

GABRIEL MANFRO

**Importância prognóstica da reatividade linfonodal e de micrometástases em
pacientes com câncer de laringe avançado sem metástase cervical**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. Claudio Roberto Cernea

São Paulo

2009

GABRIEL MANFRO

**Importância prognóstica da reatividade linfonodal e de micrometástases em
pacientes com câncer de laringe avançado sem metástase cervical**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. Claudio Roberto Cernea

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Manfro, Gabriel

Importância prognóstica da reatividade linfonodal e de micrometástases em
pacientes com câncer de laringe avançado sem metástases cervical / Gabriel
Manfro. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Claudio Roberto Cernea.

Descritores: 1.Neoplasias laríngeas 2.Metástase linfática 3.Linfadenite
4.Prognóstico

USP/FM/SBD-469/09

Dedicatória

À minha esposa Brigitte, minha grande companheira, amiga, meu grande amor.

Agradecimentos

Aos meus pais pelo apoio, incentivo e orientação durante toda a minha vida.

Aos meus familiares por todo incentivo, mesmo distantes por longos períodos.

Ao Prof. Dr. Claudio R. Cernea, pela amizade, orientação, apoio e compreensão durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Luiz Dias pela amizade, e pelas oportunidades que me proporcionou durante a minha formação.

Aos Drs. Roberto Araújo Lima, José Roberto Netto Soares, Emílson de Queiroz Freitas, Isabela Costa Santos, Terence Pires de Farias, Walber Jurema, Mauro Marques Barbosa, Pedro Medeiros, Dr. Geraldo Matos de Sá (*in memorium*) e Dr. Fernando Botelho (*in memorium*), pelos ensinamentos durante a minha residência médica em Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Ao Dr. Gilberto Vaz Teixeira pelo coleguismo e incentivo durante a minha formação.

Ao Prof. Dr. Alberto Rosseti Ferraz pela oportunidade a estudantes de diversas universidades do país cursarem esta pós-graduação.

Aos componentes da Banca de Qualificação desta Tese, Prof. Dr. Lenine Garcia Brandão, Prof. Dr. Marcos Tavares, Dr. Flávio Hojaij e Dra. Beatriz Cavalheiro, pelas sugestões e orientações para melhora deste trabalho.

A todos os meus colegas de residência médica e de trabalho pela amizade e incentivo durante todos os momentos.

Normatização Adotada

Tese de acordo com as normas em vigor no momento da publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação: 2005.

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

Tese escrita conforme o novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa.

LISTA DE SIGLAS

APC Célula Apresentadora de Antígeno

CEC Carcinoma Epidermoide

CK Citoqueratina

IL Interleucina

INCA Instituto Nacional de Câncer

LTh1 Linfócito T *helper* 1

LTh2 Linfócito T *helper* 2

MHC Complexo Principal de Histocompatibilidade

NK *Natural killers*

TAA Antígeno Associado ao Tumor

TCR Receptor de célula T

TSA Antígeno Específico ao Tumor

UICC União Internacional Contra o Câncer

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre sexo, recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.....	57
Tabela 2 – Relação entre a idade, recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005....	57
Tabela 3 – Relação entre etnia, recidiva e mortalidade, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.....	58
Tabela 4 – Número de pacientes com e sem história familiar de câncer e média de idade, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.....	59
Tabela 5 – Relação entre exposição ao tabagismo ou etilismo com a recidiva e mortalidade, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005	59
Tabela 6 – Relação entre a presença e traqueostomia prévia ao tratamento, recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005	61
Tabela 7 – Relação entre a presença de traqueostomia prévia ao tratamento e recidiva local, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005	61
Tabela 8 – Relação entre tamanho do tumor, tratamento realizado com a incidência de recidiva e óbito nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.....	62
Tabela 9 – Relação entre margens cirúrgicas, recidiva e óbito nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005	63
Tabela 10 – Relação entre o subsítio do tumor, recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005	63
Tabela 11 – Relação do tamanho do tumor (pT), recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005	64
Tabela 12 – Relação do tamanho do tumor (pT) com a recidiva locoregional e recidiva a distância nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.....	64
Tabela 13 – Relação da superfície tumoral com a recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005	65

Tabela 14 – Relação entre número de linfonodos ressecados, recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005	65
Tabela 15 – Relação entre o grau de diferenciação, recidiva e óbito, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005	66
Tabela 16 – Relação entre infiltrado inflamatório tumoral, invasão de estruturas adjacentes, invasão da cartilagem, invasão vascular e perineural com a recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005	67
Tabela 17 – Relação entre o padrão de reatividade linfonodal, recidiva e mortalidade, nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.	71
Tabela 18 – Relação entre o tipo de imunidade estimulada, recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.	72
Tabela 19 – Relação da presença de estímulo imunológico nos linfonodos com a recidiva e óbito nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005	75
Tabela 20 – Relação entre o padrão de reatividade linfonodal com o tipo de recidiva da doença nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.....	75
Tabela 21 – Relação entre o padrão de reatividade do maior linfonodo ressecado com a recidiva e mortalidade, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.....	76
Tabela 22 - Relação entre a pesquisa de AE1/AE3 com o, volume tumoral, subsítio do tumor primário, tamanho do tumor, grau de diferenciação, número de linfonodos ressecados e traqueostomia prévia nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.	79
Tabela 23 - Relação entre o padrão de reatividade linfonodal e o padrão de imunidade estimulada com a pesquisa com AE1/AE3, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.....	80
Tabela 24 - Relação entre recidiva e mortalidade e a pesquisa de AE1/AE3, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005	80
Tabela 25 - Relação entre a recidiva e tratamento adjuvante com radioterapia nos pacientes com pesquisa de AE1/AE3 positiva e negativa, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005	81

Tabela 26 – Análise uni e multivariada relacionando as variáveis etnia, número de linfonodos ressecados e pesquisa de AE1/AE3 com a recidiva da doença, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005	81
Tabela 27 – Análise uni e multivariada relacionando as variáveis volume tumoral, número de linfonodos ressecados, invasão de estruturas adjacentes, invasão de cartilagem, tipo de resposta imune estimulada e AE1/AE3 com a mortalidade pela doença, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005	82
Tabela 28 - Relação entre a incidência de micrometástases, recidiva e mortalidade, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005	84
Tabela 29 - Relação entre a presença de micrometástases, padrão de reatividade linfonodal, tipo de imunidade estimulada e a presença de estímulo linfonodal, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem de um linfonodo normal à microscopia óptica, mostrando uma proporcionalidade entre as regiões dos linfonodos (Aumento de 40 vezes).....	45
Figura 2 – Foto à microscopia óptica da região do córtex linfonodal, mostrando um folículo primário (Aumento de 100 vezes).	46
Figura 3 – Foto mostrando a região cortical do linfonodo com folículo secundário à microscopia óptica (Aumento de 100 vezes).	47
Figura 4 – Folículo secundário mostrando figuras de mitose à microscopia óptica (Aumento 400 vezes).	47
Figura 5 A e B – Imagem à microscopia óptica de linfonodo estimulado com predomínio da região cortical, mostrando folículos estimulados (Aumento de 100 vezes).....	48
Figura 6 – Foto mostrando uma das características da região paracortical, as vênulas pós-capilares de endotélio alto à microscopia óptica (Aumento de 400 vezes).....	49
Figura 7 – Foto de linfonodo com predomínio da região paracortical à microscopia óptica (Aumento 40 vezes).....	49
Figura 8 – Foto de linfonodo à microscopia óptica com predomínio da região do seio linfonodal, com histiocitose ocupando até a região do córtex linfonodal (Aumento de 40 vezes).....	50
Figura 9 – Foto do linfonodo à microscopia óptica positivo para citoqueratina AE1/AE3 no estudo imuno-histoquímico. A área marrom corresponde ao conglomerado de células epiteliais dentro do linfonodo.....	53
Figura 10 – Foto de epitélio de ducto de glândula salivar positivo para citoqueratina AE1/AE3 no estudo imuno-histoquímico.	54
Figura 11 - Estadiamento clínico do tamanho do tumor dos pacientes conforme a AJCC – 2002, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005	60
Figura 12 - Estadiamento clínico dos linfonodos dos pacientes conforme a AJCC– 2002, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005	60
Figura 13 - Estadiamento clínico dos pacientes conforme a AJCC – 2002, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005	61
Figura 14 - Relação entre o tamanho do tumor e o tratamento realizado nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005	62

Figura 15 - Gráfico mostrando o local da recidiva dos pacientes nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.....	68
Figura 16 - Subsítios das recidivas locais nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.....	68
Figura 17 – Sítios das recidivas a distância nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.....	68
Figura 18 - Curva de sobrevida livre de doença nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.....	69
Figura 19 - Curva de sobrevida global, nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.....	70
Figura 20 - Padrão de reatividade linfonodal cervical nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.....	71
Figura 21 - Curvas de sobrevida livre de doença, conforme a imunidade estimulada, nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005	73
Figura 22 - Curvas de sobrevida global, conforme a imunidade estimulada nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.....	74
Figura 23 – Curva de sobrevida global conforme o padrão de reatividade linfonodal, nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.	77
Figura 24 – Curva de sobrevida livre de doença conforme o padrão de reatividade linfonodal, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.....	78
Figura 25– Foto da análise imuno-histoquímica positiva para citoqueratina 5/6 em linfonodo cervical confirmando micrometástase.	82
Figura 26 – Foto da análise imuno-histoquímica positiva para citoqueratina 5/6 em região externa à cápsula do linfonodo, confirmando contaminação devido a manipulação do produto da linfadenectomia.	83
Figura 27 – Foto da análise imuno-histoquímica positiva para citoqueratina 7 em linfonodo cervical, confirmando inclusão epitelial benigna.	84

Manfro G. Importância prognóstica da reatividade linfonodal e de micrometástases em pacientes com câncer de laringe avançado sem metástase cervical [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.143p.

INTRODUÇÃO: A presença de metástase cervical é um dos principais fatores prognósticos em pacientes com carcinoma epidermoide de laringe. A análise rotineira dos linfonodos não inclui a avaliação da reatividade linfonodal, nem pesquisa de micrometástases, podendo ser desprezadas informações prognósticas relevantes neste grupo de pacientes. **OBJETIVOS:** Relacionar a reatividade linfonodal com a recidiva e mortalidade de pacientes com carcinoma epidermoide de laringe estadiados como pT3 e pT4, pN0, identificar através de marcadores imuno-histoquímicos (AE1/AE3, citoqueratina 7 e citoqueratina 5/6) a incidência de micrometástases e relacionar com o prognóstico dos pacientes. **MÉTODO:** Entre 2002 e 2005, foram selecionados 105 pacientes estadiados como pN0 com carcinoma epidermoide de laringe submetidos à laringectomia total e esvaziamento cervical seletivo dos níveis II, III e IV bilateralmente, com a maioria dos pacientes (69) submetidos à radioterapia adjuvante. Todos os linfonodos foram analisados conforme os padrões de reatividade: hiperplasia folicular (associada à resposta imune humoral), hiperplasia paracortical (associada à resposta imune celular), histiocitose sinusal, linfonodo normal e depleção linfonodal. Apenas os dois primeiros padrões são considerados como linfonodos estimulados e os demais como não estimulados. O padrão linfonodal mais frequente de cada caso foi considerado na análise da recidiva da doença e mortalidade. Todos os linfonodos foram submetidos à análise imuno-histoquímica com o clone de citoqueratinas AE1/AE3, e nos casos de positividade utilizou-se as citoqueratinas 5/6 e 7 para a diferenciação entre micrometástases e inclusões epiteliais benignas. **RESULTADOS:** Foram analisados um total de 3.648 linfonodos, com uma média de 34,7 linfonodos por paciente. O padrão de reatividade mais frequente foi a histiocitose sinusal (50 casos) seguido da hiperplasia paracortical (35 casos) e hiperplasia folicular (20 casos), não havendo relação entre esta análise e a recidiva ($p = 0,98$) ou mortalidade ($p = 0,49$). A resposta imune humoral esteve relacionada com maior mortalidade ($p = 0,05$), com sobrevida global em 5 anos de 76%, comparado a 60% de sobrevida no grupo com imunidade celular estimulada ($\log\text{-rank} = 0,05$). A pesquisa imuno-histoquímica utilizando o clone de citoqueratinas AE1/AE3 foi positiva em 17 pacientes (16,2%) tendo esta análise relação com a recidiva da doença ($p = 0,03$) e com a mortalidade ($p = 0,04$). No grupo com AE1/AE3 positivo, a radioterapia associou-se a uma tendência de proteção à recidiva regional ($p = 0,06$). A citoqueratina 5/6 confirmou a presença de micrometástases em 4 (3,81%) casos e estas não apresentaram relação prognóstica com a recidiva ($p = 0,66$) e mortalidade ($p = 0,66$). A citoqueratina 7 diagnosticou inclusões epiteliais benignas em 11 (10,47%) casos. **CONCLUSÕES:** Pacientes com imunidade celular estimulada (hiperplasia paracortical) apresentaram menor mortalidade comparados aos pacientes com resposta imune humoral (hiperplasia folicular) ($p = 0,05$). A positividade na pesquisa com o clone de citoqueratinas AE1/AE3 apresentou relação com significância com a recidiva ($p = 0,03$) e com a mortalidade ($p = 0,04$). A incidência de micrometástases na pesquisa com citoqueratina 5/6 foi de 3,86% (4 casos de 105) e de inclusões epiteliais benignas foi de 10,47% (11 casos de 105).

Summary

Prognostic significance of lymph node reactivity and micrometastases in patients with advanced laryngeal cancer without regional metastasis.

INTRODUCTION: The presence of neck metastasis is one of the most important prognostic factors in patients with squamous cell carcinoma of the larynx. Immunohistochemical analysis for lymph node reactivity, micrometastasis and presence of benign epithelial inclusions are not included in routine anatomopathological exam, leading to potential missing of important prognostic information in this group of patients. **OBJECTIVES:** 1- To analyze if lymph node reactivity is associated with recurrence and mortality in patients with pT3/pT4, pN0 SCCa of the larynx. 2- To identify, with the aid of histochemical markers AE1/AE3, cytokeratin 7 and cytokeratin 5/6, the incidence of micrometastasis and benign intraepithelial inclusions and to evaluate the relationship of these findings with the patient's prognosis. **METHODS:** One hundred and five patients with SCCa of the larynx underwent total laryngectomy and bilateral selective neck dissection of the levels II, III, and IV between 2002 and 2005. Sixty-nine patients also received postoperative radiotherapy. All 105 patients were N0 at the time of diagnosis. The lymph nodes were analyzed according to their reactivity pattern: Follicular hyperplasia (associated to humoral immune response), paracortical hyperplasia (associated to cellular immune response), sinusoidal histiocytosis, normal lymph node, lymphoid depletion. Only the he first two patterns are associated with stimulated lymph nodes. The predominant pattern on each case was recorded and the relationship between these patterns and tumor recurrence and mortality was assessed. All the lymph nodes were tested for cytokeratin AE1/AE3, and the positive cases were than tested for cytokeratin 5/6 and 7 to further differentiate micrometastasis from benign epithelial inclusions. **RESULTS:** A total of 3648 lymph nodes were analyzed (average of 34.7 lymph nodes/patient). The most common reactivity pattern was paracortical hyperplasia (49 cases), followed by sinusoidal histiocytosis (36 cases) and follicular hyperplasia (20 cases). There was no association between these different patterns and recurrence ($p=0.98$) or mortality ($p=0.49$). The humoral immune response was associated with increased mortality ($p=0.005$). The 5-year overall survival was 76%, compared to 60% on the stimulated cellular response group (LogRank=0.05). Seventeen patients (16.2%) were positive for cytokeratin AE1/AE3, and this was associated with tumor recurrence ($p=0.03$) and mortality ($p=0.004$). In the positive cytokeratin group, the use of radiation therapy showed a tendency to protect against regional recurrence ($p=0.06$). The use of cytokeratin 5/6 confirmed the presence of micrometastasis in 4 cases (3.81%), but this finding was not associated with local recurrence ($p=0.66$) or mortality ($p=0.66$). Cytokeratin 7 has diagnosed benign epithelial inclusions in 11 cases (10.47%). **CONCLUSION:** Patients with stimulated cellular immunity experienced decreased mortality when compared to humoral immune response ($p=0.05$). AE1/AE3 positivity was significantly related to recurrence ($p=0.03$) and mortality ($p=0.04$). The incidence of micrometastasis was 3.86% (4 cases in 105 patients), and of benign epithelia inclusions was 10.47% (11 cases in 105 patients).

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IXI
RESUMO	XIII
<i>SUMMARY</i>	XIV
1.0 INTRODUÇÃO	1
2.0 OBJETIVOS	7
3.0 REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO CÂNCER DE LARINGE	8
3.2 TRATAMENTO DO PESCOÇO NO CÂNCER DA LARINGE	14
3.3 ESTRUTURA DO LINFONODO	18
3.4 IMUNOLOGIA TUMORAL	21
3.5 MECANISMOS DAS METÁSTASES LINFONODAIS	24
3.6 FATORES PROGNÓSTICOS DO CÂNCER DA LARINGE	28
3.7 REATIVIDADE LINFONODAL	31
3.8 MICROMETÁSTASES NO CÂNCER DE LARINGE	35
3.9 INCLUSÕES EPITELIAIS BENIGNAS	39
4.0 CASUÍSTICA E MÉTODOS	41
4.1 CASUÍSTICA	41
4.1.1 <i>Crítérios de inclusão</i>	41
4.1.2 <i>Crítérios de exclusão</i>	41
4.1.3 <i>Dados epidemiológicos</i>	42
4.1.4 <i>Dados clínicos</i>	42
4.1.5 <i>Dados histopatológicos</i>	42
4.1.6 <i>Seguimento</i>	43
4.2 MÉTODOS	43
4.2.1 <i>Análise histopatológica</i>	43
4.2.2 <i>Análise imuno-histoquímica</i>	51
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
4.4 CARACTERIZAÇÃO FINAL DA CASUÍSTICA	55

4.5 AVALIAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA	56
5.0 RESULTADOS	57
6.0 DISCUSSÃO	86
6.1 VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS.....	86
6.1.1 <i>Idade</i>	86
6.1.2 <i>Sexo</i>	87
6.1.3 <i>Etnia</i>	88
6.2 VARIÁVEIS CLÍNICAS.....	88
6.2.1 <i>Sintomas</i>	88
6.2.2 <i>História Familiar</i>	90
6.2.3 <i>Fatores de Risco</i>	90
6.2.3.1 <i>Tabagismo e Etilismo</i>	90
6.3 VARIÁVEIS CIRÚRGICAS	91
6.3.1 <i>Traqueostomia Prévia</i>	91
6.3.2 <i>Localização do Tumor</i>	92
6.3.3 <i>Número de linfonodos ressecados</i>	93
6.3.4 <i>Grau de Diferenciação Tumoral</i>	94
6.3.5 <i>Superfície Tumoral</i>	94
6.3.6 <i>Infiltrado Inflamatório</i>	95
6.3.7 <i>Invasão de Cartilagem e de Estruturas Adjacentes</i>	95
6.3.8 <i>Invasão Vascular e Perineural</i>	96
6.4 EVOLUÇÃO PROGNÓSTICA	96
6.5 REATIVIDADE LINFONODAL.....	98
6.6 MICROMETÁSTASES E INCLUSÕES EPITELIAIS BENIGNAS	104
7.0 CONCLUSÕES	109
8.0 INFERÊNCIAS	110
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

1.0 Introdução

O câncer de laringe corresponde a 1,7% da incidência mundial de câncer. Foi estimado para o ano de 2005 mais de 160.000 novos casos em todo o mundo, sendo apenas pouco mais de 20.000 acometendo o sexo feminino (FERLAY J et. al., 2000).

Na Europa, o câncer de laringe corresponde entre 2 a 5% de todas as neoplasias malignas (LICITRA L *et. al.*, 2003). Nos Estados Unidos, no ano de 2001 foram diagnosticados 75.000 casos de câncer de cabeça e pescoço, sendo 26% dos casos localizados na laringe (DAVIES L & WELCH HG, 2006). Entre os anos de 1975 e 2001 houve um decréscimo de 26% na incidência do câncer de laringe. No entanto, a mortalidade desta doença diminuiu apenas 6% entre 1990 e 2001 (DAVIES L & WELCH HG, 2006).

No Brasil, esta neoplasia maligna corresponde a aproximadamente 2% dos cânceres diagnosticados, com 8.000 novos casos por ano, causando aproximadamente 3.000 mortes no mesmo período (INCA, 2002). É o segundo câncer mais frequente do trato aerodigestivo superior, sendo superado apenas pelas neoplasias malignas da boca. Na população brasileira, é o 8º câncer mais frequente entre os homens (INCA, 2008). A cidade de São Paulo apresenta uma das maiores incidências do país e do mundo, com índice maior que 10 casos por 100.000 habitantes, dados estes semelhantes aos das cidades de Turin na Itália, Ahmedabad na Índia e Zaragoza na Espanha (WÜNSCH FILHO V, 2004).

A incidência do câncer de laringe tem diminuído na cidade de São Paulo entre os homens desde o final da década de 80, enquanto que entre as mulheres tem permanecido estável (WÜNSCH FILHO V, 2004).

O grupo etário mais acometido são os indivíduos entre 50 e 70 anos, mas o número de casos em pacientes mais jovens tem aumentado nos últimos tempos (WÜNSCH FILHO V, 2004).

O tipo histológico mais frequente das neoplasias malignas que acometem a laringe é o carcinoma epidermoide, correspondendo a mais de 90% dos casos (DAVIES L & WELCH HG, 2006; WÜNSCH FILHO V, 2004). Devido aos diferentes tipos de tecidos que formam a laringe, esta pode também ser sítio de condrossarcoma, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoide cístico e linfoma (BLANCO EC *et. al.*, 2005; DAVIES L & WELCH HG, 2006; PRGOMET D *et. al.*, 2003).

O carcinoma epidermoide da laringe tem como principais fatores de risco o hábito do tabagismo e do etilismo. O primeiro aumenta em aproximadamente 13 vezes a chance de desenvolver uma neoplasia maligna da laringe (WYNDER EL *et. al.*, 1976), e o segundo aumenta este risco em duas vezes (TOMATIS L, 1990). Quando existem ambos os fatores associados, o risco aumenta ainda mais (ELWOOD JM *et. al.*, 1984; FLANDERS WD & ROTHMAN KJ, 1982; TALAMINI R *et. al.*, 2002). Num estudo caso-controle na cidade de São Paulo encontrou-se um risco-relativo para desenvolvimento de neoplasias malignas da laringe de 7,5 entre os tabagistas e 3,7 entre os etilistas (WÜNSCH FILHO V, 2004).

Algumas particularidades a respeito do comportamento biológico do câncer de laringe são importantes. No estudo anatômico desse órgão é possível identificar

compartimentos formados por ligamentos e membranas, que são barreiras de disseminação tumoral, resultando muitas vezes na existência de um tumor localmente avançado, porém totalmente compartimentalizado no órgão e passível de ressecção cirúrgica com bons resultados oncológicos, comparado a tumores avançados da hipofaringe e da cavidade oral (DIAS FL *et. al.*, 2005; HALL SF *et. al.*, 2008; ZWETYENGA N *et. al.*, 2003).

Muitas vezes, a falha do tratamento ocorre nas cadeias de drenagem linfáticas cervicais. A quantidade de vasos linfáticos é variável conforme o subsítio da laringe, sendo muito mais frequente a presença de metástases regionais em tumores malignos com acometimento supraglótico (WERNER AJ *et. al.*, 2003).

Mesmo na ausência de metástases linfáticas clinicamente detectáveis, o tratamento profilático das cadeias linfáticas cervicais é preconizado em pacientes com tumores T3 e T4 submetidos a tratamento cirúrgico, devido à alta incidência de metástases ocultas neste grupo de pacientes, chegando a ocorrer em 55% dos casos no nível III de drenagem linfática cervical (SHAH JP, 1990).

A presença de metástases cervicais é um dos principais fatores de pior prognóstico comparado aos pacientes pN0, principalmente quando existir extravazamento linfonodal (OOSTERKAMP S *et. al.*, 2006; TAKES RP *et. al.*, 1997), devendo o pescoço ser um sítio de atenção especial no tratamento da doença neoplásica da laringe (REID AP *et. al.*, 1991; SHAH JP, 1990; SHAH JP *et. al.*, 1993).

Aproximadamente 70% dos casos de câncer de laringe submetidos a esvaziamento cervical eletivo não apresentam metástases no estudo anatomopatológico (pN0) (SHAH JP, 1990). Em alguns casos, contudo, a ressecção

com margens livres associada ao esvaziamento cervical profilático não impede uma recidiva da doença, podendo este comportamento ser explicado através do entendimento da relação entre a doença e o sistema imunológico do hospedeiro e da importância prognóstica das micrometástases linfonodais.

A ausência de metástase linfonodal no produto dos esvaziamentos cervicais não é utilizada como fator indicativo de tratamento adjuvante. Entretanto, um estudo mais detalhado destes linfonodos ressecados durante as linfadenectomias cervicais talvez resultem em informações prognósticas importantes e auxiliares na indicação de tratamento adjuvante.

O paciente não é um agente passivo no desenvolvimento do tumor maligno, respondendo imunologicamente à presença da doença (BURNET FM, 1967).

O estudo da reatividade linfonodal, como uma aferição indireta da resposta imunológica do hospedeiro à doença, iniciou-se em casos de câncer de mama, não sendo mais utilizado atualmente nesse tipo de doença. No entanto, existe esta relação descrita mais recentemente analisando tumores malignos da cabeça e pescoço, retirando informações relevantes a respeito do prognóstico da doença de dados muitas vezes desconsiderados pelo cirurgião como a ausência de metástases linfáticas no produto de sua linfadenectomia (ALBERTY J & WARDELMANN E, 2001; CERNEA CR *et. al.*, 1997; GALLO O *et. al.*, 1995; STANKIEWICZ C, 1994).

A padronização e a reprodução destes resultados em amostras maiores são necessárias para que a avaliação da reatividade linfonodal seja ou não indicada na avaliação prognóstica do câncer de laringe e de cabeça e pescoço (AMAR A *et. al.*, 2001).

Apesar da evolução dos métodos de imagem, nenhum exame pré-operatório é capaz de detectar depósitos metastáticos microscópicos (TAKES RP *et. al.*, 1997).

A sensibilidade do exame anatomopatológico convencional que utiliza um único corte em cada linfonodo corados com hematoxilina-eosina é pouco maior que 80%, e corrige o estadiamento em pouco mais de 40% dos casos (ROSS GL *et. al.*, 2004), podendo o número de esvaziamentos com metástases linfonodais ser maior que o diagnosticado no exame de rotina.

A pesquisa das micrometástases visa a diminuir os casos de falsos-negativos, que ocorrem entre 20 e 30% dos pacientes, devido à menor sensibilidade no diagnóstico de metástases linfonodais no estudo anatomopatológico usual (MACHANT FE *et. al.*, 1993). No entanto, o conceito de micrometástases e a importância prognóstica destes achados ainda são discutidos na literatura.

O conceito de micrometástase varia desde qualquer metástase não diagnosticada pela hematoxilina-eosina a metástases menores que 3 mm de diâmetro (DEVANEY KO *et. al.*, 2002; STOECKLI SJ *et. al.*, 2002; Van den BREKEL MWM *et. al.*, 1992; Van den Brekel MW *et. al.*, 1996).

A incidência das micrometástases é muito variada, entre 5 e 58% (DEVANEY KO *et. al.*, 2007; KOCATÜRK S *et. al.*, 2003; RINALDO A *et. al.*, 2004), e a sua importância prognóstica em carcinomas do trato aerodigestivo superior também não é bem definida. Quando não tratadas, tendem a proliferar gradualmente e se transformar numa macrometástase (FERLITO A *et. al.*, 2008a). Esta evolução pode justificar as recidivas cervicais que ocorrem em até 10% dos casos em pacientes pN0 (BECKER MT *et. al.*, 2004).

Além da dificuldade do diagnóstico das micrometástases devido à ausência de exame de rotina para tal, elas devem ser diferenciadas de inclusões epiteliais benignas, que são estruturas epiteliais glandulares benignas associadas a linfonodos, podendo também ser encontradas em outros sítios do organismo (BROWN RB *et. al.*, 1953). Distinguir estas inclusões linfonodais das metástases cervicais é importante tanto para melhorar o estadiamento quanto para evitar tratamentos desnecessários (RESERKOVA E *et. al.*, 2003).

2.0 Objetivos

O trabalho tem como objetivos:

2.1 Relacionar a reatividade linfonodal com a recidiva e mortalidade de pacientes com carcinoma de laringe estadiados como pT3 e pT4, pN0, submetidos à laringectomia total associada à esvaziamento cervical dos níveis II, III e IV bilateralmente.

2.2 Neste mesmo grupo de pacientes, identificar através de método imuno-histoquímico de pesquisa de citoqueratinas AE1/AE3, a incidência de células epiteliais no produto de esvaziamentos cervicais e analisar a importância prognóstica deste achado.

2.3 Nos casos positivos para o clone AE1/AE3, identificar através de marcadores imuno-histoquímicos (citoqueratina 7 e citoqueratina 5/6) a incidência de micrometástases e a relação destas com o prognósticos dos pacientes.

3.0 Revisão da Literatura

3.1 Aspectos Epidemiológicos do Câncer de Laringe

A epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço recebe uma atenção limitada na literatura mundial. Vários fatores contribuem para isso, como a variedade de tecidos localizados nesta região, desde o tecido ósseo ao tecido glandular, do epitélio faríngeo ao tecido sinovial da laringe, resultando em tumores relativamente raros quando comparados à incidência de neoplasias malignas de outros sítios anatômicos, porém, esta região apresenta uma diversidade histológica, evolução e prognóstico muito variáveis (DAVIES L & WELCH HG, 2006).

A incidência global do câncer de cabeça e pescoço nos EUA chega a 270 casos para cada 1 milhão de pessoas, sendo menos da metade do número de casos de câncer de pulmão (620 casos/milhão) e de cólon (550 casos/milhão) (DAVIES L & WELCH HG, 2006). Entretanto, pacientes com neoplasias malignas da cabeça e pescoço geralmente apresentam uma mortalidade menor que aqueles portadores de câncer de pulmão e uma morbidade maior comparados aos tratados de câncer de cólon (HAMMERLID E & TAFT C, 2001; RAMSEY SD *et. al.*, 2002).

Devido às diferentes localizações anatômicas do câncer de cabeça e pescoço, se os tumores forem divididos quanto ao sítio, 44% das neoplasias ocorrem em regiões potencialmente palpáveis, 31% nos locais prontamente visíveis, e 25% dos tumores em locais que precisam de instrumentos específicos para ser visualizados, sendo o sítio mais frequente deste último grupo, a laringe (DAVIES L & WELCH HG, 2006).

As neoplasias malignas deste sítio anatômico até o ano de 1860 eram raramente diagnosticadas, até o desenvolvimento da laringoscopia indireta por Garcia (LIMARA & KLIGERMAN J, 1997).

O câncer da laringe ganha importância devido ao fato de ser um tumor que causa alta morbidade (HAMMERLID E & TAFT C, 2001; RAMSEY SD, *et. al.*, 2002), e pode ter sua incidência consideravelmente diminuída com a cessação dos seus fatores de riscos, podendo ter até 90% dos casos prevenidos com a suspensão do tabagismo e do etilismo. Apenas a interrupção do etilismo reduz em até 25% a incidência deste câncer (BERRINO F & CROSIGNANI P, 1992).

