n/d	4	n/d	4	n/d	0	0	-	-
Cont 9b	242	20			3	1	420	189	-	n/d
Caso 10	370	n/d	2	0	4	n/d	364	99	-	-
Cont 10a	88	81	4	2	4	2	381	100	-	-
Cont 10b	205	120	3	1	4	2	0	n/d	-	-
Caso 11	214	122	4	n/d	4	2	468	n/d	-	-
Cont 11a	330	261	0	1	1	1	485	n/d	-	n/d
Cont 11b	444	n/d	0	1	2	2	216	0	-	-
Caso 12	186	20	4	3	4	2	99		-	-
Cont 12a	330	261	0	1	1	1	485	n/d	-	n/d
Cont 12b	444	n/d	0	1	2	2	216	0	-	n/d

Anexo 2 – tabela de casos – parte 3

Id Caso	idade	tabagista	etilista	sítio	TNM	RDT	QT	recidiva	metástase	óbito	SG	SLD
Caso 13	39	Sim	Não	Laringe	T2N0	Sim	Sim	Não	Não	Não	52	52
Cont 13a	70	Ex	Ex	Laringe	"	Não	Não	Não	Não	Não	94	94
cont 13b	44	Ex	Não	Laringe	"	Não	Não	Não	Não	Não	103	103
Caso 14	25	não	Não	Cav oral	T2N2c	Sim	Sim	Não	Não	Não	113	113
Cont 14a	51	Sim	Sim	Cav Oral	"	Sim	Sim	Não	Não	Não	65	65
Cont 14b	57	Sim	Sim	Cav Oral	"	Sim	Não	Sim	Não	Sim	19	11
Caso 15	38	Não	Não	Orofaringe	T1N0	Não	Não	Não	Não	Não	115	115
Cont 15a	59	Sim	Sim	Orofaringe	"	Não	Não	Não	Não	Não	100	100
Cont 15b	49	Sim	Sim	Orofaringe	"	Sim	Não	Não	Não	Não	71	71
Caso 16	39	Sim	Sim	Cav Oral	T1N0	Não	Não	Não	Não	Não	97	97
Cont 16a	59	Ex	Não	Cav oral	"	Não	Não	Não	Não	Não	62	62
Cont 16b	70	Sim	Sim	Cav oral	"	Não	Não	Não	Não	Sim*	27	27
Caso 17	37	Sim	Sim	Hipofaringe	T4N2c	Sim	Sim	Não	Não	Não	64	64
Cont 17a	59	Ex	Ex	Hipofaringe	"	Sim	Sim	Não	Não	Sim	3	3
Cont 17b	54	Sim	Sim	Hipofaringe	"	Sim	Sim	Não	Não	Sim	11	4
Caso 18	29	Não	Não	Orofaringe	T2N1	Sim	Não	Não	Não	Não	25	25
Cont 18a	49	Sim	Ex	Orofaringe	"	Sim	Não	Não	Não	Não	83	83
Cont 18b	66	Sim	Sim	Orofaringe	"	Sim	Sim	Não	Não	Não	103	103
Caso 19	38	Sim	Ex	Laringe	T4N2b	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	12	9
Cont 19a	65	Sim	Sim	Laringe	"	Sim	Sim	Não	Não	Sim	11	11
Caso 20	32	Sim	Não	Cav oral	T1Nx	Não	Não	Não	Não	Não	65	65
Cont 20a	53	Ex	Ex	Cav oral	"	Sim	Não	Não	Não	Não	64	64
Cont 20b	64	Ex	Ex	Cav oral	"	Sim	Não	Não	Não	Não	47	47
Caso 21	28	Não	Não	Orofaringe	T2N2b	Sim	Sim	Não	Não	Não	59	59
Cont 21a	66	Sim	Sim	Orofaringe	"	Sim	Sim	Não	Não	Não	103	103
Cont 21b	58	Sim	Sim	Orofaringe	"	Não	Não	Sim	Não	Não	6	5
Caso 22	38	Sim	Sim	Laringe	T4aN0	Sim	Não	Não	Não	Não	50	50
Cont 22a	69	Sim	Sim	Laringe	"	Sim	Não	Sim	Não	Sim	15	15
Cont 22b	65	Ex	Ex	Laringe	"	Não	Não	Não	Não	Não	4	4
Caso 23	29	Sim	Sim	Cav oral	T2N0	Não	Não	Não	Não	nao	16	16
Cont 23a	67	Sim	Ex	Cav Oral	"	Sim	Não	Não	Não	sim*	33	33
Cont 23b	71	Ex	Sim	Cav Oral	"	Não	Não	Não	Não	Não	18	8
Caso 24	36	Sim	Ex	Cav oral	T3N1	Sim	Sim	Não	Sim	sim	13	6
Cont 24a	70	Sim	Sim	Cav Oral	"	Sim	Não	Não	Não	Não	11	11
Cont 24b	70	Sim	Não	Cav Oral	"	Não	Não	Não	Não	Não	74	74
Caso 25	32	Ex	Ex	Orofaringe	T2N0	Sim	Sim	Sim	Não	sim	31	14
Cont 25a	66	Sim	Sim	Orofaringe	"	Sim	Sim	Não	Não	Não	103	103
Cont 25b	59	Sim	Sim	Orofaringe	"	Não	Não	Não	Não	Não	100	100
Caso 26	34	Sim	Sim	Cav oral	T1N1	Não	Não	Sim	Não	Sim	13	3
Cont 26a	53	Ex	Ex	Cav oral	"	Sim	Não	Não	Não	Não	64	64
Cont 26b	64	Ex	Ex	Cav oral	"	Sim	Não	Não	Não	Não	47	47

Anexo 2 – tabela de casos – parte 4

Id Caso	Ki-67 Tu	Ki-67 Mg	VEGF Tu	VEGF Mg	EGFRTu	EGFR Mg	P53 Tu	P53 Mg	P16 Tu	HPV
Caso 13	171	n/d	0	n/d	2	1	0	-	-	n/d
Cont 13a	145	n/d	4	n/d	4	n/d	0	n/d	-	-
cont 13b										-
Caso 14	197	75			3	0	0	0	-	-
Cont 14a	367	250	4	3	4	3	0	n/d	-	n/d
Cont 14b	199	160	1	0	2	0	0	0	-	n/d
Caso 15	328	137	n/d	1	n/d	2	0	n/d	-	-
Cont 15a	0	n/d	n/d	1	4	3	0	n/d	-	-
Cont 15b	175	135	1	0	4	2	0	n/d	-	n/d
Caso 16	170	40	4	0	1	1	0	n/d	-	-
Cont 16a	226	20	3	4	1	1	243	81	-	-
Cont 16b	280	n/d	4	n/d	1	1	40	n/d	-	n/d
Caso 17	280	160	4	4	n/d		0	0	-	-
Cont 17a	120	100			1	1	0	n/d	-	n/d
Cont 17b	150	130	1	1	4	2	240	25	-	-
Caso 18	98	10	4	n/d	4	4	260	75	+	+
Cont 18a	40	0	2	1	4	3	500	136	+	n/d
Cont 18b	111	3	4	n/d	4	2	185	8	-	-
Caso 19	10	0	1	1	4	1	99	n/d	-	-
Cont 19a							460	120		n/d
Caso 20	0	n/d	2	1	n/d	1	99	n/d	-	-
Cont 20a	95	30	4	1	4	2	365	0	+	n/d
Cont 20b	50	5	1	1	4	1	420	n/d	-	-
Caso 21	460	22			3	2	298	21	+	-
Cont 21a	111	3	3	1	4	2	185	8	-	-
Cont 21b	84	3	3	1	4	2	57	0	-	n/d
Caso 22	8	0	4	1	3	2	54	3	+	-
Cont 22a	223	n/d			4	2	430	13	-	-
Cont 22b	359	52	1	n/d	4	4	0	n/d	-	n/d
Caso 23	60	12	1	1	4	1	0	n/d	-	n/d
Cont 23a	0	0			4	3	0	0	-	-
Cont 23b										n/d
Caso 24	220	7			4	2	0	n/d	-	-
Cont 24a	156	10	3	n/d	4	2	0	n/d		n/d
Cont 24b	330	261	1	1	1	1	485	n/d	-	-
Caso 25	202	30	2	2	4	3	29	0	+	-
Cont 25a	111	3			4	2	185	8	-	n/d
Cont 25b	0	n/d	n/d	1	4	3	0	n/d	-	-
Caso 26	350	20	3	n/d	4	3	431	n/d	-	-
Cont 26a	95	30			4	2	365	0	+	n/d
Cont 26b	50	5	1	1	4	1	420	n/d	-	-

9. REFERÊNCIAS

¹ D M Parkin et al., “Estimating the World Cancer Burden: Globocan 2000,” *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 94, no. 2 (October 15, 2001): 153–156.

² W J Blot et al., “Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer,” *Cancer Research* 48, no. 11 (June 1, 1988): 3282–3287.

³ Y H Son and D S Kapp, “Oral Cavity and Oropharyngeal Cancer in a Younger Population. Review of Literature and Experience at Yale,” *Cancer* 55, no. 2 (January 15, 1985): 441–444.

⁴ R M Byers, “Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue in Patients Less Than Thirty Years of Age,” *American Journal of Surgery* 130, no. 4 (October 1975): 475–478.

⁵ S Atula et al., “Cancer of the Tongue in Patients Younger Than 40 Years. A Distinct Entity?,” *Archives of Otolaryngology--head & Neck Surgery* 122, no. 12 (December 1996): 1313–1319.

⁶ P G von Doersten et al., “Relation Between Age and Head and Neck Cancer Recurrence After Surgery: a Multivariate Analysis,” *Otolaryngology--head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 113, no. 3 (September 1995): 197–203.

⁷ P L Friedlander et al., “Squamous Cell Carcinoma of the Tongue in Young Patients: a Matched-pair Analysis,” *Head & Neck* 20, no. 5 (August 1998): 363–368.

⁸ Chun-Ta Liao et al., “Higher Distant Failure in Young Age Tongue Cancer Patients,” *Oral Oncology* 42, no. 7 (August 2006): 718–725, doi:10.1016/j.oraloncology.2005.11.012.

⁹ David P Goldstein and Jonathan C Irish, “Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in the Young Patient,” *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 13, no. 4 (August 2005): 207–211.

¹⁰ G I McGregor, N Davis, and R E Robins, “Squamous Cell Carcinoma of the Tongue and Lower Oral Cavity in Patients Under 40 Years of Age,” *American Journal of Surgery* 146, no. 1 (July 1983): 88–92.

¹¹ Imjai Chitapanarux et al., “Oral Cavity Cancers at a Young Age: Analysis of Patient, Tumor and Treatment Characteristics in Chiang Mai University Hospital,” *Oral Oncology* 42, no. 1 (January 2006): 83–88, doi:10.1016/j.oraloncology.2005.06.015.

-
- ¹² Elaine M Smith et al., “Age, Sexual Behavior and Human Papillomavirus Infection in Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers,” *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 108, no. 5 (February 20, 2004): 766–772, doi:10.1002/ijc.11633.
- ¹³ Y T Jin et al., “Genetic Alterations in Oral Squamous Cell Carcinoma of Young Adults,” *Oral Oncology* 35, no. 3 (May 1999): 251–256.
- ¹⁴ M S Greenblatt et al., “Mutations in the P53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis,” *Cancer Research* 54, no. 18 (September 15, 1994): 4855–4878.
- ¹⁵ K T Pitman et al., “Cancer of the Tongue in Patients Less Than Forty,” *Head & Neck* 22, no. 3 (May 2000): 297–302.
- ¹⁶ R DOLL and A B HILL, “Smoking and Carcinoma of the Lung; Preliminary Report,” *British Medical Journal* 2, no. 4682 (September 30, 1950): 739–748.
- ¹⁷ Béatrice Secretan et al., “A Review of Human carcinogens--Part E: Tobacco, Areca Nut, Alcohol, Coal Smoke, and Salted Fish,” *The Lancet Oncology* 10, no. 11 (November 2009): 1033–1034.
- ¹⁸ T Hirayama, “Non-smoking Wives of Heavy Smokers Have a Higher Risk of Lung Cancer: a Study from Japan,” *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* 282, no. 6259 (January 17, 1981): 183–185.
- ¹⁹ “[Http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2008/s](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2008/s),” n.d.
- ²⁰ Carlos Augusto Monteiro et al., “Population-based Evidence of a Strong Decline in the Prevalence of Smokers in Brazil (1989-2003),” *Bulletin of the World Health Organization* 85, no. 7 (July 2007): 527–534.
- ²¹ J M Gaziano et al., “Light-to-moderate Alcohol Consumption and Mortality in the Physicians’ Health Study Enrollment Cohort,” *Journal of the American College of Cardiology* 35, no. 1 (January 2000): 96–105.
- ²² “Alcohol Drinking. Biological Data Relevant to the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans,” *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer* 44 (1988): 101–152.
- ²³ C S Lieber et al., “Alcohol and Cancer,” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 6, no. 5 (October 1986): 1005–1019.
- ²⁴ W F Bosron and T K Li, “Genetic Polymorphism of Human Liver Alcohol and Aldehyde Dehydrogenases, and Their Relationship to Alcohol Metabolism and Alcoholism,” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 6, no. 3 (June 1986): 502–510.
- ²⁵ “Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France, 17-24 February 1998,” *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans / World*

Health Organization, International Agency for Research on Cancer 71 Pt 1 (1999): 1–315.

²⁶ A Yoshida, L C Hsu, and M Yasunami, “Genetics of Human Alcohol-metabolizing Enzymes,” *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 40 (1991): 255–287.

²⁷ A Yokoyama et al., “Esophageal Cancer and Aldehyde Dehydrogenase-2 Genotypes in Japanese Males,” *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: a Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 5, no. 2 (February 1996): 99–102.

²⁸ A Yokoyama et al., “Alcohol and Aldehyde Dehydrogenase Gene Polymorphisms and Oropharyngolaryngeal, Esophageal and Stomach Cancers in Japanese Alcoholics,” *Carcinogenesis* 22, no. 3 (March 2001): 433–439.

²⁹ Akira Yokoyama and Tai Omori, “Genetic Polymorphisms of Alcohol and Aldehyde Dehydrogenases and Risk for Esophageal and Head and Neck Cancers,” *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)* 35, no. 3 (April 2005): 175–185, doi:10.1016/j.alcohol.2005.04.003.

³⁰ Takahiro Asakage et al., “Genetic Polymorphisms of Alcohol and Aldehyde Dehydrogenases, and Drinking, Smoking and Diet in Japanese Men with Oral and Pharyngeal Squamous Cell Carcinoma,” *Carcinogenesis* 28, no. 4 (April 2007): 865–874, doi:10.1093/carcin/bgl206.

³¹ Yokoyama and Omori, “Genetic Polymorphisms of Alcohol and Aldehyde Dehydrogenases and Risk for Esophageal and Head and Neck Cancers.”

³² K Syrjänen et al., “Morphological and Immunohistochemical Evidence Suggesting Human Papillomavirus (HPV) Involvement in Oral Squamous Cell Carcinogenesis,” *International Journal of Oral Surgery* 12, no. 6 (December 1983): 418–424.

³³ C G L Hobbs et al., “Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer: a Systematic Review and Meta-analysis,” *Clinical Otolaryngology: Official Journal of ENT-UK; Official Journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery* 31, no. 4 (August 2006): 259–266, doi:10.1111/j.1749-4486.2006.01246.x.

³⁴ William H Westra, “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 Pathology* 3, no. 1 (March 2009): 78–81, doi:10.1007/s12105-009-0100-y.

-
- ³⁵ M L Gillison et al., “Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers,” *Journal of the National Cancer Institute* 92, no. 9 (May 3, 2000): 709–720.
- ³⁶ Samir K El-Mofty and Sushama Patil, “Human Papillomavirus (HPV)-related Oropharyngeal Nonkeratinizing Squamous Cell Carcinoma: Characterization of a Distinct Phenotype,” *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 101, no. 3 (March 2006): 339–345, doi:10.1016/j.tripleo.2005.08.001.
- ³⁷ A M Hong et al., “Human Papillomavirus Predicts Outcome in Oropharyngeal Cancer in Patients Treated Primarily with Surgery or Radiation Therapy,” *British Journal of Cancer* 103, no. 10 (November 9, 2010): 1510–1517, doi:10.1038/sj.bjc.6605944.
- ³⁸ T Andl et al., “Etiological Involvement of Oncogenic Human Papillomavirus in Tonsillar Squamous Cell Carcinomas Lacking Retinoblastoma Cell Cycle Control,” *Cancer Research* 58, no. 1 (January 1, 1998): 5–13.
- ³⁹ Bhavna Kumar et al., “Response to Therapy and Outcomes in Oropharyngeal Cancer Are Associated with Biomarkers Including Human Papillomavirus, Epidermal Growth Factor Receptor, Gender, and Smoking,” *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 69, no. 2 Suppl (2007): S109–111, doi:10.1016/j.ijrobp.2007.05.072.
- ⁴⁰ Carole Fakhry et al., “Improved Survival of Patients with Human Papillomavirus-positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Prospective Clinical Trial,” *Journal of the National Cancer Institute* 100, no. 4 (February 20, 2008): 261–269, doi:10.1093/jnci/djn011.
- ⁴¹ Pernille Lassen et al., “Effect of HPV-associated p16INK4A Expression on Response to Radiotherapy and Survival in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck,” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, no. 12 (April 20, 2009): 1992–1998, doi:10.1200/JCO.2008.20.2853.
- ⁴² Ahmad R Sedaghat et al., “Prognostic Significance of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas,” *The Laryngoscope* 119, no. 8 (August 2009): 1542–1549, doi:10.1002/lary.20533.
- ⁴³ Lisa Licitra et al., “High-risk Human Papillomavirus Affects Prognosis in Patients with Surgically Treated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma,” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, no. 36 (December 20, 2006): 5630–5636, doi:10.1200/JCO.2005.04.6136.
- ⁴⁴ Claude Fischer et al., “Is Immunohistochemical Epidermal Growth Factor Receptor Expression Overestimated as a Prognostic Factor in Head-

neck Squamous Cell Carcinoma? A Retrospective Analysis Based on a Tissue Microarray of 365 Carcinomas,” *Human Pathology* 39, no. 10 (October 2008): 1527–1534, doi:10.1016/j.humpath.2008.03.001.

⁴⁵ Smith et al., “Age, Sexual Behavior and Human Papillomavirus Infection in Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers.”

⁴⁶ G M Clifford et al., “Human Papillomavirus Types in Invasive Cervical Cancer Worldwide: a Meta-analysis,” *British Journal of Cancer* 88, no. 1 (January 13, 2003): 63–73, doi:10.1038/sj.bjc.6600688.

⁴⁷ Giuseppina Campisi et al., “Human Papillomavirus: Its Identity and Controversial Role in Oral Oncogenesis, Premalignant and Malignant Lesions (review),” *International Journal of Oncology* 30, no. 4 (April 2007): 813–823.

⁴⁸ S Syrjänen et al., “Human Papillomaviruses in Oral Carcinoma and Oral Potentially Malignant Disorders: a Systematic Review,” *Oral Diseases* 17 Suppl 1 (April 2011): 58–72, doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01792.x.

⁴⁹ N Termine et al., “HPV in Oral Squamous Cell Carcinoma Vs Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Biopsies: a Meta-analysis (1988-2007),” *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 19, no. 10 (October 2008): 1681–1690, doi:10.1093/annonc/mdn372.

⁵⁰ Samir K El-Mofty and Danielle W Lu, “Prevalence of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Squamous Cell Carcinoma of the Palatine Tonsil, and Not the Oral Cavity, in Young Patients: a Distinct Clinicopathologic and Molecular Disease Entity,” *The American Journal of Surgical Pathology* 27, no. 11 (November 2003): 1463–1470.

⁵¹ Aimee R Kreimer et al., “Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: a Systematic Review,” *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: a Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 14, no. 2 (February 2005): 467–475, doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0551.

⁵² Louise T Chow, Thomas R Broker, and Bettie M Steinberg, “The Natural History of Human Papillomavirus Infections of the Mucosal Epithelia,” *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica* 118, no. 6–7 (June 2010): 422–449, doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02625.x.

⁵³ “Classification of Papillomaviruses. [Virology. 2004] - PubMed - NCBI,” accessed June 11, 2012, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=de%20Villiers%20EM%2C%20Fauquet%20C%2C%20Broker%20TR%2C%20Bernard%20HU%2C%2>

0zur%20Hausen%20H.%20Classification%20of%20papillomaviruses.%20
Virology%202004%3B324%3A17%E2%80%93327.

⁵⁴ Ibid.

⁵⁵ Chow, Broker, and Steinberg, “The Natural History of Human Papillomavirus Infections of the Mucosal Epithelia.”

⁵⁶ P M Howley, “Role of the Human Papillomaviruses in Human Cancer,” *Cancer Research* 51, no. 18 Suppl (September 15, 1991): 5019s–5022s.

⁵⁷ H zur Hausen and E M de Villiers, “Human Papillomaviruses,” *Annual Review of Microbiology* 48 (1994): 427–447, doi:10.1146/annurev.mi.48.100194.002235.

⁵⁸ Shinji Takeuchi et al., “Intrinsic Cooperation Between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the Onset of Cellular Senescence and Tumor Suppression in Vivo,” *Cancer Research* 70, no. 22 (November 15, 2010): 9381–9390, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0801.

⁵⁹ Katerina Strati and Paul F Lambert, “Role of Rb-dependent and Rb-independent Functions of Papillomavirus E7 Oncogene in Head and Neck Cancer,” *Cancer Research* 67, no. 24 (December 15, 2007): 11585–11593, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3007.

⁶⁰ Adel K El-Naggar and William H Westra, “P16 Expression as a Surrogate Marker for HPV-related Oropharyngeal Carcinoma: a Guide for Interpretative Relevance and Consistency,” *Head & Neck* 34, no. 4 (April 2012): 459–461, doi:10.1002/hed.21974.

⁶¹ Giuseppe Pannone et al., “Evaluation of a Combined Triple Method to Detect Causative HPV in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas: P16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization,” *Infectious Agents and Cancer* 7 (2012): 4, doi:10.1186/1750-9378-7-4.

⁶² Chien-Hung Lee et al., “Population Burden of Betel Quid Abuse and Its Relation to Oral Premalignant Disorders in South, Southeast, and East Asia: An Asian Betel-quid Consortium Study,” *American Journal of Public Health* 102, no. 3 (March 2012): e17–24, doi:10.2105/AJPH.2011.300521.

⁶³ David Goldenberg, Avishay Golz, and Henry Zvi Joachims, “The Beverage Maté: a Risk Factor for Cancer of the Head and Neck,” *Head & Neck* 25, no. 7 (July 2003): 595–601, doi:10.1002/hed.10288.

⁶⁴ Julien Berthiller et al., “Marijuana Smoking and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the INHANCE Consortium,” *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: a Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18, no. 5 (May 2009): 1544–1551, doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0845.

⁶⁵ Shu-Chun Chuang et al., “Diet and the Risk of Head and Neck Cancer: a Pooled Analysis in the INHANCE Consortium,” *Cancer Causes & Control: CCC* 23, no. 1 (January 2012): 69–88, doi:10.1007/s10552-011-9857-x.