Para o ano de 2005, a estimativa mundial foi de mais de 160.000 novos casos de câncer da laringe em homens e 22.000 casos entre as mulheres (FERLAY J *et. al.*, 2000). Estes números correspondem a aproximadamente 1,7% dos casos de câncer em todo o mundo, com uma proporção de 7 homens para 1 mulher (FERLAY J *et. al.*, 2000).

Em alguns relatos, a neoplasia maligna da laringe corresponde ao 11º câncer mais frequente no homem, correspondendo a 2,8% do total dos casos, sendo superada pelo câncer de pulmão, estômago, cólon e reto, próstata, fígado, esôfago, bexiga, boca, leucemia e linfoma não-hodgkin (PARKIN DM, *et. al.*, 1999).

Nos Estados Unidos da América, foram diagnosticados 75.000 casos de câncer da cabeça e pescoço no ano de 2001, sendo 19.500 (26%) localizados na laringe. Na Europa este órgão é acometido em 2 a 5% dos casos das neoplasias malignas (LICITRA L *et. al.*, 2003). Apenas na Província Italiana de Ragusa, entre 1986 e 1997, a incidência foi de 9.842 casos e 3.946 mortes por câncer de laringe (TUMINO R & VICARIO G, 2004).

No Brasil, esta neoplasia corresponde a 2% dos casos de câncer, chegando até a 8.000 casos diagnosticados anualmente (INCA, 2002).

No início da década de 90, Zaragoza na Espanha apresentava a mais alta taxa de incidência, chegando a 17,1 casos para cada 100.000 habitantes. Outras áreas com incidência maior que 10 casos por 100.000 habitantes eram a França, norte da Itália, Espanha, Portugal e várias regiões da Europa central, sudeste do Brasil, Uruguai e a Ásia Ocidental (WUNSCH FILHO V, 2006).

A taxa de incidência de câncer de laringe é mais alta em países Europeus, na América do Norte e nas regiões de clima temperado da América do Sul, variando de 8,1 a 15,1 casos para cada 100.000 homens e de 0,6 a 1,2 casos para cada 100.000 mulheres (PARKIN DM *et. al.*, 1999).

Analisando diferentes cidades brasileiras, não se consegue definir um predomínio da incidência em alguma região. Nota-se que na maioria das capitais existe uma incidência superior a 5 casos para cada 100.000 homens. Alcançam mais de 10 casos para cada grupo de 100.000 habitantes do sexo masculino as cidades de Belo Horizonte – MG, Cuiabá – MT, Brasília – DF, Fortaleza – CE, Manaus – AM, Porto Alegre – RS e São Paulo – SP (WUNSCH FILHO V, 2006).

A mortalidade alcança uma taxa de até 0,65 mortes para cada 100.000 óbitos de qualquer natureza em países desenvolvidos (PARKIN DM *et. al.*, 1999).

A faixa etária de maior risco para desenvolvimento desta neoplasia é entre a 6ª e 8ª décadas de vida. Na cidade de São Paulo, entre janeiro de 1999 e dezembro de 2001, 63% dos pacientes pertenciam a este grupo etário (WUNSCH FILHO V, 2006).

Quanto à incidência do câncer da laringe e à etnia, alguns trabalhos relataram uma maior incidência em brancos comparados a negros e orientais (ACKERMAN LV & DEL REGATO JA, 1962).

Quanto ao tipo histológico, o carcinoma epidermoide é o tumor mais frequente da laringe, com sua incidência variando entre 93,7 e 97,4% dos casos (DAVIES L & WELCH HG, 2006; WÜNSCH FILHO V, 2006), sendo este órgão raramente sítio de sarcomas, adenocarcinomas, carcinomas adenoide cístico, linfomas (BLANCO EC *et. al.*, 2005; PRGOMET D *et. al.*, 2003; WÜNSCH FILHO V, 2006).

O carcinoma epidermoide da laringe tem como principais fatores de risco o tabagismo e o etilismo, ambos grandes problemas de saúde pública em qualquer país. O consumo crônico do cigarro e do álcool são fatores independentes de aumento da incidência de câncer do trato aerodigestivo superior, entre estes o câncer da laringe, sendo esta relação dose-dependente. O risco relativo para o câncer de laringe em tabagistas chega a 13,2 (WYNDER EL *et. al.*, 1976), e o efeito carcinógeno multiplica-se quando o cigarro é associado ao etilismo (FLANDERS WD & ROTHMAN KJ, 1982; TALAMINI R *et. al.*, 2002). Isoladamente o etilismo dobra a chance de desenvolver o câncer da laringe (TOMATIS L, 1990).

Na França, devido à diminuição do consumo de álcool e cigarro, a incidência e mortalidade por câncer de cabeça e pescoço vem diminuindo nas últimas décadas (MORINIÈRE S, 2006).

Os pacientes sem história de exposição ao tabagismo e etilismo apresentam uma tendência a desenvolver a doença numa idade mais avançada comparado aos pacientes que fumam e ingerem bebida alcoólica (AGUDELO D *et. al.*, 1997).

Apesar do tabagismo e do etilismo serem os principais fatores envolvidos na carcinogênese dos tumores malignos da laringe, existem outros relatos de fatores que também apresentam relação com a gênese desta neoplasia como fatores ambientais, nutricionais, infecciosos, familiares e genéticos.

Um baixo nível de instrução e alguns agentes ocupacionais aumentam o risco de desenvolver uma neoplasia. Desde 1970, o asbesto tem sido tratado como um fator de risco para o câncer de laringe (NEWHOUSE ML & BERRY G, 1973; STELL PM & MCGILL T, 1973). Em duas comunidades na Suécia, foi evidenciado um aumento do risco para câncer de laringe em pacientes expostos a asbesto, com um risco relativo de 1,8 (GUSTAVSSON P *et. al.*, 1998). Além destes relatos, vários trabalhos afirmaram o aumento da incidência desta neoplasia em pacientes deste grupo de risco (BERRINO F *et. al.*, 2003; BURCH JD *et. al.*, 1981; DE STEFANI E *et. al.*, 1998).

Estudos caso-controle realizados na Alemanha e nos Estados Unidos demonstraram um aumento da incidência do câncer de laringe em trabalhadores que usava cimento e madeira (DIETZ A *et. al.*, 2004; WYNDER EL *et. al.*, 1976).

O estado nutricional apresenta relação com grande parte das doenças neoplásicas. Um aporte nutricional rico em vegetais e frutas é um fator de proteção para o desenvolvimento de câncer de laringe. Outros trabalhos mostraram uma incidência maior desta doença no grupo de pacientes com alta ingestão de carne salgada e alto aporte de gordura (BOSETTI C *et. al.*, 2002; CROSIGNANI P *et. al.*, 1996; DE STEFANI *et. al.*, 1995; DE STAFANI *et. al.*, 2000; ESTEVÈ J *et. al.*, 1996; OREGGIA F *et. al.*, 2001).

A relação da carcinogênese do câncer de laringe com a infecção por Papiloma Vírus Humano (HPV) é bastante discutida, sendo difícil avaliar sua relação independente do hábito do tabagismo e do etilismo (SMITH EM *et. al.*, 2000). A relação da infecção pelo HPV é muito mais comum com o câncer da orofaringe comparado ao câncer de laringe (HERRERO R, 2003). Os subtipos mais relacionados são o 16, 18 e 33, os mesmos do câncer de colo de útero (SUGÁR J *et. al.*, 1996).

O aumento da incidência do câncer de laringe em indivíduos com doença do refluxo gastroesofágico ainda não está bem definida, nem mesmo a ação carcinógena do conteúdo do refluxo na mucosa laríngea (WÜNSCH FILHO V, 2006).

A importância da história familiar no desenvolvimento do câncer de laringe é mostrada em um estudo brasileiro caso-controle que evidenciou um risco-relativo de 3,65 em pacientes com familiares de primeiro grau portadores de neoplasias malignas, sendo ainda maior quando esta neoplasia é na região da cabeça e pescoço (FOULKES WD *et. al.*, 1995).

Apesar de não ser um dos tumores mais frequentes da população brasileira, o câncer de laringe é responsável por aproximadamente 3.000 mortes por ano, totalizando 3,8% das mortes por câncer entre os homens e 0,6% entre as mulheres (INCA, 2002).

Tanto a incidência quanto a mortalidade do câncer de laringe tem diminuído, esta última menos que a primeira. Como razões para este achado são apontados o atraso no diagnóstico da doença resultando num menor sucesso terapêutico e alterações no comportamento biológico do tumor (DAVIES L & WELCH HG, 2006).

Nos EUA houve uma diminuição da sobrevivência dos pacientes com câncer de laringe nas últimas 2 décadas, e neste mesmo período foi notada uma diminuição do número de cirurgias da laringe, em consequência do aumento da opção terapêutica com radioterapia e quimioterapia (HOFFMAN HT *et. al.*, 2006).

3.2 Tratamento do pescoço no câncer da laringe

O termo esvaziamento cervical refere-se ao processo cirúrgico que remove da região cervical os linfonodos e vasos linfáticos relacionados com metástases linfáticas de tumores, podendo estar associado à ressecção de estruturas não linfáticas, sendo ordenado segundo os princípios oncológicos pertinentes ao tumor primário que lhe deu origem.

Os primeiros estudos sobre a necessidade do tratamento do pescoço foram em casos de tumores de boca.

CHELIUS em 1847 citou que na metástase “as glândulas e linfáticos vizinhos tornam-se duros e dolorosos” e que “uma vez que o crescimento na boca tenha disseminado para a glândula submandibular, a remoção completa é impossível”. Em 1880 KOCHER e posteriormente em 1893 SUTTON descreveram a ressecção dos linfonodos do triângulo submandibular junto com a remoção da lesão primária (MARTIN H *et. al.*, 1951).

A descrição mais clássica a respeito do esvaziamento cervical foi feita por CRILE em 1906, quando publicou seu artigo *Excision of câncer of the head and neck; with special reference to the plan of dissection based on one hundred and thirty-two operation* (CRILE G, 1906).

Até 1933, o tratamento do pescoço baseava-se em extirpar radicalmente a doença cervical macroscópica. Neste ano, BLAIR e BROWN foram pioneiros na descrição do tratamento do pescoço antes mesmo de desenvolver as metástases, no entanto, ainda não realizavam no mesmo tempo operatório, mas após o tratamento cirúrgico do tumor primário e da radioterapia (BLAIR VP & BROWN JB, 1933).

MARTIN, em 1951 elaborou uma completa revisão sobre esvaziamento cervical, definindo os termos esvaziamento cervical radical, parcial, bilateral combinado e profilático. Concluiu que, para se indicar o esvaziamento cervical, deve-se ter uma incidência definida de câncer no linfático cervical (MARTIN H *et al.*, 1951).

Em 1963, SUAREZ analisou 803 casos de câncer da laringe e hipofaringe tratados com esvaziamento cervical, e notou que grande parte dos pacientes eram submetidos a mutilações desnecessárias com riscos de acidentes e complicações como edema de face, fístulas, necrose da pele e rotura da carótida quando eram tratados com esvaziamento cervical radical. Baseado nisto, em 1952, passou a desenvolver uma técnica que permitia retirar os linfáticos junto com o tumor primário, respeitando os músculos esternocleidooccipitomastoideo e omohioideo, glândula submandibular, veia jugular interna e nervo acessório, sendo conhecida como esvaziamento ganglionar funcional (SUAREZ O, 1963).

Após 1967, quando BOCCA e PIGNATARO descreveram o esvaziamento cervical conservador nos moldes do relato de SUAREZ quatro anos antes, esta técnica ficou difundida (BOCCA E & PIGNATARO O, 1967).

Subsequentemente à descrição da técnica de SUAREZ, em que era realizada a linfadenectomia dos níveis I a V com preservação de todas as estruturas não

linfáticas, muitos cirurgiões passaram a não remover o nível I do pescoço (SPRIANO G *et. al.*, 2003).

Em 1985, BYERS introduziu o conceito de realizar a linfadenectomia nos níveis de maior risco de metástases, sendo chamado de esvaziamento cervical seletivo (BYERS RM, 1985).

Vários autores descreveram que em casos de câncer de laringe os níveis I e V são raramente envolvidos, principalmente nos casos com ausência de metástase clínica ou radiologicamente aparentes (FERLITO A & RINALDO A, 2007; RINALDO A *et. al.*, 2004). Assim, muitos autores passaram a indicar o esvaziamento cervical seletivo dos níveis II, III e IV, definido como esvaziamento cervical lateral, como melhor procedimento eletivo para a abordagem do pescoço no câncer de laringe, sendo o esvaziamento cervical radical modificado desnecessário nos casos sem doença linfonodal extensa (BRAZILIAN HEAD AND NECK CANCER STUDY GROUP, 1999; BUCKLEY JG & MACLENNAN K, 2000; FERLITO A *et. al.*, 2008b; GALLO O *et. al.*, 2006).

Mais recentemente houve uma tendência a restringir o esvaziamento cervical seletivo para as áreas onde a incidência de metástase no câncer de laringe seja mais frequente, sem comprometimento do resultado oncológico. Essa linfadenectomia mais limitada visa à diminuição da morbidade, sem piora da sobrevida deste grupo de pacientes (FERLITO A *et. al.*, 2008b).

A incidência de metástase no subnível I**IIb** chega a apenas 1,4% dos casos, e todos os pacientes com metástase cervical no estudo anatomopatológico no nível I**IIb**, apresentavam metástases em outros níveis de drenagem (COSKUN HH *et. al.*, 2004; ELSHEIKH MN *et. al.*, 2006; PALERI V *et. al.*, 2008; SEZES OS *et. al.*, 2007).

Vários autores consideraram desnecessária a linfadenectomia do subnível IIb, minimizando o tempo operatório e a disfunção causada pela manipulação do nervo espinhal (FERLITO A *et. al.*, 2007; RINALDO A *et. al.*, 2006).

O nível IV de drenagem cervical também foi alvo de estudo, e assim como no subnível IIb, a incidência de metástase foi bastante baixa, chegando a apenas 3,4% dos casos em alguns relatos (COSKUN HH *et. al.*, 2004; ELSHEIKH MN *et. al.*, 2006; LIM YC *et. al.*, 2006).

Alguns autores concluíram que o esvaziamento do nível IV não se faz necessário em casos de pescoço clinicamente sem metástases cervicais (ÇAGLI S *et. al.*, 2007; KHAFIF A *et. al.*, 2004), diminuindo a incidência de fístula linfática e lesão inadvertida do nervo frênico (FERLITO A *et. al.*, 2007).

Atualmente a linfadenectomia seletiva dos níveis IIa e III é a mais indicada nos casos onde não há evidência de metástase cervical diagnosticada clínica ou radiologicamente (FERLITO A *et. al.*, 2008b), porém isto ainda não é consenso em âmbito mundial.

A pesquisa de linfonodo sentinela em câncer de laringe não é tão utilizada quanto em tumores de boca e orofaringe. A acurácia deste método chega a 95%, mas o diagnóstico, na maioria das vezes, é feito na pesquisa com imunohistoquímica. No estudo rotineiro de congelação, onde é realizado apenas um corte em cada linfonodo, o diagnóstico ocorre raramente, o que torna pouco indicada a utilização rotineira da pesquisa de linfonodo sentinela (TOMIFUGI M *et. al.*, 2008).

No câncer de laringe, além das indicações baseadas nas características do tumor primário, a radioterapia é utilizada no tratamento adjuvante do pescoço nos casos em que o estudo anatomopatológico evidenciar múltiplos linfonodos comprometidos

(O'BRIEN CJ *et. al.*, 1986; OLSEN KD *et. al.*, 1994) ou nos casos de extravazamento capsular no linfonodo metastático (CACHIN Y & ESCHWEGW F, 1975; CLOSE LG *et. al.*, 1989; JOHNSON JT *et. al.*, 1985; JOHNSON JT *et. al.*, 1981; O'BRIEN CJ *et. al.*, 1986; SYNDERMAN NL *et. al.*, 1985).

3.3 Estrutura do Linfonodo

Os linfonodos são divididos em três compartimentos principais, cada um deles podendo desenvolver-se em resposta a um determinado estímulo antigênico (ROSAI J, 2004). Têm como função filtrar a linfa, manter e produzir linfócitos B e acomodar os linfócitos T.

O linfonodo é formado por uma cápsula e pelo parênquima, sendo este último dividido em córtex e medula. A cápsula é formada por tecido conjuntivo denso envolvido por tecido adiposo e é penetrada por vasos linfáticos aferentes valvulados que evitam o refluxo da linfa que entra no linfonodo.

O córtex, que é a parte mais superficial do parênquima, possui uma parte externa e uma interna. A mais externa, localizada logo abaixo do seio subcapsular, contém principalmente os folículos linfoides ricos em linfócitos B e seios linfáticos e a mais interna aloja linfócitos T auxiliares CD4+ e vênulas com endotélio alto.

Os folículos linfoides dividem-se em primários e secundários. Os primários são agregados densos e homogêneos de pequenos linfócitos, situados na região cortical do linfonodo. É o folículo em estado de repouso. Os folículos secundários formam-se quando no primário desenvolve-se um centro germinativo, que contém principalmente linfócitos B, secundários à resposta de um estímulo antigênico. Neste

centro germinativo também se observam figuras de mitose por ser uma área de intensa atividade de proliferação celular (LIU YJ *et. al.*, 1991).

A parte mais interna do córtex, também denominada de região paracortical ou córtex profundo, localiza-se entre os folículos linfóides e os seios medulares, sendo o seu principal componente celular os linfócitos T CD4 +. É um compartimento de difícil delimitação, sendo característica a identificação, nesta região do linfonodo, de vênulas pós-capilares de endotélio alto. É nesta região onde os linfócitos CD4+ interagem com os linfócitos B quando expostos a um antígeno específico (SZAKAL AK *et. al.*, 1989).

Os seios linfáticos, ricos em histiócitos e macrófagos, podem conter também eosinófilos, plasmócitos, hemáceas e neutrófilos, são espaços sob a cápsula revestidos por células endoteliais (seio subcapsular) e ao longo das trabéculas de tecidos conjuntivos originadas da cápsula que entram no córtex (seio peritrabecular) (ROSAI J, 2004).

É nesse compartimento que os antígenos presentes na linfa são filtrados e apresentados aos linfócitos corticais. A linfa chega ao seio peritrabecular, passando pelo seio subcapsular, dirige-se aos seios medulares e sai por um único vaso linfático eferente.

A medula é envolvida pelo córtex, exceto da região do hilo onde os vasos linfáticos eferentes juntos com uma veia saem e uma artéria entra no linfonodo. A região medular do linfonodo contém dois componentes principais: 1. Sinusoides medulares que são espaços revestidos por células endoteliais envolvidas por células reticulares e macrófagos. 2. Cordões medulares, com linfócitos B, macrófagos e

plasmócitos; estes últimos secretam imunoglobulinas diretamente para os seios medulares sem deixar o linfonodo (ROSAI J, 2004).

Os linfonodos são unidos em série pelos vasos linfáticos, de modo que o vaso linfático eferente de um linfonodo se torna o vaso linfático aferente de outro linfonodo adjacente na cadeia (ROSAI J, 2004).

Como o organismo encontra-se constantemente em contato com antígenos, tanto exógenos quanto endógenos, todos os linfonodos apresentam algum grau de ativação ou reatividade. Essa ativação leva ao desenvolvimento do compartimento estimulado (ROSAI J, 2004).

Os folículos linfóides são a região do linfonodo responsável pela resposta imunológica mediada por linfócitos B com produção de anticorpos, isto é, resposta imune humoral. Na região paracortical, o predomínio é de linfócitos T, especialmente os CD4+, favorecendo a montagem da resposta imunológica do tipo celular (STEIN H *et. al.*, 1980).

Nos seios linfáticos há um maior número de histiócitos, exercendo sua atividade de fagocitose e apresentação de antígenos e participando tanto da resposta imune celular quanto humoral (POHRIS E *et. al.*, 1987).

Nos cordões medulares ocorre a liberação de imunoglobulinas pelos plasmócitos formados a partir dos linfócitos B dos folículos ativados.

Portanto, o compartimento predominante em um linfonodo que drena uma área tumoral indica qual modalidade de resposta imune o organismo do hospedeiro está desenvolvendo contra a neoplasia localizada na área de drenagem do linfonodo (COTTIER H *et. al.*, 1973; POHRIS E *et. al.*, 1987).

Em um mesmo linfonodo pode haver mais de um padrão de hiperplasia e um mesmo paciente pode ter linfonodos com diferentes combinações de padrões reacionais.

3.4 Imunologia Tumoral

A ativação do sistema imune envolve a participação de diferentes tipos celulares e mecanismos efetores. A perda do controle imunológico pode gerar diferentes tipos de doenças, entre elas as neoplasias malignas (ABBAS AK *et. al.*, 1996).

As células do sistema imune originam-se a partir de células-tronco pluripotentes da medula óssea. Os precursores mieloides diferenciam-se em monócitos, eritrócitos, granulócitos entre outros. Nos órgãos linfoides primários, os precursores linfoides diferenciam-se em células NK (*Natural Killer*) e em linfócitos B e T imaturos, que após a maturação, colonizarão órgãos linfóides secundários, terciários e quaternários (VIOLA JPB *et. al.*, 2004).

Os precursores dos linfócitos T originam-se na medula óssea e a sua maturação e diferenciação ocorrem no timo. Os linfócitos maduros diferenciam-se em dois tipos celulares caracterizados pela expressão de moléculas CD4 (*LT Helper*) e CD8 (*LT citotóxico*) na superfície celular (VIOLA JPB *et. al.*, 2004).

A defesa do hospedeiro contra o tumor dá-se pelas seguintes vias: infiltração de células linfocíticas e plasmáticas no estroma tumoral, que constituem uma barreira contra o desenvolvimento do tumor; aumento do número de linfócitos periféricos e a presença de linfócitos T no sangue periférico e no estroma tumoral (STANKIEWICZ C, 1994).

A resposta imunológica ocorre em duas fases: a primeira linha de defesa é rápida, pouco específica e denominada imunidade inata. A segunda é de grande especificidade, denominada imunidade adaptativa. Na primeira fase participam os neutrófilos e macrófagos que realizam fagocitose e liberação de citocinas inflamatórias. As células NK também participam desta fase a partir da produção de interferon- γ , assim como o sistema de complemento. O sistema imune adaptativo estimula uma resposta imune mais específica, através de sinais para a ativação de linfócitos T e B específicos para determinados antígenos (VIOLA JPB *et. al.*, 2004).

Os linfócitos T só reconhecem antígenos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APC), sendo as células dendríticas e macrófagos as mais eficientes neste processo. Estas células processam os antígenos e fragmentos peptídicos que são colocados em estruturas denominadas complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Os linfócitos T maduros apresentam um receptor de célula T (TCR). Para iniciar a resposta imune específica este receptor deve ligar-se a um MHC de classe I ou de classe II dependendo da molécula de superfície do linfócito T, se CD4 ou CD8. Este fenômeno está relacionado com muitas respostas imunes, entre elas a resposta à formação de tumores (VIOLA JPB *et. al.*, 2004). Nesta fase podem ocorrer mecanismos de escape tumoral como a diminuição de MHC de classe I e classe II, além da diminuição da expressão de células apresentadoras de antígenos (DRAKE CG & PARDOLL DM, 2002; SOGN JA, 1998)

Existem também várias moléculas acessórias que ajudam na resposta imunológica ao tumor. São os sinais coestimulatórios, que são mediados pelas

interações moleculares entre os receptores expressos nos linfócitos T e seus respectivos ligantes nas APCs (VIOLA JPB *et. al.*, 2004).

A resposta ao estímulo antigênico leva os linfócitos Th a se diferenciarem em dois tipos: LTh1 que tem como principal característica a secreção de interferon- γ , mediando principalmente a imunidade celular, e LTh2 que produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, mediando a resposta imune dependente de células B (humoral) (VIOLA JPB *et. al.*, 2004). A resposta imune que utiliza LTh2 permite maior atividade dos mecanismos de escape tumoral, associados a pior prognóstico (KOBAYASHI M *et. al.*, 1998; SHEU BC *et. al.*, 2001).

Durante a transformação tumoral de uma célula normal, ela passa a expressar proteínas em níveis anormais e também novas proteínas. Isto faz com que células tumorais apresentem na sua superfície antígenos alterados em relação às células normais (Antígenos Associados ao Tumor – TAA) ou antígenos específicos de tumores (TSA) (VIOLA JPB *et. al.*, 2004).

Alguns dos principais antígenos capazes de gerar uma resposta imunológica eficiente são produtos proteicos de oncogenes ou genes supressores de tumor. Essas proteínas seguem o caminho normal de processamento e apresentação de peptídeos na membrana celular através de moléculas de MHC de classe I. Linfócitos CD8⁺ reconhecem esses antígenos na superfície das células tumorais e desenvolvem uma resposta citotóxica. Os MHC de classe II apresentam peptídeos através da fagocitose de células tumorais podendo também ativar linfócitos CD4⁺ específicos. Estas células são responsáveis pela produção de citocinas que fazem com que aumente a eficiência da fagocitose de células tumorais e a ampliação de clones de linfócitos B e T CD8⁺ (VIOLA JPB *et. al.*, 2004).

FERLITO e POLIDORO, em 1979, descreveram que o aumento sérico dos linfócitos T, além do aumento de linfócitos T no estroma tumoral e nos linfonodos, são manifestações de aumento da imunidade celular (FERLITO A & POLIDORO F, 1979). A imunidade humoral é mostrada pelo aumento do número de centros germinativos (FERLITO A *et. al.*, 1979; OKURA M *et. al.*, 2005).

Os linfonodos têm como função não apenas a barreira anatômica na disseminação tumoral, mas também a função de barreira imunológica (SANTIN AD, 2000).

3.5 Mecanismos das Metástases Linfonodais

Metástases são a presença de células tumorais em outros tecidos do organismo que não sejam o do sítio primário do tumor, e para isso é necessária a circulação de células tumorais por vasos linfáticos ou sanguíneos. Para que uma célula tumoral seja capaz de desenvolver uma metástase, ela deve sobreviver a uma série de interações com os mecanismos homeostáticos do hospedeiro. Devido a estes mecanismos a presença de metástases é rara dentro da grande frequência de tumores malignos (ARAP MA, *et. al.*, 2004).

A metástase tumoral para linfonodos regionais representa o primeiro passo na disseminação do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (FRANCHI A *et. al.*, 2004).

O comprometimento linfonodal tem um papel importante no diagnóstico, estadiamento e tratamento, além de ser um dos principais fatores de pior prognóstico dos pacientes com tumores epiteliais como o da laringe (BALCH CM, *et. al.*, 2001;

FOSTER Jr RS, 1996; FRANCHI A, *et. al.*, 2004; SWARTZ MA & SKOBE M, 2001).

Apesar da importância das metástases linfáticas na oncologia, o seu mecanismo de ocorrência detalhado é bastante recente (NATHANSON SD, 2003), e ainda não se conhece o mecanismo de entrada de células malignas no sistema linfático (FRANCHI A *et. al.*, 2004).

A transformação metastática de uma célula tumoral representa uma série extremamente complexa de eventos que incluem a disseminação e a invasão de tecidos vizinhos ao tumor primário, a penetração de vasos linfáticos e a fixação das células tumorais nos linfonodos regionais (JI RC, 2006).

A aquisição das características fenotípicas de invasão resulta da ativação de genes promotores e da inativação de genes supressores da invasão tecidual (ARAP MA, *et. al.*, 2004).

O processo de formação de metástases é agrupado em fases. No início a célula tumoral precisa se multiplicar, e para isso utiliza nutrientes normalmente absorvidos por difusão. Por este método, é possível obter oxigênio até aproximadamente 150 micrômetros de extensão, isto é, capacidade de suprir um tumor de até 1 ou 2 mm de diâmetro. A partir daí, a angiogênese é necessária para a sobrevivência do tumor (ARAP MA *et. al.*, 2004).

Uma vez que o tumor se desenvolveu, ocorre a proliferação de vasos linfáticos a partir de vasos do hospedeiro o que é denominado linfangiogênese (FISHER B & FISHER ER, 1966; JELTSCH M *et. al.*, 1997; MINSKY BD *et. al.*, 1989; ZEIDMAN J *et. al.*, 1955), tendo este mecanismo um papel ativo na disseminação de vários tumores malignos, entre eles o carcinoma epidermoide da cabeça e pescoço

(BEASLEY NJ *et. al.*, 2002; CARMELIET P & JAIN RK, 2000). Estudos recentes relataram a descoberta de marcadores de células linfáticas endoteliais, que, através da produção de citocinas estimulam a linfangiogênese e a entrada de células tumorais no capilar linfático (CLARIJS R *et. al.*, 2001; PLATE KH, 2001; SWARTZ MA & SKOBE M, 2001). A principal família de citocinas relacionadas com a linfangiogênese são os fatores de crescimento de endotélio vascular (VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E), que se ligam aos seus receptores (VEGFR) (FRANCHI A *et. al.*, 2004; NATHANSON SD, 2003).

Os linfáticos intratumorais não são identificados em todos os tumores, mas sim na maioria daqueles com origem epitelial (JAIN RK, 1989).

A extensão da linfangiogênese no tumor e na área peritumoral relaciona-se diretamente com a presença de metástases linfáticas e com a evolução dos pacientes (FRANCHI A *et. al.*, 2004). Existem marcadores imuno-histoquímicos de vasos linfáticos como o D2-10, anticorpo LYVE-1, receptor do Fator de Crescimento de Epitélio Vascular-3 e podoplamina, que possibilitam a aferição da concentração de vasos linfáticos peritumorais, e seu aumento estaria relacionado com o aumento da incidência de metástases linfáticas (FRANCHI A *et. al.*, 2004).

Com o desenvolvimento da doença, a célula tumoral invade a matriz extracelular onde a pressão do fluido intersticial é menor, sendo esta diferença de pressão um dos fatores favoráveis para o transporte celular pelos linfáticos peritumorais. Outros fatores importantes para esse movimento são a secreção de enzimas proteolíticas, a expressão de receptores de adesão e as citocinas (LIOTTA LA & KOHN E, 2001; NATHANSON SD, 2003).

O próximo passo para o desenvolvimento da metástase é o desprendimento das células do tumor primário. Para isso ocorrer, é necessária uma regulação negativa de moléculas de coesão e adesinas como as E-caderinas (LI LC *et. al.*, 2001; RIBEIRO-FILHO *et. al.*, 2002) e da capacidade de motilidade celular, esta última determinada por alterações no citoesqueleto e por resposta a fatores como tromboplastinas (CHUNG AS *et. al.*, 2003) e de automotilidade (NATHANSON SD, 2003).

Com o crescimento tumoral, ocorre um aumento da pressão do fluido intersticial do tumor, do fluxo em direção ao linfonodo, aumentando a incidência de metástase em pacientes com o tumor maior (JAIN RK, 1989; JAIN RK, *et. al.*, 2002). Filamentos de ancoragem mantêm os capilares linfáticos abertos sempre que a pressão do fluido intersticial aumenta. Em seguida, o diâmetro destes linfáticos e os espaços nas paredes destes vasos também aumentam (SCHMID-SCHONBEIN GW, 1990).

Uma vez que as células neoplásicas migram e caem na circulação do hospedeiro, a grande maioria padece em decorrência de vários fatores como a sua deformidade, seu poder de agregação e moléculas de adesão expressas em sua superfície. Além dos fatores como macrófagos, plaquetas e *natural killers*, a própria turbulência do sangue dificulta a sobrevivência das células neoplásicas na circulação. As células que sobrevivem devem aderir a receptores presentes nos pericitos ou nas células do endotélio ou em moléculas da membrana basal do órgão-alvo, como as proteoglicanas e o colágeno tipo IV (CHUNG AS *et. al.*, 2003; CRAWFORD HC & MATRICIAN LM, 1994).