⁶⁶ A Sapkota et al., “Dietary Risk Factors for Squamous Cell Carcinoma of the Upper Aerodigestive Tract in Central and Eastern Europe,” *Cancer Causes & Control: CCC* 19, no. 10 (December 2008): 1161–1170, doi:10.1007/s10552-008-9183-0.

⁶⁷ Jack Siemiatycki et al., “Listing Occupational Carcinogens,” *Environmental Health Perspectives* 112, no. 15 (November 2004): 1447–1459.

⁶⁸ Kimon Divaris et al., “Oral Health and Risk for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: The Carolina Head and Neck Cancer Study,” *Cancer Causes & Control: CCC* 21, no. 4 (April 2010): 567–575, doi:10.1007/s10552-009-9486-9.

⁶⁹ Gabriela Fürst Vaccarezza, José Leopoldo Ferreira Antunes, and Pedro Michaluart-Júnior, “Recurrent Sores by Ill-fitting Dentures and Intra-oral Squamous Cell Carcinoma in Smokers,” *Journal of Public Health Dentistry* 70, no. 1 (2010): 52–57, doi:10.1111/j.1752-7325.2009.00143.x.

⁷⁰ Eva Negri et al., “Family History of Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium,” *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 124, no. 2 (January 15, 2009): 394–401, doi:10.1002/ijc.23848.

⁷¹ James D McKay et al., “A Genome-wide Association Study of Upper Aerodigestive Tract Cancers Conducted Within the INHANCE Consortium,” *PLoS Genetics* 7, no. 3 (March 2011): e1001333, doi:10.1371/journal.pgen.1001333.

⁷² A G Knudson Jr, “Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68, no. 4 (April 1971): 820–823.

⁷³ R A Weinberg, “The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control,” *Cell* 81, no. 3 (May 5, 1995): 323–330.

⁷⁴ Swadesh K Das et al., “Fucoxanthin Induces Cell Cycle Arrest at G0/G1 Phase in Human Colon Carcinoma Cells Through Up-regulation of p21WAF1/Cip1,” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1726, no. 3 (November 30, 2005): 328–335, doi:10.1016/j.bbagen.2005.09.007.

⁷⁵ D P Lane and L V Crawford, “T Antigen Is Bound to a Host Protein in SV40-transformed Cells,” *Nature* 278, no. 5701 (March 15, 1979): 261–263.

⁷⁶ Milena Gasco and Tim Crook, “The P53 Network in Head and Neck Cancer,” *Oral Oncology* 39, no. 3 (April 2003): 222–231.

⁷⁷ Ibid.

⁷⁸ W S el-Deiry, "Regulation of P53 Downstream Genes," *Seminars in Cancer Biology* 8, no. 5 (1998): 345–357.

⁷⁹ Alberto Inga et al., "Differential Transactivation by the P53 Transcription Factor Is Highly Dependent on P53 Level and Promoter Target Sequence," *Molecular and Cellular Biology* 22, no. 24 (December 2002): 8612–8625.

⁸⁰ A G Scholes et al., "P53 Mutations in Relation to Human Papillomavirus Type 16 Infection in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck," *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 71, no. 5 (May 29, 1997): 796–799.

⁸¹ S A Shahnavaz et al., "P53 Gene Mutations in Sequential Oral Epithelial Dysplasias and Squamous Cell Carcinomas," *The Journal of Pathology* 190, no. 4 (March 2000): 417–422, doi:10.1002/(SICI)1096-9896(200003)190:4<417::AID-PATH544>3.0.CO;2-G.

⁸² I B Cruz et al., "P53 Immunoexpression in Non-malignant Oral Mucosa Adjacent to Oral Squamous Cell Carcinoma: Potential Consequences for Clinical Management," *The Journal of Pathology* 191, no. 2 (June 2000): 132–137, doi:10.1002/(SICI)1096-9896(200006)191:2<132::AID-PATH605>3.0.CO;2-E.

⁸³ I B Cruz et al., "P53 Expression Above the Basal Cell Layer in Oral Mucosa Is an Early Event of Malignant Transformation and Has Predictive Value for Developing Oral Squamous Cell Carcinoma," *The Journal of Pathology* 184, no. 4 (April 1998): 360–368, doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199804)184:4<360::AID-PATH1263>3.0.CO;2-H.

⁸⁴ J Alsner, S B Sørensen, and J Overgaard, "TP53 Mutation Is Related to Poor Prognosis After Radiotherapy, but Not Surgery, in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck," *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 59, no. 2 (May 2001): 179–185.

⁸⁵ Jesper Grau Eriksen et al., "The Possible Role of TP53 Mutation Status in the Treatment of Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck (HNSCC) with Radiotherapy with Different Overall Treatment Times," *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 76, no. 2 (August 2005): 135–142, doi:10.1016/j.radonc.2005.05.004.

⁸⁶ J Gerdes et al., "Production of a Mouse Monoclonal Antibody Reactive with a Human Nuclear Antigen Associated with Cell Proliferation," *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 31, no. 1 (January 15, 1983): 13–20.

-
- ⁸⁷ T Scholzen and J Gerdes, "The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown," *Journal of Cellular Physiology* 182, no. 3 (March 2000): 311–322, doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
- ⁸⁸ J Gerdes et al., "Cell Cycle Analysis of a Cell Proliferation-associated Human Nuclear Antigen Defined by the Monoclonal Antibody Ki-67," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 133, no. 4 (October 1984): 1710–1715.
- ⁸⁹ Neelam G Shah et al., "Prognostic Significance of Molecular Markers in Oral Squamous Cell Carcinoma: a Multivariate Analysis," *Head & Neck* 31, no. 12 (December 2009): 1544–1556, doi:10.1002/hed.21126.
- ⁹⁰ M Serrano, G J Hannon, and D Beach, "A New Regulatory Motif in Cell-cycle Control Causing Specific Inhibition of Cyclin D/CDK4," *Nature* 366, no. 6456 (December 16, 1993): 704–707, doi:10.1038/366704a0.
- ⁹¹ J W Rocco and D Sidransky, "p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in Cancer Progression," *Experimental Cell Research* 264, no. 1 (March 10, 2001): 42–55, doi:10.1006/excr.2000.5149.
- ⁹² H zur Hausen, "Papillomavirus Infections--a Major Cause of Human Cancers," *Biochimica Et Biophysica Acta* 1288, no. 2 (October 9, 1996): F55–78.
- ⁹³ J Koh et al., "Tumour-derived P16 Alleles Encoding Proteins Defective in Cell-cycle Inhibition," *Nature* 375, no. 6531 (June 8, 1995): 506–510, doi:10.1038/375506a0.
- ⁹⁴ Paul M Weinberger et al., "Molecular Classification Identifies a Subset of Human Papillomavirus--associated Oropharyngeal Cancers with Favorable Prognosis," *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, no. 5 (February 10, 2006): 736–747, doi:10.1200/JCO.2004.00.3335.
- ⁹⁵ Shahnaz Begum et al., "Tissue Distribution of Human Papillomavirus 16 DNA Integration in Patients with Tonsillar Carcinoma," *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11, no. 16 (August 15, 2005): 5694–5699, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0587.
- ⁹⁶ "National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines, Version 1.2011 Head and Neck Cancers," n.d.
- ⁹⁷ Stephen L Harris et al., "Association of p16(INK4a) Overexpression with Improved Outcomes in Young Patients with Squamous Cell Cancers of the Oral Tongue," *Head & Neck* 33, no. 11 (November 2011): 1622–1627, doi:10.1002/hed.21650.
- ⁹⁸ Shah et al., "Prognostic Significance of Molecular Markers in Oral Squamous Cell Carcinoma."

⁹⁹ Niklas Reimers et al., “Combined Analysis of HPV-DNA, P16 and EGFR Expression to Predict Prognosis in Oropharyngeal Cancer,” *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 120, no. 8 (April 15, 2007): 1731–1738, doi:10.1002/ijc.22355.

¹⁰⁰ Serge J Smeets et al., “A Novel Algorithm for Reliable Detection of Human Papillomavirus in Paraffin Embedded Head and Neck Cancer Specimen,” *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 121, no. 11 (December 1, 2007): 2465–2472, doi:10.1002/ijc.22980.

¹⁰¹ Giuseppe Pannone et al., “Evaluation of a Combined Triple Method to Detect Causative HPV in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas: P16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization,” *Infectious Agents and Cancer* 7 (2012): 4, doi:10.1186/1750-9378-7-4.

¹⁰² Erika E Doxtader and Anna-Luise A Katzenstein, “The Relationship Between P16 Expression and High-risk Human Papillomavirus Infection in Squamous Cell Carcinomas from Sites Other Than Uterine Cervix: a Study of 137 Cases,” *Human Pathology* 43, no. 3 (March 2012): 327–332, doi:10.1016/j.humpath.2011.05.010.

¹⁰³ Shinsuke Ohta et al., “Alterations of P16 and p14ARF Genes and Their 9p21 Locus in Oral Squamous Cell Carcinoma,” *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 107, no. 1 (January 2009): 81–91, doi:10.1016/j.tripleo.2008.08.027.

¹⁰⁴ Aatur D Singhi and William H Westra, “Comparison of Human Papillomavirus in Situ Hybridization and P16 Immunohistochemistry in the Detection of Human Papillomavirus-associated Head and Neck Cancer Based on a Prospective Clinical Experience,” *Cancer* 116, no. 9 (May 1, 2010): 2166–2173, doi:10.1002/ncr.25033.

¹⁰⁵ Estela Kaminagakura et al., “High-risk Human Papillomavirus in Oral Squamous Cell Carcinoma of Young Patients,” *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 130, no. 8 (April 15, 2012): 1726–1732, doi:10.1002/ijc.26185.

¹⁰⁶ D Gospodarowicz, J A Abraham, and J Schilling, “Isolation and Characterization of a Vascular Endothelial Cell Mitogen Produced by Pituitary-derived Folliculo Stellate Cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, no. 19 (October 1989): 7311–7315.

¹⁰⁷ D R Senger et al., “Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites Fluid,” *Science (New York, N.Y.)* 219, no. 4587 (February 25, 1983): 983–985.

-
- ¹⁰⁸ E Tischer et al., "Vascular Endothelial Growth Factor: a New Member of the Platelet-derived Growth Factor Gene Family," *Biochemical and Biophysical Research Communications* 165, no. 3 (December 29, 1989): 1198–1206.
- ¹⁰⁹ B I Terman et al., "Identification of the KDR Tyrosine Kinase as a Receptor for Vascular Endothelial Cell Growth Factor," *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187, no. 3 (September 30, 1992): 1579–1586.
- ¹¹⁰ L B Jakeman et al., "Developmental Expression of Binding Sites and Messenger Ribonucleic Acid for Vascular Endothelial Growth Factor Suggests a Role for This Protein in Vasculogenesis and Angiogenesis," *Endocrinology* 133, no. 2 (August 1993): 848–859.
- ¹¹¹ K J Kim et al., "Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-induced Angiogenesis Suppresses Tumour Growth in Vivo," *Nature* 362, no. 6423 (April 29, 1993): 841–844, doi:10.1038/362841a0.
- ¹¹² D Shweiki et al., "Vascular Endothelial Growth Factor Induced by Hypoxia May Mediate Hypoxia-initiated Angiogenesis," *Nature* 359, no. 6398 (October 29, 1992): 843–845, doi:10.1038/359843a0.
- ¹¹³ Jian Zang et al., "Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Head and Neck Cancer: A Meta-analysis," *Head & Neck* (September 18, 2012), doi:10.1002/hed.23156.
- ¹¹⁴ A D Karatzanis et al., "Molecular Pathways of Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Head and Neck Cancer," *European Archives of Oto-rhino-laryngology: Official Journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): Affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 269, no. 3 (March 2012): 731–737, doi:10.1007/s00405-011-1809-2.
- ¹¹⁵ Koji Kishimoto et al., "Expression of Vascular Endothelial Growth factor-C Predicts Regional Lymph Node Metastasis in Early Oral Squamous Cell Carcinoma," *Oral Oncology* 39, no. 4 (June 2003): 391–396.
- ¹¹⁶ Xing Lv et al., "Prospective Validation of the Prognostic Value of Elevated Serum Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Nasopharyngeal Carcinoma: More Distant Metastases and Shorter Overall Survival After Treatment," *Head & Neck* 33, no. 6 (June 2011): 780–785, doi:10.1002/hed.21541.
- ¹¹⁷ S COHEN, "Isolation of a Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the New-born Animal," *The Journal of Biological Chemistry* 237 (May 1962): 1555–1562.

-
- ¹¹⁸ Andreas Gschwind, Oliver M Fischer, and Axel Ullrich, "The Discovery of Receptor Tyrosine Kinases: Targets for Cancer Therapy," *Nature Reviews. Cancer* 4, no. 5 (May 2004): 361–370, doi:10.1038/nrc1360.
- ¹¹⁹ T Callaghan et al., "A Complete Description of the EGF-receptor Exon Structure: Implication in Oncogenic Activation and Domain Evolution," *Oncogene* 8, no. 11 (November 1993): 2939–2948.
- ¹²⁰ Christoph A Ritter and Carlos L Arteaga, "The Epidermal Growth Factor Receptor-tyrosine Kinase: a Promising Therapeutic Target in Solid Tumors," *Seminars in Oncology* 30, no. 1 Suppl 1 (February 2003): 3–11, doi:10.1053/sonc.2003.50027.
- ¹²¹ A P Meert et al., "The Role of EGF-R Expression on Patient Survival in Lung Cancer: a Systematic Review with Meta-analysis," *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 20, no. 4 (October 2002): 975–981.
- ¹²² Vivian Wai Yan Lui and Jennifer Rubin Grandis, "EGFR-mediated Cell Cycle Regulation," *Anticancer Research* 22, no. 1A (February 2002): 1–11.
- ¹²³ B D Smith and B G Haffty, "Molecular Markers as Prognostic Factors for Local Recurrence and Radioresistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma," *Radiation Oncology Investigations* 7, no. 3 (1999): 125–144, doi:10.1002/(SICI)1520-6823(1999)7:3<125::AID-ROI1>3.0.CO;2-W.
- ¹²⁴ J R Grandis and D J Tweardy, "Elevated Levels of Transforming Growth Factor Alpha and Epidermal Growth Factor Receptor Messenger RNA Are Early Markers of Carcinogenesis in Head and Neck Cancer," *Cancer Research* 53, no. 15 (August 1, 1993): 3579–3584.
- ¹²⁵ M G van Oijen et al., "Increased Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Normal Epithelium Adjacent to Head and Neck Carcinomas Independent of Tobacco and Alcohol Abuse," *Oral Diseases* 4, no. 1 (March 1998): 4–8.
- ¹²⁶ I-H Chen et al., "Prognostic Significance of EGFR and Her-2 in Oral Cavity Cancer in Betel Quid Prevalent Area Cancer Prognosis," *British Journal of Cancer* 89, no. 4 (August 18, 2003): 681–686, doi:10.1038/sj.bjc.6601171.
- ¹²⁷ Klaus Laimer et al., "High EGFR Expression Predicts Poor Prognosis in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity and Oropharynx: a TMA-based Immunohistochemical Analysis," *Oral Oncology* 43, no. 2 (February 2007): 193–198, doi:10.1016/j.oraloncology.2006.02.009.
- ¹²⁸ R J Cusumano and M S Persky, "Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity and Oropharynx in Young Adults," *Head & Neck Surgery* 10, no. 4 (April 1988): 229–234.

¹²⁹ J N Myers et al., “Squamous Cell Carcinoma of the Tongue in Young Adults: Increasing Incidence and Factors That Predict Treatment Outcomes,” *Otolaryngology--head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 122, no. 1 (January 2000): 44–51.

¹³⁰ P C Gupta, “Mouth Cancer in India: a New Epidemic?,” *Journal of the Indian Medical Association* 97, no. 9 (September 1999): 370–373.

¹³¹ Susan P McGorray, Yi Guo, and Henrietta Logan, “Trends in Incidence of Oral and Pharyngeal Carcinoma in Florida: 1981-2008,” *Journal of Public Health Dentistry* 72, no. 1 (2012): 68–74, doi:10.1111/j.1752-7325.2011.00285.x.

¹³² J B Jones, H B Lampe, and H W Cheung, “Carcinoma of the Tongue in Young Patients,” *The Journal of Otolaryngology* 18, no. 3 (April 1989): 105–108.

¹³³ Chitapanarux et al., “Oral Cavity Cancers at a Young Age.”

¹³⁴ Friedlander et al., “Squamous Cell Carcinoma of the Tongue in Young Patients.”

¹³⁵ Liao et al., “Higher Distant Failure in Young Age Tongue Cancer Patients.”

¹³⁶ McGregor, Davis, and Robins, “Squamous Cell Carcinoma of the Tongue and Lower Oral Cavity in Patients Under 40 Years of Age.”

¹³⁷ Caroline H Shiboski, Brian L Schmidt, and Richard C K Jordan, “Tongue and Tonsil Carcinoma: Increasing Trends in the U.S. Population Ages 20-44 Years,” *Cancer* 103, no. 9 (May 1, 2005): 1843–1849, doi:10.1002/cncr.20998.

¹³⁸ Harris et al., “Association of p16(INK4a) Overexpression with Improved Outcomes in Young Patients with Squamous Cell Cancers of the Oral Tongue.”

¹³⁹ Masayuki Kabeya et al., “Prevalence of Human Papillomavirus in Mobile Tongue Cancer with Particular Reference to Young Patients,” *Cancer Science* 103, no. 2 (February 2012): 161–168, doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02149.x.

¹⁴⁰ Shanthi Marur et al., “HPV-associated Head and Neck Cancer: a Virus-related Cancer Epidemic,” *The Lancet Oncology* 11, no. 8 (August 2010): 781–789, doi:10.1016/S1470-2045(10)70017-6.

¹⁴¹ P Boffetta et al., “Cigar and Pipe Smoking and Lung Cancer Risk: a Multicenter Study from Europe,” *Journal of the National Cancer Institute* 91, no. 8 (April 21, 1999): 697–701.

¹⁴² Sergio Guerra Sartor et al., “[Occupational Risks for Laryngeal Cancer: a Case-control Study],” *Cadernos De Saúde Pública / Ministério Da*

Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional De Saúde Pública 23, no. 6 (June 2007): 1473–1481.

¹⁴³ James S Lewis Jr, “P16 Immunohistochemistry as a Standalone Test for Risk Stratification in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma,” *Head and Neck Pathology* 6 Suppl 1 (July 2012): S75–82, doi:10.1007/s12105-012-0369-0.

¹⁴⁴ K Kian Ang et al., “Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer,” *The New England Journal of Medicine* 363, no. 1 (July 1, 2010): 24–35, doi:10.1056/NEJMoa0912217.

¹⁴⁵ Odey C Ukpo et al., “High-risk Human Papillomavirus E6/E7 mRNA Detection by a Novel in Situ Hybridization Assay Strongly Correlates with P16 Expression and Patient Outcomes in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma,” *The American Journal of Surgical Pathology* 35, no. 9 (September 2011): 1343–1350, doi:10.1097/PAS.0b013e318220e59d.

¹⁴⁶ Schantz and Yu, “Head and Neck Cancer Incidence Trends in Young Americans, 1973-1997, with a Special Analysis for Tongue Cancer.”

¹⁴⁷ Mallet et al., “Head and Neck Cancer in Young People.”

¹⁴⁸ Masayuki Kabeya et al., “Prevalence of Human Papillomavirus in Mobile Tongue Cancer with Particular Reference to Young Patients,” *Cancer Science* 103, no. 2 (February 2012): 161–168, doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02149.x.

¹⁴⁹ Harris et al., “Association of p16(INK4a) Overexpression with Improved Outcomes in Young Patients with Squamous Cell Cancers of the Oral Tongue.”

¹⁵⁰ Atula et al., “Cancer of the Tongue in Patients Younger Than 40 Years. A Distinct Entity?”

¹⁵² Ligy Thomas et al., “Prognostic Features, Human Papillomavirus Status, and Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma in Young Adults,” *American Journal of Otolaryngology* 33, no. 6 (December 2012): 650–656, doi:10.1016/j.amjoto.2012.01.009.

¹⁵³ Harris et al., “Association of p16(INK4a) Overexpression with Improved Outcomes in Young Patients with Squamous Cell Cancers of the Oral Tongue.”

¹⁵⁴ M P Tabor et al., “Persistence of Genetically Altered Fields in Head and Neck Cancer Patients: Biological and Clinical Implications,” *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 7, no. 6 (June 2001): 1523–1532.

¹⁵⁵ D P SLAUGHTER, H W SOUTHWICK, and W SMEJKAL, “Field Cancerization in Oral Stratified Squamous Epithelium; Clinical Implications of Multicentric Origin,” *Cancer* 6, no. 5 (September 1953): 963–968.

¹⁵⁶ Boudewijn J M Braakhuis et al., “A Genetic Explanation of Slaughter’s Concept of Field Cancerization: Evidence and Clinical Implications,” *Cancer Research* 63, no. 8 (April 15, 2003): 1727–1730.

¹⁵⁷ M Weijers et al., “The Clinical Relevance of Epithelial Dysplasia in the Surgical Margins of Tongue and Floor of Mouth Squamous Cell Carcinoma: An Analysis of 37 Patients,” *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 31, no. 1 (January 2002): 11–15.

¹⁵⁸ Tienieke B M Schaaij-Visser et al., “Differential Proteomics Identifies Protein Biomarkers That Predict Local Relapse of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas,” *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15, no. 24 (December 15, 2009): 7666–7675, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2134.

¹⁵⁹ F Farshadpour et al., “Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Non-smoking and Non-drinking Patients with Multiple Tumors: Etiologic Significance of P53 and Ki-67 in Non-tumorous Epithelium,” *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 37, no. 9 (October 2008): 549–554, doi:10.1111/j.1600-0714.2008.00657.x.

¹⁶⁰ Kreimer et al., “Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide.”

¹⁶¹ Karina Braga Ribeiro et al., “Low Human Papillomavirus Prevalence in Head and Neck Cancer: Results from Two Large Case-control Studies in High-incidence Regions,” *International Journal of Epidemiology* 40, no. 2 (April 2011): 489–502, doi:10.1093/ije/dyq249.

¹⁶² Estela Kaminagakura et al., “Case-control Study on Prognostic Factors in Oral Squamous Cell Carcinoma in Young Patients,” *Head & Neck* 32, no. 11 (November 2010): 1460–1466, doi:10.1002/hed.21347.

¹⁶³ E A Sisk et al., “Human Papillomavirus Infection in ‘Young’ Versus ‘Old’ Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck,” *Head & Neck* 22, no. 7 (October 2000): 649–657.

¹⁶⁴ Kreimer et al., “Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide.”

¹⁶⁵ Gillison et al., “Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers.”

¹⁶⁶ Kabeya et al., “Prevalence of Human Papillomavirus in Mobile Tongue Cancer with Particular Reference to Young Patients,” February 2012.