Para que ocorra a penetração no órgão alvo existem enzimas envolvidas como as metaloproteinases, produzidos por células neoplásicas e por células do tecido

conectivo. Após a adesão e o extravazamento celular, deve ocorrer a proliferação celular para o crescimento da metástase, que sofre influência autócrina, endócrina e parácrina de fatores de crescimento. Uma vez que a metástase alcança o limite da difusão de oxigênio, deve-se iniciar a angiogênese da mesma forma que no tumor primário (ARAP MA *et. al.*, 2004).

Assim que a célula maligna entra no seio subcapsular no linfonodo pelo linfático, ela irá invadir o córtex do linfonodo sentinela, ou trocar de nódulo via conexões linfático-venosas (FISHER B & FISHER ER, 1966); a seguir, poderá alcançar diretamente os linfáticos eferentes e passar para o próximo nível de drenagem linfonodal (WEISS L, 1986).

O envolvimento linfático de um tumor depende da via de drenagem do órgão primário. As células malignas podem passar de vasos sanguíneos para linfáticos e vice-versa, devido à existência de uma comunicação veno-linfática no linfonodos e em outros tecidos, o que possibilita uma disseminação hematogênica ou linfática dos tumores, mesmo em estágios mais iniciais da doença (CADY B, 1984).

O fator que determina onde as células neoplásicas circulantes irão preferencialmente se fixar ainda não é conhecido (ARAP W *et. al.*, 2002a; ARAP W *et. al.*, 2002b)

3.6 Fatores Prognósticos do Câncer da Laringe

Os fatores prognósticos do câncer de laringe são agrupados em fatores epidemiológicos como a idade e o sexo; fatores clínicos como o tamanho do tumor, a presença de metástases cervicais, estágio clínico da doença e a localização anatômica do tumor; fatores histopatológicos como a diferenciação tumoral, volume tumoral,

presença de invasão perineural e vascular, infiltrado inflamatório, espessura tumoral e fatores moleculares como a ploidia do DNA (DIAS FL *et. al.*, 2000; DANIC D *et. al.*, 2000; FAGAN JJ *et. al.*, 1998; GALLO O *et. al.*, 1991; GEELLEN CP *et. al.*, 1995; HERMANS R *et. al.*, 1999; IDASIAK A *et. al.*, 2008; RAZACK MS *et. al.*, 1989; SESSIONS DG *et. al.*, 2002; SPECTOR GJ *et. al.*, 2004; TAMURA Y *et. al.*, 2007; YILMAZ T *et. al.*, 1998; YUEN A *et. al.*, 1984).

O TNM (AJCC, 2002) avalia em conjunto os principais fatores prognósticos para determinar o estágio da doença, porém ocasionalmente falha na predição da evolução dos pacientes (KORKMAZ *et. al.*, 1999).

Trabalhos relatam o tamanho do tumor (T) e a presença de metástases cervicais (N) como os principais fatores prognósticos no câncer da laringe, sendo a presença de metástase cervical o mais importante (REID AP *et. al.*, 1991; SHAH JP, 1990; SHAH JP *et. al.*, 1993). Apenas a presença de comprometimento linfonodal já resulta num pior prognóstico da doença, que se agrava ainda mais quando o linfonodo apresenta extravazamento capsular (PERA E *et. al.*, 1986; PURI SK *et. al.*, 2003; SHAH JP *et. al.*, 1993) ou ocorre o comprometimento linfonodal dos níveis de drenagem cervicais mais baixos como o nível IV (JONES AS, *et. al.*, 1994; MAMELLE G *et. al.*, 1994).

MAMELLE *et. al.* analisaram 914 pacientes com CEC de cabeça e pescoço. A sobrevida global em 5 anos nos pacientes com extravazamento capsular dos linfonodos foi de 37,3%, e no grupo de pacientes sem extravazamento capsular foi de 46,9%, sendo esta diferença com significância estatística ($p=0,001$). Neste mesmo grupo de pacientes, aqueles que apresentavam três ou mais linfonodos comprometidos apresentaram um pior prognóstico comparados àqueles com menos

de três linfonodos acometidos pela neoplasia. Neste estudo, o comprometimento linfonodal fora do linfonodo sentinela resultou numa sobrevida de 17,5% em 5 anos, e de 44,9% no grupo de pacientes com comprometimento linfonodal restrito ao linfonodo sentinela ($p < 0,001$) (MAMELLE G *et. al.*, 1994).

A incidência de metástase linfonodal em câncer de laringe varia de 24% a 49% (PERA E *et. al.*, 1986), sendo mais frequente nos tumores supraglóticos e transglóticos, locais mais acometidos pela doença (DIAS FL *et. al.*, 2000). Em aproximadamente 18% dos casos, a metástase cervical é oculta, isto é, apenas diagnosticada no estudo anatomopatológico do produto de um esvaziamento cervical até então profilático (GAVILAN C & GAVILAN J, 1989; PERA E *et. al.*, 1986; RESNICK JM *et. al.*, 1995).

A realização da traqueostomia prévia ao tratamento normalmente está relacionada à presença de um tumor maior e obstrutivo. Estes casos estão relacionados com pior resposta ao tratamento com radioterapia e quimioterápico (FARIAS TP *et. al.*, 2007), maior índice de recidiva peritraqueostômica e menor sobrevida (MANNI JJ *et. al.*, 1992; PRADIER R *et. al.*, 1993). Outros relatos não relacionaram a realização da traqueostomia prévia com piora do prognóstico do paciente (MARTÍN VC *et. al.*, 2000; PERA E *et. al.*, 1986)

As invasões perineural e vascular normalmente estão relacionadas com um tumor de comportamento mais agressivo. Já o grau de diferenciação tumoral aparentemente não tem relação com a sobrevida (GOLDSMITH MM & PILLSBURY HC, 1991).

A utilização da biologia molecular para identificar fatores prognósticos tem três principais objetivos: a busca de informações sobre a curabilidade dos pacientes; a

seleção de pacientes que seriam responsivos a tratamentos não cirúrgicos como a radioterapia e a quimioterapia, com intenção de preservação de órgão, e a compreensão da tumorigênese, podendo resultar em ações mais específicas e efetivas no tratamento da doença neoplásica da laringe (SINARD RJ *et. al.*, 1996).

O valor prognóstico da reatividade linfonodal é controverso. A provável razão para isso é a variedade dos padrões de resposta em cada paciente, assim como em cada linfonodo (COCHRAN AJ *et. al.*, 1987). No intuito de diminuir o viés dependente do observador na classificação da reatividade linfonodal, alguns trabalhos utilizaram a digitalização da imagem de cada corte de linfonodo, analisando através de programas de computador qual região do linfonodo predomina (OKURA M *et. al.*, 2005).

3.7 Reatividade Linfonodal

O aumento de linfonodos em pacientes portadores de neoplasia maligna nem sempre é secundário ao comprometimento neoplásico desta estrutura, mas sim à hiperplasia linfonodal. Os linfonodos hiperplásicos são frequentemente encontrados durante os esvaziamentos cervicais, com significado clínico ainda não elucidado (AMAR A *et. al.*, 2001).

A linfadenite reativa em pacientes com tumor maligno consiste numa proliferação de tecido linfático e numa resposta imunológica ativa do hospedeiro ao tumor maligno (STANKIEWICZ C *et. al.*, 1994). É importante salientar que o esvaziamento cervical eletivo não é um tratamento inócuo ao paciente. Além das sequelas funcionais como a paresia do nervo espinhal nos casos de esvaziamento do nível IIb (KOYBASIOGLU A *et. al.*, 2006), a remoção dos linfonodos na ausência

das metástases pode resultar na perda da competência imunológica como as células *natural killers* ou predispor a uma migração anômala de células neoplásicas em casos de segundo tumor primário (GALLO O *et. al.*, 1995).

O exame físico não é um método diagnóstico que possui alta sensibilidade para o diagnóstico das metástases linfáticas, principalmente em nódulos pequenos, apresentando uma taxa de 70% de achados falso-negativos (FEINMESSER R *et. al.*, 1992).

Os tumores da cabeça e pescoço muitas vezes são sítios de processos infecciosos, resultando numa hiperplasia linfóide reacional. Essa hiperplasia pode ser interpretada clinicamente como comprometimento neoplásico, com um índice de falso-positivo próximo de 25% (FEINMESSER R *et. al.*, 1992), no entanto, o significado clínico desta hiperplasia ainda não está definido (AMAR A *et. al.*, 2001).

Devido a esta limitação do exame físico no diagnóstico das metástases cervicais, há um aumento do uso de exames radiológicos para este objetivo como a ultrassonografia, tomografia computadorizada e a ressonância magnética (FEINMESSER R *et. al.*, 1992).

O estudo da reatividade destes linfonodos não comprometidos por metástases linfonodais tenta aferir de maneira indireta a resposta imunológica do hospedeiro à presença do tumor, relacionando a reatividade linfonodal com o prognóstico da doença (FERNÁNDEZ-NOGUERAS FJ *et. al.*, 1992; RING AH *et. al.*, 1985; STARSKA K *et. al.*, 2003).

A primeira descrição da reatividade linfonodal foi realizada por HALSTED e data de 1898, com o relato de linfadenite reativa em câncer de mama (*apud* STANKIEWICZ C *et. al.*, 1994). BLACK e SPEER, em 1953, observaram a

presença de histiocitose no baço de ratos que apresentavam regressão espontânea dos tumores (BLACK MM *et. al.*, 1953), e também encontraram relação entre a histiocitose em linfonodos provenientes de esvaziamentos axilares e melhor prognóstico de pacientes com câncer de mama, independente do tamanho do tumor primário, da presença de metástase axilar e da idade da paciente (BLACK MM & SPEER FD, 1960).

Os mesmos achados em câncer de laringe foram descritos por MALICKA em 1970 (MALICKA K, 1970). Dois anos mais tarde, BENNETT *et. al.* descreveram que o melhor prognóstico ocorreu em pacientes com hiperplasia folicular, e a histiocitose sinusal não esteve relacionada com melhor evolução da doença neoplásica da laringe (BENNETT SH *et. al.*, 1971).

Em 1973, TSAKRAKLIDES *et. al.* descreveram uma classificação conforme o padrão de reatividade linfonodal em pacientes com câncer de útero e mama, sendo esta classificação utilizada como padrão, mesmo quando estudado outros tipos de tumores. Os linfonodos eram considerados estimulados quando havia um predomínio da área de concentração de linfócitos T (hiperplasia paracortical) ou da área com formação de centros germinativos (hiperplasia folicular). Eram considerados linfonodos não estimulados, aqueles em que a histiocitose sinusal prevalecia sobre as outras regiões, linfonodos sem predomínio de nenhuma região, sendo considerados normais ou linfonodos com linfócitos depletados, fibrose ou depósitos hialinos. Neste estudo, TSAKRAKLIDES *et. al.* descreveram uma sobrevida em 5 anos de 87% para os pacientes com hiperplasia paracortical, 69% para aqueles com hiperplasia folicular e apenas 25% de sobrevida para os pacientes com depleção (TSAKRAKLIDES V *et. al.*, 1973).

Apesar de várias tentativas para correlacionar as alterações morfológicas dos linfonodos e a evolução clínica dos pacientes com câncer, o assunto é controverso (BERLINGER NT *et. al.*, 1976).

Já está estabelecido que o hospedeiro de um tumor não é passivo no processo de indução, transformação e progressão da neoplasia maligna (BERLINGER NT *et. al.*, 1976).

A proposta de um sistema de padronização da relação da morfologia do linfonodo e a função imunológica foi primeiramente descrita por COTTIER *et. al.* em 1973. Na época, a intenção era que esta relação pudesse auxiliar o tratamento de pacientes, principalmente aqueles com doença neoplásica ou infecciosa (COTTIER H *et. al.*, 1973).

BERLINGER *et. al.* em 1976 relacionaram os achados histopatológicos dos linfonodos em 84 casos de câncer de cabeça e pescoço e descreveram que a análise da atividade imunológica através da morfologia dos linfonodos aparece como valor preditivo de sobrevida dos pacientes (BERLINGER NT *et. al.*, 1976).

KORKMAZ *et. al.* estudaram o produto de linfadenectomias de 46 pacientes tratados por câncer de laringe conforme a classificação de TSAKRAKLIDES. Nos pacientes sem metástase cervical no estudo anatomopatológico (pN0) a sobrevida global foi de 94% nos pacientes com linfonodos estimulados, contra 68% em pacientes com linfonodos não estimulados, sendo esta diferença sem significado estatístico. Ao contrário do que ocorreu nos pacientes com metástase cervical (pN+), onde 100% dos pacientes estavam vivos após 2 anos no grupo com linfonodos estimulados e nenhum paciente estava vivo no término deste período no grupo com

linfonodos não estimulados (V), podendo estes resultados auxiliarem na indicação de tratamento adjuvante (KORKMAZ H *et. al.*, 1999).

O uso da reatividade linfonodal como fator prognóstico esbarra na dificuldade de categorizar adequadamente diferentes pacientes com reatividade heterogênea, de ser um método mais subjetivo que objetivo (POHRIS E *et. al.*, 1987), além de poucos trabalhos descreverem grupos homogêneos de estudo (PATT BS *et. al.*, 1993).

3.8 Micrometástases no câncer de laringe

A abordagem do pescoço N0 em diferentes tumores do trato aerodigestivo superior é bastante discutida, devendo a linfadenectomia ser realizada quando o risco de doença metastática linfonodal for maior que 20% no nível de drenagem linfática (ROSS GL *et. al.*, 2004). Nos casos de tumores da laringe sem metástase diagnosticada clinicamente (N0) as chances de metástases linfáticas são de 14%, 52%, 55%, 24% e 7% nos níveis I, II, III, IV e V respectivamente (SHAH JP, 1990).

O diagnóstico da metástase linfonodal nem sempre é possível através do exame clínico. Este método apresenta uma incidência de falsos-negativos entre 20% e 30% (MACHANT FE *et. al.*, 1993). A sensibilidade também não é ideal nos casos de utilização de exames de imagem como ultrassonografia, tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética, pois pode haver a presença de doença metastática em linfonodos muito pequenos ou com ausência de necrose central (FEINMESSER R *et. al.*, 1992).

Devido à inexistência de um método pré-operatório ideal para o diagnóstico de metástase cervical, há uma grande proporção de casos em que a abordagem eletiva

do pescoço passa a ser terapêutica após a conclusão do estudo anatomopatológico. A sensibilidade do estudo histológico com hematoxilina-eosina é de 81%, corrigindo o estadiamento N0 em até 44% dos casos tratados com esvaziamento cervical seletivo (ROSS GL *et. al.*, 2004).

A União Internacional Contra o Câncer (UICC) não define o número de cortes a que cada linfonodo deve ser submetido durante a análise histopatológica para determinar a classificação pTNM (TNM, 2004). Na maioria dos casos, é realizado um único corte no maior diâmetro de cada linfonodo, o que corresponde a aproximadamente 1/2000 de um linfonodo de 1 cm (BRENNAN JA *et. al.*, 1995). Consequentemente, como uma grande parte do tecido nodal não é examinado, a falha na detecção de micrometástases no estudo anatomopatológico rotineiro é relativamente comum (FERLITO A *et. al.*, 2001).

Metástases podem ser consideradas ocultas ou subclínicas, isto é, pequenas demais para serem diagnosticadas por métodos clínicos ou radiológicos, porém passíveis de detecção na microscopia óptica (FERLITO A *et. al.*, 2008a).

Existe outra subdivisão das metástases ocultas, que são as micrometástases. VAN DEN BREKEL *et. al.*, em 2 publicações, definiram micrometástases como implante de célula tumoral menor ou igual a 3 mm no linfonodo (VAN DEN BREKEL *et. al.*, 1992; VAN DEN BREKEL *et. al.*, 1996).

Para DEVANEY *et. al.*, micrometástases são depósitos maiores que 0,2 mm e menores que 2,0 mm de diâmetro (DEVANEY KO *et. al.*, 2007). Já STOECKLI *et. al.* consideraram micrometástase como qualquer metástase oculta no exame convencional da hematoxilina-eosina (STOECKLI SJ *et. al.*, 2002)

As metástases que não são diagnosticadas pelo estudo anatomopatológico de rotina podem ser evidenciadas quando realizados cortes seriados no estudo com hematoxilina-eosina, através de métodos imuno-histoquímicos ou métodos moleculares (VAN DEN BREKEL *et. al.*, 1996).

O emprego de métodos imuno-histoquímicos no diagnóstico de metástases linfáticas visa a redução de casos sub-estagiados devido à limitação dos métodos diagnósticos utilizados rotineiramente.

O uso da imuno-histoquímica no estudo das proteínas do citoesqueleto é utilizado no diagnóstico de micrometástases. O citoesqueleto é constituído por microfilamentos (actinas), microtúbulos e filamentos intermediários (CHU PG & WEISS LM, 2002).

As citoqueratinas formam uma família de proteínas de filamentos intermediários do citoesqueleto, e são típicos de células epiteliais. São marcadores epiteliais, utilizados através de métodos imuno-histoquímicos no diagnóstico de neoplasias indiferenciadas e constituem-se de 20 tipos diferentes. Um coquetel de anticorpos formados pelos clones AE1 e AE3 engloba a maioria dos tipos de queratinas. O clone AE1 é relacionado com as queratinas tipo I (CK 10, CK 15, CK 16 e CK 19), já o clone AE3 reconhece as queratinas do tipo II (CK 1, CK 2, CK 3, CK 4, CK 5, CK 6 e CK 8). Os clones AE1 e AE3 são utilizadas mais amplamente na demonstração da natureza epitelial de tumores morfológicamente indiferenciados. Praticamente todos os carcinomas são positivos para AE1 e AE3 no estudo imuno-histoquímico com exceção dos tumores do córtex adrenal e do carcinoma hepatocelular (CHU PG & WEISS LM, 2002).

A utilização de métodos moleculares permite o diagnóstico das micrometástases em até 20% dos casos pN0 (BRENNAN JA *et. al.*, 1995; CORTESINA G *et. al.*, 2000; HAMAKAWA H *et. al.*, 1999; NIEUWENHUIS EJ *et. al.*, 2003)

O que dificulta o emprego de métodos moleculares em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é a dificuldade de identificação de um alvo específico para este tipo de tumor, como ocorre em melanoma com a tirosinase e a Melan A, e o antígeno prostático específico (PSA) no câncer de próstata (FEINMESSER R *et. al.*, 1992; ROEPMAN P *et. al.*, 2005; SAKA SM & MACDONALD DG, 1989; XU Y *et. al.*, 2007).

A verdadeira incidência de micrometástases em carcinomas epidermoide do trato aerodigestivo superior ainda não é possível definir devido à ausência de um exame rotineiro capaz de fazer este diagnóstico. Elas ocorrem numa frequência entre 5% e 58% dos casos, com uma média de 19,6% (BARRERA JE *et. al.*, 2003; BECKER MT *et. al.*, 2004; CONNOLLY JL, 2006; DEVANEY KO *et. al.*, 2007; FERLITO A *et. al.*, 2001; HERMANEK P, 1999a; HERMANEK P *et. al.*, 1999b; KOCATÜRK S *et. al.*, 2003; RHEE D *et. al.*, 2002; RINALDO A *et. al.*, 2004; TNM, 2002; VOGL T & BISDAS S, 2007;). AMBROSCH *et. al.* relataram uma incidência de 7,9% de micrometástases diagnosticadas pelo estudo de citoqueratinas em 1020 linfonodos examinados (AMBROSCH P *et. al.*, 1995). Incidência pouco menor foi descrita por ENEPEKIDES *et. al.* e BARRERA *et. al.* com 5% de micrometástase em 419 linfonodos (ENEPEKIDES DJ *et. al.*, 1999) e 3,85% em 288 linfonodos respectivamente (BARRERA JE *et. al.*, 2003).

A importância prognóstica das micrometástases em carcinomas do trato aerodigestivo superior não é bem definida. As micrometástases não tratadas têm tendência de se proliferar gradualmente e se transformar em macrometástases (FERLITO A *et. al.*, 2008a). Das recidivas cervicais, 10% ocorrem em pacientes pN0 (BECKER MT *et. al.*, 2004). WOOLGAR, em 1999, descrevendo a pesquisa de micrometástase em carcinoma epidermoide de boca e orofaringe, evidenciou um prognóstico semelhante entre os pacientes com micrometástase e linfonodos comprometidos (pN+) (WOOLGAR JA, 1999). YAMAZAKI *et. al.*, estudando câncer de boca, descreveram que micrometástases múltiplas e nos níveis de drenagem cervical mais baixos estão associados ao pior prognóstico, sendo isto um indicativo de radioterapia adjuvante (YAMAZAKI Y *et. al.*, 2005). Em outros sítios mostram uma menor sobrevida livre de doença em pacientes com micrometástases linfáticas de cânceres de pulmão, cólon, reto, esôfago e mama (CLARE SE *et. al.*, 1997; KOMUKAI S *et. al.*, 2000; MARUYAMA R *et. al.*, 1997; SASAKI M *et. al.*, 1997).

3.9 Inclusões Epiteliais Benignas

Inclusões de estruturas de epitélio glandular benigno associado a linfonodos são infreqüentemente relatadas em vários sítios do organismo. Estas inclusões epiteliais quando ocorrem nos linfonodos cervicais são originadas de glândulas salivares ou folículos tireoideanos (RESETKOVA E *et.al.*, 2003).

Glândula salivar ectópica é o achado de tecido salivar em sítio diferente das glândulas salivares maiores ou menores (DANIEL E & MCGUIRT F, 2005).

Distinguir estas inclusões epiteliais de carcinoma metastático tem extrema importância para melhorar o estadiamento e evitar tratamento desnecessário (BROWN RB *et. al.*, 1953).

A etiologia para esse desenvolvimento glandular ectópico não é definida. WILLIS em 1968 descreveu três principais hipóteses para este achado heterotópico: desenvolvimento ou persistência anormal de tecido glandular ectópico, deslocamento de tecido rudimentar durante o desenvolvimento embriológico e diferenciação anormal de tecido local (heteroplasia) (FERLITO A *et. al.*, 1999). As inclusões epiteliais benignas são entidades raras e a maioria das descrições na literatura resume-se a relatos de casos (DANIEL E & MCGUIRT F, 2005).

Na ajuda da diferenciação entre micrometástases e inclusões epiteliais benignas pode-se utilizar três tipos de citoqueratinas. A CK 5/6 que reconhece células basais, parte das camadas estratificadas da epiderme e mesotélio e não reconhece epitélios simples ou tumores originários deles. A CK 7 é restrita ao grupo dos adenocarcinomas de origem em epitélio glandular. Assim, carcinomas de origem em epitélio estratificado são positivos para CK 5/6 e negativos para CK 7 (BECKER MT *et. al.*, 2004, CHU PG & WEISS LM, 2002). A especificidade da CK 5/6 chega a 96% para o diagnóstico de carcinoma epidermoide (KAUFMANN O *et. al.*, 2001).

4.0 Casuística e métodos

4.1 Casuística

4.1.1 Critérios de inclusão

Para a formação do grupo de doentes deste estudo, foram selecionados 105 pacientes matriculados e tratados na Seção de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Instituto Nacional de Câncer – INCA com o diagnóstico de carcinoma epidermoide de laringe com estágio III ou IV. A pesquisa foi baseada no Banco de Dados SHI-INCA, com informações colhidas entre os anos de 2002 e 2005. Foram selecionados todos os pacientes deste período submetidos a laringectomia total com esvaziamento cervical seletivo dos níveis II, III e IV bilateralmente, associados ou não à radioterapia, sendo estes estagiados pela AJCC de 2002 como pT3 ou pT4, pN0, M0. A indicação da radioterapia foi baseada sempre no tumor primário, sendo esta realizada na maioria dos tumores pT4 e nos casos de pT3 com grande volume tumoral, avaliado subjetivamente pelo Cirurgião de Cabeça e Pescoço assistente do paciente. O tempo médio de seguimento foi de 46 meses, variando de 3 a 84 meses de acompanhamento. Nenhum paciente apresentava relato de tratamento prévio de doença neoplásica.

4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do trabalhos os pacientes que durante o mesmo período de seleção dos casos, foram submetidos ao mesmo tipo de tratamento, porém apresentando metástases linfonodais no estudo anatomopatológico convencional.

4.1.3 Dados epidemiológicos

Através da pesquisa aos prontuários foram colhidos os seguintes dados epidemiológicos: sexo (masculino ou feminino); idade (em anos), sendo os pacientes separados em 2 grupos, se idade maior que 50 anos e menor ou igual a 50 anos; etnia (branca, negra, mulata); e fatores de risco (tabagismo e etilismo).

4.1.4 Dados clínicos

Foi anotado o tipo de sintoma no momento do diagnóstico, o tempo, em meses, de duração desde o primeiro sintoma e o diagnóstico da doença e a presença de traqueostomia prévia ao tratamento definitivo.

Os pacientes tiveram seus tumores estadiados clinicamente utilizando o exame físico da laringe e das cadeias de drenagem linfonodal cervical e a videolaringoscopia, sendo classificado conforme a 6ª edição do TNM do ano de 2002.

A tomografia computadorizada da laringe não foi utilizada para o estadiamento pré-operatório em todos os pacientes. Por isso, foram utilizados para estadiamento da doença o exame físico e a videolaringoscopia realizados no dia da primeira consulta no Instituto Nacional de Câncer.

Quando o paciente foi submetido à radioterapia adjuvante ao tratamento cirúrgico, foi anotada a dose de radiação em Gy.

4.1.5 Dados histopatológicos

Através da pesquisa aos laudos anatomopatológicos dos produtos das laringectomias, os tumores foram divididos conforme o subsítio que acometiam a

laringe (glótico, supraglótico ou transglótico), sendo anotadas as medidas longitudinais e transversais do tumor aferidas no estudo macroscópico da peça cirúrgica e calculada a superfície tumoral em mm^2 , além da presença de invasão cartilaginosa, invasão perineural, invasão vascular, acometimento de estruturas adjacentes e o infiltrado inflamatório adjacente ao tumor.

Foram analisadas também as margens de ressecção do tumor (livres, exíguas ou comprometidas) e o grau de diferenciação tumoral (bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado).

No estadiamento anatomopatológico, foi utilizado como referência a 6ª edição no TNM.

4.1.6 Seguimento

Através da consulta ao prontuário médico dos pacientes foi anotada a data do tratamento cirúrgico, a data da última consulta de controle e a condição do doente em relação ao seu seguimento: vivo sem doença, óbito secundário a doença, óbito por outro motivo, sendo nos casos de recidiva anotada a data da ocorrência, sendo calculado o tempo de acompanhamento em meses.

4.2 Métodos

Estudo retrospectivo de coorte.

4.2.1 Análise histopatológica

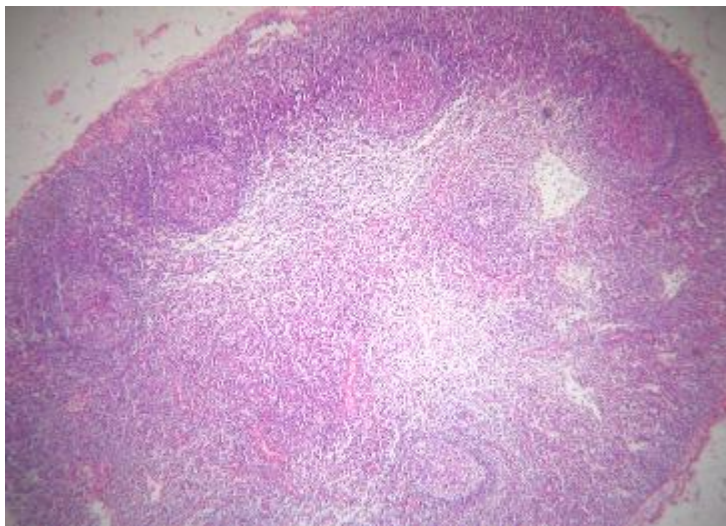
Após a coleta destes dados supracitados, foram separadas todas as lâminas e blocos de parafina onde estavam fixados os produtos dos esvaziamentos cervicais do grupo de pacientes selecionados, onde já havia sido realizado um corte em cada

linfonodo com uma espessura de 0,2 micra. Todos os linfonodos ressecados e dissecados foram examinados pelo mesmo Médico Patologista (Dr. Paulo Antonio Silvestre de Faria) e pelo Pesquisador, e classificados conforme a região linfonodal de maior predomínio. Esta classificação foi baseada no trabalho de TSAKRAKLIDES (TSAKRAKLIDES V *et. al.*, 1973), que dividiu os padrões em 4 classes: hiperplasia folicular, hiperplasia paracortical, histiocitose sinusal e linfonodo normal.

Hiperplasia é o aumento da celularidade e da área ocupada por um compartimento ativado no linfonodo. A histologia normal do linfonodo foi o parâmetro para a identificação de qual compartimento destaca-se frente aos demais.

Em cada paciente, o linfonodo era analisado à microscopia óptica com lente de menor aumento (40 vezes). Neste momento era realizada uma varredura de uma maior área do linfonodo, sendo possível a identificação da região que predominava ou a proporcionalidade das regiões caracterizando um linfonodo normal (Figura 1). O maior aumento (400 vezes) na microscopia óptica era utilizado na confirmação do padrão de hiperplasia.

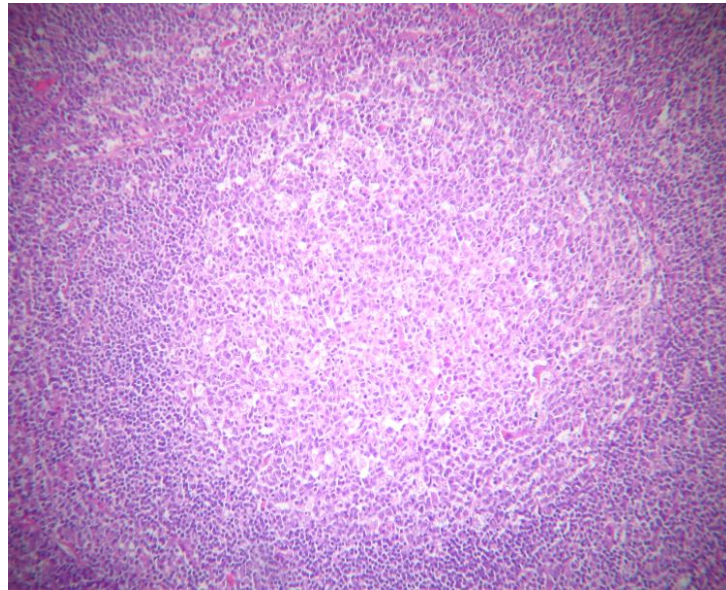
Figura 1 - Imagem de um linfonodo normal à microscopia óptica, mostrando uma proporcionalidade entre as regiões dos linfonodos (Aumento de 40 vezes).



O padrão de hiperplasia predominante de cada linfonodo era anotado, e ao final da análise de todos os linfonodos de cada caso era identificado o padrão mais frequente, o segundo mais frequente e o padrão de hiperplasia no maior linfonodo dissecado.

Na análise microscópica de cada linfonodo, primeiramente eram avaliadas as regiões cortical e medular. Na região cortical identificava-se o córtex externo, situado logo abaixo do seio subcapsular, onde era possível identificar os folículos linfoides, ricos em linfócitos B. O folículo linfoide primário é o folículo não estimulado, onde se identifica um agregado denso e homogêneo de linfócitos pequenos (Figura 2).