¹⁶⁷ Paul M Weinberger et al., “Molecular Classification Identifies a Subset of Human Papillomavirus--associated Oropharyngeal Cancers with

Favorable Prognosis,” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, no. 5 (February 10, 2006): 736–747, doi:10.1200/JCO.2004.00.3335.

¹⁶⁸ M Toner and E M O’Regan, “Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in the Young: a Spectrum or a Distinct Group? Part 2,” *Head and Neck Pathology* 3, no. 3 (September 2009): 249–251, doi:10.1007/s12105-009-0137-y.

¹⁶⁹ J Califano et al., “Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization,” *Cancer Research* 56, no. 11 (June 1, 1996): 2488–2492.

¹⁷⁰ M A Hermsen et al., “Assessment of Chromosomal Gains and Losses in Oral Squamous Cell Carcinoma by Comparative Genomic Hybridisation,” *Oral Oncology* 33, no. 6 (November 1997): 414–418.

¹⁷¹ Cathie Garnis et al., “Use of Complete Coverage Array Comparative Genomic Hybridization to Define Copy Number Alterations on Chromosome 3p in Oral Squamous Cell Carcinomas,” *Cancer Research* 63, no. 24 (December 15, 2003): 8582–8585.

APÊNDICE 1

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 01/08/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0511/07**, intitulado: **"BUSCA DE MARCADORES DE AGRESSIVIDADE EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO"** apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Pedro Michaluart Jr**

CAPPesq, 08 de Agosto de 2007

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

APÊNDICE 2

FORMULÁRIO DE CADASTRO DOS PACIENTES

::Dados de Identificação

Q1- Nº de identificação:

Q2- Nome do Paciente:

Q3- Número do prontuário no hospital:

Q4- Hospital:

Q5- Paciente: ☐ Internado ☐ Ambulatorial

Q6- Diagnóstico principal: ☐ Controlado ☐ Câncer

Q7- CID-10(código):

Q8- CID-10(Descrição da doença):

Q9- Entrevistador:

::Informações Gerais

Q10- Data de Entrevista: dd/mm/aaaa

Q11- Início da entrevista: hh:mm

Q12- Coleta de Sangue: ☐ Sim ☐ Não

Q13- Data: dd/mm/aaaa

Q14- Sexo: ☐ Feminino ☐ Masculino

Meu nome é De início eu quero agradecer o(a) senhor(a) por participar nesse estudo. Nós estamos conduzindo um estudo com a finalidade de esclarecer se determinadas características e hábitos de homens e mulheres podem ter relação com algumas doenças. Eu fiz várias perguntas cujas respostas serão registradas neste caderno. Devo dizer que tudo que o(a) senhor(a) responder na entrevista será estritamente confidencial e as informações colhidas das inúmeras pessoas que não participar do estudo serão usadas apenas em relatos científicos, sem nenhuma identificação pessoal.

Os possíveis benefícios desse estudo dependem de que as respostas sejam as mais reais (verdadeiras, sinceras) possíveis. Por favor pergunte se não entender o significado de alguma questão. A qualquer momento o(a) senhor(a) pode se recusar a continuar ou a responder perguntas específicas. Além do questionário o estudo inclui a coleta de uma amostra de sangue.

Se houver necessidade de entrar em contato com o(a) senhor(a), poderia fornecer seu endereço e telefone?

Q15- Endereço:

Q16- Bairro:

Q17- Cidade: Q18- UF da cidade: Q19- descrição da cidade:

Q20- Cep: 00000-000

Q21- Telefone: (DDD)- 0000-0000

Podemos começar? O(A) Sr(a) poderia assinar essa folha de consentimento?

Q22- Data de Nascimento: dd/mm/aaaa

Q23- Qual é a sua idade?

Qual é sua profissão? (aquela que o(a) sr(a) exerceu por mais tempo): Q24- Q25- Descrição: (CBO)

Q26- Por quanto tempo o(a) sr(a) exerceu esta profissão? anos

Pergunte ao entrevistado como ele/ela se classifica racialmente. Pergunte sobre a raça/origem dos avós. O entrevistador decide sobre a classificação racial.

Q27- Raça: ☐ Branco ☐ Mulato ☐ Negro ☐ Oriental ☐ Índio Q28-(outroraça) ☐ Outra:

Q29- O(A) Sr(a) já fez algum tratamento para a doença atual? (A doença que o(a) trouxe ao hospital agora?) ☐ Sim ☐ Não

Q30- Se "Sim", então qual tratamento?

Q31- Qual a cidade onde o(a) Sr(a) mora? Q32- UF da cidade: Q33- descrição da cidade:

Q34- Há quanto tempo o(a) Sr(a) mora nessa cidade?(anos) Se menos de 1 ano codifique como 00

Se o(a) Sr(a) está morando há menos de 1 ano nessa cidade, onde o(a) Sr(a) morava antes?

Q35- Q36- UF da cidade: Q37- descrição da cidade:

Em que cidade/estado/país o(a) sr.(a) nasceu?

Q38 (nacionalidade) - ☐ Brasileiro ☐ Estrangeiro Q39(onde nasceu)- Q40 - UF da cidade: Q41 - descrição da cidade:

Q42(onde nasceu) - País:

Q43 - O(A) sr.(a) estudou em escola? ☐ Sim ☐ Não

Q44 - Selecione a opção mais elevada quanto ao grau de instrução: ☐ Alfabetizado ☐ Primário Completo
☐ Primário Incompleto ☐ Secundário Completo ☐ Secundário Incompleto ☐ Técnico ☐ Universitário

:.:História de Câncer no Entrevistado e na Família

Quanto irmãos o(a) Sr(a) teve?: Q45-

Quanto irmãs o(a) Sr(a) teve? :Q46-

Quanto filhos o(a) Sr(a) teve? :Q47-

Quanto filhas o(a) Sr(a) teve? :Q48-

OBS: Segue as opções de preenchimento : Coloque os números e letras em vermelho correspondentes aos campos nos quadros em branco da tabela anexada abaixo :

Tipode familiar : Próprio(a) Paciente : 01 Mãe: 02 Pai: 03 Irmão: 04 Irmã: 05 Filha: 06 Filho: 07

Vivo/Morto : Vivo: V Morto: M

Tumor : Sim: S Não: N IGN: I

Tabagismo : Sim: S Não: N IGN: I

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
T1	Tipo de familiar	Vivo/Morto	Idade atual ou da morte	Tumor	Tipo de tumor (CID-10)	Idade no diagnóstico	Tabagista
L1	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L2	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L3	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L4	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L5	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L6	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L7	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L8	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L9	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L10	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L11	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L12	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L13	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L14	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L15	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L16	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L17	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L18	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L19	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L20	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Ln	T1_LnC1	T1_LnC2	T1_LnC3	T1_LnC4	T1_LnC5	T1_LnC6	T1_LnC7

OBS: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (tipo de familiar, vivo/morto, idade atual ou da morte, tipo do tumor, idade no diagnóstico ou tabagista). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T1_L3C2- Tabela1 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de história familiar, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de Vivo/Morto.

:.:História de Tabagismo

Q49 - O(A) Sr.(a) fuma ou já fumou em média 1 cigarro, charuto ou cachimbo, diariamente, pelo menos por 1 ano?

☐ Sim, ainda fuma ☐ Nunca fumou ☐ Somente no passado

APÊNDICE 3

FORMULÁRIO DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS: CABEÇA E PESCOÇO

Q0 - Nº de identificação: Nome do Paciente:

!! Dados Clínicos e Laboratoriais ao Diagnóstico de Cabeça e Pescoço

PRIMEIRA CONSULTA

QUEIXA E DURAÇÃO

Q201 - Nome da Mãe:

Q1 - Peso habitual antes da doença: (KG)

Q2 - Altura: (cm)

Q3 - Perda de Peso: ☐ Sim ☐ Não Q4 - (KG) Q5 - (%) Q6 - (meses)

Q7 - IMC:

Q8 - Alterações Visuais: ☐ Sim ☐ Não Q9 - (dias)

Q10 - Dificuldade Respiratória/Dispneia: ☐ Sim ☐ Não Q11 - (dias)

Q12 - Traqueostomia: ☐ Sim ☐ Não Q13 - Data Realização: dd/mm/aaaa

Q14 - Disfagia: ☐ Sim ☐ Não Q15 - (dias)

Q16 - Distonia: ☐ Sim ☐ Não Q17 - (dias)

Q18 - Dor: ☐ Sim ☐ Não Q19 - (dias)

Q20 - Feridas: ☐ Sim ☐ Não Q21 - (dias) Q22 - Localização:

Q23 - Lesões externas visíveis: ☐ Sim ☐ Não Q24 - (dias) Q25 - Localização:

Q26 - Nódulos ou massas: ☐ Sim ☐ Não Q27 - (dias) Q28 - Localização:

Q29 - Obstrução Nasal: ☐ Sim ☐ Não Q30 - (dias) Q31 - Lado: ☐ Esquerda ☐ Direta

Q32 - Otorrinolaringite: ☐ Sim ☐ Não Q33 - (dias)

Q34 - Otitite: ☐ Sim ☐ Não Q35 - (dias)

Q36 - Rinorréia: ☐ Sim ☐ Não Q37 - (dias)

Q38 - Sangramentos: ☐ Sim ☐ Não Q39 - (dias)

Q40 - Sensação de corpo estranho: ☐ Sim ☐ Não Q41 - (dias) Q42 - Localização:

Q43 - Tosse: ☐ Sim ☐ Não Q44 - (dias) Q45 - Outras Queixas:

LOCALIZAÇÃO DA LESÃO
CID-10

- Q46 - ☐ C00 - Neoplasia maligna do lábio
- Q47 - ☐ C00.0 - Lábio superior externo
- Q48 - ☐ C00.1 - Lábio inferior externo
- Q49 - ☐ C00.2 - Lábio externo, não especificado
- Q50 - ☐ C00.3 - Lábio superior, face interna
- Q51 - ☐ C00.4 - Lábio inferior, face interna
- Q52 - ☐ C00.5 - Lábio, sem especificação, face interna
- Q53 - ☐ C00.6 - Comissura labial
- Q54 - ☐ C00.8 - Lesão invasiva do lábio
- Q55 - ☐ C00.9 - Lábio, não especificado
- Q56 - ☐ C01 - Neoplasia maligna de base de língua
- Q57 - ☐ C02 - Neoplasia maligna de outras partes e partes não especificadas de língua
- Q58 - ☐ C02.0 - Face dorsal da língua
- Q59 - ☐ C02.1 - Borda da língua
- Q60 - ☐ C02.2 - Face ventral da língua

-
- Q61 - ☐ C02.3 - Dois terços anteriores da língua, parte não especificada
 Q62 - ☐ C02.4 - Amígdala lingual
 Q63 - ☐ C02.8 - Lesão invasiva da língua
 Q64 - ☐ C02.9 - Língua, não especificada
- Q65 - ☐ C03 - Neoplasia maligna de gengiva
 Q66 - ☐ C03.0 - Gengiva superior
 Q67 - ☐ C03.1 - Gengiva inferior
 Q68 - ☐ C03.9 - Gengiva, não especificada
- Q69 - ☐ C04 - Neoplasia maligna de osso alveolar da boca
 Q70 - ☐ C04.0 - Osso alveolar anterior da boca
 Q71 - ☐ C04.1 - Osso alveolar lateral da boca
 Q72 - ☐ C04.8 - Lesão invasiva do osso alveolar da boca
 Q73 - ☐ C04.9 - Osso alveolar da boca, não especificado
- Q74 - ☐ C05 - Neoplasia maligna de palato
 Q75 - ☐ C05.0 - Palato duro
 Q76 - ☐ C05.1 - Palato mole
 Q77 - ☐ C05.2 - Úvula
 Q78 - ☐ C05.8 - Lesão invasiva do palato
 Q79 - ☐ C05.9 - Palato não especificado
- Q80 - ☐ C06 - Neoplasia maligna de outras partes e de partes não especificadas da boca
 Q81 - ☐ C06.0 - Mucosa oral
 Q82 - ☐ C06.1 - Vestíbulo da boca
 Q83 - ☐ C06.2 - Área retromolar
 Q84 - ☐ C06.8 - Lesão invasiva de outras partes e de partes não especificadas da boca
 Q85 - ☐ C06.9 - Boca, não especificada
- Q86 - ☐ C09 - Neoplasia maligna da amígdala
 Q87 - ☐ C09.0 - Fossa amigdalina
 Q88 - ☐ C09.1 - Pilar amigdalino(anterior)(posterior)
 Q89 - ☐ C09.8 - Lesão invasiva da amígdala
 Q90 - ☐ C09.9 - Amígdala, não especificada
- Q91 - ☐ C10 - Neoplasia maligna da orofaringe
 Q92 - ☐ C10.0 - Valsécia
 Q93 - ☐ C10.1 - Face anterior da epiglote
 Q94 - ☐ C10.2 - Parede lateral da orofaringe
 Q95 - ☐ C10.3 - Parede posterior da orofaringe
 Q96 - ☐ C10.4 - Fenda branquial
 Q97 - ☐ C10.8 - Lesão invasiva da orofaringe
 Q98 - ☐ C10.9 - Orofaringe, não especificada
- Q99 - ☐ C11 - Neoplasia maligna da nasofaringe
 Q100 - ☐ C11.0 - Parede superior da nasofaringe
 Q101 - ☐ C11.1 - Parede posterior da nasofaringe
 Q102 - ☐ C11.2 - Parede lateral da nasofaringe
 Q103 - ☐ C11.3 - Parede anterior da nasofaringe
 Q104 - ☐ C11.8 - Lesão invasiva da nasofaringe

Em que cidade/estado/país o(a) sr.(a) nasceu?

Q38 (nacionalidade) - ☐ Brasileiro ☐ Estrangeiro Q39(onde nasceu)- Q40 - UF da cidade: Q41 - descrição da cidade:
Q42(onde nasceu) - País:

Q43 - O(A) sr.(a) estudou em escola? ☐ Sim ☐ Não

Q44 - Selecione a opção mais elevada quanto ao grau de instrução: ☐ Alfabetizado ☐ Primário Completo
☐ Primário Incompleto ☐ Secundário Completo ☐ Secundário Incompleto ☐ Técnico ☐ Universitário

:.História de Câncer no Entrevistado e na Família

Quantos irmãos o(a) Sr(a) teve? : Q45-

Quantos irmãos o(a) Sr(a) teve? : Q46-

Quantos filhos o(a) Sr(a) teve? : Q47-

Quantos filhos o(a) Sr(a) teve? : Q48-

OBS: Segue as opções de preenchimento: Coloque os números e letras em vermelho correspondentes aos campos nos quadros em branco da tabela anexada abaixo:

Tipode familiar: R:Próprio(a) P:Parente: 01 Mãe:02 Pai:03 Irmão:04 Irmã:05 Filho:06 Filha:07

Vivo/Morto: V:Vivo M:Morto

Tumor: Sim: S Não: N IGN: I

Tabagismo: Sim: S Não: N IGN: I

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
T1	Tipode familiar	Vivo/Morto	Idade atual ou de morte	Tumor	Tipode tumor (CID-10)	Idade no diagnóstico	Tabagista
L1							
L2							
L3							
L4							
L5							
L6							
L7							
L8							
L9							
L10							
L11							
L12							
L13							
L14							
L15							
L16							
L17							
L18							
L19							
L20							
Ln	T1_LnC1	T1_LnC2	T1_LnC3	T1_LnC4	T1_LnC5	T1_LnC6	T1_LnC7

OB 8: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (tipode familiar,vivo/morto,idade atual ou de morte,tipode tumor,idade no diagnóstico ou tabagista). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T1_L3C2- Tabela1 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de história familiar, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de Vivo/Morto.

:.História de Tabagismo

Q49 - O(A) Sr(a) fuma ou já fumou em média 1 cigarro, charuto ou cachimbo, diariamente, pelo menos por 1 ano?

☐ Sim, ainda fuma ☐ Nunca fumou ☐ Somente no passado

(se parou de fumar há menos de 12 meses assinalar (sim, ainda fuma))

Gostaríamos que o(a) sr.(a) descrevesse os períodos de sua vida em que fumou cigarro, charuto ou cachimbo, as quantidades que fumou e outros detalhes. Por favor, tente lembrar as mudanças mais importantes quanto à quantidade e tipo de cigarro. Ignore as mudanças que ocorrerem por períodos curtos (menos de 1 ano).

Nota para o entrevistador: Evite a superposição de anos para consumo do mesmo tipo de cigarro, por exemplo: utilize 30-40, 41-45 ao invés de 30-40, 40-45.

OBS: Segue as opções de preenchimento: Coloque os números em vermelho correspondentes aos campos nos quadros em branco da tabela anexada abaixo: **Tipos de Tabaco:** Cigarro : 01 Charuto : 02 Cachimbo : 03 Cigarro de palha : 04

Que tipo de tabaco o(a) sr.(a) fuma ou já fumou?

	C1	C2	C3	C4
T2	Tipos de Tabaco	Idade de Início	Idade que Parou	Nº por Dia
L1				
L2				
L3				
L4				
L5				
Ln	T2_LnC1	T2_LnC2	T2_LnC3	T2_LnC4

OBS: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (tipo de tabaco, idade de início, idade que parou, nº por dia). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T2_L3C2 - Tabela2 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de tabaco, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de idade de início.

!! Hábitos de Bebida

Q50 - O(A) Sr(a) já tomou (ingeriu) bebidas alcoólicas pelo menos 1 vez por mês?

☐ Sim, ainda bebo ☐ Nunca ☐ Só no passado

(se parou nos últimos 12 meses, a resposta é (sim ainda bebo))

Q51 - Quando o(a) Sr(a) costuma beber (ou beber)?

☐ Nas refeições ☐ Entre as refeições ☐ Aos finais de semana ☐ Ambos

Descreva os períodos de sua vida durante os quais o(a) tomou bebidas alcoólicas. Por favor, tente resumir as mudanças mais importantes em sua vida em relação à quantidade e tipo de bebida. Ignore quaisquer mudanças ocorridas durante curtos períodos de tempo (menos de 1 ano), ou bebidas consumidas ocasionalmente.

NOTA PARA O ENTREVISTADOR: Evite a superposição de anos de consumo de uma mesma bebida, por exemplo: utilize 30-40, 41-45 ao invés de 30-40, 40-45, perguntar separadamente para cada bebida.

OBS: Destilados: uísque, conhaque, cachapa e vodka.

OBS: Segue as opções de preenchimento: Coloque os números em vermelho correspondentes aos campos nos quadros em branco da tabela anexada abaixo:

Bebida: Vinho : 01 Cerveja : 02 Destilados : 03

Unidade: Copo pequeno - 50ml : 01 Copo médio - 100ml : 02 Copo grande - 250ml : 03 1/2 garrafa pequena ou lata - 330ml : 04

Garrafa 700-750ml : 05 Garrafa - 1L : 06

Por : Dia : 01 Semana : 02 Mês : 03

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
T3	Bebida	Idade de Início	Idade que Parou	Unidade	Unidade Consumida	Por
L1						
L2						
L3						
L4						
L5						
Ln	T3_LnC1	T3_LnC2	T3_LnC3	T3_LnC4	T3_LnC5	T3_LnC6

OBS: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (tipo de bebida, idade de início, idade que parou, unidade, unidade consumida e por). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T3_L3C4 - Tabela3 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de bebida, e da 4ª coluna (C4) que representa o campo com informações de unidade.

-
- Q61 - ☐ C02.3 - Dois terços anteriores da língua, parte não especificada
 Q62 - ☐ C02.4 - Amígdala lingual
 Q63 - ☐ C02.8 - Lesão invasiva da língua
 Q64 - ☐ C02.9 - Língua, não especificada
- Q65 - ☐ C03 - Neoplasia maligna de gengiva
 Q66 - ☐ C03.0 - Gengiva superior
 Q67 - ☐ C03.1 - Gengiva inferior
 Q68 - ☐ C03.9 - Gengiva, não especificada
- Q69 - ☐ C04 - Neoplasia maligna de assoalho da boca
 Q70 - ☐ C04.0 - Assoalho anterior da boca
 Q71 - ☐ C04.1 - Assoalho lateral da boca
 Q72 - ☐ C04.8 - Lesão invasiva do assoalho da boca
 Q73 - ☐ C04.9 - Assoalho da boca, não especificado
- Q74 - ☐ C05 - Neoplasia maligna de palato
 Q75 - ☐ C05.0 - Palato duro
 Q76 - ☐ C05.1 - Palato mole
 Q77 - ☐ C05.2 - Úvula
 Q78 - ☐ C05.8 - Lesão invasiva do palato
 Q79 - ☐ C05.9 - Palato não especificado
- Q80 - ☐ C06 - Neoplasia maligna de outras partes e de partes não especificadas da boca
 Q81 - ☐ C06.0 - Mucosa oral
 Q82 - ☐ C06.1 - Vestíbulo da boca
 Q83 - ☐ C06.2 - Área retromolar
 Q84 - ☐ C06.8 - Lesão invasiva de outras partes e de partes não especificadas da boca
 Q85 - ☐ C06.9 - Boca, não especificada
- Q86 - ☐ C09 - Neoplasia maligna de amígdala
 Q87 - ☐ C09.0 - Fossa amigdalina
 Q88 - ☐ C09.1 - Pilar amigdalino (anterior) (posterior)
 Q89 - ☐ C09.8 - Lesão invasiva da amígdala
 Q90 - ☐ C09.9 - Amígdala, não especificada
- Q91 - ☐ C10 - Neoplasia maligna da orofaringe
 Q92 - ☐ C10.0 - Valécula
 Q93 - ☐ C10.1 - Face anterior da epiglote
 Q94 - ☐ C10.2 - Parede lateral da orofaringe
 Q95 - ☐ C10.3 - Parede posterior da orofaringe
 Q96 - ☐ C10.4 - Fenda branquial
 Q97 - ☐ C10.8 - Lesão invasiva da orofaringe
 Q98 - ☐ C10.9 - Orofaringe, não especificada
- Q99 - ☐ C11 - Neoplasia maligna da nasofaringe
 Q100 - ☐ C11.0 - Parede superior da nasofaringe
 Q101 - ☐ C11.1 - Parede posterior da nasofaringe
 Q102 - ☐ C11.2 - Parede lateral da nasofaringe
 Q103 - ☐ C11.3 - Parede anterior da nasofaringe
 Q104 - ☐ C11.8 - Lesão invasiva da nasofaringe

APÊNDICE 4

FORMULÁRIO ANATOMO PATOLÓGICO: CABEÇA E PESCOÇO

OQ2: Ao utilizar o banco de dados relatórios este formulário, deve-se verificar que há um código formado pela letra "Q" seguida de um número, antes do código de cada questão. Como para um item o paciente pode haver mais de um anátomo patológico, esse código inclui com a letra "Q" indica o número do formulário de anátomo patológico inserido no sistema. Suponha o exemplo Q2_Q2: "Q2" indica o o segundo formulário de anátomo patológico e "Q2" a terceira questão desse formulário.

OQ - Nº de identificação: Nome do Paciente:

1) Protocolo Anátomo Patológico: Cabeça e Pescoço

1) TIPO DE MATERIAL

Nota: Preencher o campo biópsia e as informações subsequentes somente para os casos em que o paciente não foi submetido a cirurgia.