Figura 2 – Foto à microscopia óptica da região do córtex linfonodal, mostrando um folículo primário (Aumento de 100 vezes).



No folículo secundário, uma resposta a um estímulo antigênico forma um centro germinativo dentro do folículo primário. O centro germinativo é caracterizado por um agregado celular heterogêneo, contendo linfócitos grandes e pequenos, além de macrófagos (Figura 3). Nesta região, também observam-se figuras de mitose por ser esta uma área de intensa atividade de proliferação celular (Figura 4). Quando no linfonodo ocorria predomínio desta região, este era caracterizado como hiperplasia folicular (Figura 5).

Figura 3 – Foto mostrando a região cortical do linfonodo com folículo secundário à microscopia óptica (Aumento de 100 vezes).

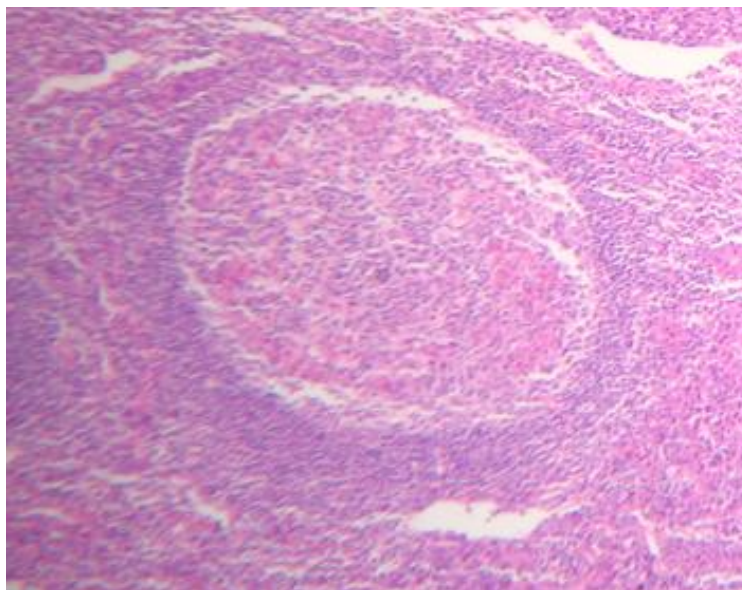


Figura 4 – Folículo secundário mostrando figuras de mitose à microscopia óptica (Aumento 400 vezes).

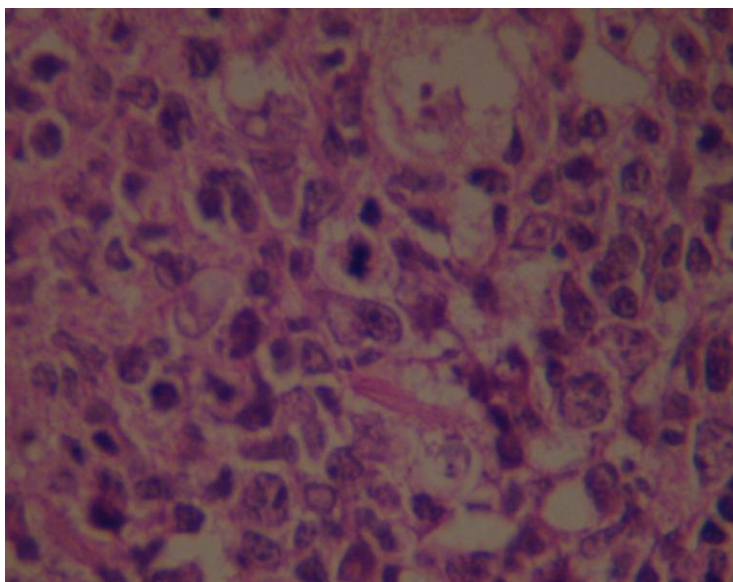
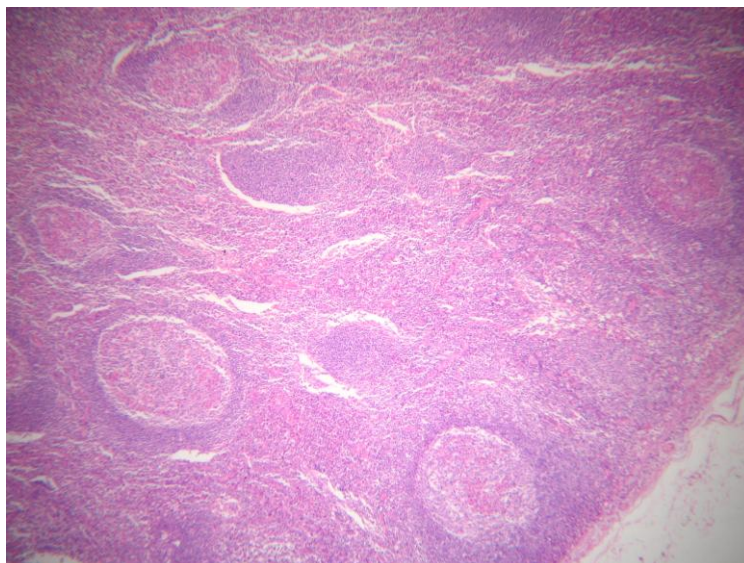
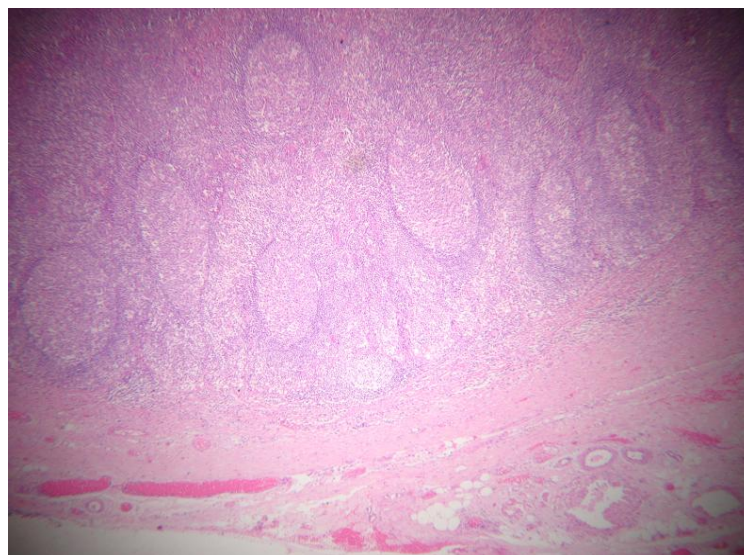


Figura 5 A e B – Imagem à microscopia óptica de linfonodo estimulado com predomínio da região cortical, mostrando folículos estimulados (Aumento de 100 vezes).



A



B

No centro do linfonodo, após o córtex externo identifica-se o córtex profundo ou região paracortical. Esta região é constituída predominantemente por linfócitos T CD4+. É um compartimento de difícil delimitação, podendo estender-se por entre os folículos linfoides até o seio subcapsular, sendo utilizada a visualização das vênulas pós-capilares do linfonodo para caracterização desta região linfonodal (Figura 6).

Quando esta região do linfonodo predominava sobre as outras era denominada hiperplasia paracortical (Figura 7).

Figura 6 – Foto mostrando uma das características da região paracortical, as vênulas pós-capilares de endotélio alto à microscopia óptica (Aumento de 400 vezes).

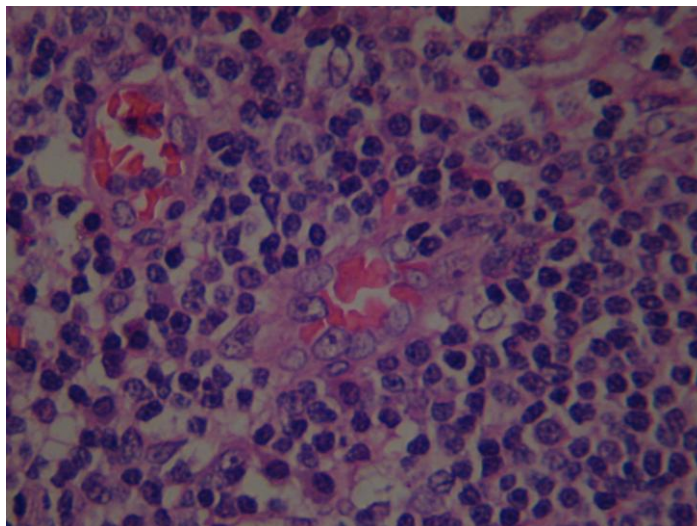
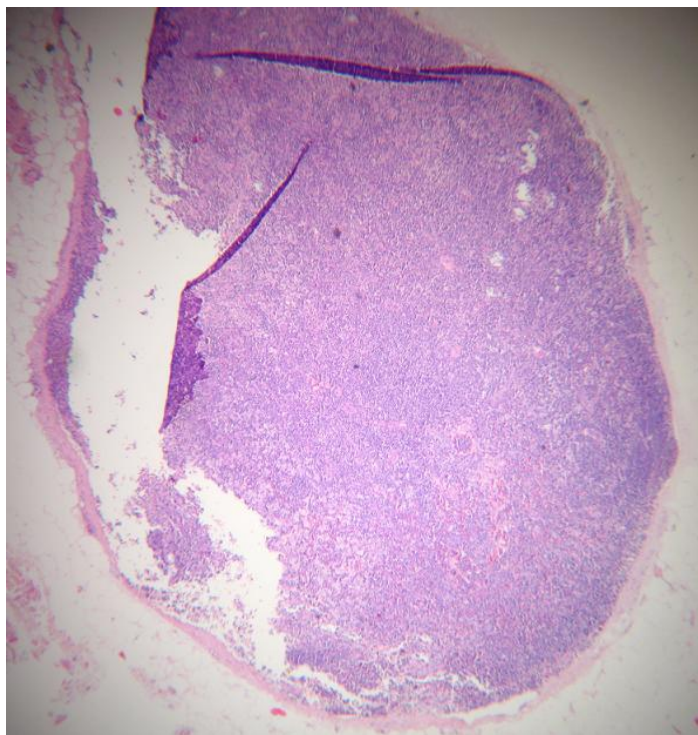
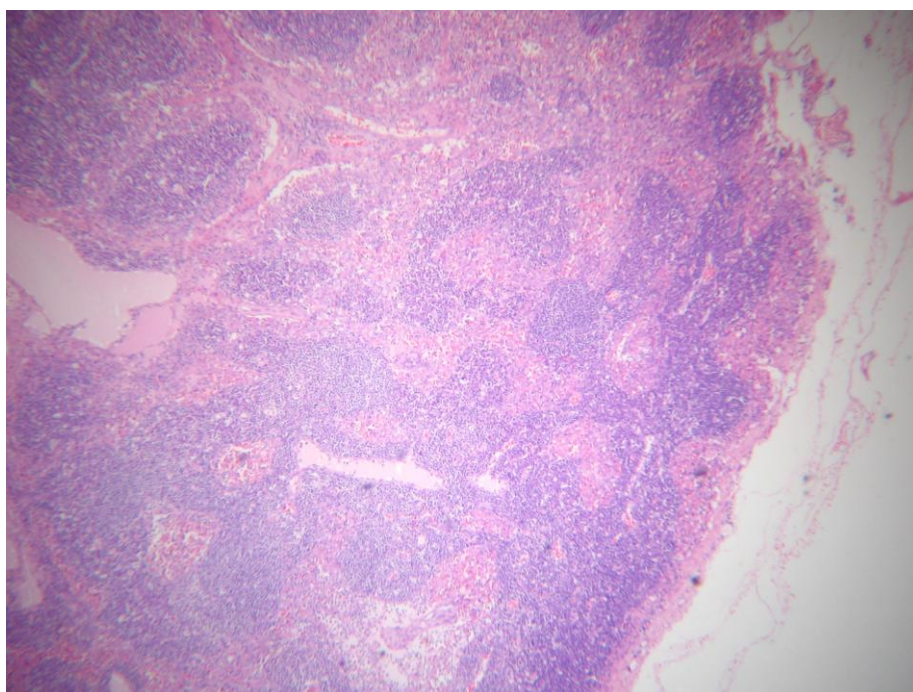


Figura 7 – Foto de linfonodo com predomínio da região paracortical à microscopia óptica (Aumento 40 vezes).



Na porção mais central do linfonodo localiza-se a região medular, onde se identificam os cordões medulares que são intercalados pelos seios medulares, ricos em histiócitos e macrófagos, podendo conter também eosinófilos, plasmócitos, hemáceas e neutrófilos. É nesse compartimento que os antígenos presentes na linfa são filtrados e apresentados aos linfócitos corticais. Quando se identifica uma dilatação dos seios medulares, esta região pode se estender para além da região medular, caracterizando a histiocitose sinusal (Figura 8).

Figura 8 – Foto de linfonodo à microscopia óptica com predomínio da região do seio linfonodal, com histiocitose ocupando até a região do córtex linfonodal (Aumento de 40 vezes).



Em 60% dos casos, houve concordância entre as análises dos dois observadores. Os 40% que apresentaram discordância entre o Pesquisador e o Médico Patologista foram discutidos em conjunto até um consenso da região de predomínio nos linfonodos.

Após a definição do padrão de reatividade linfonodal, os 105 pacientes foram agrupados conforme a resposta imune (celular ou humoral) apresentada em cada caso e conforme a presença ou não de estímulo imunológico. Esta divisão foi realizada da seguinte maneira: os casos onde havia predomínio de hiperplasia folicular ou paracortical foram considerados linfonodos estimulados, e os casos onde o predomínio era da histiocitose sinusal foram considerados como não estimulados; os casos com predomínio de hiperplasia folicular foram considerados como portadores de imunidade humoral estimulada, e nos casos em que a hiperplasia paracortical era mais frequente havia estímulo da imunidade celular; em casos nos quais predominava a histiocitose sinusal, levava-se em consideração o segundo padrão de hiperplasia mais frequente, pois a histiocitose sinusal não está relacionada com nenhum tipo específico de resposta imunológica.

O padrão de hiperplasia linfonodal, o tipo de imunidade estimulada e a presença ou ausência de estímulo imunológico foram relacionados com a sobrevida livre de doença e a sobrevida global no grupo de pacientes estudados.

4.2.2 Análise imuno-histoquímica

Após realização da análise do padrão de reatividade linfonodal, novos cortes nos blocos de parafina foram realizados para a pesquisa de citoqueratinas utilizando imuno-histoquímica.

Foram confeccionados cortes com espessura de 3 micras e fixados em lâminas com cola junto com o controle positivo. Estes cortes foram fixados em estufa a uma temperatura de 60° C por um período de duas horas. Posteriormente foram desparafinizados utilizando dois banhos de xilol aquecido por vinte minutos e dois

banhos de xilol à temperatura ambiente por outros vinte minutos. A seguir, realizava-se a desidratação das lâminas utilizando três banhos de álcool etílico de duração de três minutos para posterior hidratação com água corrente por 5 minutos.

Para a recuperação antigênica foi utilizado o método do Steamer, e como tampão, o citrato.

Após a ciclagem com caneta hidrofóbica Dako®, os cortes foram lavados com tampão de lavagem TRIS Buffer Solution (TBS) durante cinco minutos, três vezes.

Depois de secar o TBS para o bloqueio da peroxidase endógena foi utilizada uma única vez por vinte minutos, uma solução concentrada de peróxido de hidrogênio com 5 ml de peridrol® a 30% e 45 ml de TBS. Em seguida, foi realizada lavagem com água destilada seguida de três banhos de TBS com duração de cinco minutos cada.

No bloqueio das ligações inespecíficas, após secar o TBS, foi utilizado leite desnatado a 10% na temperatura ambiente por um período de trinta minutos.

Retirado o excesso do bloqueio de leite, foi utilizado como anticorpo primário a citoqueratina, clone AE1/AE3 (Dako®, Carpinteria, CA, EUA) na diluição de 1/1200 e pingado 200 microlitros em cada lâmina. As lâminas foram colocadas em refrigeração na temperatura de 4 graus Celcius por 12 horas.

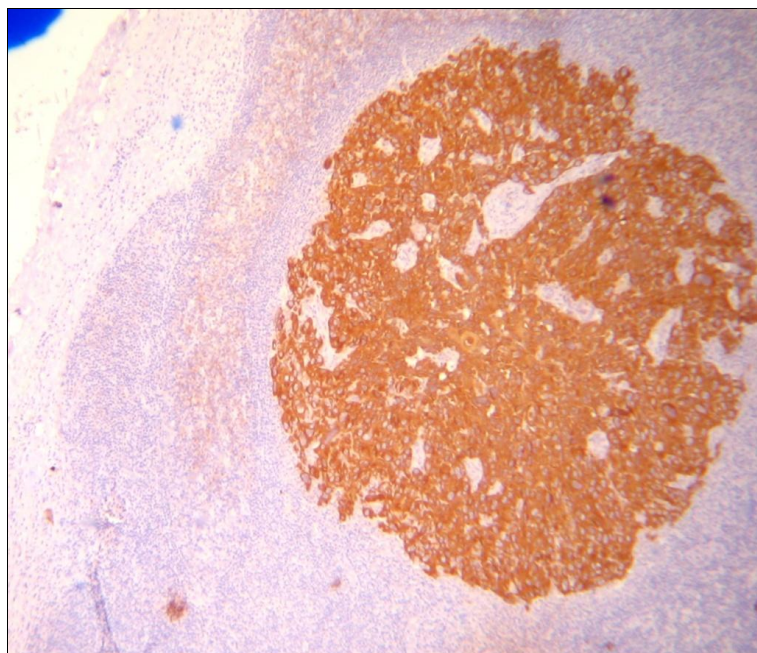
Escorrido o excesso do anticorpo primário, as lâminas foram novamente lavadas com água destilada e submetidas a outros três banhos com TBS de cinco minutos de duração. Retirado o TBS excedente foi pingado o polímero e deixado por um período de 30 minutos.

Posteriormente, foi pingada a solução formada por 2 ml de tampão por uma gota de cromógeno e deixado agir por três minutos, sendo paralisada a reação com

água corrente e contracolorando com hematoxilina por vinte segundos, sendo posteriormente desidratado com quatro banhos de álcool etílico e clarificado com quatro banhos de xilol, estando prontas para a leitura da imuno-histoquímica.

Dos 105 pacientes (3.648 linfonodos), em 17 casos a pesquisa das citoqueratinas AE1/AE3 foram positivas (Figura 9).

Figura 9 – Foto do linfonodo à microscopia óptica positivo para citoqueratina AE1/AE3 no estudo imuno-histoquímico. A área marrom corresponde ao conglomerado de células epiteliais dentro do linfonodo.



Devido a dúvidas e à dificuldade de diferenciação se esta positividade correspondia a micrometástase ou a inclusões epiteliais benignas como glândula salivar (Figura 10), foi realizada, em cada caso, uma nova análise imuno-histoquímica com os marcadores CK 5/6 (Clone D5/16 B4, Carpinteria, CA, EUA) e CK7 (Clone OV/TL 12/30, Carpinteria, CA, EUA), procurando a marcação de epitélio estratificado e epitélio glandular respectivamente (CHU PG & WIESS LM, 2002).

Figura 10 – Foto de epitélio de ducto de glândula salivar positivo para citoqueratina AE1/AE3 no estudo imuno-histoquímico.



Para a técnica de coloração imuno-histoquímica para estes marcadores foi utilizada a mesma metodologia já descrita, com a diluição de 1/400 para a CK 7 e de 1/100 para o CK 5/6.

4.3 Análise estatística

Todos os dados coletados durante o estudo foram inseridos no programa Excel 8.0, colocado num microcomputador Toshiba ®. A partir deste programa foi realizada a importação dos dados para o programa estatístico Epi Info versão 3.4.3 de novembro de 2007 para subsequente análise.

As variáveis categorizadas analisadas foram o sexo (masculino e feminino), etnia (branca, mulata e negra), hábitos de vida (tabagista e/ou etilista e abstêmios), presença de traqueostomia prévia, tamanho do tumor, tratamento realizado, margens cirúrgicas, localização do tumor primário, grau de diferenciação histológico, presença de infiltrado inflamatório, invasão de estruturas adjacentes, invasão de

cartilagem, invasão vascular, invasão perineural, padrão de reatividade linfonodal (hiperplasia folicular, hiperplasia parafolicular, histiocitose sinusal), imunidade estimulada (humoral, celular), presença de estímulo linfonodal.

As variáveis contínuas foram categorizadas da seguinte maneira: Idade (≤ 50 anos e > 50 anos), superfície tumoral ($> 900 \text{ mm}^2$ e $\leq 900 \text{ mm}^2$), número de linfonodos ressecados (< 33 linfonodos e ≥ 33 linfonodos).

Os grupos formados foram relacionados com a recidiva e mortalidade através do teste exato de FISHER e qui-quadrado de PEARSON na análise univariada. Para a análise multivariada foi utilizado o risco proporcional de COX.

Para a análise das curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida global foi utilizado o método de KAPLAN-MEIER.

4.4 Caracterização Final da Casuística

Foram avaliados 105 pacientes, sendo 91 homens e 14 mulheres, com uma média de idade de 62,2 anos (38 – 86 anos) e uma mediana de 62 anos. Setenta pacientes (66,7%) foram estadiados como pT4 e 35 pacientes (33,3%) como pT3.

Durante o tempo de seguimento dos pacientes, 25 (23,8%) apresentaram recidiva da doença, sendo em 13 (12,4%) casos a recidiva a distância, seguido da recidiva local (6 casos – 5,7%), recidiva regional (4 casos – 3,8%), recidiva local e a distância em 1 caso (0,9%) e recidiva local e regional em outro caso (0,9%). A sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 73%.

Trinta e um pacientes (29,5%) evoluíram para óbito, alcançando uma sobrevida global em 5 anos de 68,5%.

4.5 Avaliação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

A Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer - CEP/INCA aprovou o protocolo de pesquisa sob o número 077/07. Posteriormente 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 também o fez, com o registro de pesquisa n° 2858, projeto CAPPesq n° 0784/08.

5.0 Resultados

O sexo dos pacientes não apresentou importância prognóstica neste grupo de pacientes, sem relação tanto com a recidiva, quanto com a mortalidade (Tabela 1). Quando separados os pacientes em dois grupos relacionados com a idade, o grupo de pacientes mais jovens que 51 anos, não apresentou diferença na recidiva e mortalidade, comparado ao grupo de pacientes com 51 anos ou mais (Tabela 2).

Tabela 1 – Relação entre sexo, recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.

Sexo	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
Feminino	12	2	14	11	3	14
Masculino	68	23	91	63	28	91
<i>Valor de p</i>		0,29			0,35	

Tabela 2 – Relação entre a idade, recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.

Idade	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
≤ 50 anos	12	3	15	11	4	15
> 50 anos	68	22	90	63	27	90
<i>Valor de p</i>		0,49			0,52	

Analisando as etnias deste grupo de pacientes, 64 (61,0%) eram pacientes de brancos, 24 (22,8%) mulatos e 17 (16,2%) negros. Quando agrupados os pacientes em 2 segmentos, um formado pelos de etnia branca e outro formado pelos negros e mulatos, este último apresentou uma tendência à maior recidiva (Tabela 3).

Tabela 3 – Relação entre etnia, recidiva e mortalidade, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

Etnia	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
Branços	53	11	64	49	15	64
Mulatos/Negros	27	14	41	25	16	41
Valor de p		0,079			0,13	

O tempo médio de sintoma até a procura por tratamento especializado foi de 12,41 meses com variação entre 1 e 84 meses. O sintoma mais frequente foi a disfonia (99 casos – 94,2%), seguido de tosse (51 casos – 48,6%), dor (42 casos – 40%), disfagia (39 casos – 37,1%), emagrecimento (17 casos – 16,2%), dispnéia (16 casos – 15,2%), sangramento (12 casos – 11,4%), odinofagia (11 casos – 10,5%), otalgia (6 casos – 5,7%) e aumento de volume cervical (4 casos – 3,8%).

Nenhum paciente apresentava história pregressa de outro tipo de neoplasia, no entanto, 30 deles (28,6%) tinham história de comorbidades como acidente vascular cerebral, hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus*, glaucoma, infarto agudo do miocárdio, arritmias cardíacas e infecção pelo vírus HIV. Apenas 13 pacientes (12,4%) tinham familiares acometidos por câncer. Quando analisada a média de idade do grupo de pacientes com ou sem história familiar de doença neoplásica a diferença foi mínima (Tabela 4), sem mostrar tendência de acometimento pela doença em pacientes mais jovens se história familiar presente.

Tabela 4 – Número de pacientes com e sem história familiar de câncer e média de idade, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

História Familiar para Câncer	Número de casos	Média de Idade
Presente	13 (12,4%)	62,9 anos
Ausente	92 (87,6%)	62,1 anos

A maioria dos pacientes deste grupo de estudo tinha como hábito o tabagismo associado ao etilismo (67 casos – 63,8%). Vinte e seis pacientes (24,8%) eram apenas tabagistas, apenas dois (1,9%) tinham o etilismo como hábito isolado, e 10 pacientes (9,5%) não fumavam ou ingeriam bebidas alcoólicas. Dos dez pacientes que não eram expostos a nenhum fator de risco, nenhum deles apresentava idade de 50 anos ou menos, tendo este grupo uma idade média de 66,3 anos, comparado a média de 61,8 anos dos pacientes que eram expostos a pelo menos um fator de risco. O tabagismo ou o etilismo não apresentaram relação com recidiva ou com mortalidade (Tabela 5).

Tabela 5 – Relação entre exposição ao tabagismo ou etilismo com a recidiva e mortalidade, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

Tabagismo e/ou Etilismo	Recidiva		Óbito	
	Não	Sim	Não	Sim
Não	9	1	9	1
Sim	71	24	65	30
Valor de p	0,25		0,14	

No estadiamento clínico a maioria dos pacientes apresentava um tumor T3. Dez casos tiveram aumento dos linfonodos diagnosticados ao exame clínico, não confirmados como metástases no estudo anatomopatológico, e nenhum paciente apresentava doença a distância no momento do diagnóstico, este dado sendo

investigado com radiografia de tórax para avaliação de campos pulmonares, principal local de doença metastática da laringe (Figura 11,12 e 13).

Figura 11 - Estadiamento clínico do tamanho do tumor dos pacientes conforme a AJCC – 2002, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

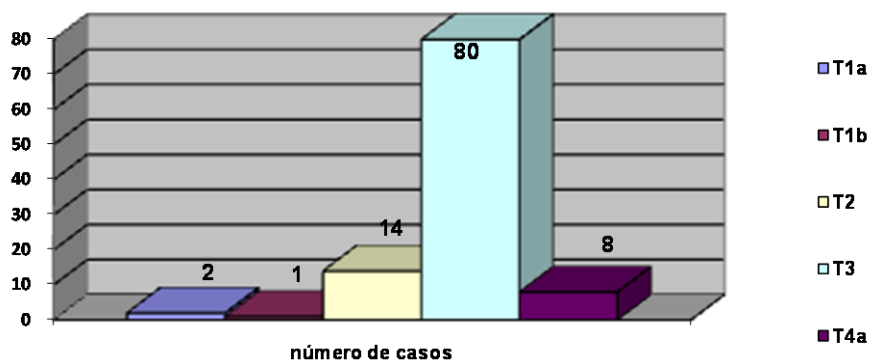


Figura 12 - Estadiamento clínico dos linfonodos dos pacientes conforme a AJCC– 2002, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

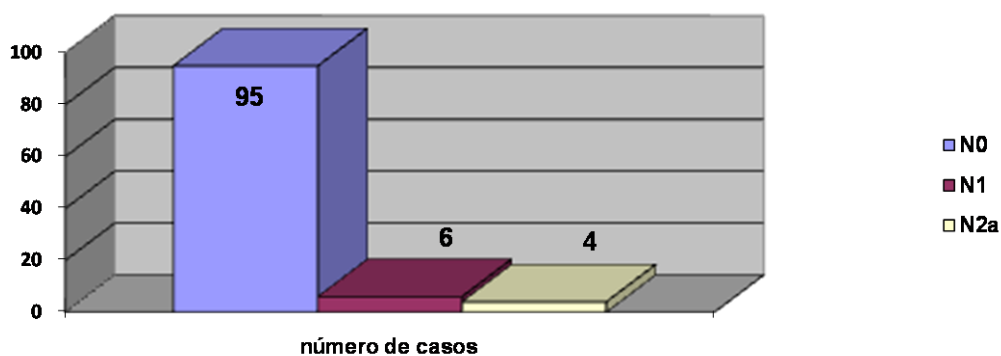
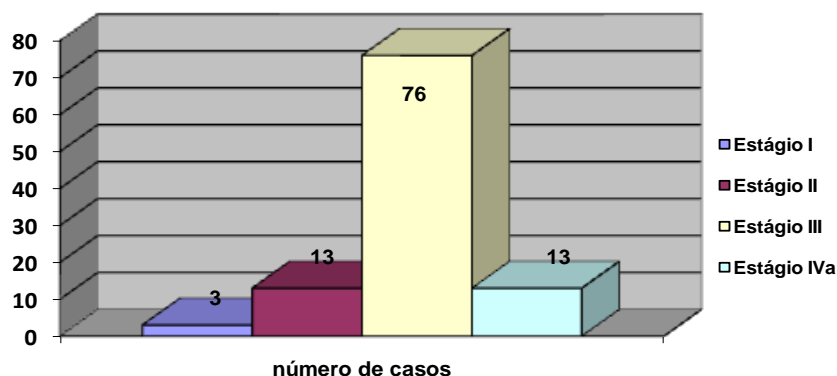


Figura 13 - Estadiamento clínico dos pacientes conforme a AJCC – 2002, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.



Sessenta e sete pacientes (63,8%) foram submetidos à traqueostomia antes do tratamento definitivo e este dado não apresentou importância prognóstica (Tabela 6).

Tabela 6 – Relação entre a presença e traqueostomia prévia ao tratamento, recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.

Traqueostomia prévia	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
Não	30	8	38	29	9	38
Sim	50	17	67	45	22	67
<i>Valor de p</i>		0,79			0,44	

Quando analisadas apenas as recidivas locais, a presença de traqueostomia antes do tratamento cirúrgico também não apresentou relação prognóstica (Tabela 7).

Tabela 7 – Relação entre a presença de traqueostomia prévia ao tratamento e recidiva local, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

Traqueostomia prévia	Recidiva Local		
	Não	Sim	TOTAL
Não	36	2	38
Sim	61	6	67
<i>Valor de p</i>		0,39	

Todos os pacientes foram submetidos à laringectomia total com esvaziamento cervical seletivo dos níveis II, III e IV bilateralmente. Em 69 casos (65,7%) foi associado ao tratamento cirúrgico à radioterapia, devido ao estágio pT4 em 59 casos e pelo volume tumoral em 10 casos estagiados como pT3, sendo que o estágio da doença e o tratamento realizado não apresentaram significância estatística quando relacionados com a recidiva ou com a mortalidade. A dose média de radioterapia foi de 49,7 Gy, com uma dose mínima de 45 Gy e máxima de 65 Gy (Figura 14, Tabela 8).

Figura 14 - Relação entre o tamanho do tumor e o tratamento realizado nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.

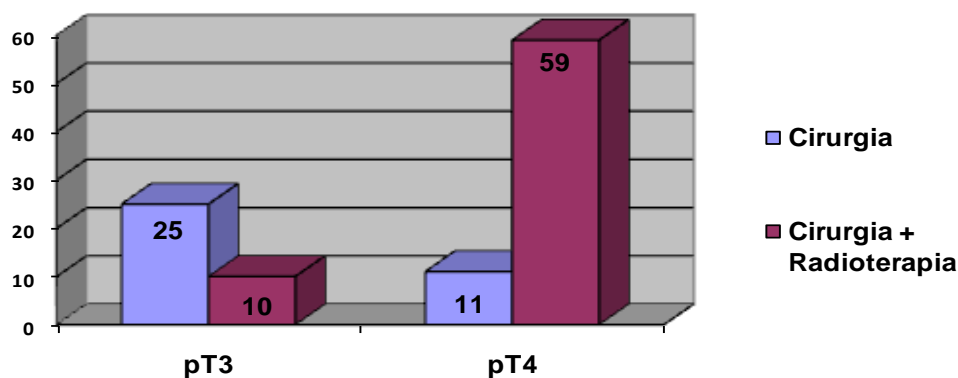


Tabela 8 – Relação entre tamanho do tumor, tratamento realizado com a incidência de recidiva e óbito nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.

pT / Tratamento	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
pT3 / Cirurgia	22	3	25	22	3	25
pT3 / Cirurgia + Radioterapia	6	4	10	6	4	10
pT4 / Cirurgia	7	4	11	7	4	11
pT4 / Cirurgia + Radioterapia	45	14	59	39	20	59
Valor de p		0,59			0,11	

Dos 105 casos submetidos à laringectomia com esvaziamento cervical seletivo dos níveis II, III e IV bilateralmente, 99 (94,3%) obtiveram margens livres na ressecção, cinco casos (4,8%) apresentaram margens comprometidas e um caso (0,9%) margens exíguas. A presença de margem comprometida ou exígua não resultou em maior recidiva ou mortalidade neste grupo de pacientes (Tabela 9).

Tabela 9 – Relação entre margens cirúrgicas, recidiva e óbito nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.

Margens	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
Livres	76	23	99	70	29	99
Comprometidas	4	1	5	4	1	5
Exíguas	0	1	1	0	1	1
Valor de p		0,54			0,80	

A maior parte dos tumores tinha a localização transglótica. No entanto o subsítio da laringe acometido pelo tumor não apresentou relação com significância estatística com a recidiva ou com a mortalidade (Tabela 10).

Tabela 10 – Relação entre o subsítio do tumor, recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.

Localização do tumor	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
Supraglótico	11	7	18	11	7	18
Glótico	13	2	15	13	2	15
Transglótico	56	16	72	50	22	72
Valor de p		0,38			0,96	

Na análise anatomopatológica 70 pacientes (66,7%) foram estagiados como pT4 e 35 pacientes (33,3%) como pT3. Todos os pacientes foram estagiados como

pN0, pois este era um dos critérios para inclusão dos pacientes neste grupo de estudo, sendo o estágio da doença determinado diretamente pelo tamanho do tumor.

Na análise estatística o tamanho do tumor no estudo anatomopatológico (pT), não apresentou relação com a recidiva ou com a mortalidade (Tabela 11).

Tabela 11 – Relação do tamanho do tumor (pT), recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.

Estágio pT	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
pT3	28	7	35	28	7	35
pT4	52	18	70	46	24	70
Valor de p		0,68			0,19	

Quando analisado apenas os casos de recidiva locorregional, o tamanho do tumor (pT) apresentou relação com significado estatístico, mas sem relação com a recidiva a distância (Tabela 12).

Tabela 12 – Relação do tamanho do tumor (pT) com a recidiva locoregional e recidiva a distância nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.

Estágio pT	Recidiva locorregional			Recidiva à distância		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
pT3	34	1	35	29	6	35
pT4	59	11	70	62	8	70
Valor de p		0,044			0,61	

Analisando a superfície tumoral, os pacientes com tumor com área menor que 900 mm², apresentaram tendência menor à mortalidade ($p = 0,09$) (Tabela 13).

Tabela 13 – Relação da superfície tumoral com a recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.

Superfície tumoral	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
> 900 mm ²	38	15	53	33	20	53
≤ 900 mm ²	42	10	52	41	11	52
<i>Valor de p</i>		0,38			0,09	

Apesar de todos os pacientes serem estagiados como pN0, foi analisado o número de linfonodos ressecados durante tratamento do pescoço. Houve evidência de maiores índices de recidiva e mortalidade no grupo de pacientes com menos de 33 linfonodos ressecados (Tabela 14).

Tabela 14 – Relação entre número de linfonodos ressecados, recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.

Número de linfonodos ressecados	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
< 33 linfonodos	34	18	52	30	22	52
≥ 33 linfonodos	46	7	53	44	9	53
<i>Valor de p</i>		0,018			0,008	

O grau de diferenciação histológica dos casos de carcinoma epidermoide de laringe não apresentou relação com a recidiva da doença e a incidência de óbito. A maioria dos casos apresentava tumores moderadamente diferenciados (Tabela 15).

Tabela 15 – Relação entre o grau de diferenciação, recidiva e óbito, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.

Grau de diferenciação	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	Total	Não	Sim	Total
Bem diferenciado	3	0	3	3	0	3
Moderadamente diferenciado	73	24	97	67	30	97
Pouco diferenciado	4	1	5	4	1	5
<i>Valor de p</i>		0,67			0,76	

Em 58 casos (55,2%) o tumor apresentava extravazamento do compartimento laríngeo. A invasão de cartilagem esteve presente em 57 casos (54,3%), invasões vascular e perineural em 13 casos (12,4%) e infiltrado inflamatório em 37 casos (35,2%). A invasão de cartilagem apresentou relação com significância estatística com a mortalidade ($p = 0,04$). A invasão de estruturas adjacentes pelo tumor primário também esteve relacionada com significância estatística à mortalidade ($p = 0,05$) (Tabela 16).

Tabela 16 – Relação entre infiltrado inflamatório tumoral, invasão de estruturas adjacentes, invasão da cartilagem, invasão vascular e perineural com a recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.

VARIÁVEL	Recidiva				Óbito			
	Não	Sim	TOTAL	Valor de p	Não	Sim	TOTAL	Valor de p
Infiltrado inflamatório								
Não	49	19	68	0,26	45	23	68	0,27
Sim	31	6	37		29	8	37	
Invasão estruturas adjacentes								
Não	38	9	47	0,43	38	9	47	0,05
Sim	42	16	58		36	22	58	
Invasão cartilagem								
Não	40	8	48	0,17	39	9	48	0,04
Sim	40	17	57		35	22	57	
Invasão vascular								
Não	70	22	92	0,62	65	27	92	0,57
Sim	10	3	13		9	4	13	
Invasão perineural								
Não	70	22	92	0,62	65	27	92	0,57
Sim	10	3	13		9	4	13	

Durante o acompanhamento dos pacientes, 25 (23,8%) apresentaram recidiva da doença, sendo em seis casos a recidiva local, quatro casos regional e em treze casos a recidiva ocorreu a distância. Em um caso ocorreu recidiva local e regional e em outro recidiva a distância e local (Figura 15, 16 e 17).

Figura 15 - Gráfico mostrando o local da recidiva dos pacientes nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

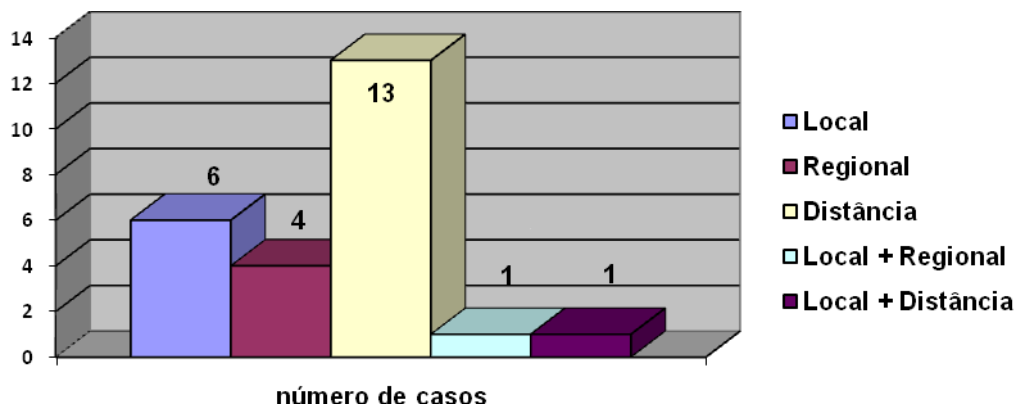
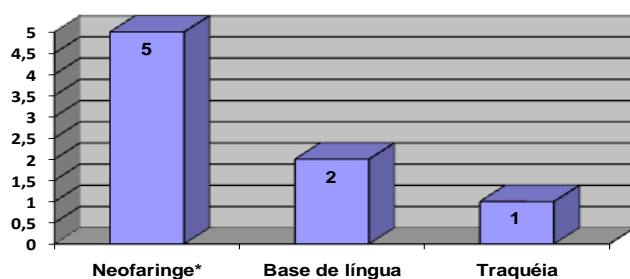
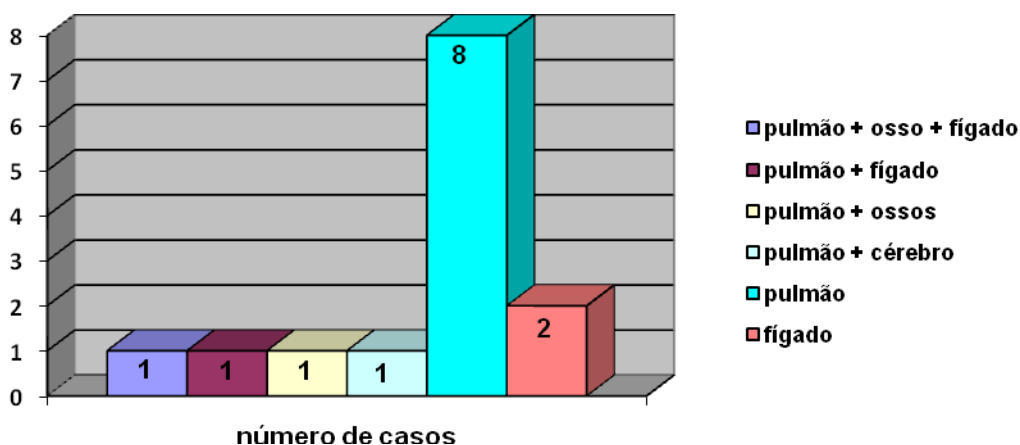


Figura 16 - Subsítios das recidivas locais nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.



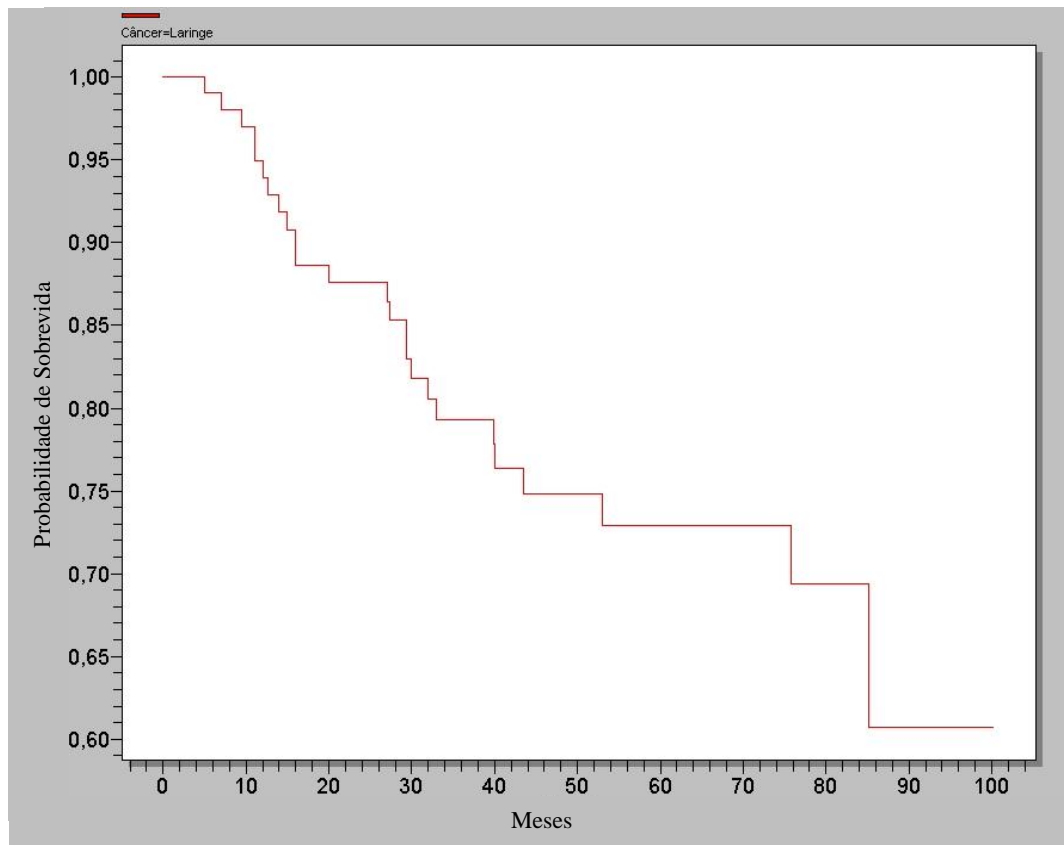
*: remanescente da faringe após ressecção total da laringe

Figura 17 – Sítios das recidivas a distância nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA, entre 2002 e 2005.



A sobrevida média livre de doença foi 45,1 meses e a sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 73% (Figura 18).

Figura 18 - Curva de sobrevida livre de doença nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

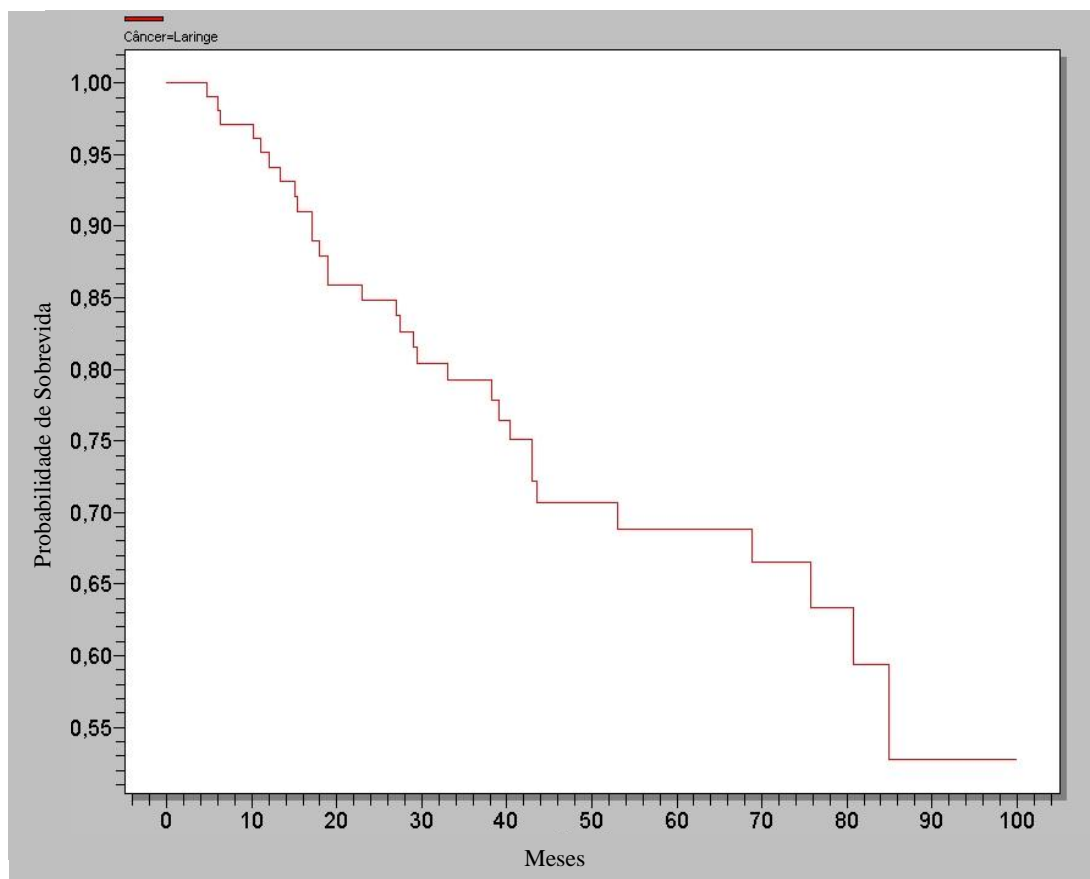


Três pacientes (2,8%) apresentaram segundo tumor primário, sendo em um caso o tumor localizado no esôfago, um caso na orofaringe e outro caso no estômago.

Trinta e um pacientes (29,5%) evoluíram para óbito, sendo que nos 25 casos de recidiva, o óbito ocorreu devido à doença neoplásica da laringe. Em outros dois casos o óbito ocorreu devido a segundo tumor primário, um caso por complicações de hemorragia digestiva alta secundária a varizes esofágicas e em três casos não foi possível definir a causa do óbito pelos dados presentes no prontuário médico dos

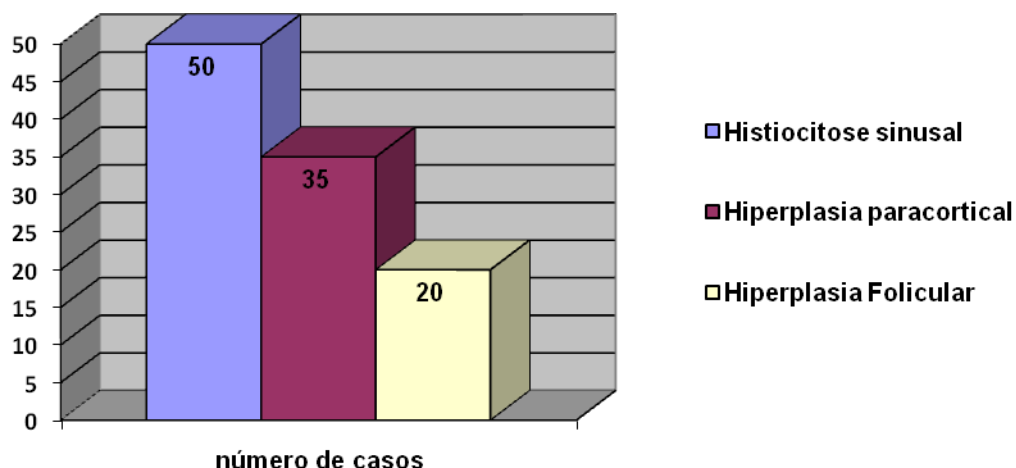
pacientes. A sobrevida global média foi de 46 meses e a sobrevida global em 5 anos de 68,5% (Figura 19).

Figura 19 - Curva de sobrevida global, nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.



Quando analisada a reatividade linfonodal observou-se que o padrão de reatividade nos linfonodos cervicais mais frequente foi a histiocitose sinusal, seguida da hiperplasia paracortical e da hiperplasia folicular (Figura 20).

Figura 20 - Padrão de reatividade linfonodal cervical nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.



O padrão de reatividade do linfonodo cervical foi relacionado com a recidiva da doença e mortalidade. Quando analisados os três tipos de padrão de reatividade separadamente, não houve nenhuma relação prognóstica desta variável com significância estatística. (Tabela 17).

Tabela 17 – Relação entre o padrão de reatividade linfonodal, recidiva e mortalidade, nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

Padrão de Reatividade	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
Hiperplasia Folicular	15	5	20	12	8	20
Hiperplasia Parafolicular	27	8	35	26	9	35
Histiocitose Sinusal	38	12	50	36	14	50
<i>Valor de p</i>		0,98			0,49	

Quando analisado o padrão de reatividade conforme a imunidade estimulada, se humoral ou celular, o óbito pela doença foi mais frequente nos pacientes com a resposta imune humoral estimulada, sendo esta relação com significância estatística

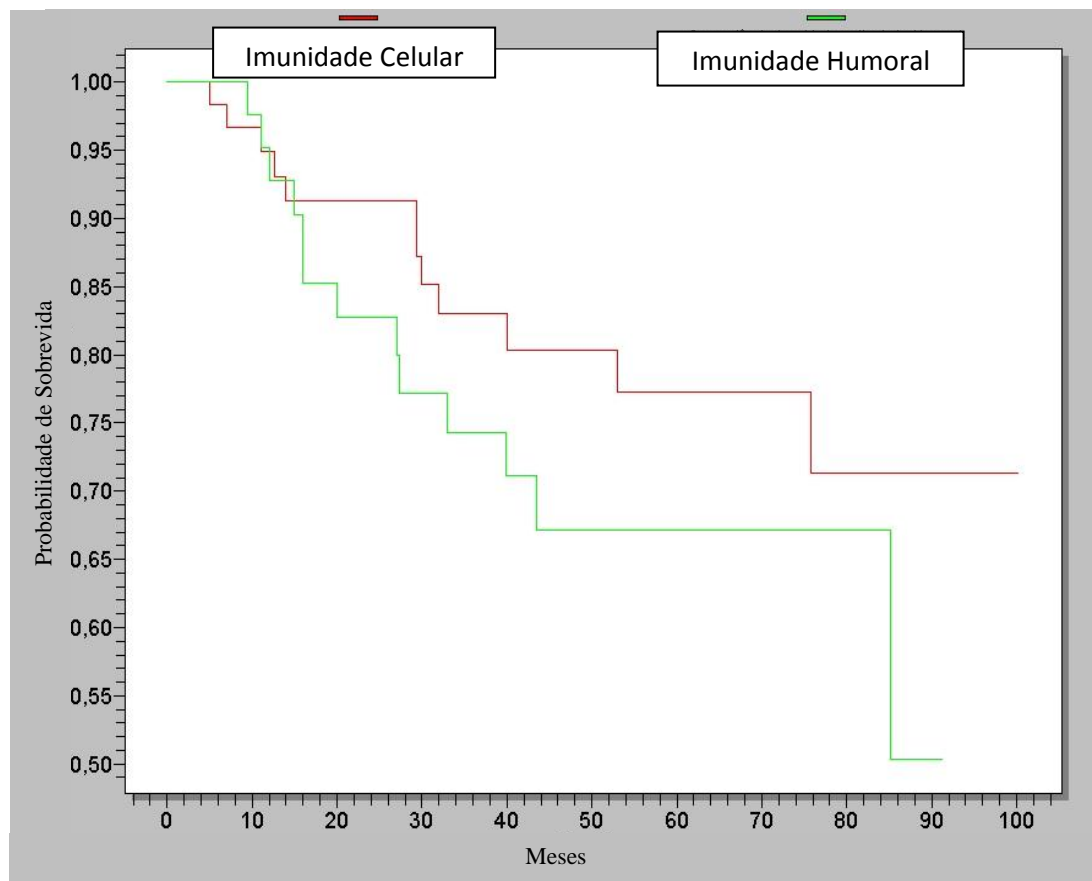
($p = 0,05$). Quando relacionado com a recidiva, o tipo de resposta imune não apresentou relação prognóstica (Tabela 18).

Tabela 18 – Relação entre o tipo de imunidade estimulada, recidiva e mortalidade nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

Imunidade estimulada	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
Imunidade humoral	31	13	44	26	18	44
Imunidade celular	49	12	61	48	13	61
Valor de p		0,34			0,05	

Quando analisadas as curvas de sobrevida livre de doença em 5 anos conforme a imunidade estimulada, nos casos onde a imunidade humoral (hiperplasia folicular) apresentou-se estimulada foi evidenciada sobrevida de 67%, comparada a 77% do grupo com a imunidade celular estimulada (hiperplasia parafolicular). Contudo, esta diferença não apresentou significância estatística (Figura 21).

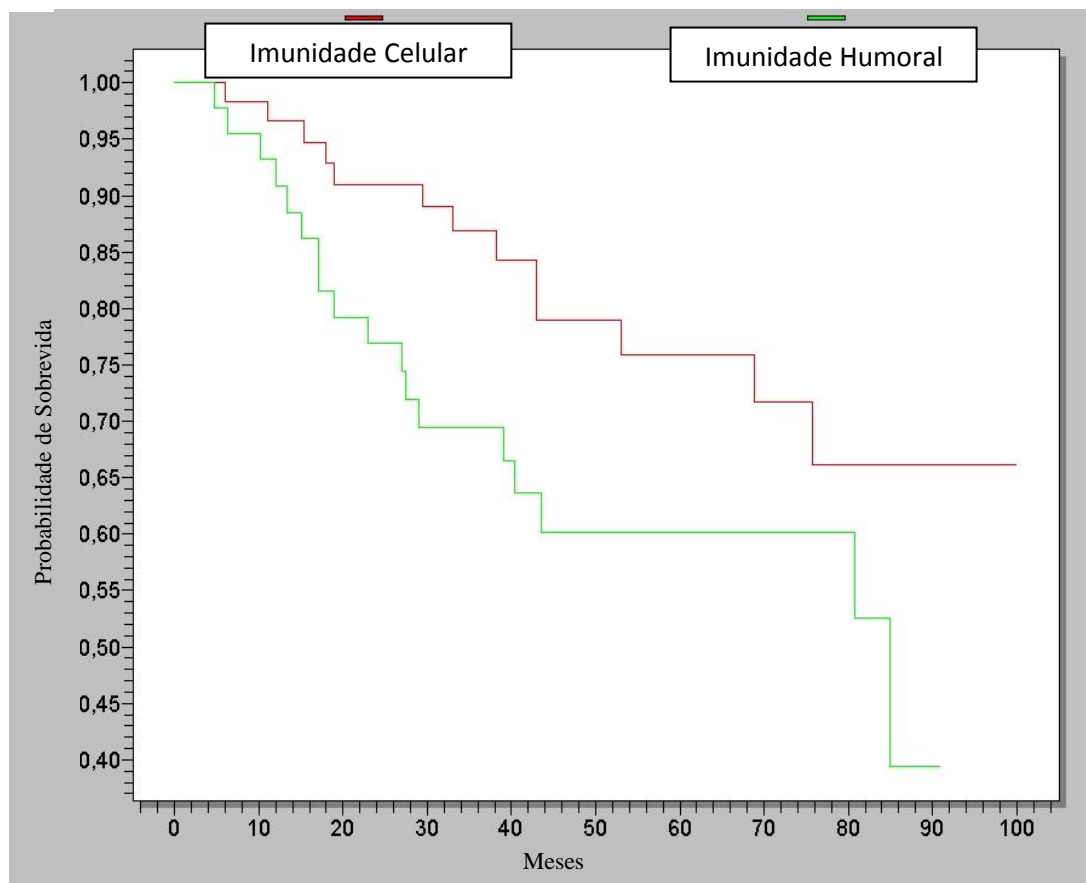
Figura 21 - Curvas de sobrevida livre de doença, conforme a imunidade estimulada, nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.



Log rank = 0,26 / Wilcoxon = 0,28

Quando analisadas as curvas de sobrevida global em relação a esta mesma variável, o grupo que apresentava imunidade celular estimulada apresentou melhor prognóstico, com 76% dos pacientes vivos após 5 anos de tratamento, comparado ao grupo com imunidade humoral onde apenas 60% dos pacientes alcançaram 5 anos de sobrevida, sendo esta diferença estatisticamente significativa (Figura 22).

Figura 22 - Curvas de sobrevida global, conforme a imunidade estimulada nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.



Log rank = 0,051 / Wilcoxon = 0,033

Quando divididos os pacientes em dois grupos conforme a prevalência de linfonodos estimulados imunologicamente (predomínio de hiperplasia folicular ou parafolicular) e linfonodos não estimulados (predomínio de histiocitose sinusal), e comparados com a recidiva e mortalidade, não houve relação com significância estatística (Tabela 19).

Tabela 19 – Relação da presença de estímulo imunológico nos linfonodos com a recidiva e óbito nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

Linfonodos estimulados	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
Não	38	12	50	36	14	50
Sim	42	13	55	38	17	55
<i>Valor de p</i>		0,85			0,91	

A comparação do padrão de reatividade linfonodal com o tipo de recidiva, se local, regional ou a distância, não apresentou relação com significância estatística (Tabela 20).

O padrão de reatividade linfonodal do maior linfonodo ressecado não apresentou relação com a recidiva da doença e a mortalidade deste grupo de pacientes (Tabela 21).

Tabela 20 – Relação entre o padrão de reatividade linfonodal com o tipo de recidiva da doença nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

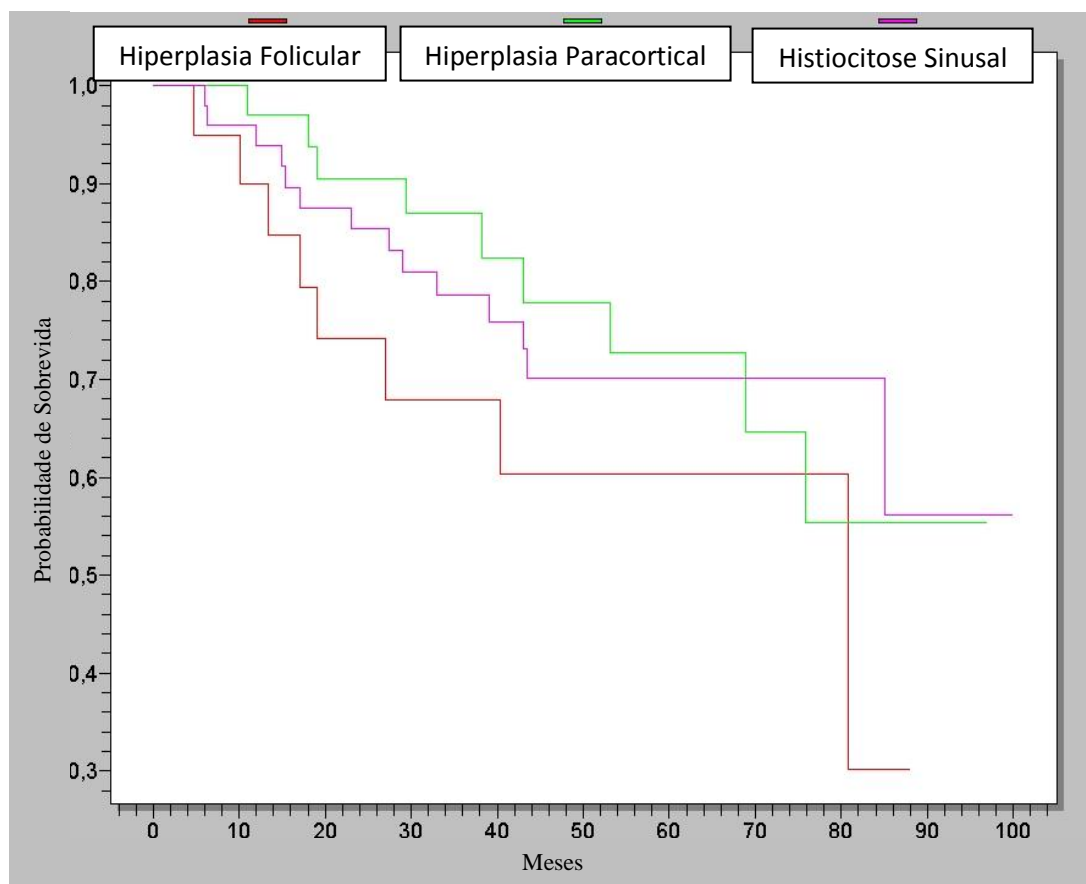
Recidiva	Padrão de reatividade linfonodal			<i>Valor de p</i>
	Hiperplasia folicular	Hiperplasia parafolicular	Histiocitose sinusal	
Local				
Não	18	32	47	0,53
Sim	2	3	3	
Regional				
Não	20	34	46	0,12
Sim	0	1	4	
Distância				
Não	17	30	44	0,70
Sim	3	5	6	

Tabela 21 – Relação entre o padrão de reatividade do maior linfonodo ressecado com a recidiva e mortalidade, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

Padrão de Reatividade do Maior Linfonodo	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
Hiperplasia Folicular	27	6	33	25	8	33
Hiperplasia Parafolicular	25	7	32	23	9	32
Histiocitose Sinusal	14	8	22	12	10	22
Normal	14	4	18	14	4	18
Valor de p		0,34			0,51	

O padrão de reatividade linfonodal não apresentou relação com significância estatística com a sobrevida global dos pacientes, tendo o grupo com hiperplasia folicular 60,5 % de sobrevida global em 5 anos, comparado a 73% do grupo de pacientes com hiperplasia paracortical e 70,5% nos pacientes com histiocitose sinusal (Figura 23).

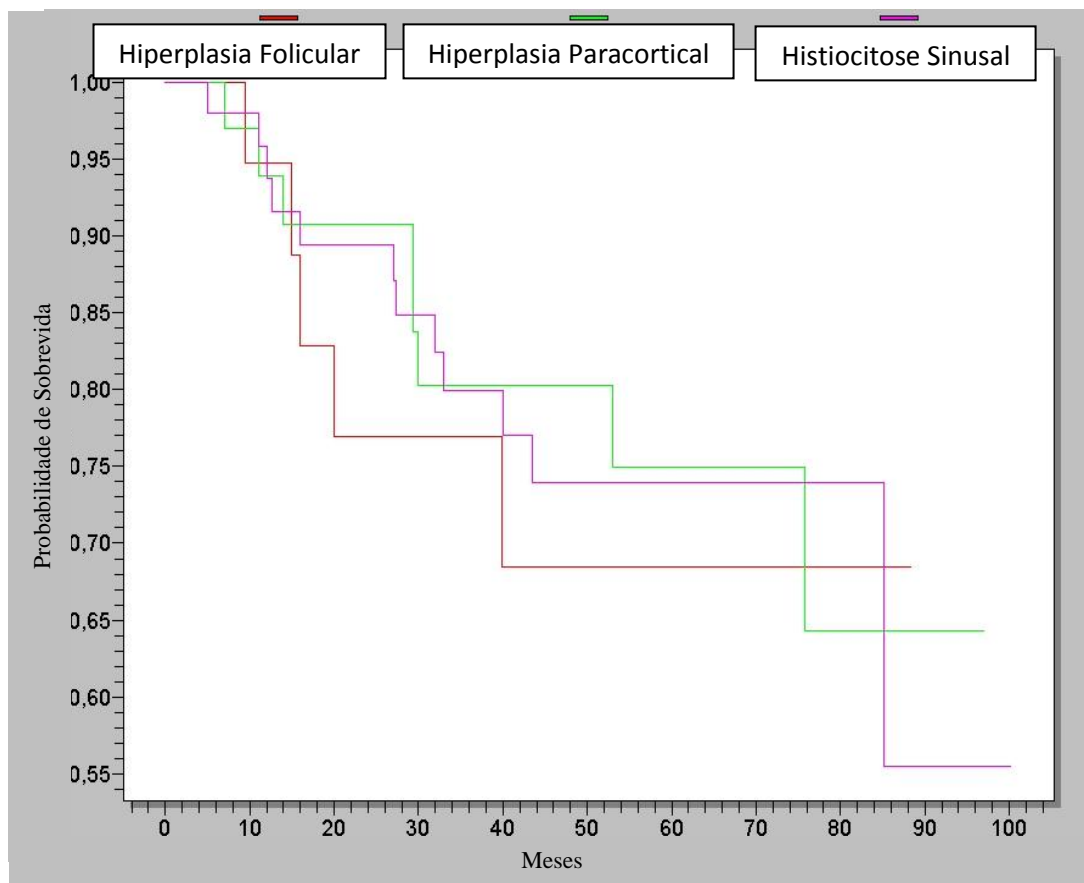
Figura 23 – Curva de sobrevida global conforme o padrão de reatividade linfonodal, nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.



Log-rank: 0,30 / Wilcoxon: 0,25

Não houve diferença significativa estatisticamente entre a sobrevida livre de doença entre os grupos de pacientes conforme o padrão da reatividade linfonodal. Apesar da ausência de significância estatística, o grupo com hiperplasia folicular apresentou menor sobrevida livre de doença, com 68,5% dos pacientes sem recidiva em 5 anos, comparado a 75% e 74% de sobrevida livre de doença em 5 anos dos pacientes com hiperplasia paracortical e histiocitose sinusal respectivamente (Figura 24).

Figura 24 – Curva de sobrevida livre de doença conforme o padrão de reatividade linfonodal, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.



Log-rank: 0,86 / Wilcoxon: 0,78

A presença de células epiteliais nos linfonodos foi inicialmente pesquisada através de estudo imuno-histoquímico utilizando as citoqueratinas AE1/AE3. A positividade para este marcador ocorreu em 17 pacientes (16,2%). A positividade para este marcador esteve relacionada com significância estatística com o subsítio do tumor primário. Nenhum caso de AE1/AE3 positivos foi descrito no grupo de paciente com tumores glóticos. Esta análise não demonstrou relação significativa com o número de linfonodos ressecados, volume tumoral, o tamanho do tumor, o grau de diferenciação tumoral e a presença de traqueostomia prévia (Tabela 22).

Tabela 22 - Relação entre a pesquisa de AE1/AE3 com o, volume tumoral, subsítio do tumor primário, tamanho do tumor, grau de diferenciação, número de linfonodos ressecados e traqueostomia prévia nos 105 pacientes com CEC de laringe tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

	AE1/AE3		Valor de p
	Negativo	Positivo	
Volume tumoral			
> 900 mm ³	44	9	0,96
≤ 900 mm ³	44	8	
Subsítio tumor primário			
Transglótico ou Supraglótico	73	17	0,05
Glótico	15	0	
pT			
pT3	30	5	0,92
pT4	58	12	
Grau de diferenciação			
I	3	0	0,10
II	82	15	
III	3	2	
nº de linfonodos ressecados			
< 33 linfonodos	40	12	0,10
≥ 33 linfonodos	48	5	
Traqueostomia prévia			
Não	34	4	0,18
Sim	54	13	

Quando analisados separadamente cada padrão de reatividade linfonodal e relacionados com a pesquisa das citoqueratinas AE1/AE3 não houve significância. No entanto, quando relacionados conforme a imunidade estimulada na maioria dos linfonodos de cada paciente houve uma tendência à pesquisa com citoqueratinas AE1/AE3 ser positiva quando o paciente apresentava imunidade humoral estimulada ($p = 0,06$) (Tabela 23).

Tabela 23 - Relação entre o padrão de reatividade linfonodal e o padrão de imunidade estimulada com a pesquisa com AE1/AE3, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

		AE1/AE3		P
		Negativo	Positivo	
Padrão de Hiperplasia	Hiperplasia folicular	16	4	0,81
	Hiperplasia parafolicular	30	5	
	Histiocitose celular	42	8	
Imunidade Estimulada	Celular	55	6	0,06
	Humoral	33	11	

Ao relacionar a pesquisa de citoqueratinas AE1/AE3 nos linfonodos dos pacientes com a recidiva e mortalidade, notou-se relação com significância estatística com a recidiva, recidiva regional e locorregional e com a mortalidade (Tabela 24).

Tabela 24 - Relação entre recidiva e mortalidade e a pesquisa de AE1/AE3, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

		AE1/AE3		Valor de P
		Negativo	Positivo	
Recidiva da doença				0,03
	Não	71	17	
	Sim	9	8	
Recidiva Local				0,11
	Não	83	5	
	Sim	14	3	
Recidiva Regional				0,02
	Não	86	2	
	Sim	14	3	
Recidiva Locorregional				0,03
	Não	81	7	
	Sim	12	5	
Recidiva a Distância				0,4
	Não	77	11	
	Sim	14	3	
Óbito				0,04
	Não	66	22	
	Sim	8	9	

Após dividirmos os pacientes em dois grupos, um com AE1/AE3 positivos (17 - 16,2% pacientes) e outro com AE1/AE3 negativos (88 - 83,8% pacientes) e relacionarmos os casos que apresentaram recidivas e que foram tratados com radioterapia, esta se mostrou com uma tendência a ser um fator protetor de recidiva regional nos casos positivos na pesquisa das citoqueratinas (Tabela 25).

Tabela 25 - Relação entre a recidiva e tratamento adjuvante com radioterapia nos pacientes com pesquisa de AE1/AE3 positiva e negativa, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

Pacientes sem micrometástases (88 – 83,8%)				Pacientes com micrometástases (17 – 16,2%)			
Radioterapia				Radioterapia			
	Não	Sim	<i>p</i>		Não	Sim	<i>P</i>
Recidiva Regional	32	54	0,61	Recidiva regional	1	13	0,06
Não	1	1		Não	2	1	
Sim				Sim			
Recidiva Locoregional	31	50	0,47	Recidiva Locoregional	1	11	0,19
Não	2	5		Não	2	3	
Sim				Sim			
Recidiva da Doença	28	43	0,31	Recidiva da Doença	1	8	0,45
Não	5	12		Não	2	6	
Sim				Sim			

Na análise multivariada, ambas as variáveis com significância estatística relacionadas com a recidiva mantiveram a relação prognóstica (Tabela 26).

Tabela 26 – Análise uni e multivariada relacionando as variáveis etnia, número de linfonodos ressecados e pesquisa de AE1/AE3 com a recidiva da doença, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

Variável	<i>p</i> univariada	<i>p</i> multivariada
Nº de linfonodos ressecados	0,018	0,022
AE1/AE3	0,03	0,017

Quando avaliada a mortalidade na análise multivariada, apenas o número de linfonodos ressecados apresentou relação com significância estatística (Tabela 27).

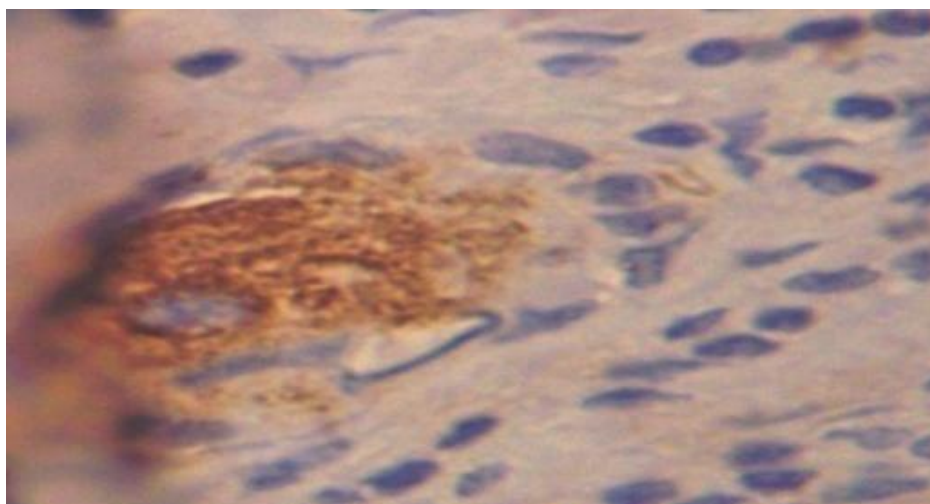
Tabela 27 – Análise uni e multivariada relacionando as variáveis volume tumoral, número de linfonodos ressecados, invasão de estruturas adjacentes, invasão de cartilagem, tipo de resposta imune estimulada e AE1/AE3 com a mortalidade pela doença, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

Variável	<i>p</i> univariada	<i>p</i> multivariada
Nº de linfonodos ressecados	0,008	0,04
Invasão de estruturas adjacentes	0,05	0,42
Invasão de cartilagem	0,04	0,37
Resposta imune estimulada	0,05	0,23
AE1/AE3	0,04	0,03

Nos 17 casos que apresentaram positividade na pesquisa de citoqueratinas AE1/AE3, foi realizada uma pesquisa mais específica utilizando CK5/6 e CK7.

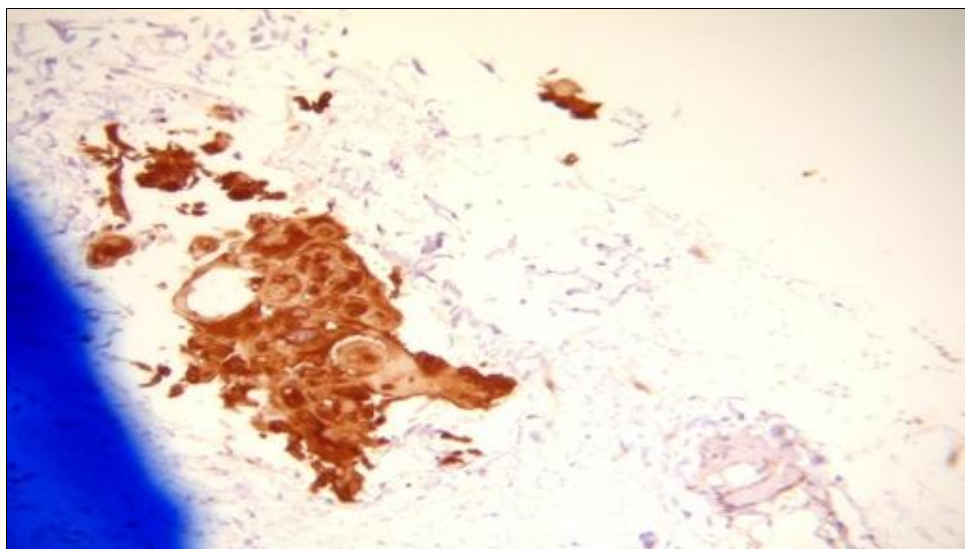
Dos 17 casos apenas 4 (23,53%) foram positivos para o marcador CK5/6 específico para epitélio estratificado, sendo estes casos confirmados como micrometástases, finalizando uma incidência de 3,81% dos casos (Figura 25).

Figura 25– Foto da análise imuno-histoquímica positiva para citoqueratina 5/6 em linfonodo cervical confirmando micrometástase.



Outros 2 (11,76%) casos apresentaram positividade a CK5/6, no entanto o agrupamento celular localizava-se fora da cápsula do linfonodo, podendo corresponder à contaminação durante a manipulação da peça no trans ou pós-operatório (Figura 26).

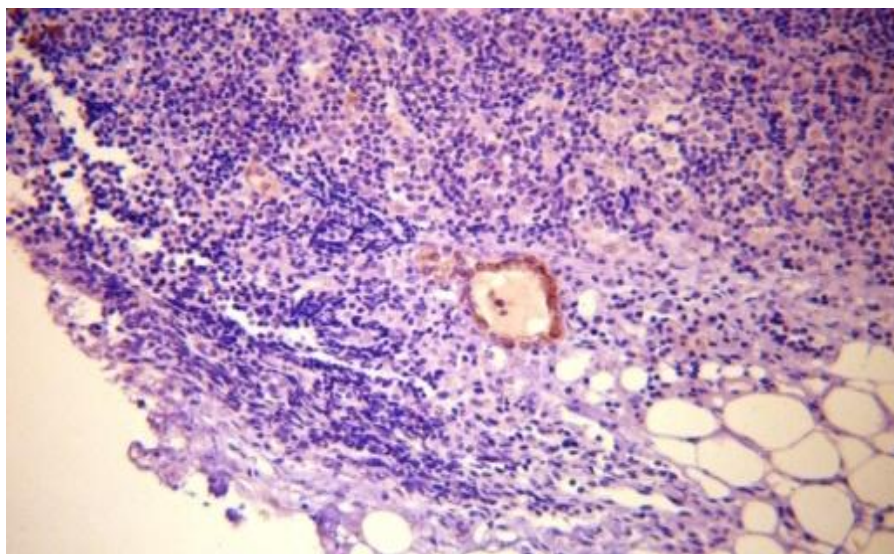
Figura 26 – Foto da análise imuno-histoquímica positiva para citoqueratina 5/6 em região externa à cápsula do linfonodo, confirmando contaminação devido a manipulação do produto da linfadenectomia.



A pesquisa de CK 7 foi positiva em outros 7 (41,2%) dos 17 casos, sendo este marcador mais específico de epitélio glandular, e associado ao aspecto glandular à microscopia óptica foram confirmadas como inclusões epiteliais benignas (Figura 27). Todos os casos onde a CK5/6 foi positivo, a pesquisa de CK7 foi negativa, incluindo nos dois casos que foram considerados como contaminação de células epiteliais nos produtos dos esvaziamentos linfonodais cervicais.

Em 4 dos 17 casos (23,5%), ambas as pesquisas da CK5/6 e da CK7 foram negativas, prevalecendo a análise imuno-histoquímica com AE1/AE3 onde definiu que estes casos correspondiam a inclusões epiteliais benignas.

Figura 27 – Foto da análise imuno-histoquímica positiva para citoqueratina 7 em linfonodo cervical, confirmando inclusão epitelial benigna.



As inclusões epiteliais benignas ocorreram em 11 (10,47%) dos 105 pacientes e a incidência de micrometástase neste grupo de pacientes foi de 4 (3,81%) casos, não apresentando relação com a recidiva ou mortalidade (Tabela 28).

Tabela 28 - Relação entre a incidência de micrometástases, recidiva e mortalidade, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

Micrometástase CK 5/6	Recidiva			Óbito		
	Não	Sim	TOTAL	Não	Sim	TOTAL
Negativo	77	24	101	71	30	101
Positivo	3	1	4	3	1	4
P		0,66			0,66	

Quando relacionados a presença de micrometástases com o padrão de reatividade linfonodal, o tipo de imunidade estimulada e a presença de estímulo linfonodal, nenhuma relação estatisticamente significativa foi encontrada (Tabela 29).

Tabela 29 - Relação entre a presença de micrometástases, padrão de reatividade linfonodal, tipo de imunidade estimulada e a presença de estímulo linfonodal, nos 105 pacientes com CEC de laringe, tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA entre 2002 e 2005.

	Micrometástase		Valor de <i>p</i>
	Não	Sim	
Padrão de Reatividade			
Hiperplasia Folicular	19	1	0,41
Hiperplasia Paracortical	33	2	
Histiocitose Sinusal	49	1	
Imunidade Estimulada			
Celular	59	2	0,55
Humoral	42	2	
Linfonodos estimulados			
Não	49	1	0,34
Sim	52	3	

6.0 Discussão

Algumas particularidades do comportamento biológico dos tumores da laringe têm extrema importância. A conformação anatômica da laringe, incluindo ligamentos e membranas, resulta na formação de barreiras de disseminação tumoral, compartimentalizando o tumor. Assim, há tumores laríngeos avançados e restritos ao órgão que não apresentam metástases linfonodais detectadas pelos métodos habituais. Este grupo de pacientes foi focalizado pelo presente estudo.

No estudo anatomopatológico rotineiro, realiza-se um único corte em cada linfonodo, direcionando-se à pesquisa de metástase linfonodal e à presença de extravasamento linfonodal.

Outras informações provenientes do estudo do produto dos esvaziamentos cervicais profiláticos, como o padrão de reatividade linfonodal e a pesquisa de micrometástases, podem fornecer informações potencialmente úteis na avaliação prognóstica e na indicação de tratamento adjuvante em determinado grupo de pacientes, visando à melhora da sobrevida.

6.1 Variáveis Epidemiológicas

6.1.1 Idade

O câncer de laringe acomete com maior frequência pacientes entre a sexta e oitava década de vida, com mais de 60% dos pacientes pertencentes a este grupo etário (WÜNSCH FILHO V, 2004). Neste estudo, 90 (85,7%) pacientes apresentavam idade maior que 50 anos, e apenas 15 (14,3%) tinham 50 anos de idade

ou menos. Quando comparados estes dois grupos etários com a recidiva da doença e com a mortalidade, não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,49 / p = 0,52$).

A divisão entre os grupos de pacientes com a idade de corte de 50 anos foi realizada na tentativa de avaliar a evolução da doença no grupo de pacientes jovens, isto é, com idade menor que a faixa etária normalmente acometida pelos tumores da laringe. Como citado anteriormente não houve diferença no prognóstico da doença entre os dois grupos etários.

6.1.2 Sexo

A neoplasia maligna da laringe é mais frequente no sexo masculino, numa proporção de 7 casos em homens para cada caso em mulher (FERLAY J *et. al.*, 2001). A incidência desta doença na América do Norte e nos países sul-americanos de clima temperado varia de 8,1 a 15,1 casos para cada 100.000 homens e 0,6 a 1,2 casos para cada 100.000 mulheres (PARKIN DM *et. al.*, 1999). Este estudo não apresentou diferença comparado aos trabalhos de diferentes locais do mundo. O sexo masculino foi mais frequentemente acometido (91 casos – 86,7%) do que o sexo feminino (14 casos – 13,3%), com uma proporção de 6,5 casos em homens para cada caso em mulheres. Apesar desta diferença entre os sexos, não houve diferença estatística quando relacionada esta variável com a recidiva ($p = 0,29$) e a mortalidade ($p = 0,35$).

6.1.3 Etnia

ACKERMAN LV & DEL REGATO JA em 1962 publicaram que o câncer de laringe era menos frequente em negros e orientais, relatando que apesar da maior frequência em brancos os fatores etiológicos eram diversos e não exclusivamente ligado à etnia (ACKERMAN LV & DEL REGATO JA, 1962). Neste trabalho a maioria dos pacientes era da etnia branca, seguida dos mulatos e dos negros. Sessenta e um por cento (64 pacientes) dos casos acometiam brancos, 22,8% (24 pacientes) mulatos e 16,2% (17 pacientes) acometiam negros.

O grupo formado por negros e mulatos apresentou maior tendência à recidiva, comparado ao grupo de pacientes de etnia branca. Pouco mais de 51% dos negros e mulatos apresentaram recidiva da doença, contra apenas 20,75% nos pacientes brancos ($p = 0,079$). Não houve relação entre a etnia dos pacientes e a mortalidade ($p = 0,13$).

A tendência à maior recidiva da doença em pacientes negros ou mulatos não pode ser muito valorizada. Além de ser pouco citada na literatura, não se comprovou uma tendência à melhor evolução do câncer de laringe em países com menor população de negros ou mulatos, como no continente europeu.

6.2 Variáveis Clínicas

6.2.1 Sintomas

A sintomatologia dos tumores da laringe dependerá do subsítio do órgão que é acometido pelo tumor. A maioria dos tumores acometem a glote (INCA, 2008), conseqüentemente a disfonia é o sintoma mais frequentemente relatado pelos pacientes portadores de câncer da laringe, com cerca de 87% dos casos (LIMA RA &

KLIGERMAN J, 1997). Neste estudo, 99 pacientes (94,2%) apresentavam disfonia no momento da primeira consulta com especialista. Outros sintomas estiveram associados à disfonia, porém com menor incidência. Entre eles podemos salientar tosse (51 casos – 48,6%), provavelmente secundária à alteração da função esfinteriana do órgão pela presença do tumor.

Apesar de este estudo selecionar pacientes com diagnóstico de câncer de laringe, a disfagia (39 casos – 37,1%) foi uma queixa mais frequente comparada à dispnéia (16 casos – 15,2%). A otalgia reflexa foi citada por apenas 6 pacientes (5,7%) como sintoma associado à doença. Como foram incluídos apenas pacientes com ausência de metástases cervicais, nenhum deles tinha como sintoma no momento do diagnóstico a linfonomegalia cervical, apesar deste evento ser frequente em casos de tumores glóticos avançados e supraglóticos mesmo em estágios iniciais (LIMA RA & KLIGERMAN J, 1997).

O primeiro sintoma da doença foi questionado no dia da primeira consulta do paciente no Instituto Nacional de Câncer, e a variabilidade das queixas deve-se ao fato de neste momento encontrarmos pacientes em diferentes estágios da doença. No momento do estagiamento clínico, realizado com videolaringoscopia, existiam pacientes com tumores T1a, T1b, T2, T3 e T4a. Devido ao período de definição diagnóstica e do tratamento indicado, houve crescimento tumoral, típico da evolução natural da doença, justificando o fato de pacientes com estágio clínico T1a, terem sido classificados posteriormente como pT3 ou pT4a.

6.2.2 História Familiar

Um estudo caso-controle brasileiro realizado em 1995 por FOULKES WD *et. al.*, avaliaram a importância da história familiar positiva para neoplasias na incidência de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, mostrando um risco-relativo de 3,65 de desenvolver câncer de laringe se algum familiar de primeiro grau apresentar história de neoplasias malignas (FOULKES WD *et. al.*, 1995). Nesta série, apenas 13 pacientes (12,4%) apresentavam história familiar positiva de qualquer tipo de câncer. Entre esses dois grupos de pacientes, conforme a história familiar, a média de idade de surgimento da doença foi muito semelhante, com 62,1 anos a idade média no grupo de pacientes sem antecedentes familiares e 62,9 anos para o grupo com história mórbida familiar de neoplasias malignas.

Nesta amostra, esta semelhança etária entre estes dois grupos diminui a importância da história familiar de neoplasias malignas no desenvolvimento do câncer da laringe. A exposição a outros fatores de risco como o tabagismo e o etilismo é mais importante na carcinogênese, sendo este risco dependente da dose e do tempo de exposição.

6.2.3 Fatores de Risco

6.2.3.1 Tabagismo e Etilismo

Vários artigos relatam o tabagismo e o etilismo como os principais fatores de riscos para o desenvolvimento do câncer da laringe (TOMATIS L, 1990; TALAMINI R *et. al.*, 2002; WYNDER EL *et. al.*, 1976). O risco relativo do hábito do cigarro isolado chega a 13,2 (WYNDER EL *et. al.*, 1976), sendo ainda maior

quando associado ao etilismo (FLANDERS WD *et. al.*, 1982; TALAMINI R *et. al.*, 2002).

Neste trabalho, dos 105 pacientes, apenas 10 (9,5%) não faziam uso de cigarro nem ingeriam bebidas alcoólicas. Sessenta e sete pacientes (63,8%) eram etilistas e tabagistas, 26 pacientes (24,8%) fumavam e apenas 2 (1,9%) tinham o hábito isolado do etilismo. Neste grupo de estudo, houve uma tendência dos pacientes sem exposição aos principais fatores de risco ao câncer de laringe apresentarem a doença mais tardiamente, pois nenhum paciente do grupo não exposto a fator de risco tinha 50 anos de idade ou menos no momento do diagnóstico, sendo a idade média dos pacientes não expostos a fatores de risco 4,5 anos maior. A exposição ao tabagismo e etilismo não influenciaram na recidiva ($p = 0,25$) ou mortalidade ($p = 0,14$).

AGUDELO D *et. al.*, analisaram num estudo retrospectivo 933 pacientes com câncer de laringe, e concluíram que pacientes sem história de tabagismo e etilismo apresentavam idade média 10 anos maior, e mais frequentemente eram acometidos na região glótica que permite um diagnóstico mais precoce e melhor taxa de sobrevida (AGUDELO D *et. al.*, 1997).

6.3 Variáveis Cirúrgicas

6.3.1 Traqueostomia Prévia

A traqueostomia nem sempre é realizada durante o tratamento cirúrgico definitivo. Em um grande número dos casos, isto ocorre dias ou semanas antes da operação. Esta manipulação próxima à região do tumor pode estar relacionada com o aumento da recidiva local da doença (PRADIER *et. al.*, 1993). Nos casos de tratamento com intenção de preservação da laringe com radioterapia combinado com

quimioterapia, a presença da traqueostomia prévia ao tratamento definitivo esteve relacionada com uma pior resposta ao tratamento (FARIAS TP *et. al.*, 2007).

Neste trabalho, a presença de traqueostomia prévia não apresentou relação com a recidiva local da doença ($p = 0,39$). Dos 105 pacientes avaliados apenas 1 apresentou recidiva da doença no traqueostoma, sendo que este paciente havia sido submetido à traqueostomia prévia, foi estadiado como pT3 e submetido a radioterapia adjuvante devido à superfície tumoral.

A traqueostomia prévia, quando relacionada com a recidiva da doença independentemente do local desta recidiva e com a mortalidade, também não apresentou significância estatística ($p = 0,79$) / ($p = 0,44$). Resultados semelhantes são descritos por MARTIN-VILARES C e por PERA E, não sendo a traqueostomia prévia fator prognóstico de recidiva em 500 e 486 pacientes tratados com cirurgia, respectivamente (MARTÍN VC *et. al.*, 2000; PERA E *et. al.*, 1986).

6.3.2 Localização do Tumor

Dos 105 pacientes estudados, 72 eram tumores transglóticos, 18 acometiam a supraglote e apenas 15 localizavam-se na glote. DIAS *et. al.* relataram em seu estudo que 81,3% dos tumores tinham localização supraglótica e transglótica (DIAS FD, *et. al.*, 2000). Na nossa série, estas duas localizações corresponderam a 85,7% dos tumores, sem relação prognóstica com a recidiva ($p = 0,38$) nem com a mortalidade ($p = 0,96$).

A ausência de associação entre o local do tumor e o prognóstico da doença também foi descrita no trabalho de HOFFMAN *et. al.* de 2006, no qual foi analisada a sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de laringe T3N0 e T4N0

tratados entre 1994 e 1996. A sobrevida livre de doença em 5 anos em tumores T3N0 glóticos foi de 60%, muito semelhante aos 54% de sobrevida dos pacientes com o mesmo estágio localizados na supraglote. Em tumores T4N0, analisados no mesmo período, a sobrevida livre de doença foi de 52%, independentemente do subsítio (HOFFMAN HT *et. al.*, 2006).

6.3.3 Número de linfonodos ressecados

Apesar de este estudo avaliar apenas pacientes com ausência de metástases linfáticas no estudo anatomopatológico, o número de linfonodos ressecados no esvaziamento apresentou-se como um fator prognóstico. O grupo de pacientes com menos de 33 linfonodos ressecados tiveram maior índice de recidiva e mortalidade quando comparados aos pacientes que tiveram mais de 33 linfonodos ressecados junto ao produto dos esvaziamentos, tanto na análise univariada quanto na multivariada.

Na cirurgia de cabeça e pescoço, não existe uma determinação do número de linfonodos que devem ser ressecados dependendo do sítio do tumor primário, como ocorre em casos de tumores de estômago, onde o número mínimo é de 15 linfonodos, e em tumores de cólon e reto, onde no mínimo devem ser ressecados 12 linfonodos para o esvaziamento linfonodal ser considerado adequado (TNM, 2002).

O que existe na região da cabeça e pescoço é uma tendência a se considerar uma linfadenectomia adequada quando se resseca no mínimo 10 linfonodos no esvaziamento cervical radical e 6 linfonodos no esvaziamento seletivo (TNM, 2002), número que foi alcançado em todos os pacientes deste estudo, onde o número menor de linfonodos ressecados foi onze.

Existem contradições a respeito desta variável da literatura. Se, por um lado, alguns trabalhos evidenciam melhor sobrevida em pacientes onde é ressecado um número maior de linfonodos, por outro há uma tendência de linfadenectomias cada vez mais seletivas em pacientes sem metástases linfonodais diagnosticadas clinicamente (GALLO O *et. al.*, 2006; FERLITO A *et. al.*, 2008b).

6.3.4 Grau de Diferenciação Tumoral

Mais de 90% dos pacientes deste estudo apresentavam tumores moderadamente diferenciados. O grau de diferenciação tumoral não apresentou relação com a sobrevida ou com a mortalidade neste grupo de estudo. Semelhantes resultados foram descritos por DANIC *et. al.* em 2000 onde o grau de diferenciação tumoral não foi indicador prognóstico de sobrevida global ($p = 0,988$) em 63 pacientes com câncer de laringe (DANIC D, *et. al.*, 2000). GEELEN *et. al.* em 1995 relataram que o grau de diferenciação quando pouco diferenciado ou indiferenciado esteve relacionado à pior sobrevida livre de doença quando comparado aos tumores bem ou moderadamente diferenciados (GEELEN CP, *et. al.*, 1995).

6.3.5 Superfície Tumoral

A maior superfície tumoral dos pacientes avaliados neste estudo apresentou uma tendência a maior mortalidade ($p = 0,09$). Dos 29 pacientes que evoluíram ao óbito durante o tempo de estudo, 20 (68,9%) apresentavam superfície tumoral maior que 900 mm².

Esta variável é pouco considerada nos casos de tratamento cirúrgico no câncer da laringe, sendo que a maioria dos trabalhos utiliza o volume tumoral, variável

aferida em exame radiológico de tomografia como fator preditivo de resposta ao tratamento radioterápico, associado ou não à quimioterapia.

HERMANS *et. al.* em 1999, avaliou em exames de tomografia o volume tumoral em 103 pacientes com carcinoma epidermoide supraglótico. Neste estudo um maior volume tumoral medido na tomografia computadorizada esteve relacionado com uma maior recidiva local da doença ($p < 0,001$) (HERMANS R, *et. al.*, 1999).

6.3.6 Infiltrado Inflamatório

Nossos resultados evidenciaram que a presença de infiltrado inflamatório no tumor, não apresentou relação com a recidiva da doença ($p = 0,26$) nem com a mortalidade ($p = 0,27$).

GALLO *et. al.* investigaram 88 pacientes com carcinoma epidermoide de laringe e relataram que o infiltrado inflamatório foi um fator prognóstico favorável no grupo de pacientes estudado (GALLO O, *et. al.*, 1991).

6.3.7 Invasão de Cartilagem e de Estruturas Adjacentes

Na nossa série, invasão de cartilagem e de estruturas adjacentes não apresentaram relação com a recidiva, com o valor de $p = 0,17$ e $0,43$, respectivamente. Quando estas variáveis foram relacionadas com a mortalidade, apresentaram significado estatístico com o valor de $p = 0,04$ e $0,05$, respectivamente.

FAGAN *et. al.* em 1998 analisaram 104 pacientes com tumores de laringe estadiados como pT3 ou pT4, não evidenciando relação entre a invasão de cartilagem

e a recidiva local, regional, metástases a distância e a sobrevida dos pacientes (FAGAN JJ *et. al.*, 1998).

6.3.8 Invasão Vascular e Perineural

Nos 105 pacientes deste estudo, a presença de invasão vascular e perineural foi encontrada em apenas 13 pacientes (12,4%), não sendo estas variáveis um fator prognóstico na evolução da doença.

FAGAN *et. al.* em 1998 relataram a presença de invasão perineural em 74 de 142 pacientes (52,1%), associada à maior recidiva local e mortalidade, além de maior índice de metástase linfonodal (FAGAN JJ *et. al.*, 1998).

YILMAZ *et. al.* em 1998 descreveram que a invasão vascular e perineural sempre devem ser avaliadas nos produtos das laringectomias, pois influenciam significativamente a recidiva e a sobrevida livre de doença (YILMAZ T *et. al.*, 1998).

6.4 Evolução Prognóstica

Na nossa casuística, 25 (23,8%) pacientes apresentaram recidiva da doença durante o período de seguimento do estudo, sendo que a recidiva local ocorreu em 8 (7,6%) pacientes e a distância em 13 (12,4%).

Em 12 (11,4%) pacientes desta série a recidiva locorregional foi evidenciada. Esta ocorrência de recidiva foi semelhante ao do grupo de pacientes com tumores T3 e T4 tratados com cirurgia associado à radioterapia no estudo de YUEN *et. al.* de 1984, onde a recidiva locorregional ocorreu em 9% e 6% dos casos de tumores T3 e T4 respectivamente. A recidiva locorregional foi menor comparada ao grupo tratado

com cirurgia isoladamente, onde a recidiva locorregional foi de 16% e 31% nos tumores T3 e T4 respectivamente (YUEN A *et. al.*, 1984).

RAZACK *et. al.* em 1989 relataram uma recidiva maior, comparado à esta série. Pouco mais de 50% dos 128 pacientes T3 e T4 tratados com laringectomia total e esvaziamento cervical apresentaram recidiva locorregional. Neste mesmo trabalho a incidência de metástases à distância foi de 7%, aproximadamente a metade da incidência encontrada na casuística desta tese onde as metástases a distância ocorreram em 13 (12,4%) casos (RAZACK MS *et. al.*, 1989).

Onze a 12% também foi a incidência de metástases a distância nos trabalhos publicados por SESSIONS *et. al.*, IDASIAK *et. al.* e por SPECTOR *et. al.* em 2002, 2008 e 2004 respectivamente. Os sítios das metástases que ocorreram no nosso grupo de estudo também foram iguais comparados à literatura sendo o local mais frequente os pulmões, seguidos dos ossos, fígado e cérebro (SESSIONS DG *et. al.*, 2002; IDASIAK A *et. al.*, 2008; SPECTOR GJ *et. al.*, 2004).

SPECTOR *et. al.* em 2004 e SESSIONS *et. al.* em 2002 relataram uma incidência de 9% e 19,5% de segundo tumor primário, respectivamente (SESSIONS DG *et. al.*, 2002; SPECTOR GJ *et. al.*, 2004). Na nossa casuística de 105 pacientes, 3 (2,8%) apresentaram segundo tumor primário, sendo em 2 deles em regiões onde os fatores de risco eram os mesmos dos tumores da laringe, como a orofaringe (1 caso), e esôfago (1 caso).

A sobrevida livre de doença no grupo estudado foi de 73% em 5 anos.

TAMURA *et. al.* em 2007, analisaram 130 casos de câncer de laringe com estágio III e IV tratados com laringectomia total associada à linfadenectomia cervical e apresentaram uma sobrevida livre de doença de 100 e 68% em 5 anos,

respectivamente. Na nossa casuística a sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 80 e 69% nos estágios III e IV respectivamente (TAMURA Y *et. al.*, 2007).

6.5 Reatividade Linfonodal

A evolução do tumor maligno é o resultado da oposição de fatores de agressividade do tumor e de resistência do hospedeiro (BURNET FM, 1967). Estudos baseados nesta interação entre o tumor e o hospedeiro têm ganhado popularidade em câncer de cabeça e pescoço (ALBERTY J & WARDELMANN E, 2001).

O hospedeiro apresenta defesas imunológicas a algumas doenças malignas. Dessa forma, parâmetros dos quais refletem a defesa do hospedeiro podem ser preditivos de sobrevida (BERLINGER NT *et. al.*, 1976).

O paciente não é apenas um participante passivo na carcinogênese e no crescimento tumoral. A linfadenite reativa encontrada em alguns pacientes com tumores malignos consiste numa proliferação de tecido linfático e uma resposta imunológica ativa do hospedeiro ao tumor maligno (STANKIEWICZ C *et. al.*, 1994).

Poucos estudos, analisando esta relação tumor-hospedeiro, nos apresentam grupos homogêneos que foram submetidos ao mesmo tipo de tratamento. (PATT BS *et. al.*, 1993).

O uso da reatividade linfonodal como fator prognóstico esbarra na dificuldade de categorizar adequadamente diferentes pacientes com reatividade heterogênea.

O método de análise da reatividade linfonodal é muito difícil e um dos principais motivos disso é o fato da análise dos linfonodos ser mais subjetiva que

objetiva (POHRIS E *et. al.*, 1987). A reatividade dos linfonodos pode variar conforme a distância entre o tumor e os linfonodos, a presença de infecção, as condições nutricionais do paciente e a subjetividade da análise dos linfonodos (AMAR A *et. al.*, 2001).

A avaliação da reatividade linfonodal, visa a avaliar de maneira indireta a resposta imunológica do hospedeiro à presença do tumor maligno.

A linfadenite reativa em pacientes com câncer consiste na resposta imunológica do hospedeiro ao tumor maligno. Em contraste a isso, um linfonodo normal ou com depleção representa uma manifestação morfológica da perda de reatividade do sistema linfático no desenvolvimento do tumor, sendo o linfonodo estimulado um fator prognóstico favorável (STANKIEWICZ C *et. al.*, 1994).

Na casuística deste trabalho, dos 105 casos, 50 (47,6%) apresentaram o padrão de histiocitose sinusal na maioria dos linfonodos ressecados. O segundo padrão mais frequente foi a hiperplasia paracortical, sendo predominante em 35 casos (33,3%). A hiperplasia folicular foi o padrão mais comum em 20 pacientes (19,1%). A hiperplasia folicular foi o padrão de reatividade mais freqüente nos linfonodos do estudo de CERNEA *et. al.*, onde dos 26 pacientes com carcinoma epidermoide de boca, 13 (50%) apresentavam a predominância de folículos primários no córtex linfonodal (CERNEA CR *et. al.*, 1997). Neste estudo o segundo padrão mais freqüente foi a histiocitose sinusal, e o grupo de pacientes com predomínio de linfonodos estimulados (hiperplasia folicular e paracortical) apresentou uma menor recidiva da doença (23% dos casos) e melhor sobrevida livre de doença em 5 anos (73%), resultados estes com significância estatística ($p < 0,05$).

Neste estudo, o padrão de reatividade linfonodal não apresentou relação significativa estatisticamente com a recidiva da doença e com a mortalidade. Um dos motivos que corroboram com este achado é o fato de os padrões de reatividade linfonodal serem bastante variados, dentro do mesmo caso. Existiram casos onde um padrão de reatividade linfonodal predominava intensamente sobre os outros, no entanto, em certos pacientes, era encontrado todos os tipos de hiperplasia com leve predomínio de uma das formas. Na tentativa de uniformizar melhor os padrões, os pacientes foram divididos conforme a imunidade estimulada e a presença ou não de estímulo linfonodal.

RING *et. al.* em 1985, estudaram 43 pacientes com câncer de assoalho de boca. Neste trabalho, a histiocitose sinusal esteve relacionada com melhor prognóstico comparado aos pacientes com hiperplasia paracortical (RING AH *et. al.*, 1985). PATT BS *et. al.* em 1993, encontraram resultados semelhantes. Em 48 pacientes com câncer de laringe, o grupo com metástase linfonodal no estudo anatomopatológico com padrão de histiocitose sinusal na maioria dos linfonodos, apresentou uma melhor sobrevida ($p = 0,007$) (PATT BS, *et. al.*, 1993).

Em câncer de mama, BLACK, em 1953, um dos pioneiros no estudo da reatividade linfonodal, evidenciou que os pacientes que apresentavam um maior grau de histiocitose nos linfonodos dos produtos dos esvaziamentos axilares também apresentavam uma melhor sobrevida (BLACK MM *et. al.*, 1953).

Resultados diferentes são descritos na literatura. BENNET *et. al.* em 1971, descreveram 84 pacientes com câncer de laringe e hipofaringe, onde a hiperplasia folicular no grupo de pacientes pN+ e com grau de diferenciação III ou IV apresentaram um melhor prognóstico (BENNET SH *et. al.*, 1971).

FERNANDEZ-NOGUEIRAS *et. al.* em 1992 não encontraram relação entre o padrão de reatividade linfonodal e a sobrevida em 5 anos dos pacientes com câncer de laringe, assim como AMAR *et. al.* que estudaram 19 pacientes com tumor primário oculto, não sendo encontrada relação entre a reatividade linfonodal e o prognóstico deste grupo de pacientes (FERNANDEZ-NOGUEIRA FJ *et. al.*, 1992; AMAR A, *et. al.*, 2001).

O aspecto microscópico no linfonodo de drenagem é importante na compreensão do sistema imunológico no controle das células malignas. Os linfonodos que se encontram com padrão de hiperplasia folicular ou paracortical, mostram indiretamente um sinal de resposta imunológica ao tumor. Já a histiocitose sinusal, quando predomina no linfonodo, corresponde à proliferação de macrófagos, que é uma célula não específica de imunidade humoral ou celular (POHRIS E *et. al.*, 1987).

Neste estudo, quando divididos os pacientes em dois grupos conforme o estímulo no linfonodo, sendo um grupo formado pelos pacientes onde a maioria dos linfonodos ressecados apresentava o padrão de hiperplasia folicular ou paracortical, isto é, linfonodos estimulados, e outro grupo formado pelos pacientes onde a maioria dos linfonodos apresentava um predomínio de histiocitose sinusal, isto é, não estimulados, e comparados com a recidiva e mortalidade, não houve relação com significância estatística. Baseado neste achado, não podemos afirmar que o sistema imunológico não apresenta importância na evolução da doença neoplásica da laringe. A presença de linfonodos estimulados é apenas uma aferição indireta da resposta imunológica do paciente ao tumor, pois ele pode não apresentar estímulo linfonodal e

apresentar aumento de linfócitos circulantes que também demonstram participação do sistema imunológico na defesa do hospedeiro ao tumor.

STARSKA *et. al.* em 2003 estudaram 179 casos de câncer de laringe, concluindo que pacientes que apresentavam linfonodos sem sinais de estímulo imunológico apresentavam um pior prognóstico (STARSKA K *et. al.*, 2003).

BERLINGER *et. al.* analisaram 84 pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço, sendo evidenciada uma sobrevida em 5 anos significativamente maior no grupo de pacientes com sinais de estímulo imunológico no estudo anatomopatológico dos linfonodos ressecados (BERLINGER NT *et. al.*, 1976).

POHRIS *et. al.* em 1987, avaliaram 107 pacientes com câncer de laringe em diferentes estágios, variando desde o estágio II ao IV. Este grupo relatou uma sobrevida livre de doença em 5 anos melhor no grupo de pacientes com linfonodos estimulados, isto é, com hiperplasia folicular ou paracortical (POHRIS E *et. al.*, 1987).

A região paracortical do linfonodo é o principal sítio de proliferação de linfócitos na resposta imune celular, estando presente nesta região um número aumentado de grandes células linfóides (COTTIER H *et. al.*, 1973; FERLITO A *et. al.*, 1979).

Os centros germinativos estão sempre relacionados com a imunidade humoral, isto é, com a produção de anticorpos (COTTIER H *et. al.*, 1973; FERLITO A *et. al.*, 1979).

A histiocitose sinusal apresenta um predomínio de macrófagos e histiócitos, não sendo específica de resposta imunológica humoral ou celular (POHRIS E *et. al.*, 1987).

Se caracterizada hiperplasia paracortical como resposta imune celular e hiperplasia folicular como resposta imune humoral, e analisada este tipo de resposta imunológica presente no linfonodo ao prognóstico do paciente, o grupo de pacientes com sinais de resposta humoral na maioria dos linfonodos apresentou uma maior mortalidade com significância estatística ($p = 0,05$) comparado aos pacientes com resposta imune celular. Já a recidiva da doença, não apresentou relação com significância estatística com o tipo de resposta imunológica à presença do tumor, apesar do maior número de recidiva no grupo de resposta imune humoral, que ocorreu em 41,9% dos casos comparados a 24,4% de recidiva nos casos de resposta imune celular ($p = 0,34$). O aumento de linfócitos T *helper* está associado com a resposta imune humoral. Estas células relacionam-se com mecanismos de escape tumoral durante o desenvolvimento neoplásico, podendo justificar a relação com a maior mortalidade e um maior número de recidiva neste grupo de pacientes.

Relacionando o padrão de reatividade linfonodal com o tipo de recidiva, houve uma distribuição bastante homogênea entre o tipo de hiperplasia e o local da recidiva da doença, não havendo relação com significância estatística nesta análise.

A subjetividade do método e grupos heterogêneos de pacientes são alguns dos motivos dos diferentes prognósticos relacionados com a reatividade linfonodal. No intuito de diminuição deste viés, selecionamos um grupo de pacientes bastante homogêneo, com o mesmo tipo de doença e semelhantes indicações terapêuticas além da amostra ser composta por um número significativo de pacientes. Todas as lâminas foram examinadas por apenas dois examinadores e os casos onde houve discordância de qual padrão predominava nos linfonodos ressecados, foram analisados em conjunto até um consenso.

A importância do sistema imunológico na evolução das neoplasias malignas não deve ser discutida, os questionamentos são a respeito de como aferir a participação da defesa do hospedeiro no prognóstico da doença. Muitas são as maneiras de ação do sistema imunológico durante a carcinogênese, e muitos são os mecanismos de escape que facilitam o desenvolvimento do câncer. Um destes mecanismos envolve o aumento do número de linfócitos T *helper 2*, que são relacionados com a imunidade humoral.

No estudo de KOBAYASHI M *et. al.* a administração de células T *helper 2* produzidas no baço de ratos que tiveram injetados uma colônia de células de melanoma altamente metastatizante, em ratos com células de melanoma menos agressivas, fizeram com que estas cobaias desenvolvessem um número de metástases pulmonares semelhantes ao grupo que recebeu células agressivas, apenas pelo aumento de células T *helper 2* relacionados com imunidade humoral e mecanismos de escape para o desenvolvimento da doença neoplásica (KOBAYASHI M *et. al.*, 1998). Este relato corrobora com os resultados desta tese, onde o estímulo da imunidade humoral apresentou maior mortalidade com significância estatística.

6.6 Micrometástases e Inclusões Epiteliais Benignas

Na literatura, as micrometástases são muito mais discutidas comparadas às inclusões epiteliais benignas, sendo a diferenciação entre elas pouco elucidada.

Apesar dos linfonodos não se originarem de tecido epitelial, podem apresentar inclusões de epitélio glandular salivar e tireoideano em situações benignas, não necessariamente traduzindo doença epitelial metastática (RESETKOVA E *et. al.*, 2003).

A utilização do clone de citoqueratinas AE1/AE3 é o método imunohistoquímico mais utilizado e considerado por vários artigos a positividade para este clone de citoqueratinas como positivo para micrometástases (BECKER MT *et. al.*, 2004; RHEE D *et. al.*, 2002).

Este clone AE1/AE3 marca de maneira ampla a natureza epitelial da célula localizada no linfonodo. A utilização de citoqueratinas mais específicas visam a diferenciação da origem das células epiteliais marcadas no estudo imunohistoquímico. As citoqueratinas CK 5/6 marcam camadas estratificadas da epiderme, não marcando epitélios simples. Já a CK 7 relaciona-se com os adenocarcinomas de origem em epitélio glandular (CHU PG & WEISS LM, 2002).

No nosso trabalho, a incidência de casos positivos na pesquisa de citoqueratinas utilizando o clone AE1/AE3 foi de 16,2%, apresentando uma frequência dentro da média encontrada na literatura, que descreve uma prevalência entre 5 e 58% dos casos (DEVANEY KO *et. al.*, 2007; CONNOLLY JL *et. al.*, 2006; HERMANEK P *et. al.*, 1999a; HERMANEK P *et. al.*, 1999b; VOGL T & BISDAS S, 2007; FERLITO A *et. al.*, 2001; BARRERA JE *et. al.*, 2003; BECKER MT *et. al.*, 2004; RINALDO A *et. al.*, 2004; KOCATÜRK S *et. al.*, 2003).

A pesquisa com citoqueratina AE1/AE3, quando associada com a recidiva da doença, recidiva regional, locorregional e mortalidade, apresentou relação com significância estatística, resultado semelhante aos descrito por YAMAZAKI no estudo de câncer de boca onde relacionou a presença de micrometástases diagnosticadas com o clone AE1/AE3 com pior prognóstico, sendo indicativo de radioterapia (YAMAZAKI Y *et. al.*, 2005).

Quando separados os paciente em dois grupos conforme a pesquisa de citoqueratina AE1/AE3, no grupo onde a pesquisa foi positiva, a radioterapia apresentou-se como um fator protetor da recidiva regional ($p = 0,06$). Isto poderia ser explicado se em todos os casos positivos para o clone AE1/AE3 fossem devido a metástases, pois as células epiteliais metastáticas são radiosensíveis, no entanto como não se tratava de metástases em todos os casos, este achado deve ser considerado como coincidência.

Quando utilizada a pesquisa com CK 5/6, a incidência definitiva de micrometástases foi de apenas 3,8% (4 casos), estando esta incidência próxima aos limites inferiores relatados na literatura (DEVANEY KO *et. al.*, 2007; CONNOLLY JL *et. al.*, 2006; HERMANEK P *et. al.*, 1999a; HERMANEK P *et. al.*, 1999b; VOGL T & BISDAS S, 2007; FERLITO A *et. al.*, 2001; BARRERA JE *et. al.*, 2003; BECKER MT *et. al.*, 2004; RINALDO A *et. al.*, 2004; KOCATÜRK S *et. al.*, 2003) e sem relação com o prognóstico da doença.

Em outros 4 casos (3,8%) a pesquisa positiva pela imuno-histoquímica para CK 7 confirmou como inclusões epiteliais benignas. Além destes casos, outros 7 pacientes, onde a pesquisa de CK 5/6 e CK 7 foram negativas, também foram considerados como inclusões epiteliais benignas baseadas na morfologia das células coradas na pesquisa com AE1/AE3, totalizando 11 casos (10,47%) com inclusões epiteliais que não se tratavam de metástases.

Os resultados deste trabalho mostram que a utilização do clone AE1/AE3 para o diagnóstico de micrometástases é questionável. Este marcador também é descrito na pesquisa de micrometástase em linfonodo sentinela (TOMIFUGI M *et. al.*, 2008), podendo a acurácia de este método ser menor que o descrito caso realizasse uma

pesquisa no linfonodo sentinela com um marcador mais específico como a citoqueratina 5/6.

A maioria dos casos que foram positivos para células epiteliais não se tratava de micrometástases, mas sim de inclusões epiteliais benignas. Assim, esta presença de “micrometástases” que é considerada na literatura como associada com maior recidiva e mortalidade, pode ser apenas uma coincidência, pois a presença de células epiteliais benignas no linfonodo provavelmente não irá influenciar na evolução da doença neoplásica da laringe.

A confirmação das micrometástases com o uso da CK 5/6 ocorreu em 4 casos. Em outros 2 casos o conjunto de células coradas encontrava-se fora da cápsula linfonodal, não podendo ser secundário a ruptura da cápsula do linfonodo pois não havia células coradas dentro do linfonodo, sendo esta marcação secundária a manipulação trans ou pós-operatória do produtos dos esvaziamentos e do tumor primário. Isto pode ocorrer, pois no mesmo momento que é realizado a clivagem do tumor primário para análise anatomopatológica, é realizado a dissecação dos linfonodos, podendo ser implantadas algumas células tumorais no tecido perilinfonodal, mas não dentro da cápsula do linfonodo, como ocorre na doença linfonodal metastática.

A ausência de importância prognóstica das micrometástases pode estar relacionada com o baixo número de pacientes acometidos. No entanto apesar deste achado infrequente, em apenas 3,81% da amostra, isto não ocorreu devido a uma pequena casuística, mas sim pela baixa frequência que as micrometástases ocorrem quando investigadas de maneira mais detalhada como foi feito com o uso das citoqueratinas 5/6 e 7.

Talvez uma das maiores contribuições deste estudo seja a caracterização destas inclusões epiteliais benignas nos linfonodos pesquisados para micrometástases em câncer de laringe. De fato, existem poucos relatos sobre este fenômeno na literatura mundial.

7.0 Conclusões

7.1 Pacientes com sinais de estímulo da imunidade celular (hiperplasia paracortical) apresentaram menor mortalidade comparado aos pacientes com predomínio de resposta imune humoral (hiperplasia folicular) ($p = 0,05$).

O padrão de reatividade linfonodal analisados isoladamente não apresentou relação com a recidiva da doença ou com a mortalidade.

7.2 A presença de células epiteliais nos linfonodos estudados ocorreu em 17 casos (16,2%). Esta positividade no estudo imuno-histoquímico utilizando o clone AE1/AE3 apresentou relação com significância com a recidiva ($p = 0,03$) e com a mortalidade ($p = 0,04$).

7.3 A incidência de micrometástases na pesquisa com CK 5/6 foi de 3,86% (4 casos de 105), sem relação prognóstica com a doença.

8.0 Inferências

A incidência de inclusões epiteliais benignas foi de 10,47% (11 casos de 105).

9.0 Referências Bibliográficas

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**. 1996;383:787-93.

Ackerman LV, Del Regato JA. **Cancer, diagnosis, treatment, and prognosis**. Saint Louis: Mosby Company; 1962.

Agudelo D, Quer M, León X, Díez S, Burgués J. Laryngeal carcinoma in patients without a history of tobacco and alcohol use. **Head Neck**. 1997;19:200-4.

Alberty J, Wardelmann E. Histomorphologic reaction patterns in cervical lymph nodes of different neck sites. **Lymphology**. 2001;34(2):77-83.

Amar A, Rosa MP, Rapoport A, Magalhães MR, Carvalho MB. Reatividade linfonodal com metástase cervical de tumor primário oculto – Estudo de 24 pacientes. **Rev Col Bras Cir**. 2001;28:193-7.

Ambrosch P, Kron M, Fischer G, Brinck U. Micrometastases in carcinoma of the upper aerodigestive tract: detection, risk of metastasizing, and prognostic value of depth of invasion. **Head Neck**. 1995;17:473-9.

Arap MA, Pasqualini R, Arap W. Mecanismos de metástases e angiogênese. In: Ferreira CG, Rocha JC. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu; 2004, p. 97-103.

Arap W, Haedicke W, Bernasconi M, Kain R, Rajotte D, Krajewski S, Ellerby HM, Bradesen DE, Pasqualini R, Ruoslahti E. Targeting the prostate for destruction through a vascular address. **Proc Natl Acad Sci, USA**. 2002;99:1527-31.

Arap W, Kolonin MG, Trepel M, Lahdenranta J, Cardó-Vila M, Giordano RJ, Mintz PJ, Ardelt PU, Yao VJ, Vidal CI, Chen L, Flamm A, Valtanen H, Weavind LM, Hicks M, Pollock RE, Botz GH, Bucana CD, Koivunen E, Cahill D, Troncoso P, Baggerly KA, Pentz RD, Do KA, Logothetis CJ, Pasqualini R. Steps toward mapping the human vasculature by phage display. **Nat Med**. 2002;8:121-7.

Balch CM, Soon SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMaster KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Cort DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morobito A. Prognostic factors analysis of 17.600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging System. **J Clin Oncol**. 2001;19:3622-34.

Barrera JE, Miller ME, Said S, Jafek BW, Campana JP, Shroyer KR. Detection of occult cervical micrometastases in patients with head and neck squamous cell cancer. **Laryngoscope**. 2003;113:892-6.

Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, Leek RD, Moorre J, van Trappen P, Cox G, Harris AL, Jackson DG. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. **Cancer Res**. 2002;62:1315-20.

Becker MT, Shores CG, Yu KK, Yarbrough WG. Molecular assay to detect metastatic head and neck squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. 2004;130:21-7.

Bennett SH, Futrell JW, Roth JA, Hoye RC, Ketcham AS. Prognostic significance of histologic host response in cancer of the larynx or hypopharynx. **Cancer**. 1971;28:1255-65.

Berlinger NT, Tsakraklides V, Pollak K, Adams GL, Yang M, Good RA. Immunologic assessment of regional lymph node histology in relation to survival in head and neck carcinoma. **Cancer**. 1976;37:697-705.

Berrino F, Crosignani P. Epidemiology of malignant tumors of the larynx and lung. **Ann Ist Super Sanita**. 1992;28:107-20.

Berrino F, Richiardi L, Boffetta P, Estève J, Belletti I, Raymond L, Troschel L, Pisani P, Zubini L, Ascunce N, Gubéran E, Tuyns A, Terracini B, Merletti F, Millan JEM Working Group. Occupation and larynx and hypopharynx cancer: a job-exposure matrix approach in an international case-control study in France, Italy, Spain and Switzerland. **Cancer Causes Control**. 2003;14:213-23.

Black MM, Kerpe S, Speer FD. Lymph node structure in patients with cancer of the breast. **Am J Path**. 1953;29:505-21.

Black MM, Speer FD. Lymph node reactivity in cancer patients. **Surg Gynecol Obstet**. 1960;110:477-87.

Blair VP, Brown JB. The treatment of cancerous or potentially cancerous cervical lymph-nodes. **Ann. Surg**. 1933;98:650-61.

Blanco EC, González FB, García BR, Marina RA, Ramos KC, Muñoz GH, Gómez A. Chondrosarcomas of the larynx: diagnostic and therapeutic controversies. **An Otorrinolaringol Ibero Am**. 2005;32:515-5.

Bocca E, Pignataro O. A conservation technique in radical neck dissection. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol**. 1967;76:975-87.

Bosetti C, La Vecchia C, Talamini R, Negri E, Levi F, Dal Maso L, Franceschi S. Food groups and laryngeal cancer risk: a case-control study from Italy and Switzerland. **Int J Cancer**. 2002;100:355-60.

Brazilian Head and Neck Cancer Study Group. End results of a prospective trial on elective lateral neck dissection vs type III modified radical neck dissection in the management of supraglottic and transglottic carcinomas. **Head Neck**. 1999;21:694-702.

Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, Goodman SN, Sidransky D. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med**. 1995;332:429-35.

Brown RB, Gaillard RA, Turner JA. The significance of aberrant or heterotopic parotid gland tissue in lymph nodes. **Ann Surg**. 1953;138:850-6.

Buckley JG, MacLennan K. Cervical node metastases in laryngeal and hypopharyngeal cancer: a prospective analysis of prevalence and distribution. **Head Neck**, vol. 22, p. 380-385, 2000.

Burch JD, Howe GR, Miller AB, Semenciw R. Tobacco, alcohol, asbestos, and nickel in the etiology of cancer of the larynx: a case-control study. **J Natl Cancer Inst**. 1981;67:1219-24.

Burnet FM. Immunological aspects of malignant disease. **Lancet**. 1967;3:1171-4.

Byers RM. Modified neck dissection. A study of 967 cases from 1970 to 1980. **Am J Surg**. 1985;150:414-21.

Cachin Y, Eschwege F. Combination of radiotherapy and surgery in the treatment of head and neck cancers. **Cancer Treat Rev**. 1975;2:177-91.

Cady B. Lymph node metastases. Indications, but not governors of survival. **Arch Surg**. 1984;119: 167-72, 1984.

Çagli S, Yüce I, Güney E. Is routine inclusion of level IV necessary in neck dissection for clinically N0 supraglottic carcinoma? **Otolaryngol Head Neck Surg**. 2007;136:287-90.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**. 2000;407:249-57.

Cernea C, Montenegro F, Castro I, Cordeiro A, Gayotto L, Ferraz A, de Carlucci D Jr. Prognostic significance of lymph node reactivity in the control of pathologic negative node squamous cell carcinomas of the oral cavity . **Am J Surg.** 1997;174:548-51.

Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasm. **Histopathology.** 2002;40:403-39.

Chung AS, Yoon SO, Park SJ, Roles of matrix metalloproteinases in tumour metastasis and angiogenesis. **J Biochem Mol Biol.** 2003;36:128-37.

Clare SE, Sener SF, Wilkens W, Goldschmidt R, Merkel D, Winchester DJ. Prognostic significance of occult lymph node metastases in node-negative breast cancer. **Ann Surg Oncol.** 1997;4:447-51.

Clarijs R, Ruiter DJ, De Waal RM. Lymphangiogenesis in malignant tumors: does it occur? **J Pathol.** 2001;193:143-6.

Close LG, Brown PM, Vutich MF, Reisch J, Schaefer SD. Microvascular invasion and survival in cancer of the oral cavity and oropharynx. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 1989;115:1304 –9.

Cochran AJ, Pihl E, Wen DR, Hoon DS, Korn EL. Zoned immune suppression of lymph nodes draining malignant melanoma: histologic and immunohistologic studies. **J Natl Cancer Inst.** 1987;78:399-405.

Connolly JL. Changes and problematic areas in interpretation of the AJCC cancer staging manual, 6th edn, for breast cancer. **Arch Pathol Lab Med.** 2006;130:287–91.

Cortesina G, Martone T, Galeazzi E, Olivero M, De Stefani A, Bussi M, Valente G, Comoglio PM, Di Renzo MF. Staging of head and neck squamous cell carcinoma using the MET oncogene product as marker of tumor cells in lymph node metastases. **Int J Cancer.** 2000;89:286–92.

Coskun HH, Erisen L, Barut O. Selective neck dissection for clinically N0 neck in laryngeal cancer: is dissection of level IIb necessary? **Otolaryngol Head Neck Surg.** 2004;131:655-9.

Cottier, H, Turk J, Sobin L. A proposal for a standardized system of reporting human lymph node morphology in relation to immunological function. **J Clin Path.** 1973;26:317-31.

Crawford HC, Matrisian LM. Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. **Invasion Metastasis.** 1994;14:234-45.

Crile G. Excision of cancer of the head and neck. With special reference to the plan of dissection based on one hundred and thirty-two operations. **JAMA**. 1906;47:1780-6.

Crosignani P, Russo A, Tagliabue G, Berrino F. Tobacco and diet as determinants of survival in male laryngeal cancer patients. **Int J Cancer**. 1996;65:308-13.

Danic D, Maruic M, Uzarevic B, Milicic D. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec**. 2000;62:143-8.

Daniel E, McGuirt F. Neck masses secondary to heterotopic salivary gland tissue: a 25-year experience. **Am J Otolaryngol Head Neck Med Surg**. 2005;26:96-100.

Davies L, Welch HG. Epidemiology of head and neck cancer in the United States. **Otolaryngol Head Neck Surg**. 2006;135:451-77.

De Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, Brennan P, Ronco A, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M. Plant foods and risk of laryngeal cancer: A case-control study in Uruguay. **Int J Cancer**. 2000;87:129-32.

De Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, Ronco A, Kogevinas M, Mendilaharsu M. Occupation and the risk of laryngeal cancer in Uruguay. **Am J Ind Med**. 1998;33:537-42.

De Stefani E, Oreggia F, Rivero S, Ronco A, Fierro L. Salted meat consumption and the risk of laryngeal cancer. **Eur J Epidemiol**. 1995;11:177-80.

Devaney KO, Rinaldo A, Ferlito A. Micrometastases in cervical lymph nodes from patients with squamous carcinoma of the head and neck: should they be actively sought? Maybe. **Am J Otolaryngol**. 2007;28:271-4.

Dias FL, Lima RA, Kligerman J, Freitas EQ, Barbosa MM, Farias TP, Chagas MJ. Prognostic significance of cartilage invasion in surgically treated advanced laryngeal cancer (abstract). Final Program and Abstract Book – 5th **International Conference on Head and Neck Cancer**, 2000.

Dias FL, Lima RA, Kligerman J, Cernea C. Therapeutic options in advanced laryngeal cancer: an overview. **ORL**. 2005;67:311-8.

Dietz A, Ramroth H, Urban T, Ahrens W, Becher H. Exposure to cement dust, related occupational groups and laryngeal cancer risk: results of a population based case-control study. **Int J Cancer**. 2004;108:907-11.

Drake CG, Pardoll DM. Tumor immunology – towards a paradigm of reciprocal research. **Sem Cancer Biol.** 2002;12:73-80.

Elsheikh MN, Mahfouz ME, Salim EI, Elsheikh EA. Molecular assessment of neck dissections supports preserving level IIB lymph nodes in selective neck dissection for laryngeal squamous cell carcinoma with a clinically negative neck. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.** 2006;68:177-84.

Elwood JM, Pearson JC, Skippen DH, Jackson SM. Alcohol, smoking, social and occupational factors in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. **Int J Cancer.** 1984;34:603-12.

Enepekides DJ, Sultanem K, Nguyen C, Shenanda G, Black MJ, Rochon L. Occult cervical metastases: immunoperoxidase analysis of the pathologically negative neck. **Otolaryngol Head Neck Surg.** 1999;120:713-17.

Estève J, Riboli E, Péquignot G, Terracini B, Merletti F, Crosignani P, Ascunce N, Zubiri L, Blanchet F, Raymond L, Repetto F, Tuyns AJ. Diet and cancers of the larynx and hypopharynx: the IARC multi-center study in southwestern Europe. **Cancer Causes Control.** 1996;7:240-52.

Fagan JJ, D'Amico F, Wagner RL, Johnson JT. Implications of cartilage invasion in surgically treated laryngeal carcinoma. **Head Neck.** 1998;20(3):189-92.

Farias TP, Dias FD, Fonseca TC, Manfro G, Gisler ICS, Costa ALC, Zdanowski R, Fernandes KL, Peryassu BC. Análise de fatores clínicos, histopatológico e moleculares (p53, Ki-67 e PCNA) preditivos de resposta terapêutica à quimioterapia e radioterapia em pacientes com carcinoma espinocelular de laringe e orofaringe. **Rev Bras Cir Cabeça Pescoço.** 2007;36:131-9.

Feinmesser R, Freeman JL, Feinmesser N, Noyek A, Mullen JB. Role of modern imaging in decision-making for elective neck dissection. **Head Neck.** 1992;14:173-6.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Globocan 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Version 1. Cancer base No. 5. Lyon: IARC Press; 2001. Available from URL: <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.html>. Accessed in 2004 (Aug 4).

Ferlito A, Bertino G, Rinaldo A, Mannarà GM, Devaney KO. A review of heterotopic and associated salivary gland neoplasm of the head and neck. **J Laryngol Otol.** 1999;113:299-303.

Ferlito A, Devaney KO, Devaney SL, Rinaldo A. What is the incidence of occult metastasis in patients with stage N(0) cancers of the head and neck? **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.** 2001;63:1-5.

Ferlito A, Partridge M, Brennan J, Hamakawa H. Lymph node micrometastases in head and neck cancer. **Acta Otolaryngol.** 2001;121:660-5.

Ferlito A, Polidoro F. Biological and prognostic implications of the morphologic aspects of immune reaction in lymph nodes draining head and neck cancers. **J Laryngol Otol.** 1979;93:153-75.

Ferlito A, Rinaldo A, Devaney KO, Nakashiro K, Hamakawa H. Detection of lymph node micrometastases in patients with squamous carcinoma of the head and neck. **Eur Arch Otorhinolaryngol.** 2008;265:1147-53.

Ferlito A, Rinaldo A. Level I dissection for laryngeal and hypopharyngeal cancer: is it indicated? **J Laryngol Otol.** 1988;112:438-40.

Ferlito A, Silver CE, Rinaldo A. Neck dissection in the new era. **J Am Coll Surg.** 2007;204:466-8.

Ferlito A, Silver CE, Rinaldo A. Selective neck dissection (IIA, III): A rational replacement for complete functional neck dissection in patients with NO supraglottic and glottis squamous carcinoma. **Laryngoscope.** 2008;118:676-9.

Ferlito A, Silver CE, Suarez C, Rinaldo A. Preliminary multiinstitutional prospective pathologic and molecular studies support preservation of sublevel IIb and level IV for laryngeal squamous carcinoma with clinically negative neck. **Eur Arch Otorhinolaryngol.** 2007;264:111-4.

Fernández-Nogueras FJ, Fernández-Nogueras V, Esquivias LCJJ. Prognostic value of lymph node histologic pattern in epidermoid carcinoma of the larynx. **Acta Otorrinolaringol Esp.** 1992;43:165-7.

Fisher B, Fisher ER. The interrelationship of hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination. **Surg Gynecol Obstet.** 1966;122:791-8.

Flanders WD, Rothman KJ. Interaction of alcohol and tobacco in laryngeal cancer. **Am J Epidemiol.** 1982;115:371-9.

Foster Jr RS. The biologic and clinical significance of lymphatic metastases in breast cancer. **Surg Oncol Clin N Am.** 1996;5:79-104.

Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod SA, Franco EL. Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. **Int J Cancer.** 1995;63:769-73.

Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer.** 2004;101:973-8.

Gallo O, Boddi V, Bottai GV, Franchi A, Storchi OF. Prognostic significance of clinically false positive cervical lymph nodes in patients with laryngeal carcinoma. **Cancer**. 1995;75:1077-83.

Gallo O, Deganello A, Scala J, De Campora E. Evolution of elective neck dissection in N0 laryngeal cancer. **Acta Otorhinolaryngol Ital**. 2006;26:335-44.

Gallo O, Libonati GA, Gallina E, Fini-Storchi O, Giannini A, Urso C, Bondi R. Langerhans cells related to prognosis in patients with laryngeal carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. 1991;117:1007-10.

Gavilan C, Gavilan J. Five-year results of functional neck dissection for cancer of the larynx. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. 1989;115:1193-6.

Geelen CP, Hordijk GJ, Ravasz LA, Terhaard CH. Degree of tumor differentiation as a prognostic factor in advanced laryngeal cancer. **Acta Otorhinolaryngol Belg**. 1995;49:1-4.

Goldsmith MM, Pillsbury HC. Pathologic and cytometric indicators of biologic behaviour in laryngeal cancer. In: Silver CE. **Laryngeal cancer**. New York: Thieme: 1991.

Gustavsson P, Jakobsson R, Johansson H, Lewin F, Norell S, Rutkvist LE. Occupational exposures and squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx, larynx, and oesophagus: a case-control study in Sweden. **Occup Environ Med**. 1998;55:393-400.

Hall SF, Groome PA, Irish J, O'Sullivan B. The natural history of patients with squamous cell carcinoma of the hypopharynx. **Laryngoscope**. 2008;118:1-10.

Hamakawa H, Fukizumi M, Bao Y, Sumida T, Onishi A, Tanioka H, Sato H, Yumoto E. Genetic diagnosis of micrometastasis based on SCC antigen mRNA in cervical lymph nodes of head neck cancer. **Clin Exp Metastasis**. 1999;17:593-9.

Hammerlid E, Taft C. Health related quality of life in long term head and neck cancer survivors: a comparison with general population norms. **Br J Cancer**, v. 84, p. 149-156, 2001.

Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. **Cancer**. 1999;86:2668-73.

Hermanek P. Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. **Anticancer Res**. 1999;19:2771-4.

Hermans R, Van den Bogaert W, Rijnders A, Doornaert P, Baert AL. Predicting the local outcome of glottis squamous cell carcinoma after definitive radiation therapy: value of computed tomography determined tumour parameters. **Radiother Oncol.** 1999;50:39-46.

Herrero R. Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. **J Natl Cancer Inst Monogr.** 2003;31:47-51.

Hoffman HT, Porter K, Karnell LH, Cooper JS, Weber RS, Langer CJ, Ang KK, Gay G, Stewart A, Robinson RA. Laryngeal cancer in the United States: Changes in demographics, patterns of care, and survival. **Laryngoscope.** 2006;116:1-13.

Idasiak A, Maslvc B, Blamek S, Suwinski R. Risk of distant metastases after postoperative radiation therapy for locally advanced laryngeal cancer. **Otolaryngol Pol.** 2008;62:149-57.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2008 Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em 2008: <http://www.inca.gov.br>.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-1999. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

Jain RK, Munn LL, Fukumara D. Dissection tumour pathophysiology using intravital microscopy. **Nat Rev Cancer.** 2002;2:266-76.

Jain RK. Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies. **J Natl Cancer Ins.** 1989;81:570-6.

Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. **Science.** 1997;276:1423-5.

Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. **Cancer Metastasis Rev.** 2006;25:677-94.

Johnson JT, Barnes EL, Myers EN, Schramm VL Jr, Borochovit D, Sigler BA. The extracapsular spread of tumors in cervical node metastasis. **Otolaryngol.** 1981;107:725-9.

Johnson JT, Myers EN, Bedetti CD, Barnes EL, Schramm VL Jr, Thearle PB. Cervical lymph node metastases. Incidence and implications of extracapsular carcinoma. **Arch Otolaryngol.** 1985;111:534-7.

Jones AS, Roland NJ, Field JK, Phillips DE. The level of cervical lymph node metastases: Their prognostic relevance and relationship with head and neck squamous carcinoma primary sites. **Clin Otolaryngol.** 1994;19:63.

Kaufmann O, Fietze E, Mengs J, Dietel M. Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. **Am J Clin Pathol.** 2001;116:823-30.

Khafif A, Fliss DM, Gil Z, Medina JE. Routine inclusion of level IV in neck dissection for squamous cell carcinoma of the larynx: is it justified? **Head Neck.** 2004;26:309-12.

Kobayashi M, Kobayashi H, Pollard RB, Suzuki F. A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma. **J Immunol.** 1998;160:5869-73.

Kocatürk S, Yilmazer D, Önal B, Erkam Ü, Ürünal B. Do micrometastases detected with cytokeratin immunoperoxidase reactivity affect the treatment approach to neck in supraglottic cancers. **Otolaryngol Head Neck Surg.** 2003;128:401-11.

Komukai S, Nishimaki T, Watanabe H, Ajioka Y, Suzuki T, Hatakeyama K. Significance of immunohistochemically demonstrated to lymph nodes in esophageal cancer with histologically negative nodes. **Surgery.** 2000;127:40-6.

Korkmaz H, Caydere M, Dursun E, Samim E, Ustün H, Göcmen H, Ozeri C. Prognostic importance of lymphatic reaction pattern in laryngeal carcinoma. **Am J Otolaryngol.** 1999;20:298-303.

Koybaşıoğlu A, Bora Tokçaeer A, Inal E, Uslu S, Koçak T, Ural A. Accessory nerve function in lateral selective neck dissection with undissected level IIb. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.** 2006;68:88-92.

Li LC, Zhao H, Nakajima K, Oh BR, Ribeiro Filho LA, Carroll P, Dahiya R. Methylation of the E-cadherin gene promoter correlates with progression of prostate cancer. **J Urol.** 2001;166:705-9.

Licitra I, Bernier J, Grandi C, Locati L, Merlano M, Gatta G, Lefebvre JL. Cancer of the larynx. **Crit Rev Oncol Hematol.** 2003;47:65-80.

Lim YC, Choi EC, Lee, JS, Koo BS, Song MH, Shin HA. Is dissection of level IV absolutely necessary in elective neck dissection for clinically N0 laryngeal carcinoma? **Oral Oncol.** 2006;42:102-7.

Lima RA, Kligerman J. Diagnóstico – História, avaliação e quadro clínico, exame físico locorregional, diagnóstico diferencial do câncer da laringe. In: Noronha MJR, Dias FL. **Câncer da Laringe - Uma Abordagem Multidisciplinar.** Rio de Janeiro: Revinter: 1997. p. 33-9.

Liotta LA, Kohn E. Microenvironment of the tumour-host interface. **Nature**. 2001;11:375-9.

Liu YJ, Zhang J, Lane PJ, Chan EY, MacLennan IC. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T-cell-dependent and T-cell-independent antigens. **Eur J Immunol**. 1991;21:2951-62.

Machant FE, Lowry LD, Moffitt JJ, Sabbagh R. Current trends in post-treatment follow-up of patients with SCCA of the head and neck. **Am J Otolaryngol**. 1993;14:88-93.

Malicka K. The assessment of defense function of lymph nodes on the basis of microscopical and clinical studies in laryngeal carcinoma. **BTN Pr Wydz Nauk Przyr A**. 1970;14:5-29.

Mamelle G, Pampurik J, Luboinski B, Lancar R, Lusinchi A, Bosq J. Lymph node prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma. **Am J Surg**. 1994;168:494-8.

Manni JJ, Terhaard CH, de Boer MF. Prognostic factors for survival in patients with T3 laryngeal carcinoma. **Am J Surg**. 1992;164:682.

Martin H, Del Valle B, Ehrlich H, Cahan WG. Neck dissection. **Cancer**. 1951;4:441-99.

Martín VC, Poch BJ, Ortega ML, Iglesias Moreno MC, González Gimeno MJ. Clinical and histological indicators predictive of cervical metastases in laryngeal cancer. **Acta Otorrinolaringol Esp**. 2000;51:330-4.

Maruyama R, Sugio K, Mitsudomi T, Saitoh G, Ishida T, Sugimachi K. Relationship between early recurrence and micrometastases in the lymph nodes of patients with stage I non-small cell lung cancer. **J Thorac Cardiovasc Surg**. 1997;114:535-43.

Minsky BD, Mies C, Rich TA, Recht A. Lymphatic vessel invasion is an independent prognostic factor for survival in colorectal cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Physc**. 1989;17:311-6.

Morinière S. Epidemiology of head and neck cancer. **Rev Prat**. 2006;56:1637-41.

Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. **Cancer**. 2003;98:413-23.

Newhouse ML, Berry G. Asbestos and laryngeal carcinoma. **Lancet**. 1973;2:615.

Nieuwenhuis EJ, Leemans CR, Kummer JA, Denkers F, Snow GB, BrakenhoV RH (2003) Assessment and clinical significance of micrometastases in lymph nodes of head and neck cancer patients detected by E48 (Ly-6D) quantitative reverse transcriptionpolymerase chain reaction. *Lab Invest* 83:1233–1240. Erratum in: **Lab Invest.** 2003;83:1917.

O'Brien CJ, Smith JW, Soong SJ, Urist MM, Maddox WA. Neck dissection with and without radiotherapy: prognostic factors, patterns of recurrence, and survival. **Am J Surg.** 1986;152:456–63.

Okura M, Kagamiuchi H, Tominaga G, Iida S, Fukuda Y, Kogo M. Morphological changes of regional lymph node in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **J Oral Pathol Med.** 2005;34:214-9.

Olsen KD, Caruso M, Foote RL, Stanley RJ, Lewis JE, Buskirk SJ, Frassica DA, DeSanto LW, O'Fallon WM, Hoverman VR. Primary head and neck cancer. Histopathologic predictors of recurrence after neck dissection in patients with lymph node involvement. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 1994;120:1370 –4.

Oosterkamp S, Jong JMA, Van den Ende PL, Manni JJ, Dehing-Oberije C, Kremer B. Predictive value of lymph node metastases and extracapsular extension for the risk of distant metastases in laryngeal carcinoma. **Laryngoscope.** 2006;116:2067-70.

Oreggia F, De Stefani E, Boffetta P, Brennan P, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL. Meat, fat and risk of laryngeal cancer: a case-control study in Uruguay. **Oral Oncol.** 2001;37:141-5.

Paleri V, Subramaniam KS, Oozeer N, Rees G, Krishnan S. Dissection of the submuscular recess (sublevel IIb) in squamous cell cancer of the upper aerodigestive tract: prospective study and systematic review of the literature. **Head Neck.** 2008;30:194-200.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. **Int J Cancer.** 1999;80:827-41.

Patt BS, Close LG, Vuitch F. Prognostic significance of sinus histiocytosis in metastatic laryngeal cancer. **Laryngoscope.** 1993;103:498-502.

Pera E, Moreno A, Galindo I. Prognostic factors in laryngeal carcinoma: a multifactorial study of 416 cases. **Cancer.** 1986;58:928-34.

Plate KH. From angiogenesis to lymphangiogenesis. **Nat Med.** 2001;7:151-2.

Pohris E, Eichhorn T, Glanz H, Kleinsasser O. Immunohistological reaction patterns of cervical lymph nodes in patients with laryngeal carcinomas. **Arch Otorhinolaryngol.** 1987;244:278-83.

Pradier R, González A, Matos E, Loria D, Adan R, Saco P, Califano L.. Prognostic factors in laryngeal carcinoma. Experience in 296 male patients. **Cancer.** 1993;71:2472-6.

Prgomet D, Bilic M, Bumber Z.; Manojlović S, Katić V. Mucoepidermoid carcinoma of the larynx: report of three cases. **J Laryngol Otol.** 2003;117:998-1000.

Puri SK, Fan CY, Hanna E. Significance of extracapsular lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.** 2003;11:119-23.

Ramsey SD, Berry K, Moinpout C.; Giedzinska A, Andersen MR. Quality of life in long term survivors of colorectal cancer. **Am J Gastroenterol.**, v. 97, p. 1228-1234, 2002.

Razack MS, Maipang T, Sako K, Bakamjian V, Shedd DP. Bakamjian V, Shedd DP. Management of advanced glottis carcinomas. **Am J Surg.** 1989;158:318-20.

Reid AP, Robin PE, Powell J, McConkey CC, Rockley T. Staging carcinoma: Its value in cancer of the larynx. **J Laryngol Otol.** 1991;105:456.

Rhee D, Wenig BM, Smith RV. The significance of immunohistochemically demonstrated nodal micrometastases in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Laryngoscope.**2002;112:1970-4.

Reserkova E, Hoda SA, Clarke JL, Rosen PP. Benign heterotopic epithelial inclusions in axillary lymph nodes. **Arch Pathol Lab Med.** 2003;127:e25-7.

Ribeiro-Filho LA, Franks J, Sasaki M, Shiina H, Li LC, Nojima D, Arap S, Carroll P, Enokida H, Nakagawa M, Yonezawa S, Dahiya R. CpG hypermethylation of promoter region and inactivation of E-cadherin gene in human bladder cancer. **Mol Carcinog.** 2002;34:187-98.

Rinaldo A, Devaney KO, Ferlito A. Immunohistochemical studies in the identification of lymph node micrometastases in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.** 2004;66:38-41.

Rinaldo A, Elsheikh MN, Ferlito A, *et. al.* Prospective studies of neck dissection specimens support preservation of sublevel IIb for laryngeal squamous carcinoma with clinically negative neck. **J Am Coll Surg.** 2006;202:967-70.

Rinaldo A, Ferlito A, Kowalski LP, Quer M, Suárez C, León X, Robbins KT. Is dissection of level V necessary in patients with T2-T4N0 supraglottic cancer? **J Laryngol Otol.** 2004;118:175-8.

Ring AH, Sako K, Rao U, Razack MS, Reese P. Immunologic patterns of regional lymph nodes in squamous cell carcinoma of the floor of the mouth. **Am J Surg.** 1985;150:461-5.

Roepman P, Wessels LFA, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P, Tilanus MGJ, Koole R, Hordijk GJ, van der Vliet PC, Reinders MJT, Slootweg PJ, Holstege FCP. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. **Nat Genet.** 2005;37:182–186

Rosai J. **Surgical Pathology.** St. Louis: Elsevier; 2004, p. 1878-982.: Lymph nodes.

Resnick JM, Uhlman D, Niehans GA, Gapany M, Adams G, Knapp D, Jaszcz W.. Cervical lymph node status and survival in laryngeal carcinoma: Prognostic factors. **Ann Otol Rhinol Laryngol.** 1995;104:685-94.

Ross GI, Soutar DS, Macdonald DG, Shoaib T, Camilleri IG, Robertson AG. Improved staging of cervical metastases in clinically node-negative patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Ann Surg Oncol.** 2004;11:213-8.

Saka SM, MacDonald DG. Sampling of jugulo-digastric lymph nodes in oral cancer. **J Oral Pathol Med.** 1989;18:123–4.

Santin AD. Lymph node metastases: the importance of the microenvironment. **Cancer.** 2000;88:175-9.

Sasaki M, Watanabe H, Jass JR, Ajioka Y, Kobayashi M, Matsuda K, Hatakeyama K.. Occult lymph node metastases detected by cytokeratin immunohistochemistry predict recurrence in “node-negative” colorectal cancer. **J Gastroenterol.** 1997;32:758-64.

Schmid-Schonbein GW. Microlymphatics and lymph flow. **Physiol Rev.** 1990;70:987-1028.

Sessions DG, Lenox J, Spector GJ, Newland D, Simpson J, Haughey BH, Chao KS. Management of T3N0M0 glottic carcinoma: therapeutic outcomes. **Laryngoscope.** 2002;112:1281-8.

Sezes OS, Kubilay U, Haytoglu S, Unver S. Frequency of metastases in the area of the supracervical (level IIB) lymph node in laryngeal cancer. **Head Neck.** 2007;29:1111-4.

Shah JP, Medina JE, Shaha AR, Schantz SP, Marti JR. Cervical lymph node metastasis. **Curr Probl Surg.** 1993;30:284-335.

Shah JP. Patterns of cervical lymph node metastasis from squamous carcinomas of the upper aerodigestive tract. **Am J Surg.** 1990;160:405-9.

Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor –infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. **J Immunol.** 2001;167:2972-8.

Sinard RJ, Netterville JL, Garrett CG, *et. al.* Cancer of the larynx. In: MYERS, E. N.; SUEN, J. Y. **Cancer of the head and neck.** Philadelphia: Saunders: 1996; p. 381-421.

Smith EM, Summersgill KF, Allen J, Hoffman HT, McCulloch T, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. **Ann Otol Rhinol Laryngol.** 2000;15:195-9.

Sogn JA. Tumor immunology: the glass is half full. **Immunity.** 1998;95:1178-83.

Spector GJ, Session DG, Lenox J, Newland D, Simpson J, Haughey BH. Management of stage IV glottis carcinoma: therapeutic outcomes. **Laryngoscope.** 2004;114:1438-46.

Spriano G, Piantanida R, Pellini R.; Muscatello L. Elective treatment of the neck in squamous cell carcinoma of the larynx: clinical experience. **Head Neck.** 2003;25:97-102.

Stankiewicz C. Prognostic significance of lymph node reactivity in patients with laryngeal carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol.** 1994;251:418-22.

Starska K, Kulig A, Lukomski M. Prognostic significance of sinus histiocytosis and lymphocyte predominance in lymph nodes of patients with laryngeal carcinoma. **Otolaryngol Pol.** 2003;57:45-50.

Stein H, Bonk A, Tolksdorf G, Lennert K, Rodt H, Gerdes J. Immunohistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's lymphomas. **J Histochem Cytochem.** 1980;28:746-60.

Stell PM, McGill T. Asbestos and laryngeal carcinoma. **Lancet.** 1973;2:416-7.

Stoeckli SJ, Pfaltz M, Steinert H, Schmid S. Histopathological features of occult metastasis detected by sentinel lymph node biopsy in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Laryngoscope.** 2002;112:111–5.

Suarez O. El problema de las metastasis linfáticas y alejadas del cáncer de laringe e hipofaringe. **Rev. Otorrinolaringol.** 1963;23:83-99.

Sugár, J, Vereczkey I, Tóth J, et. al. Some etio-pathogenetic factors in laryngeal carcinogenesis. **J Environ Pathol Toxicol Oncol.** 1996;15:195-9.

Swartz MA, Skobe M. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. **Microsc Res Tech.** 2001;55:92-9.

Synderman NL, Johnson JT, Schramm VL, Myers EN, Bedetti CD, Thearle P. Extracapsular spread of carcinoma in cervical lymph nodes. Impact upon survival in patients with carcinoma of the supraglottic larynx. **Cancer.** 1985;56:1597-9.

Szakai AK, Kosco MH, Tew JG. Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune response. Structures function relationship. **Annu Rev Immunol.** 1989;7:91-109.

Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurung E, Hermans J, Vis AA, Litvinov SV, van Krieken JH. Markers for assessment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 1997;123:412-9.

Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C; Dal Maso L, Levi F, Bidoli E, Negri E, Pasche C, Vaccarella S, Barzan L, Franceschi S. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. **Cancer Causes Control.** 2002;13:957-64.

Tamura Y, Tanaka S, Asato R, Hirano S, Yamashita M, Tamaki H, Ito J. Therapeutic outcomes of laryngeal cancer at Kyoto University Hospital for 10 years. **Acta Otolaryngol Suppl.** 2007;557:62-5.

TNM Classificação de Tumores Malignos. UICC, 6ª ed, 2004.

Tomatis L. Cancer: Causes, occurrence and control. Lyon: IARC; 1990.

Tomifuji M, Shiotani A, Fujii H, Araki K, Saito K, Inagaki K, Mukai M, Kitagawa Y, Ogawa K. Sentinel Node Concept in Clinically N0 Laryngeal and Hypopharyngeal Cancer. **Ann Surg Oncol.** 2008;15:2568-75.

Tsakraklides V, Anastassiades OT, Kersey JH. Prognostic significance of regional lymph node histology in uterine cervical cancer. **Cancer.** 1973;31:860-8.

Tumino R, Vicario G. Head and neck cancers: oral cavity, pharynx, and larynx. **Epidemiol Prev.** 2004;28:28-33.

Van den Brekel MW, van der Waal I, Meijer CJ, Freeman JL, Castelijns JA, Snow GB. The incidence of micrometastases in neck dissection specimens obtained from elective neck dissections. **Laryngoscope.** 1996;106:987-91.

Van den Brekel MWM, Stel HV, van der Valk P, van der Waal I, Meyer CJLM, Snow GB. Micrometastases from squamous cell carcinoma in neck dissection specimens. **Eur Arch Otorhinolaryngol.** 1992;249:349–53.

Viola JPB, Teixeira LK, Werneck MBF. Imunologia tumoral. In: Ferreira CG, Rocha JC. **Oncologia Molecular.** São Paulo: Atheneu; 2004, p. 105-112.

Vogl T, Bisdas S. Lymph node staging. *Top Magn Reson Imaging.* 2007;18:303–16.

Weiss, L. The pathobiology of metastasis within the lymphatic system. **Surg Oncol Clin N Am.** 1996;5:15-24.

Werner AJ, Dünne AA, Myers JN. Functional anatomy of the lymphatic drainage system of the upper aero digestive tract and its role in metastasis of squamous cell carcinoma. **Head Neck.** 2003;25:322-32.

Woolgar JA. Micrometastasis in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma: incidence, histopathological features and clinical implications. **Br J Oral Maxillofac Surg.** 1999;37:181–186.

Wünsch Filho V. The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. **São Paulo Med J.** 2004;122:188-94.

Wynder EL, Covey IS, Mabuchi K., Mushinski M. Environmental factors in cancer of the larynx: a second look. **Cancer.** 1976;38:1591-601.

Xu Y, Zhao X, Guan M, Li B, Zhou Y, Zhou F. Determination of lymph node micrometastases in patients with supraglottic carcinoma. **Acta Otolaryngol.** 2007;127:1188–95.

Yamazaki Y, Chiba I, Hirai A, Satoh C, Sakakibara N, Notani K, Iizuka T, Totsuka Y. Clinical value of genetically diagnosed lymph node micrometastasis for patients with oral squamous cell carcinoma. **Head Neck.** 2005;27:676–81.

Yilmaz T, Hosal AS, Gedikoglu G, Onerci M, Gürsel B. Prognostic significance of vascular and perineural invasion in cancer of the larynx. **Am J Otolaryngol.** 1998;19:83-8.

Yuen A, Medina JE, Goepfert H, Fletcher G. Management of stage T3 and T4 glottic carcinomas. **Am J Surg.** 1984;148:467-72.

Zeidman J, Copland BF, Warren S. Experimental studies on the spread of cancer in the lymphatic system II. Absence of a lymphatic supply in carcinoma. **Cancer.** 1955;8:123-7.

Zwetyenga N, Majoufre-Lefebvre C, Siberchicot F; Demeaux H, Pinsolle J. Squamous-cell carcinoma of the tongue: treatment results and prognosis. **Rev Stomatol Chir Maxillofac.** 2003;104:10-7.