O1 - ☐ Biópsia ☐ Peça Cirúrgica - O2 - data do exame: ☐ Admissível

2) EXAME MACROSCÓPICO

Tamanho do Tumor - dimensão máxima em centímetros

(maior diâmetro e a espessura tomada a partir da superfície mucosa normal)

O3 - cm X O4 - cm X O5 - cm O6 - ☐ Não-avaliável

O7 - Crescimento: ☐ Exófito ☐ Endófito ☐ Não-avaliável

O8 - Área de comprometimento do tumor

3) EXAME MICROSCÓPICO

Tipo Histológico - Carcinoma e/ou sarcoma

O9 - Carcinoma espinhal (CEC): ☐ Sim ☐ Não ☐ Não informado

O10 - Variante Morfológica:

☐ Verrucoso ☐ Adenocarcinoma
☐ Linfopático ☐ Squamoso basalóide ☐ Squamoso ódenóide ☐ Pulacrocular (Sarcomatide)
☐ Não-avaliável ☐ Outro

O11 - Grau de diferenciação:

☐ Bem diferenciado ☐ Moderadamente ☐ Pouco diferenciado ☐ Não-avaliável

Para melanoma (o componente in situ predomina, com invasão local da lâmina própria)

☐ Melanoma ☐ Lâmina Própria ☐ Plano Muscular ☐ Cartilagem ☐ Outras estruturas

O12 - Profundidade de invasão do tumor:

☐ Não-avaliável

Invasão Vascular

O13 - Sanguínea: ☐ Ausente ☐ Presente ☐ Não-avaliável

O14 - Linfática: ☐ Ausente ☐ Presente ☐ Não-avaliável

O15 - Invasão Perineural: ☐ Ausente ☐ Presente ☐ Não-avaliável

O16 - Infiltrado inflamatório peritumoral:

☐ Ausente ☐ Escasso ☐ Moderado ☐ Intenso ☐ Não-avaliável

O17 - Margens Cirúrgicas

☐ Com distúrbio de alto grau (especificar o local): O18
☐ Envolvida por tumor invasivo (especificar o local): O19
☐ Com carcinoma in situ (especificar o local): O20
☐ Não-avaliável O21
☐ Livres de tumor

O22 - Lesões em órgãos adjacentes

Linfonodos

NÍVEL I

O23 - Nº dissecado

O24 - Nº comprometido

O25 - Invasão extracapsular

NÍVEL II

O26 - Nº dissecado

O27 - Nº comprometido

O28 - Invasão extracapsular

NÍVEL III

O29 - Nº dissecado

O30 - Nº comprometido

O31 - Invasão extracapsular

NÍVEL IV

O32 - Nº dissecado

O33 - Nº comprometido

O34 - Invasão extracapsular

NÍVEL V

O35 - Nº dissecado

O36 - Nº comprometido

O37 - Invasão extracapsular

NÍVEL VI

O38 - Nº dissecado

O39 - Nº comprometido

O40 - Invasão extracapsular

NÍVEL VII

O41 - Nº dissecado

O42 - Nº comprometido

O43 - Invasão extracapsular

NÍVEL VIII

O44 - Nº dissecado

O45 - Nº comprometido

O46 - Invasão extracapsular

NÍVEL IX

O47 - Nº dissecado

O48 - Nº comprometido

O49 - Invasão extracapsular

NÍVEL X

O50 - Nº dissecado

O51 - Nº comprometido

O52 - Invasão extracapsular

O53 - Nº dissecado

O54 - Nº comprometido

O55 - Invasão extracapsular

O56 - Nº dissecado

O57 - Nº comprometido

O58 - Invasão extracapsular

O59 - Nº dissecado

O60 - Nº comprometido

O61 - Invasão extracapsular

Estadiamento Patológico:

O62 - T cm X O63 - N cm X O64 - M cm O65 - ☐ Não-avaliável

APÊNDICE 5

FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO: CABEÇA E PESCOÇO

OB'S: Ao utilizar o banco de dados relativo a este formulário, deve-se verificar que há um código formado pela letra "A" seguido de um número, antes do código de cada questão. Como para um mesmo paciente pode haver mais de um acompanhamento, este código inicial com a letra "A" indica o número do formulário de acompanhamento inserido no sistema. Suponha o exemplo: A2_Q3: "A2" indica o o segundo formulário de acompanhamento e "Q3" a terceira questão deste formulário.

Q0 - Nº de identificação: Nome do Paciente:

Obs: Para cada retorno do paciente ao acompanhamento, deverá ser aberto um novo questionário de acompanhamento.

1º Acompanhamento de Cabeça e Pescoço

Q1- ☐ Sem evidências de doenças - Q2- Data: dd/mm/aaaa

Q3- ☐ Recidiva loco-regional ou residual

Q4- ☐ Metástase à distância

Q5- ☐ 2º Tumor primário

Q6- ☐ Óbito

Q7- ☐ Paciente perdido do acompanhamento - Q8- Data: dd/mm/aaaa

Q9- ☐ Outras situações - Q10- Data: dd/mm/aaaa

Se Sim, qual? Q11- ☐ Acompanhamento em outro hospital ☐ Mudou de cidade ☐ Outra - Qual? Q12-

Comentários referente aos campos mencionados acima:

Sem evidências de doenças - Ao clicar neste tópico será aberto somente o campo de inclusão de data de retorno das paciente, ocultando os demais itens do questionário;

Recidiva loco-regional ou residual - Ao clicar neste tópico será aberto somente os itens A e B deste questionário, demais serão ocultados;

Metástase à distância - Ao clicar neste tópico será aberto somente os itens C e D deste questionário, demais serão ocultados;

2º Tumor primário - Ao clicar neste tópico será aberto somente os itens E e F deste questionário, demais serão ocultados;

Óbito - Ao clicar neste tópico será aberto somente o item G deste questionário, demais serão ocultados.

Paciente perdido do acompanhamento - Ao clicar neste tópico será aberto somente o campo de inclusão de data, incluir tela de alerta: "Esta opção somente deverá ser escolhida na condição de busca de informações sobre o paciente terem sido esgotadas".

OB'S: Se mais de uma opção for escolhida, serão abertos na tela os tópicos relacionados ao item de opção. Ex: Paciente retornou para acompanhamento, mas teve uma recidiva e veio a óbito, os tópicos a serem marcados serão: ☒ Recidiva loco-regional ou residual ☒ Óbito, esta propriedade não se aplica para os casos da opção escolhida ser: "Paciente Perdido".

A) RECIDIVA B - Recidiva loco-regional ou residual

Q13- Tumor Residual (tumor primário): ☐ Sim ☐ Não Q14- Data: dd/mm/aaaa

Q15- Recidiva Local: ☐ Sim ☐ Não Q16- Data: dd/mm/aaaa

Q17- Tumor Residual (doença regional): ☐ Sim ☐ Não Q18- Data: dd/mm/aaaa

Q19- Recidiva Regional - Cervical: ☐ Sim ☐ Não Q20- Data: dd/mm/aaaa

Q21- Nível: Q22- ☐ Direto ☐ Esquerdo

Q23- Nível: Q24- ☐ Direto ☐ Esquerdo

Q25- Nível: Q26- ☐ Direto ☐ Esquerdo

B) TRATAMENTO REALIZADO PARA A RECIDIVA - Recidiva loco-regional ou residual

Q27- Notas:

- Q105 - ☐ C11.9 - Nasofaringe, não especificada
- Q106 - ☐ C12 - Neoplasia maligna do seio piriforme
- Q107 - ☐ C13 - Neoplasia maligna da hipofaringe
- Q108 - ☐ C13.0 - Região pós-crióides
- Q109 - ☐ C13.1 - prega ar epiglótica, face hipofaríngea
- Q110 - ☐ C13.2 - Parede posterior da hipofaringe
- Q111 - ☐ C13.8 - Lesão invasiva da orofaringe
- Q112 - ☐ C13.9 - Hipofaringe, não especificada
- Q113 - ☐ C14 - Neoplasia maligna de outras localidades e de localidades mal definidas do lábio cavidade oral e faringe
- Q114 - ☐ C14.0 - Faringe, não especificada
- Q115 - ☐ C14.1 - Laringofaringe, descrita como tal
- Q116 - ☐ C14.2 - Anel de Warty
- Q117 - ☐ C14.8 - Lesão invasiva do lábio, cavidade oral e faringe
- Q118 - ☐ C30 - Neoplasia maligna da cavidade nasal e do ouvido médio
- Q119 - ☐ C30.0 - Cavidade nasal
- Q120 - ☐ C30.1 - Ouvido médio
- Q121 - ☐ C31 - Neoplasia maligna dos seios da face
- Q122 - ☐ C31.0 - Seio maxilar
- Q123 - ☐ C31.1 - Seio etmoidal
- Q124 - ☐ C31.2 - Seio frontal
- Q125 - ☐ C31.3 - Seio esfenoidal
- Q126 - ☐ C31.8 - Lesão invasiva dos seios da face
- Q127 - ☐ C31.9 - Seio da face, não especificado
- Q128 - ☐ C32 - Neoplasia maligna da laringe
- Q129 - ☐ C32.0 - Glote
- Q130 - ☐ C32.1 - Região supraglótica
- Q131 - ☐ C32.2 - Região subglótica
- Q132 - ☐ C32.3 - Cartilagens da laringe
- Q133 - ☐ C32.8 - Lesão invasiva da laringe
- Q134 - ☐ C32.9 - Laringe não especificada
- Q135 - ☐ C77.0 - Neoplasia maligna secundária e não especificada dos gânglios linfáticos
- Q136 - ☐ C44.9 - Neoplasia maligna da pele

TAMANHO DO TUMOR

Tamanho: Q137 - cm X Q138 - cm X Q139 - cm

LINFONDO S COM PROMETIDOS CLINICAMENTE

Q140 - E1 NIVEL I D:	☐ Sim ☐ Não	Q141 - Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q142 - Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm
Q143 - E2 NIVEL II D:	☐ Sim ☐ Não	Q144 - Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q145 - Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm
Q146 - E3 NIVEL III D:	☐ Sim ☐ Não	Q147 - Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q148 - Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm

- Q105 - ☐ C11.9 - Nasofaringe, não especificada
- Q106 - ☐ C12 - Neoplasia maligna do seio piriforme
- Q107 - ☐ C13 - Neoplasia maligna da hipofaringe
- Q108 - ☐ C13.0 - Região pós-crióides
- Q109 - ☐ C13.1 - Prega ar epiglótica, fase hipofaríngea
- Q110 - ☐ C13.2 - Parede posterior da hipofaringe
- Q111 - ☐ C13.8 - Lesão invasiva da orofaringe
- Q112 - ☐ C13.9 - Hipofaringe, não especificada
- Q113 - ☐ C14 - Neoplasia maligna de outras localidades e de localidades mal definidas do lábio cavidade oral e faringe
- Q114 - ☐ C14.0 - Faringe, não especificada
- Q115 - ☐ C14.1 - Laringofaringe, descrita como tal
- Q116 - ☐ C14.2 - Anel de Webber
- Q117 - ☐ C14.8 - Lesão invasiva do lábio, cavidade oral e faringe
- Q118 - ☐ C30 - Neoplasia maligna da cavidade nasal e do ouvido médio
- Q119 - ☐ C30.0 - Cavidade nasal
- Q120 - ☐ C30.1 - Ouvido médio
- Q121 - ☐ C31 - Neoplasia maligna dos seios da face
- Q122 - ☐ C31.0 - Seio maxilar
- Q123 - ☐ C31.1 - Seio etmoidal
- Q124 - ☐ C31.2 - Seio frontal
- Q125 - ☐ C31.3 - Seio esfenoidal
- Q126 - ☐ C31.8 - Lesão invasiva dos seios da face
- Q127 - ☐ C31.9 - Seio da face, não especificado
- Q128 - ☐ C32 - Neoplasia maligna da laringe
- Q129 - ☐ C32.0 - Glote
- Q130 - ☐ C32.1 - Região supraglótica
- Q131 - ☐ C32.2 - Região subglótica
- Q132 - ☐ C32.3 - Cartilagens da laringe
- Q133 - ☐ C32.8 - Lesão invasiva da laringe
- Q134 - ☐ C32.9 - Laringe não especificada
- Q135 - ☐ C77.0 - Neoplasia maligna secundária e não especificada dos gânglios linfáticos
- Q136 - ☐ C44.9 - Neoplasia maligna da pele

TAMANHO DO TUMOR

Tamanho: Q137 - cm X Q138 - cm X Q139 - cm

LINFONÓDULOS COM PROMETIDOS CLINICAMENTE

Q140 - E1 NÍVEL I D:	☐ Sim ☐ Não	Q141 - Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q142 - Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm
Q143 - E2 NÍVEL II D:	☐ Sim ☐ Não	Q144 - Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q145 - Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm
Q146 - E3 NÍVEL III D:	☐ Sim ☐ Não	Q147 - Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q148 - Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm

- Q105 - ☐ C11.9 - Nasofaringe, não especificada
- Q106 - ☐ C12 - Neoplasia maligna do seio piriforme
- Q107 - ☐ C13 - Neoplasia maligna da hipofaringe
- Q108 - ☐ C13.0 - Região pós-crióides
- Q109 - ☐ C13.1 - Prega arlepiótica, face hipofaríngea
- Q110 - ☐ C13.2 - Parede posterior da hipofaringe
- Q111 - ☐ C13.8 - Lesão invasiva da orofaringe
- Q112 - ☐ C13.9 - Hipofaringe, não especificada
- Q113 - ☐ C14 - Neoplasia maligna de outras localidades e de localidades mal definidas do lábio, cavidade oral e faringe
- Q114 - ☐ C14.0 - Faringe, não especificada
- Q115 - ☐ C14.1 - Laringofaringe, descrita como tal
- Q116 - ☐ C14.2 - Anel de Warty
- Q117 - ☐ C14.8 - Lesão invasiva do lábio, cavidade oral e faringe
- Q118 - ☐ C30 - Neoplasia maligna da cavidade nasal e do ouvido médio
- Q119 - ☐ C30.0 - Cavidade nasal
- Q120 - ☐ C30.1 - Ouvido médio
- Q121 - ☐ C31 - Neoplasia maligna dos seios da face
- Q122 - ☐ C31.0 - Seio maxilar
- Q123 - ☐ C31.1 - Seio etmoidal
- Q124 - ☐ C31.2 - Seio frontal
- Q125 - ☐ C31.3 - Seio esfenoidal
- Q126 - ☐ C31.8 - Lesão invasiva dos seios da face
- Q127 - ☐ C31.9 - Seio da face, não especificado
- Q128 - ☐ C32 - Neoplasia maligna da laringe
- Q129 - ☐ C32.0 - Glote
- Q130 - ☐ C32.1 - Região supraglótica
- Q131 - ☐ C32.2 - Região subglótica
- Q132 - ☐ C32.3 - Cartilagens da laringe
- Q133 - ☐ C32.8 - Lesão invasiva da laringe
- Q134 - ☐ C32.9 - Laringe não especificada
- Q135 - ☐ C77.0 - Neoplasia maligna secundária e não especificada dos gânglios linfáticos
- Q136 - ☐ C44.9 - Neoplasia maligna da pele

TAMANHO DO TUMOR

Tamanho: Q137 - cm X Q138 - cm X Q139 - cm

LINFONDO S COM PROMETIDOS CLINICAMENTE

Q140 - E1 NIVEL I D:	☐ Sim ☐ Não	Q141 - NP de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q142 - Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm
Q143 - E2 NIVEL II D:	☐ Sim ☐ Não	Q144 - NP de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q145 - Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm
Q146 - E3 NIVEL III D:	☐ Sim ☐ Não	Q147 - NP de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q148 - Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm

Q149-E4 NIVEL IV D:	☐ Sim ☐ Não	Q150-Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q151-Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm
Q152-E5 NIVEL V D:	☐ Sim ☐ Não	Q153-Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q154-Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm
Q155-E6 NIVEL I E:	☐ Sim ☐ Não	Q156-Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q157-Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm
Q158-E7 NIVEL II E:	☐ Sim ☐ Não	Q159-Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q160-Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm
Q161-E8 NIVEL III E:	☐ Sim ☐ Não	Q162-Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q163-Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm
Q164-E9 NIVEL IV E:	☐ Sim ☐ Não	Q165-Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q166-Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm
Q167-E10 NIVEL V E:	☐ Sim ☐ Não	Q168-Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q169-Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm
Q170-E11 NIVEL VI:	☐ Sim ☐ Não	Q171-Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q172-Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm
Q173-E12 NIVEL VII:	☐ Sim ☐ Não	Q174-Nº de Linfonodos:	<input type="text"/>	Q175-Maior Linfonodo:	<input type="text"/> cm

METÁSTASES À DISTÂNCIA

Q176-SNC:	☐ Sim ☐ Não	Q177-Data:	<input type="text"/> dd/mm/aaaa
Q178-Pulmão:	☐ Sim ☐ Não	Q179-Data:	<input type="text"/> dd/mm/aaaa
Q180-Fígado:	☐ Sim ☐ Não	Q181-Data:	<input type="text"/> dd/mm/aaaa
Q182-Ossos:	☐ Sim ☐ Não	Q183-Data:	<input type="text"/> dd/mm/aaaa
Q185-Outros órgãos:	☐ Sim ☐ Não	Q186-Data:	<input type="text"/> dd/mm/aaaa
		Q184-Qual?:	<input type="text"/>
		Q187-Qual?:	<input type="text"/>

TMN Clínica: Q188-T: Q189-N: Q190-M:

INFORMAÇÕES TERAPÊUTICAS

Q191-Cirurgia realizada: ☐ Sim ☐ Não Q192-Data: dd/mm/aaaa

Q193-Notas:

Q194-Radioterapia: ☐ Sim ☐ Não Q195-Data início: dd/mm/aaaa Q196-Data término:

Q197-Tipo de Radioterapia:

Q198-Dose: cGy

Q199-Quimioterapia: ☐ Sim ☐ Não

(Preencha a tabela abaixo somente se a sua resposta em Quimioterapia for Sim)

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
T1	Drugs	Dose	Nº Dias	Ciclos	Data Iní.	Data Fim
L1						
L2						
L3						
L4						
L5						
Ln	T1_LnC1	T1_LnC2	T1_LnC3	T1_LnC4	T1_LnC5	T1_LnC6

OB8: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (drogas,dose,nº dias,dados, data início ou data fim). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T1_L3C2 - Tabela1 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de quimioterapia, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de dose.

Q200-Tipo de Quimioterapia (especificar):

Q28-Cirurgia: ☐ Sim ☐ Não Q29- Se sim, Data: dd/mm/aaaa

Q30-Notas:

Q31-Radioterapia: ☐ Sim ☐ Não Q32- Se sim, Data Início: dd/mm/aaaa Q33- Data Fim:

Q34- Se sim, tipo de Radioterapia:

Q35- Se sim, Dose:

Q36-Quimioterapia: ☐ Sim ☐ Não

	C1 Drogas	C2 Dose	C3 Ciclos	C4 Data Início	C5 Data Término
T1					
L1					
L2					
L3					
L4					
L5					
L6					
L7					
L8					
Ln	T1_LnC1	T1_LnC2	T1_LnC3	T1_LnC4	T1_LnC5

OB8: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (drogas, dose, nº de ciclos, data início ou data fim). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T1_L3C2 - Tabela1 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de quimioterapia da rede, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de dose.

Q37 -Tipo de Quimioterapia (especificar):

C) METÁSTASES À DISTÂNCIA

Q38 -SNC: ☐ Sim ☐ Não Q39-Data: dd/mm/aaaa

Q40-Pulmão: ☐ Sim ☐ Não Q41-Data: dd/mm/aaaa

Q42-Fígado: ☐ Sim ☐ Não Q43-Data: dd/mm/aaaa

Q44-Ossos: ☐ Sim ☐ Não Q45-Data: dd/mm/aaaa Q46- Qual?:

Q47-Outros órgãos: ☐ Sim ☐ Não Q48-Data: dd/mm/aaaa Q49- Qual?:

D) TRATAMENTO REALIZADO PARA A METÁSTASES À DISTÂNCIA

Q50-Notas:

Q51-Cirurgia: ☐ Sim ☐ Não Q52- Se sim, Data: dd/mm/aaaa

Q53-Notas:

Q54-Radioterapia: ☐ Sim ☐ Não Q55- Se sim, Data Início: dd/mm/aaaa Q56- Data Fim:

Q57- Se sim, tipo de

Radioterapia:

Q58-Se sim, Dose:

Q59-Quimioterapia: ☐ Sim ☐ Não

	C1	C2	C3	C4	C5
T2	Drogas	Dose	Ciclos	Data Inicio	Data Término
L1	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L2	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L3	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L4	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L5	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L6	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L7	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L8	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L9	T2_LnC1	T2_LnC2	T2_LnC3	T2_LnC4	T2_LnC5

Obs: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (drogas,dose,nº dias,ciclos, data inicio ou data fim). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T2_L3C2 - Tabela2 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de quimioterapia de metástase, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de dose.

Q60-Tipo de Quimioterapia (especificar):

E) SEGUNDA LESÃO - 2º Tumor primário

Q61-Cavidade oral: ☐ Sim ☐ Não Q62-Data: dd/mm/aaaa

Q63-Orofaringe: ☐ Sim ☐ Não Q64-Data: dd/mm/aaaa

Q65-Hipofaringe: ☐ Sim ☐ Não Q66-Data: dd/mm/aaaa

Q67-Laringe: ☐ Sim ☐ Não Q68-Data: dd/mm/aaaa

Q69-Esôfago: ☐ Sim ☐ Não Q70-Data: dd/mm/aaaa

Q71-Pulmão: ☐ Sim ☐ Não Q72-Data: dd/mm/aaaa

Q73-Outros: ☐ Sim ☐ Não Q74-Data: dd/mm/aaaa Q75-Qual?:

F) TRATAMENTO DA SEGUNDA LESÃO - 2º Tumor primário

Q76-Notas:

Q77-Cirurgia: ☐ Sim ☐ Não Q78-Se sim, Data: dd/mm/aaaa

Q79-Notas:

Q80-Radioterapia: ☐ Sim ☐ Não Q81-Se sim, Data Inicio: dd/mm/aaaa Q82-Data Fim:

Q83-Se sim, tipo de Radioterapia:

Q84-Se sim, Dose:

Q85-Quimioterapia: ☐ Sim ☐ Não

	C1	C2	C3	C4	C5
T3	Drogas	Dose	Ciclos	Data Inicio	Data Término
L1					
L2					
L3					
L4					
L5					
L6					
L7					
L8					
Ln	T3_LnC1	T3_LnC2	T3_LnC3	T3_LnC4	T3_LnC5

OB 8: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (drogas, dose, nº de ciclos, data início ou data fim). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T3_L3C2 - Tabela3 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de quimioterapia da segunda lesão, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de dose.

Q88-Tipo de
Quimioterapia
(especificar):

B) INFORMAÇÕES SOBRE O ÓBITO

Q87-Óbito: ☐ Sim ☐ Não (preencha os itens abaixo somente se for sim)

Q88-Data Óbito: dd/mm/aaaa

Q89-Tipo de Óbito: ☐ Outra causa ☐ Óbito pela neoplasia

Q90-Se por outra causa,
informe qual: