Marcus Antônio de Mello Borba

**Análise da expressão imunoistoquímica da proteína
p63 e de seu valor prognóstico em carcinomas
epidermóides da laringe**

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. Cláudio Roberto Cernea

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Borba, Marcus Antônio de Mello

Análise da expressão imunoistoquímica da proteína p63 e de seu valor prognóstico em carcinomas epidermóides da laringe / Marcus Antônio de Mello Borba. -- São Paulo, 2008.

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

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Cláudio Roberto Cernea.

Descritores: 1.Carcinomas de células escamosas 2.Imunoistoquímica 3.Neoplasias laríngeas 4.Neoplasias de cabeça e pescoço 5.Proteínas supressoras de tumor 6.Prognóstico

USP/FM/SBD-154/08

“Plus grand est l’obstacle, et plus grande est la gloire de le surmonter.”

Molière

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, **Bartolomeu e Conceição**, que com seu amor, dedicação e princípios morais balizaram minha vida pessoal e deram o suporte para a minha vida profissional.

À minha querida e amada esposa, **Tatiana**, que com seu imenso amor me fortaleceu e incentivou-me a cada momento.

À nossa filha **Helena**, fonte de inspiração e a representação do maior amor que pode existir.

Aos queridos tios, padrinhos e amigos, **Ana e Raimundo**, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Cláudio Roberto Cernea**, orientador deste trabalho, por sua disponibilidade incondicional, suas intervenções precisas e seu exemplo de seriedade e responsabilidade.

Ao Prof. Dr. **Fernando Dias** pelo seu estímulo a conclusão deste trabalho, seu reconhecimento nas pequenas vitórias e seu exemplo de elegância e destreza operatória.

Ao Prof. Dr. **Geraldo Matos de Sá** (*In Memoriam*) pelo seu exemplo de liderança, sabedoria e justiça que se impunham naturalmente onde quer que estivesse.

Ao Dr. **Emilson de Queiroz Freitas**, mestre e amigo, cujos laços de amizade ultrapassam as divisas do estado do Rio de Janeiro.

Ao Dr. **Ricardo Cruz** pelo exemplo maior de profissionalismo e dedicação que influenciou decisivamente minha atuação como cirurgião de cabeça e pescoço.

Ao Dr. **Paulo Antônio Faria** por sua ajuda na revisão das lâminas estudadas e disponibilização dos blocos de parafina para realização dos testes de Imunoistoquímica.

A Srta. **Mariana Curi**, pela dedicação e competência na realização das análises estatísticas, imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

À Dra **Danielle Camisasca** pela sua indispensável ajuda na revisão das lâminas estudadas.

A Sra **Eliane Gazetto**, secretária da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da USP, pela sua disposição em cooperar para a conclusão desta tese.

Ao Dr. **Terence Farias** pelo incentivo em todos os momentos e a gentileza de ceder algumas das referências bibliográficas consultadas para a elaboração deste trabalho.

Aos Drs. **André Leonardo e Clecius** pelo auxílio incansável no levantamento de dados de prontuários.

À Dra **Izabella Costa** pelas palavras amigas e estímulo constante que compartilhei durante todo o período do trabalho.

Ao amigo **Marcos André** pelos conselhos importantes que em muito contribuíram para a realização desta tese

Ao amigo **Marcio Silva** pelas sugestões valiosas e auxílio inestimável na confecção da parte gráfica deste trabalho.

Aos colegas e amigos da Seção de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do INCA, pelo convívio sempre fraterno durante o período deste estudo.

Gostaria de agradecer e demonstrar todo meu reconhecimento **ao Instituto Nacional do Câncer do Rio de Janeiro**, onde realizei minha pós-graduação em Cirurgia de Cabeça e Pescoço, ao qual devo não só a minha formação profissional como também os preciosos ensinamentos que me ajudam na condução de minha carreira.

Aos pacientes que são o objetivo principal da minha profissão.

À professora **Rita de Cássia Cerqueira Nogueira** que contribuiu com as revisões gramaticais e metodológicas.

Finalmente, gostaria de agradecer **a todos que contribuíram para a conclusão desta tese** e que não foram mencionados por uma omissão inconsciente deste autor.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Gráficos	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
Lista de Símbolos	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
3 REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1 Epidemiologia do câncer de laringe	8
3.2 Etiopatogenia	8
3.3 Estadiamento, tratamento e prognóstico do câncer de laringe	9
3.4 Fatores biológicos e câncer de laringe	10
3.5 Descoberta do Gene TP63	12
3.6 Estrutura do Gene TP63	16
3.6.1 Isoformas e subdomínios	18
3.7 Ação da proteína p63	20
3.8 Associação com mutações	23
3.9 Expressão da p63	26
3.10 Associação com prognóstico	32
3.11 Associação com neoplasias em geral	34
3.12 Associação com neoplasias de cabeça e pescoço ou do trato aerodigestivo superior	39
3.13 Associação com neoplasias de laringe	44
4 MÉTODOS	45
4.1 Casuística	46
4.1.1 Critérios de Seleção	47
4.1.1.1 Por Inclusão	47
4.1.1.2 Por Exclusão	47
4.1.2 Caracterização da Casuística	48
4.1.2.1 Dados Epidemiológicos	48
4.1.2.1.1 Gênero	48
4.1.2.1.2 Raça	48
4.1.2.1.3 Idade	49
4.1.2.2 Traqueostomia Prévia	49
4.1.2.3 Duração dos Sintomas	50
4.1.2.4 Tempo de Tratamento	50
4.1.2.5 Hábitos	50
4.1.2.5.1 Tabagismo e Etilismo	50
4.1.2.6 Localização do Tumor Primário	52
4.1.2.7 Tratamento da Doença	52
4.1.2.8 Estadiamento	52
4.1.2.9 Tratamento Radioterápico Complementar	55
4.2 Métodos	56
4.2.1 Método de Avaliação Histopatológica	56

4.2.1.1 Método de Avaliação Histopatológica Pós-Operatória	56
4.2.1.2 Resgate das Lâminas e Seleção dos Blocos	56
4.2.1.3 Reavaliação Histopatológica	57
4.2.2 Método de Análise da Expressão da Proteína p63	57
4.2.2.1 Análise Imunoistoquímica	57
4.2.3 Quantificação da Expressão da Proteína p63	58
4.2.4 Análise do Controle Clínico Pós-Operatório dos Pacientes	61
4.3 Análise Estatística dos Resultados	63
4.3.1 Caracterização das Variáveis	63
4.3.2 Método de Tratamento Estatístico das Variáveis	64
4.3.2.1 Análise Univariada	64
4.3.2.2 Análise Multivariada	64
4.3.3 Banco de Dados	65
4.3.4 Critérios para a Redação do Texto	66
5 RESULTADOS	67
5.1 Resultados da análise descritiva dos fatores	68
5.1.1 Invasão de cartilagem	68
5.1.2 Invasão vascular	68
5.1.3 Invasão perineural	69
5.1.4 Acometimento de estruturas adjacentes	70
5.1.5 Infiltrado inflamatório	70
5.1.6 Grau de diferenciação histológica do tumor	71
5.1.7 Margens histológicas	71
5.1.8 Área tumoral	72
5.1.9 Avaliação histopatológica do tumor primário (pT)	72
5.1.10 Avaliação histopatológica dos linfonodos regionais(pN)	72
5.1.11 Classificação histopatológica pós-cirúrgica (pTNM)	73
5.1.12 Quantificação da expressão da proteína p63	74
5.2 Resultados da análise descritiva do controle clínico e dos índices	74
5.2.1 Controle clínico pós-operatório	74
5.2.2 Recidiva do carcinoma	75
5.3 Análise estatística	76
5.3.1 Recidiva da doença	76
5.3.2 Óbito pelo carcinoma	82
5.3.3 Sobrevida, sobrevida livre de doença e probabilidade de óbito pelo Carcinoma	88
5.3.4 Análise Complementar de Outros Fatores	91
6 DISCUSSÃO	96
7 CONCLUSÕES	111
8 INFERÊNCIAS	113
9 ANEXOS	115
ANEXO A: Banco de Dados da Casuística	116
ANEXO B: Questionário de Pesquisa; Análise do Valor Prognóstico da Proteína p63 no Carcinoma Epidermóide de Laringe	136
10 REFERÊNCIAS	139
Apêndices	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação Gráfica da Estrutura do Gene Tp63 e da Proteína Codificada por esse Gene em Comparação às Proteínas p53 e p73	18
Figura 2 -	Escore 0. Coloração Nuclear Negativa para p63, pelo Método Imunoistoquímico (Aumento De 400x)	59
Figura 3 -	Escore 1. Coloração Nuclear Positiva para p63 em < 30% das Células Neoplásicas, pelo Método Imunoistoquímico (Aumento de 400x)	59
Figura 4 -	Escore 2. Coloração Nuclear Positiva para p63 em > 30% e < 70% das Células Neoplásicas, pelo Método Imunoistoquímico (Aumento de 400x)	60
Figura 5 -	Escore 3. Coloração Nuclear Positiva para p63 em > 70% das Células Neoplásicas, pelo Método Imunoistoquímico (Aumento de 400x)	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição da Ocorrência de Recidiva da Doença, Segundo Possíveis Fatores Preditivos – Variáveis Epidemiológicas e Clínicas	77
Tabela 2 - Distribuição da Ocorrência de Recidiva da Doença, Segundo Possíveis Fatores Preditivos – Variáveis Epidemiológicas e Clínicas	78
Tabela 3 - Distribuição da Ocorrência de Recidiva da Doença, Segundo Possíveis Fatores Preditivos – Variáveis Histopatológicas e Biológicas (Imunoexpressão da Proteína p63)	79
Tabela 4 - Variáveis Seleccionadas na Análise Univariada para Recidiva da Doença	80
Tabela 5 - Passos do Método “Stepwise” de Seleção das Variáveis para Análise Multivariada	81
Tabela 6 - Análise Multivariada das Variáveis mais Importantes na Predição do Evento “Recidiva do Carcinoma”	81
Tabela 7 - Distribuição da Ocorrência de Óbito, Segundo Possíveis Fatores Preditivos – Variáveis Epidemiológicas e Clínicas	82
Tabela 8 - Distribuição da Ocorrência de Óbito, Segundo Possíveis Fatores Preditivos – Variáveis Epidemiológicas e Clínicas	83
Tabela 9 - Distribuição da Ocorrência de Óbito, Segundo Possíveis Fatores Preditivos – Variáveis Histopatológicas e Biológicas (Imunoexpressão da Proteína p63)	84
Tabela 10 - Variáveis Seleccionadas na Análise Univariada para o Evento “Óbito”	85
Tabela 11 - Passos do Método “Stepwise” de Seleção das Variáveis para Análise Multivariada	86
Tabela 12 - Análise Multivariada das Variáveis mais Importantes na Predição do Evento “Óbito pelo Carcinoma”	86
Tabela 13 - Análise das Variáveis Explicativas com Resultados das Análises Univariadas mais Importantes na Predição de Óbito por Qualquer Causa, Forçando a Presença das Variáveis Margens e Rxt	87
Tabela 14 - Seleção por <i>Stepwise</i> das Variáveis Explicativas com Resultados das Análises Univariadas mais Importantes na Predição de Recidiva, Forçando a Presença das Variáveis Margens e Rxt	88
Tabela 15 - Estimativa da Probabilidade de Sobrevida (Método de Kaplan-Meier). Evento: “Óbito Total”	89
Tabela 16 - Estimativa da Probabilidade de Sobrevida (Método de Kaplan-Meier). Evento: “Recorrência do Carcinoma”	90
Tabela 17 - Estimativa da Probabilidade de Sobrevida (Método de Kaplan-Meier). Evento: “Óbito Relacionado ao Carcinoma”	91
Tabela 18 - Distribuição da Imunoexpressão da Proteína p63 de Acordo com Variáveis Associadas aos Eventos Recorrência e/ou Óbito pelo Carcinoma – Variáveis Clínicas e Epidemiológicas	93
Tabela 19 - Distribuição da Imunoexpressão da Proteína p63 de Acordo com Variáveis Associadas aos Eventos Recorrência e/ou Óbito pelo Carcinoma – Variáveis Histopatológicas	94
Tabela 20 - Distribuição da Imunoexpressão da Proteína p63 de Acordo com as Variáveis Associadas aos Eventos Recorrência e/ou Óbito pelo Carcinoma – Variáveis de Controle Clínico	95

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	- Representação da Distribuição por Gênero, Raça e Faixa Etária dos Pacientes Estudados	48
Gráfico 2	- Distribuição dos Doentes por Faixa Etária	49
Gráfico 3	- Pacientes Submetidos à Traqueostomia Prévia	50
Gráfico 4	- Tabagismo e Etilismo	51
Gráfico 5	- Organograma do Tabagismo e Etilismo	51
Gráfico 6	- Localização do Tumor Primário	52
Gráfico 7	- Estadiamento T	53
Gráfico 8	- Estadiamento N	53
Gráfico 9	- Estadiamento Clínico	54
Gráfico 10	- Estadiamento Clínico Estratificado	54
Gráfico 11	- Pacientes Submetidos à Radioterapia Adjuvante	55
Gráfico 12	- Resultados – Dados Histopatológicos – Invasão de Cartilagem	68
Gráfico 13	- Resultados – Dados Histopatológicos – Invasão Vascular	69
Gráfico 14	- Resultados – Dados Histopatológicos – Invasão Perineural	69
Gráfico 15	- Resultados – Dados Histopatológicos – Acometimento de Estruturas Adjacentes	70
Gráfico 16	- Resultados – Dados Histopatológicos – Infiltrado Inflamatório	70
Gráfico 17	- Resultados – Dados Histopatológicos – Grau de Diferenciação Histológica	71
Gráfico 18	- Resultados – Dados Histopatológicos – Margens Histológicas	71
Gráfico 19	- Resultados – Dados Histopatológicos – Estadiamento Patológico (pT)	72
Gráfico 20	- Resultados – Dados Histopatológicos – Estadiamento Patológico (pN)	73
Gráfico 21	- Resultados – Dados Histopatológicos – Estadiamento Patológico	73
Gráfico 22	- Estimativa da Probabilidade de Sobrevida (Método de Kaplan-Meier). Evento: “Óbito Total”	89
Gráfico 23	- Estimativa da Probabilidade de Sobrevida (Método de Kaplan-Meier). Evento: “Recorrência do Carcinoma”	90
Gráfico 24	- Estimativa da Probabilidade de Sobrevida (Método de Kaplan-Meier). Evento: “Óbito Relacionado ao Carcinoma”	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>Avidina-Biotina-Peroxidase</i>
AEC	<i>ankyloblepharon ,ectodermal dysplasia, and cleft lip or palate</i>
AIS	<i>Amplified in Squamous Cell Carcinomas</i>
bax	Gene pro-apoptótico
bcl-1	Gene associado a várias neoplasias, tais como leucemias e linfomas
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD34	Glicoproteínas ligadas ao processo de angiogênese
c-erb-2	Protooncogene HER-2/ <i>neu</i>
cGY	<i>centi-Gray</i>
CUSP	Denominação inicial do gene TP63
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ΔN	Isoforma truncada não transativante
ΔN-p63	Isoforma protéica truncada do gene TP63
EC	Estadiamento Clínico
EEC	<i>Ectrodactyly, Ectodermal Dysplasia and Cleft Lip/Palate</i>
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EP	Estadiamento Patológico
FISH	<i>Fluorescent in Situ Hybridization</i>
GI	Grau de diferenciação histológico, correspondente aos tumores bem diferenciados
GII	Grau de diferenciação histológico, correspondente aos tumores moderadamente diferenciados
GIII	Grau de diferenciação histológico, correspondente aos tumores pouco diferenciados
GIV	Grau de diferenciação histológico, correspondente aos tumores indiferenciados
GADD45	Proteína indutora da apoptose celular
H ₂ O ₂	Água oxigenada ou peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina-Eosina
HPV	Vírus do Papiloma Humano / Papiloma Vírus Humano
kb	<i>Kilobase</i> ou quilobase; abreviatura de 1.000 pares de bases no DNA ou 1.000 bases no RNA
KET	Denominação inicial do gene TP63
Ki-67	Antígeno nuclear marcador do ciclo celular e crescimento tumoral
LMS	<i>Limb Mamary Syndrome</i>
mdm2	Gene inibidor natural do gene TP53
mRNA	RNA mensageiro e RNA= ácido ribonucléico
myc	Família de protooncogenes (c-myc, L-myc e N-myc) associada a carcinomas e sarcomas
N	Metástase em linfonodo regional
NBP	<i>Non-p53 re-Binding Protein</i>
p	Nível de significância estatística
p21	Proteína indutora de apoptose celular
p40	Denominação inicial do p63
P504S	Proteína associada ao câncer de próstata

p51	Denominação inicial da p63
p51A	Denominação inicial da p63 e correspondente a fração transativante da p63
p51B	Denominação inicial da p63 e correspondente a fração truncada da p63
p53	Produto protéico do gene TP53
p53CP	Denominação inicial do produto do gene TP63 (<i>p53 competing protein</i>)
p63	Produto protéico do gene TP63
p73	Isoforma protéica produto do gene TP73, pertencente à família do gene TP53
p73L	Denominação inicial do produto protéico do gene TP73
p107	Produtos protéicos da família do gene do retinoblastoma
p130	Produtos protéicos da família do gene do retinoblastoma
PBS	Solução salina tamponada de fosfatos
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
pN1	Estadiamento patológico linfonodal 1
pN2	Estadiamento patológico linfonodal 2
PN3	Estadiamento patológico linfonodal 3
P504S	Proteína expressa na próstata
PPPPY	Domínio protéico da p63
PRAD1	Produto do gene da ciclina D1
pTNM	Estadiamento TNM patológico
pT2	Estadiamento patológico tumoral 2
pT3	Estadiamento patológico tumoral 3
pT4	Estadiamento patológico tumoral 4
RB	Família do gene supressor tumoral do retinoblastoma
RB-1	Gene membro da família do gene do retinoblastoma
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction</i>
SAM	<i>Sterile Alpha Motif</i>
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SHFM	<i>Split-Hand/Split-Foot Malformation</i>
SP	São Paulo
T	Extensão do Tumor primário
TA	<i>Isoforma transativante</i>
TA-p63	Isoforma protéica do gene TP63 capaz de transativar genes alvos do TP53
TNM	Classificação dos tumores malignos
TP	<i>Tumor protein</i>
TP21	Gene associado a apoptose celular
TP40	Denominação inicial do gene TP63
TP504S	Gene associado ao câncer de próstata
TP51	Denominação inicial do gene TP63
TP53	Gene supressor tumoral
TP53CP	Denominação inicial do produto do gene TP63 (<i>TP53 competing protein</i>)
TP73	Gene membro da família do TP53
UICC	<i>international union against cancer</i> ; união internacional contra o câncer
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

α	<i>Alfa</i>
β	<i>Beta</i>
γ	<i>Gama</i>
Δ	<i>Delta</i>
<	Menor que
>	Maior que
mm	Milímetro
%	Por cento
pH	Potencial Hidrogeniônico
x	Veze
+	Escore 1 para Imunocoloração em < 30% das células neoplásicas
++	Escore 2 para Imunocoloração em > 30% e < 70% das células neoplásicas
+++	Escore 3 para Imunocoloração em > 70% das células neoplásicas
=	Igual a

RESUMO

Borba MAM. *Análise da Expressão Imunoistoquímica da Proteína p63 e seu Valor Prognóstico em Carcinomas Epidermóides da Laringe* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 153p.

INTRODUÇÃO: Alterações genéticas múltiplas são comuns durante a carcinogênese e, nesse panorama, o gene supressor tumoral *TP53* é um dos mais associados à transformação maligna. Recentemente, dois genes similares ao *TP53*, foram identificados, o *TP73* e o *TP63*. O *TP63* situa-se no cromossomo 3q e tem papel comprovado no desenvolvimento epidérmico, sendo detectado em vários tecidos humanos. Inúmeros trabalhos relacionaram a expressão da proteína p63 com carcinomas do trato aerodigestivo superior. **OBJETIVOS:** O presente estudo objetivou avaliar a expressão Imunoistoquímica da proteína p63 e seu valor prognóstico nos carcinomas epidermóides da laringe. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Foram estudados retrospectivamente 127 pacientes submetidos a laringectomia total no Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, entre 1998 e 2000. Houve 111 doentes masculinos e 16 femininos, 69 brancos e 58 não-brancos, com idade entre 36 a 93 anos, média de 59 e mediana de 58 anos. Dezenove tumores eram glóticos, 16 supraglóticos e 92 acometiam mais de um local, correspondendo a 15%, 13% e 72% respectivamente. Quanto ao estadiamento clínico, dois casos eram do estágio I (1,6%), 21 do II (16,5%), 82 do III (64,6%) e 22 do IV (17,3%). Noventa e seis pacientes (75,6%) receberam radioterapia complementar. A técnica imunoistoquímica, com anticorpos monoclonais do clone 4A4, foi utilizada para estudar a expressão da p63. O percentual de células imunocoradas positivamente foi estimado conforme os seguintes escores: 0: ausência de imunocoloração; 1: imunocoloração em < 30% das células neoplásicas; 2: imunocoloração em > 30% e < 70% das células neoplásicas; e 3: imunocoloração em > 70% das células neoplásicas. Foram observados 62 casos do escore 3 (+++), 60 do escore 2 (++), 4 do 1 (+) e 1 caso sem expressão (0), correspondendo respectivamente a 48,8%, 47,2%, 3,1% e 0,8% da amostra. Através de análises uni e multivariadas, a imunoexpressão da proteína p63 e os outros fatores de provável impacto prognóstico foram avaliados quanto ao grau de associação aos eventos recidiva e óbito. **RESULTADOS:** A análise multivariada identificou a imunoexpressão da proteína p63 e o envolvimento da hipofaringe como preditivas para ocorrência de recidiva e óbito pelo carcinoma. A sobrevida global foi de 73,9% em 24 meses e de 59,5% em 60 meses. A sobrevida livre de recorrência foi de 77,2% e 75,1%, e a sobrevida relacionada ao óbito pelo carcinoma foi de 79% e 67% em 24 e 60 meses respectivamente. **CONCLUSÕES:** Apenas a recidiva associou-se estatisticamente à expressão da proteína p63. A p63 se mostrou altamente expressa nos carcinomas epidermóides de laringe e, apesar dos poucos casos com expressão reduzida, a hipoexpressão da p63 foi preditiva de um pior prognóstico nesses doentes.

Palavras-Chave: 1.Carcinomas de Células escamosas 2.Imunoistoquímica 3.Neoplasias Laríngeas 4.Neoplasias de Cabeça e Pescoço 5.Proteínas supressoras de tumor 6. Prognóstico.

SUMMARY

Borba MAM. *Analysis of p63 Protein Immunohistochemical Expression and Its Prognostic Value in Laryngeal Squamous Cells Carcinomas* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 153p.

INTRODUCTION: Multiple genetic changes are common during carcinogenesis and, in this scene, the gene TP53 is one of the most associated with malignant transformation. Recently, two related genes to the TP53, were identified, the TP73 and TP63. The TP63 stands on the chromosome 3q and has a proven role in the epidermal development, being detected in several human tissues. Many work linked the expression of p63 protein with carcinomas of the upper aero-digestive tract.

OBJECTIVE: The objective of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of p63 protein and its prognostic value in squamous cell carcinomas of the larynx.

CASUISTRY AND METHODS: The p63 expression has been examined in 127 patients who were submitted to total laryngectomy, with or without adjuvant radiotherapy, in the Brazilian National Cancer Institute, between 1998 and 2000. There were 111 male patients and 16 female, 69 white and 58 non-white, aged between 36 to 93 years, average 59 and median of 58 years. Nineteen tumors were glottic, 16 supraglottic and 92 affected more than one place, corresponding to 15%, 13% and 72% respectively. As to the clinical staging, two cases were stage I (1.6%), 21 of the II (16.5%), 82 of the III (64.6%) and 22 of the IV (17.3%). Ninety-six patients (75.6%) received complementary radiotherapy. The immunohistochemical technique with the use of monoclonal antibodies of clone 4A4, has been used to study the expression of p63. The percentage of positive cells was estimated as the following scores: 0: no immunostaining; 1: immunostaining in <30% of neoplastics cells; 2: immunostaining in >30% and <70% of neoplastics cells; And 3: immunostaining in >70% of neoplastics cells. Sixty two cases were observed in score three, 60 in score two 4 in score one (+) and 1 case without expression (0), corresponding respectively to 48.8%, 47.2%, 3.1% and 0.8% of the sample. Through uni and multivariate analysis, the immunoexpression of p63 protein and the other factors likely to impact prognosis were evaluated on the degree of association to recurrence and death.

RESULTS: The multivariate analysis identified the immunoexpression of protein p63 and the involvement of the hypopharynx as statistically significant for the risk of recurrence and death by cancer. The overall survival was 73.9% in 24 months and 59.5% at 60 months.

CONCLUSIONS: The disease-free survival was 77.2% and 75.1%, and the disease-specific survival was 79% and 67% at 24 and 60 months respectively. The p63 protein was highly expressed in squamous cell laryngeal carcinomas. In spite of few cases with reduced expression, p63 protein underexpression was statistically associated to the recurrence and may have a negative impact upon prognosis.

Key words: 1.Squamous Cell Carcinoma 2.Immunohistochemistry 3.Laryngeal Neoplasms 4.Head and Neck Neoplasms 5.Tumor Suppressive Proteins 6. Prognosis.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento desordenado e pela disseminação de células anormais no genoma celular. Essa anormalidade é derivada do acúmulo de múltiplas modificações as quais levam a disfunção dos genes responsáveis pelo crescimento e pela divisão celular (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2007).

O câncer de laringe é um dos mais comuns na região da cabeça e pescoço. Corresponde ao segundo sítio mais freqüente de câncer no trato aerodigestivo superior, precedido apenas pela cavidade oral, e representa cerca de 25% das neoplasias malignas a atingir essa área e 2% de todas as doenças malignas. Segundo fontes do Instituto Nacional de Câncer cerca de 8 000 casos novos e 3 000 mortes acontecem anualmente por conta do câncer de laringe no Brasil (INCA 2005). De acordo com a *American Cancer Society* (2007), no ano de 1999 foram registrados 10 600 novos casos de câncer da laringe nos Estados Unidos da América, com 4 200 óbitos. Em 2005, morreram 7 600 000 de pessoas em todo o mundo devido ao câncer; e as projeções para 2015 e 2030 são de 9 000 000 e 11 400 000 mortes respectivamente. Em 2007 são esperados 11 300 casos novos e cerca de 3 660 mortes.

A despeito de todos os avanços técnicos e científicos no tratamento das neoplasias malignas, especificamente no que diz respeito à laringe, a mortalidade não experimentou uma redução importante nos últimos vinte anos. Nesse contexto, a busca de novas alternativas diagnósticas as quais identifiquem os tumores com pior evolução assume grande importância (DIAS, 1999; CERNEA, 2001).

Na prática clínica diária, o prognóstico do câncer de laringe é rotineiramente estabelecido com base em uma série de fatores, que incluem a extensão anatômica da lesão, o grau de diferenciação histológica e a localização do tumor; o sexo, a idade e o estado geral também são considerados fatores prognósticos (VIELBA *et al.*, 2003).

As novas técnicas de biologia molecular permitiram um maior conhecimento da cascata bioquímica que converte as células normais em malignas. A caracterização das alterações genéticas que possam predizer o comportamento clínico e servir como possíveis alvos de terapia gênica tem despertado crescente interesse mundial, sendo objeto de vários estudos e publicações, especialmente para os carcinomas epidermóides do trato aerodigestivo superior (GLICKMAN, 2001).

Alterações genéticas múltiplas são comuns durante a carcinogênese e, nesse panorama, duas classes de genes são especialmente importantes: os oncogenes e os genes supressores tumorais. Dentre os genes supressores tumorais, o TP53 (gene supressor tumoral) é um dos mais estudados e cerca de 60-65% de todos os carcinomas possuem acúmulo de formas mutantes de p53 (produto protéico do gene TP53) no núcleo de suas células (LEVINE, 1997). Além disso, existem evidências relacionando este gene ao desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço.

Recentemente, dois genes homólogos com grande similaridade estrutural com o gene TP53 foram identificados. Inicialmente, Caput identificou o TP73 (gene membro da família do TP53) em 1997, e, posteriormente, vários grupos identificaram e nomearam independentemente o TP63 e seus produtos protéicos. O TP63 situa-se

no cromossomo 3q e foi detectado em uma variedade de tecidos humanos e de camundongos (KAGHAD *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1998; TANNAPFEL *et al.*, 2001).

O produto protéico do TP63 é necessário para manutenção de uma população epitelial de células-tronco e tem um papel comprovado na diferenciação e desenvolvimento epidérmico (BARBARESCHI, 2001).

Vários trabalhos têm procurado relacionar a expressão da proteína p63 às neoplasias epiteliais do trato aerodigestivo superior e de outros tecidos humanos. As anormalidades do TP63 e conseqüente hiperexpressão da proteína p63 (produto protéico do gene TP63) podem representar eventos precoces na carcinogênese epitelial em tumores da cabeça e do pescoço (PARSA *et al.*, 1999; NYLANDER *et al.*, 2000; GLICKMAN *et al.*; KAUFMANN *et al.*, 2001; CHOI *et al.*; DI COMO *et al.*; SNIEZEK *et al.*, 2002; GEDDERT *et al.*, MASSION *et al.*, 2003).

A identificação de marcadores prognósticos em nível clínico, em histológico e em molecular tem motivado vários grupos a investigar o seu valor prognóstico nas neoplasias malignas da cabeça e do pescoço (GLICKMAN *et al.*, 2001; ALMADORI; CHOI *et al.*; NYLANDER *et al.*; SNIEZEK *et al.*, 2002). No entanto, até o momento, a avaliação da expressão Imunoistoquímica da proteína p63 no carcinoma epidermóide da laringe, em nosso meio, não foi relatada. Dessa forma, o presente estudo visa avaliar a expressão da p63 nos tumores da laringe, bem como sua correlação com a evolução clínica.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar a expressão da proteína p63 nos carcinomas epidermóides de laringe.
2. Avaliar a influência dessa expressão no prognóstico destes tumores.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Epidemiologia do câncer de laringe

A laringe é o segundo local mais acometido por câncer no trato aerodigestivo superior - sendo a cavidade oral a primeira - e constitui 1 a 2% de todas as neoplasias malignas (SCHWARTZ, 1999). De acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2005), no ano de 2005, no Rio de Janeiro, as neoplasias malignas da laringe representaram cerca de 25% dos tumores diagnosticados em pacientes matriculados na seção de cirurgia de cabeça e pescoço. Aproximadamente 2/3 destes tumores surgem na prega vocal verdadeira, enquanto 1/3 atinge a supraglote. O carcinoma epidermóide é o tipo histológico mais comum em cerca de 90% de todos os tumores malignos situados na mucosa que recobre a boca, a faringe e a laringe (GREGOR, 1998).

3.2 Etiopatogenia

A associação entre o consumo de tabaco e de álcool e o câncer de laringe tem sido demonstrada em uma variedade de estudos (KOUFMAN & BURKE, 1997). O tabagismo, isoladamente, representa um fator de risco mais forte que o etilismo para o câncer de laringe, embora esse também seja um fator de risco independente para a doença (TUYNS, 1997; GREGOR, 1998). A associação sinérgica do tabaco e do álcool potencializa o risco relativo dos cânceres do trato aerodigestivo superior e a persistência desses hábitos durante ou após o tratamento diminui o índice de cura dos doentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005; BRASIL, 2007). Os fatores de risco devido à exposição ocupacional incluem: tinta, asbestos, ácido sulfúrico,

níquel, pó de madeira, carvão, alcatrão, gases com diesel e couro e derivados (MUSCAT & WYNDER, 1992). Diversos estudos focalizam sua atenção no papel da etiologia viral na carcinogênese, em especial nas neoplasias malignas do trato aerodigestivo superior, incluindo a laringe. Em especial, o vírus do papiloma humano (HPV) e seus subtipos têm sido estudados no tocante às alterações que influenciam no controle da replicação do ácido desoxirribonucléico (DNA), sendo detectados em cerca de 5 a 50% dos carcinomas escamosos da laringe (SCHWARTZ, 1999; ALMADORI, 2002). Uma dieta rica em frutas e vegetais pode atuar na prevenção do câncer de laringe, enquanto que a deficiência desses nutrientes pode facilitar o surgimento dessas neoplasias (ZATONSKI *et al.*, 1991). Os fatores carcinogênicos associados ao paciente incluem sexo, idade e herança genética. Dentre esses, a susceptibilidade genética é um dos principais fatores ligados à gênese do câncer (GREGOR, 1998).

3.3 Estadiamento, tratamento e prognóstico do câncer de laringe

O estadiamento dos carcinomas epidermóides de laringe baseia-se nas regras do TNM, que estima a extensão do tumor, seja essa local, regional ou à distância (BRASIL, 2004). **Apêndice A**

A determinação da extensão dos tumores de laringe é feita através de um exame físico geral da cabeça e pescoço, exame laringoscópico direto ou indireto, sob anestesia tópica ou geral, com o uso de endoscópios rígidos ou flexíveis; e

através de exames de imagem, como a tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética, principalmente. (BRASIL, 2007).

Recentemente, um estudo desenvolvido no INCA, comprovou um aumento da acurácia do estadiamento dos tumores de laringe através da demonstração de Evidência Radiológica de Invasão da Comissura Anterior (ERICA) através de cortes tomográficos seriados (BARBOSA, 2004).

As lesões iniciais da laringe são tratadas com radioterapia ou cirurgia com índices de cura muito bons. Entretanto, os tumores avançados geralmente são tratados através de terapia combinada, associando cirurgia e radioterapia e em casos selecionados quimioterapia e radioterapia. A sobrevida em 05 anos dos casos avançados, estágio III e IV submetidos à cirurgia e irradiados posteriormente normalmente varia entre 50% e 70%. (BRASIL, 2007).

3.4 Fatores biológicos e câncer de laringe

O prognóstico do câncer de laringe é normalmente baseado na extensão anatômica da doença, na localização e no grau de diferenciação histológica do tumor (VIELBA *et al.*, 2003).

Os fatores biológicos envolvidos com a carcinogênese têm sido alvo de pesquisas crescentes visando maior esclarecimento quanto ao prognóstico, seleção de pacientes responsivos a determinados tratamentos e desenvolvimento de drogas mais efetivas contra as neoplasias (GREGOR, 1998).

Nos últimos anos, o processo de carcinogênese em múltiplas etapas das neoplasias do trato aerodigestivo superior, incluindo a laringe, começou a ser desvendado. Foram identificadas alterações em múltiplos níveis, sendo detectadas anormalidades cromossômicas, como deleções, adições e rearranjos. A amplificação de genes e a hiperexpressão de seus produtos protéicos já foram associadas ao câncer de laringe e ao seu prognóstico. Pode-se citar o receptor do fator de crescimento epidérmico, os genes *int-2* e *bcl-1* (gene associado a várias neoplasias, tais como leucemias e linfomas), a proteína p21 (produto do gene *N-ras*), os genes *c-myc* e da ciclina D1 (*PRAD1* - produto do gene da ciclina D1) e a proteína p53 (JARES *et al.*, 1994; SINARD *et al.*, 1996; GREGOR; NOGUEIRA *et al.*, 1998).

Weinstein *et al.* (1996) evidenciaram aumento da incidência de metástases linfáticas e a distância em pacientes com carcinomas epidermóides supraglóticos que expressaram o *c-erb-2* (protooncogene *HER-2/neu*).

A hiperexpressão do Ki-67 (Antígeno nuclear marcador do ciclo celular) em carcinomas epidermóides do trato aerodigestivo superior tem sido relatada na literatura, mas seu valor prognóstico é controverso (NYLANDER *et al.*, 1997; VALENTE *et al.*, 1999).

Spafford *et al.* (1996) encontraram expressão da CD34 (glicoproteínas ligadas ao processo de angiogênese), um marcador utilizado para a caracterização da atividade angiogênica tumoral, em apenas 1 de 70 casos de carcinomas escamosos de laringe, sugerindo que a neovascularização não seja um evento comumente observado.

Aproximadamente 60% dos carcinomas epidermóides de laringe apresentam mutações do gene TP53, um gene de supressão tumoral, cujo produto protéico está hiperexpresso no núcleo das células tumorais. A ocorrência de danos no DNA promove um aumento na concentração desta proteína, levando à parada do ciclo celular e apoptose, caso o defeito não seja reparado. Tem sido proposto que o TP53 pode ser um dos alvos genéticos dos agentes mutagênicos presentes no tabaco (LEVINE, 1997).

Vários estudos identificaram a associação entre carcinomas de laringe e anormalidades do gene TP53. **Nadal et al.** (1995) sugerem a partir de dados que demonstram a imunoexpressão da p53 diretamente proporcional em lesões pré-neoplásicas com graus de malignidade crescente, que a expressão pode ser um evento precoce da carcinogênese laríngea. Entretanto, o valor prognóstico da hiperexpressão da p53 em carcinomas epidermóides de laringe é controverso, porque há autores que a correlacionam com a piora do prognóstico; outros, com a melhora; e outros que não evidenciam qualquer relação (NADAL *et al.*, 1995; PRUNERI *et al.*, 1998; VIELBA *et al.*, 2003).

3.5 Descoberta do gene TP63

Diferentemente dos genes procarióticos, que ocorrem apenas uma vez no genoma, os genes eucarióticos estão presentes em múltiplas cópias. Essas são chamadas famílias gênicas e acredita-se que tenham surgido por duplicação de um gene ancestral, onde os diversos membros da família trilharam caminhos distintos

durante a evolução. Tal divergência pode resultar em genes homólogos, cujos produtos protéicos podem desempenhar funções similares, ou não (COOPER, 2001).

Muitos genes podem ser agrupados em famílias de acordo com as afinidades estruturais ou funcionais. Existem vários exemplos disso como nas famílias: myc (família de protooncogenes: c-myc, L-myc e N-myc), RB (família do gene supressor tumoral do retinoblastoma e seus produtos protéicos: RB-1, p107 e p130) (OREN, 1997; WESTFALL & PIETENPOL, 2004).

Até recentemente acreditava-se que o TP53, gene supressor tumoral altamente associado às neoplasias malignas, fosse único e sem genes homólogos. Essa idéia foi modificada em 1997 e 1998 com a descoberta dos homólogos TP73 e TP63 respectivamente (WESTFALL & PIETENPOL, 2004).

Daniel Caput, em 1997, identificou o primeiro gene correlato ao TP53 o qual codifica a proteína p73 (isoforma protéica produto do gene TP73, pertencente à família do gene TP53) e situa-se no cromossomo 1p36, região freqüentemente ausente em neuroblastomas e outros tumores. O TP73 pode ativar genes alvos do TP53 e quando alterado, possivelmente, ter algum papel na transformação maligna (KAGHAD *et al.* 1997).

Kaghad *et al.* (1997) e **Marin & Kaelin (2000)** sugeriram que as proteínas correlatas à p53 faziam parte de uma rede ou família gênica, cujos produtos protéicos agem no desenvolvimento e controle do ciclo celular.

O gene TP63 foi o segundo homólogo do TP53 a ser identificado. Inicialmente foi chamado de KET por **Schmale & Bamberger** (1997), embora outros autores tenham identificado independentemente o mesmo gene e conferidos nomes diferentes, tais como: CUSP, TP40, TP73L, TP51, TP53CP, NB e, finalmente, TP63 (AUGUSTIN *et al.*; OSADA *et al.*; SENOO *et al.*; TRINK *et al.*; YANG *et al.*, 1998; KAE LIN, 1999; TAN *et al.*; ZENG *et al.*, 2001).

Bockmuhl et al. (1996) identificaram a amplificação do cromossomo 3q, a qual foi mais acentuada na região 3q27, em alta percentagem dos casos avaliados de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. **Bian et al.** (1997) identificaram previamente uma proteína nuclear que não é a p53, mas compete com ela ao se ligar a seqüências do TP53. Essa proteína foi denominada p53 *competing protein* (p53CP). No ano seguinte, **Trink et al.** (1998) clonaram o gene TP40 com grande homologia ao gene KET de ratos. Esse gene era capaz de codificar a proteína p53CP, previamente identificada por **Bian et al.** (1997) e, posteriormente, seria também reconhecido como o gene TP63. Em 1998, **Yang et al.** (1998) descreveram a clonagem do gene TP63 situado no cromossomo 3q27-29. Aquele foi então denominado definitivamente de TP63 e seu produto protéico foi detectado em vários tecidos humanos e em de camundongos.

Osada et al. (1998) utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase e um painel com fragmentos de DNA cromossômico identificaram e clonaram duas variantes de um gene com seqüência similar ao TP53. Essas variantes, denominadas p51A e p51B, são produtos de homólogos humanos do gene KET de ratos e expressas principalmente em músculos esqueléticos e placenta, como

também em próstata, traquéia, pulmão, timo, glândulas salivares, útero e coração. A isoforma p51A seria capaz de induzir respostas celulares similares às induzidas pelo TP53, tais como a indução da apoptose e a parada do ciclo celular.

Hibi et al. (2000) recentemente identificaram os genes TP40 e TP73L situados no braço longo do cromossomo 3 como sendo, na verdade, duas isoformas do gene TP63 destituídas do domínio N-terminal de transativação. Com o auxílio da técnica *fluorescent in situ hybridization* (FISH) os autores identificaram a amplificação freqüente desse *locus* gênico em carcinomas escamosos de pulmão e de cabeça e pescoço, sendo por isso chamado de *amplified in squamous cell carcinomas* (AIS).

Yamaguchi et al. (2000) identificaram e mapearam o gene TP40 no braço distal do cromossomo 3q. Investigando esse gene a procura de alterações em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, encontraram um aumento do número de cópias.

Através de técnicas de purificação que incluíram processos cromatográficos, **Tan et al.** (2001) conseguiram demonstrar que o gene TP53CP antes descoberto, na verdade trata-se do TP63, o terceiro membro da família do TP53, com propriedades agonistas e antagonistas às ações do gene TP53.

Zeng et al. (2001) identificaram e provaram que um fator transcricional similar ao TP53, chamado *Non-p53 re-Binding Protein* (NBP) e descrito previamente por eles (1998), não era outro senão o próprio gene TP63, homólogo ao TP53.

3.6 Estrutura do gene TP63

A grande semelhança seqüencial e estrutural com o TP53 levou a postulação precoce de que os produtos protéicos do TP63 pudessem também funcionar como supressores tumorais (LEVRERO *et al.*, 2000; CHOI *et al.*, 2002; WESTFALL & PIETENPOL, 2004).

Em um nível seqüencial, TP63 e TP73 são mais parecidos entre si do que cada um se parece com o TP53. Isto sugere que, ao menos filogeneticamente, o TP53 seja mais jovem que os seus homólogos e que exista um gene ancestral mais parecido com o TP63 e TP73 (STRANO *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2002).

As semelhanças entre TP63 e TP53 incluem a relação *exon/intron*, a inclusão de um grande *intron* inicial e de um *exon* inicial não codificado. Os genes TP63 e TP73 são maiores que o TP53, pois este último tem cerca de 20 Kb, 11 *exons* e codifica uma proteína com 393 aminoácidos, enquanto o TP63 e TP73 têm mais de 60 Kb e contêm 15 e 14 *exons* respectivamente (MARIN & KAE LIN, 2000).

O gene TP63 foi mapeado na região 3q27-29 e codifica pelo menos seis isoformas protéicas a depender da seqüência promotora iniciadora ou do rearranjo alternativo após exclusão de *introns*, fenômeno chamado de *splicing*. Assim como o TP53, o gene TP63 codifica três domínios, a saber: um domínio de transativação amino-terminal, representado pelos aminoácidos 01 a 59; um domínio de ligação ao DNA com os aminoácidos 142 a 321; e um domínio de oligomerização carboxi-terminal nos aminoácidos 353 a 397. Entretanto, diferente do TP53 que tem um único promotor, o gene TP63 possui dois locais de início transcripcional do mRNA

(mensageiro do ácido ribonucléico). Este codifica isoformas protéicas contendo (TA - *Isoforma transativante*) ou não (Δ N - *Isoforma truncada não transativante*) o domínio transativante, dependendo se a transcrição do mRNA começa a partir do *exon* 1 ou do *exon* 3, respectivamente). Adicionalmente ambos os genes, com ou sem o domínio amino-terminal, podem gerar outras isoformas protéicas devido à remoção alternativa de *íntrons*. A maioria das remoções ocorre na terminação 3' (ausente no gene TP53) e cria proteínas com três diferentes terminações carboxila: uma isoforma α com extensão completa; uma isoforma β truncada após o *exon* 12; e uma isoforma γ que perde os *exons* 11 a 14 e usa um *exon* adicional 15 não encontrado no TP73 (MARIN & KAE LIN, 2000; LITTLE & JOCHEMSEN, 2002; WESTFALL & PIETENPOL, 2004). **FIGURA 1**

Figura 1: Representação gráfica da estrutura do gene TP63 e da proteína codificada por esse gene em comparação às proteínas p53 e p73 (adaptado de Yang *et al.*, 1998).

3.6.1 Isoformas e subdomínios

A conservação dos três subdomínios, embora parcial, é o elo estrutural entre os membros da família do p53. A terminação amina transativante é a menos conservada, 30% idêntica entre p53 e p73 e 22% entre p53 e p63 (formas TA) e ausente nas formas truncadas (ΔN). O domínio central de ligação ao DNA do p63 é 60% idêntico ao p53 e conserva os resíduos mais comumente alterados por mutações que originam tumores, embora raros para o p63 e p73. A percentagem de coincidência na terminação de oligomerização COOH- é de 38% para o p63 (KAGHAD *et al.*, 1997; DE LAURENZI *et al.*, 1998; DI COMO *et al.*, 1999; LEVRERO *et al.*, 2000).

As variantes geradas por *splicing* alternativo do TP63, com exceção das isoformas truncadas, conservam os três domínios funcionais presentes no gene

TP53 e necessários para que esse funcione como gene supressor tumoral. O domínio N-terminal é o menos conservado dentre os três domínios dos membros da família TP53, porém esse domínio é mais conservado (99% de homologia) entre os genes humanos e dos camundongos. Por conta dessa homologia, o TP63 - pelo menos quando hiperexpresso - pode unir-se a sítios de ligação do TP53 e transativar uma série de genes promotores deste (LEVRERO *et al.*, 2000).

Os genes TP73 e TP63 contêm nas suas terminações carboxila um domínio adicional chamado de *sterile alpha motif* (SAM) e que consiste em uma área de interação protéica. Trata-se de um domínio envolvido na regulação do desenvolvimento e que reforça o papel de ambos os genes na diferenciação celular. As isoformas α (transativantes ou não) são caracterizadas por possuírem o domínio SAM. As isoformas α e β possuem também outro domínio denominado PPPPY (domínio protéico da p63) de função ainda não totalmente esclarecida (LEVRERO *et al.*, 2000; LITTLE & JOCHEMSEN, 2001; WESTFALL & PIETENPOL, 2004).

Recentes estudos demonstraram que nas reações imunoistoquímicas onde é utilizado, o anticorpo monoclonal 4A4 reage preferencialmente com Δ N-p63 (Isoforma protéica truncada do gene TP63), embora detectem as isoformas TA-p63 (Isoforma protéica do gene TP63 capaz de transativar genes alvos do TP53) quando em grandes quantidades (NYLANDER *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2003).

3.7 Ação da proteína p63

Donehower et al. (1992) investigaram o papel do gene TP53 no desenvolvimento dos mamíferos e na carcinogênese. Evidenciaram que o gene TP53 é dispensável para o desenvolvimento normal, mas que sua ausência predispõe o indivíduo à doença neoplásica.

Apesar da homologia estrutural e seqüencial do gene TP63 com o TP53, alguns autores sugerem que esses genes têm um espectro de genes alvos e funções biológicas distintas (WHITE & PRIVES, 1999). O TP53 regula a resposta a estresses celulares na supressão tumoral, enquanto que o TP63 é essencial ao desenvolvimento ectodérmico (MARIN, 1998; LOHRUM & VOUSDEN, 2000). **Roth & Dobbstein** (1999) demonstraram que oncoproteínas virais inibem especificamente o gene TP53, mas não antagonizam a atividade da p51A, uma das denominações iniciais das isoformas TA-p63. Com isso, os autores questionam o papel do TP63 como gene supressor tumoral clássico.

Inúmeros genes regulados pelo TP53 foram descritos e acredita-se que esses genes são os responsáveis pela maioria dos efeitos do TP53. Os promotores celulares responsivos ao p53 incluem aqueles que codificam proteínas associadas com crescimento celular, reparo do DNA e apoptose. Apesar dos domínios de ligação ao DNA do TP63 interagirem com seqüências consensuais p53-responsivas e ativarem promotores de vários genes p53-responsivos, incluindo p21, bax (Gene pro-apoptótico), mdm2 (gene inibidor natural do gene TP53), ciclina G e GADD45 (proteína indutora da apoptose celular), evidências indicam que muitos genes alvos respondem diferentemente aos diferentes membros da família do gene TP53 e que

determinados agentes inibitórios agem exclusivamente sobre o gene TP53 (KAGHAD *et al.*, 1997; DE LAURENZI *et al.*; OSADA *et al.*; YANG *et al.*, 1998; ROTH & DOBBELSTEIN 1999; LEVRERO *et al.*, 2000; SASAKI *et al.*, 2002).

Uma importante contribuição nesse sentido emergiu a partir de análises genéticas em camundongos mutantes destituídos de TP63. Nesses estudos, chamados de *Knock-out*, não há defeitos relacionados a apoptose induzida ou espontânea durante a embriogênese, mas sim relacionados ao desenvolvimento. Nesses animais de laboratório há um defeito na formação da ponte ectodérmica apical essencial ao desenvolvimento normal dos membros. Além disso, esses camundongos não têm folículos pilosos, dentes e nem glândulas mamárias, lacrimais ou salivares. O fenótipo desses camundongos sugere que a função primordial do gene TP63 é a regulação do desenvolvimento (MILLS *et al.*; YANG *et al.*, 1999; LEVRERO *et al.*, 2000).

Pelo menos quando superexpresso, o TP63 seria capaz de transativar genes alvos do TP53, incluindo TP21/WAF-1 e bax, que, por conseguinte, estariam aptos a induzir a parada do ciclo celular e a apoptose (YANG & MCKEON, 2000).

Noszczyk *et al.* (2001) estudaram experimentalmente a expressão da p63 e do Ki67, outro marcador de proliferação celular, durante a reparação epidérmica em tecidos humanos. Com o início e progressão do reparo cicatricial houve um aumento paralelo da expressão da p63 que não se restringiu à camada basal, mas alcançou todas as camadas espinhosas. **Pellegrini *et al.*** (2001), em um estudo intitulado: *p63 identifies keratinocyte stem cells*, identificou a expressão da proteína p63 nas células-tronco do epitélio escamoso estratificado. Esses dados sugerem que o gene

TP63 pode estar envolvido em processos fisiológicos, tais como a proliferação epitelial relacionada ao reparo epidérmico.

Patturajan *et al.* (2002) propõem um modelo de atuação e inter-relação entre os genes TP53 e TP63, onde a indução da p53 levaria a degradação da Δ Np63 abortando a sinalização da β -catenina. No câncer, a p53 mutada ou a superexpressão da Δ Np63 causa um acúmulo intranuclear da β -catenina, um evento crítico em muitos cânceres humanos, suportando uma possível função oncogênica para a isoforma Δ Np63.

Entretanto existem autores que questionam a frequência da expressão das isoformas p63 associada com o acúmulo nuclear de β -catenina em carcinomas epidermóides humanos e criticam a extrapolação precoce de resultados obtidos em estudos com linhagens celulares de carcinomas epidermóides para neoplasias humanas *in vivo* (REIS *et al.*, 2003).

Wu *et al.* (2003) empreenderam uma busca por genes alvos do gene TP63, identificando genes diferentes e com funções diversas e opostas a depender da isoforma que se relacionavam. Os isotipos transativantes (TA-p63) desempenhavam um papel mais similar ao TP53, enquanto que os isotipos truncados (Δ N-p63) tinham efeitos opostos à ação supressora tumoral do TP53.

Bamberger *et al.* (2005) investigaram a expressão das diferentes isoformas do p63 na epiderme em cicatrização observando a expressão de todas as isoformas avaliadas, embora as isoformas truncadas sejam vistas em maior quantidade na epiderme hiperproliferativa, enquanto as transativantes são mais associadas às

células musculares em proliferação. Os autores sugerem que as isoformas diferentes possam ter papéis específicos, estando as não transativantes mais relacionadas ao reparo epitelial e as transativantes mais ligadas à diferenciação e reparo muscular.

Westfall et al. (2005) avaliaram o efeito de diversos estresses gênicos na fosforilação e estabilidade da isoforma Δ N-p63, comprovando a ocorrência de redução dos níveis da isoforma estudada após radiação ultravioleta e tratamento com o quimioterápico paclitaxel.

Rocco et al. (2006) estabeleceram um relação entre a expressão das isoformas não transativantes e a inibição da apoptose, dependente do gene TP73, nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, suportando um possível papel oncogênico para as isoformas truncadas.

3.8 Associação com mutações

As mutações do gene TP63 foram associadas a diversas anormalidades de desenvolvimento, tanto em homens como em animais de experimentação. Além das diferenças funcionais, o TP63 também difere do TP53 pela raridade de mutações na grande gama de tumores examinados. Quando presentes, as mutações ocorrem entre os códons 151 e 170 e estão associadas à crise blástica na leucemia mielóide crônica. O local de mapeamento do TP63 situa-se em uma região porventura alterada nas neoplasias de pulmão, colo uterino e ovário. (RIBEIRO-SILVA & ZUCOLOTO, 2003). Por conta disso, o gene TP63 não pode ser caracterizado como

gene supressor tumoral clássico e estudos com camundongos destituídos do gene TP63, denominados *Knock-out*, enfatizam o papel deste gene no desenvolvimento de tecidos e órgãos em detrimento de suposto papel na supressão tumoral. Em humanos, as mutações do TP63 foram associadas a diversas anormalidades de desenvolvimento (HAGIWARA *et al.* 1999; LITTLE & JOCHEMSEN, 2002).

Yang *et al.* (1999) descreveram que os camundongos com alterações homozigóticas do gene TP63 possuíam anormalidades importantes no desenvolvimento de membros, região craniofacial e epitélios. A epiderme de ratos - com o gene TP63 mutado - percorre uma via anômala de diferenciação não regenerativa culminando na surpreendente ausência de todo o epitélio escamoso e de seus derivados, incluindo glândulas salivares, lacrimais e mamárias. Os autores sugeriram a partir desses resultados um papel crítico do gene TP63 na manutenção de células progenitoras necessárias ao desenvolvimento epitelial e à morfogênese.

Celli *et al.* (1999) mapearam o defeito genético em várias famílias com a síndrome *ectrodactyly, ectodermal dysplasia and cleft lip/palate* (EEC), localizando-o em uma região do cromossomo 3q27, previamente implicada em outra síndrome, a *limb mamary syndrome* (LMS). Estudos com o gene TP63 revelaram mutações heterozigóticas nesse gene, situado na área afetada nas duas síndromes estudadas. Mutações heterozigóticas nas linhagens germinativas causam a doença levando a incompetência das proteínas mutadas na transativação de genes essenciais para a regulação do desenvolvimento.

Mills *et al.* (1999) analisaram o papel do gene TP63 na embriogênese de camundongos usando células-tronco e evidenciaram que esse tem função

importante na diferenciação da ponte ectodérmica apical. Os ratos com genes TP63 mutados apresentam-se com sérias anormalidades craniofaciais e de membros, algumas vezes incompatíveis com a sobrevivência. Análises histológicas de membros de embriões de ratos com TP63 mutado confirmaram ausência da ponte ectodérmica apical. Esse é o local alterado na malformação chamada de *Split-Hand/Split-Foot Malformation* (SHFM), anomalia da divisão das mãos e dos pés de indivíduos com a doença. **Ianakiiev et al.** (2000) evidenciaram mutações afetando o gene TP63, especificamente no domínio de ligação do DNA, em famílias com os fenótipos da SHFM e da síndrome EEC, essa caracterizada por ectrodactila, displasia ectodérmica e fendas palatinas. **Wessagowit et al.** (2000) relataram a ocorrência e os aspectos clínicos e moleculares de uma paciente com a síndrome EEC, uma desordem de desenvolvimento autossômica dominante com alta variabilidade de expressão e penetração reduzida, cujo substrato molecular é a mutação do gene TP63. Clinicamente existem alterações de desenvolvimento dos membros, dos cabelos, dos dentes e das glândulas apócrinas. O conhecimento sobre a base molecular da anormalidade emergiu a partir de estudos com ablação do gene TP63 em camundongos e subseqüentes estudos de linhagem genética em famílias com a síndrome EEC que identificaram as mutações do TP63 do tipo *missense* como as mais freqüentes.

As síndromes humanas envolvendo o p63, tais como a EEC, SHFM e *Hay-Wells* não estão relacionadas a tumorigênese humana (LITTLE & JOCHEMSEN, 2001). A síndrome *Hay-Wells*, também conhecida como síndrome *ankyloblepharon, ectodermal dysplasia, and cleft lip or palate* (AEC), caracterizada por fenda labial e/ou palatal, displasia ectodérmica congênita, anquilose e blefarose, é causada por

mutações *missense* no domínio SAM do gene TP63. Estudos de encadeamento genético sugerem que as outras síndromes citadas também estão ligadas a defeitos do gene TP63 e que a sobreposição dos fenótipos vistos nas mutações do gene TP63 ocorre devido a interações entre os genes alvos do TP63 e as proteínas que interagem com o domínio SAM deste gene (MCGRATH, 2001).

3.9 Expressão da p63

Uma série de pesquisadores identificou a expressão da proteína p63 em núcleos de células basais de vários tecidos como epiderme, colo uterino, urotélio, próstata, tecidos placentários e testículos e em núcleos de linhagens celulares de carcinomas epidermóides humanos (SENOO *et al.*; YANG *et al.*, 1998; TACHA & MILLER, 2004).

Nylander *et al.* (2000) descreveram a caracterização através de anticorpos específicos para as isoformas transativas e as truncadas (TA e ΔN) e evidenciaram expressão suprabasal da p63 α na maioria das células da mucosa oral normal e neoplásica, o que contrasta com a distribuição eminentemente basal da pan-proteína em diversos tecidos epiteliais normais evidenciada por **Yang *et al.*** (1998). Em 2002, **Nylander *et al.*** encontraram uma expressão basal das isoformas ΔN e suprabasal das isoformas TA-p63 em tecidos normais e neoplásicos, sendo maior a expressão das isoformas ΔN -p63 nos carcinomas epidermóides.

Parsa *et al.* (1999) avaliaram a expressão da p63 em ceratinócitos normais e neoplásicos e evidenciaram que essa tem expressão restrita a células com alto

poder proliferativo e está ausente nas células que estão em diferenciação terminal. Em carcinomas epidermóides o número de células com núcleos imunocorados para p63 e sua distribuição depende do grau de anaplasia do tumor. Quanto menor o grau de diferenciação e maior o grau de anaplasia, maior a expressão e mais difusa será a distribuição da p63. Os autores sugerem que a p63 possa desempenhar o papel de marcador de ceratinócitos anaplásicos e que a parada irreversível do ciclo celular e a progressão da diferenciação desses estejam associadas com o desaparecimento dos transcritos que codificam as isoformas truncadas (Δ N-p63). Entretanto, afirmam ser necessários estudos com maior número de casos e maior variedade de tumores para validar esses achados.

Nishi *et al.* (1999) sugere que a expressão das isoformas TA-p63 nas neoplasias é aumentada.

Signoretti *et al.* (2000) evidenciaram a expressão seletiva da proteína p63 no núcleo das células basais da próstata normal, sendo a isoforma Δ N-p63 a mais freqüente. A inativação homozigótica do gene TP63 em camundongos leva a agenesia prostática.

Glickman *et al.* (2001) e **Takahashi *et al.*** (2006) evidenciaram forte reatividade nuclear para a p63 em todas as amostras de mucosa normal do esôfago, principalmente nas camadas basal e suprabasal, onde todas as células tiveram seus núcleos corados. Houve uma diminuição gradual da imunorreatividade à medida que as células se superficializavam, sendo rara e escassa na camada mais superficial. As amostras de carcinoma epidermóide, apesar do número reduzido que impedem conclusões definitivas, apresentaram

expressão intensa e difusa em mais de 90% de suas células, predominantemente representada pela fração truncada das isoformas p63.

Quade et al. (2001) estudaram - com o auxílio da Imunoistoquímica - a expressão da p63 na zona de transformação cervical humana e nas neoplasias cervicais iniciais, encontrando distribuição restrita às células basais e parabasais da mucosa escamosa do ectocérvix em maturação e sua expressão foi inversamente correlacionada com a maturação das células escamosas e não escamosas. A p63 foi preferencialmente expressa pelas células imaturas da linhagem escamosa, não estando relacionada à proliferação celular, visto que raramente houve co-expressão dela e do Ki-67.

Noszczyk et al. (2001) mostraram que a expressão da isoforma Δ N-p63 varia de acordo com o estágio do reparo cicatricial na epiderme. Nos estágios iniciais do processo de reparo, há uma inibição da expressão das isoformas TA-p63 e com a progressão da cicatrização há um aumento das isoformas Δ N-p63 na epiderme.

O'Connell et al. (2001) identificaram pela primeira vez a expressão da p63 nas células basais e sub-colunares do endométrio fetal em uma distribuição similar às células basais de reserva do colo uterino. Os autores sugerem que essas células identificadas possam ser células-tronco epiteliais do endométrio e do colo uterino, visto que marcadores escamosos não foram associados a elas.

Tannapfel et al. (2001) investigaram o perfil de expressão e as mutações dos genes da família do TP53, incluindo o TP63, em 32 pacientes com carcinomas gástricos simultâneos. Detectaram transcritos do gene TP63 em 48% dos

carcinomas gástricos examinados e a proteína p63 foi evidenciada em 37% dos tumores. O grau de imunocoloração pela p63 foi maior quanto menor foi o grau de diferenciação e a frequência mutacional do TP63 foi extremamente baixa.

Wang et al. (2001) avaliaram cerca de 250 casos de carcinoma de colo uterino e conseguiram correlacionar a expressão da proteína p63 com tumores escamosos e HPV 16 inclusive sugerindo que a p63 possa ser usada, para distinguir neoplasias escamosas dos tumores neuroendócrinos e dos adenocarcinomas devido a ausência de imunorreatividade para a p63 nestes últimos.

Wang et al. (2002) examinaram o perfil da p63 em amostras benignas e neoplásicas de tecidos pulmonares e concluíram que a p63 é expressa nas células-tronco benignas de brônquios e nas neoplasias escamosas pulmonares.

Reis-Filho et al. (2002) reportaram a expressão da p63 em amostras citológicas e histológicas de neoplasias benignas de mama e sugerem que a identificação da p63 possa ser utilizada como método auxiliar de identificação de células mioepiteliais, além de poder ajudar no diagnóstico diferencial entre lesões difíceis e com suspeita de malignidade.

Massion et al. (2003) identificaram expressão nuclear basal da p63 no epitélio normal da via aérea e hiperexpressão da p63 em toda a espessura dos carcinomas epidermóides. A imunoexpressão da p63 estava reduzida nos adenocarcinomas e nas áreas mais diferenciadas dos carcinomas epidermóides, sendo a isoforma Δ N-p63 alfa a mais comum nos carcinomas epidermóides, embora as isoformas transativantes TA-p63 também tenham sido identificadas nessas lesões. Os autores

também identificaram amplificação do gene TP63 na maioria dos carcinomas epidermóides e raramente nos adenocarcinomas de pulmão.

Werling et al. (2003) compararam a expressão da p63 com outros marcadores considerados padrões-ouro na detecção de células mioepiteliais em 85 lesões de mama e concluíram que esta proteína pode complementar ou substituir outros possíveis marcadores no diagnóstico diferencial entre as células mioepiteliais e as células musculares lisas e miofibroblastos.

Thurfjell et al. (2004) com o auxílio da técnica de *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) avaliaram a expressão individual das isoformas da p63 em carcinomas epidermóides da cabeça e pescoço e encontraram perfis de expressão similares tanto na superfície epitelial normal como nos tecidos tumorais, sugerindo que existe uma manutenção da expressão das isoformas p63 pelas células basais tumorais a partir do tecido que elas se originaram. Não houve correlação entre o padrão de expressão da p63 e os indicadores biológicos de proliferação, como o Ki-67, ou com a presença ou ausência de hiperexpressão do p53. Nesse estudo foi evidenciada uma hiperexpressão da p63 nos tumores menos diferenciados e ausência de expressão nas células em estágio terminal de diferenciação. Os autores evidenciaram pela primeira vez a expressão da isoforma p63 β predominantemente na camada basal, mas também na camada espinhosa da mucosa normal e nas amostras de tumor primário.

Wrone et al. (2004) avaliaram por imunistoquímica a expressão da p63 em ceratinócitos normais e neoplásicos encontrando uma maior e mais difusa expressão nos carcinomas epidermóides, em comparação ao padrão basilar da pele normal. Os

autores identificaram um desvio do padrão de expressão de basilar para difuso nas ceratoses actínicas e seborréicas, sugerindo o potencial proliferativo dessas lesões.

Boldrup *et al.* (2005) identificaram altos níveis de expressão de p63 tanto nos tecidos tumorais como nos tecidos adjacentes não tumorais. Foi demonstrada a expressão de todas isoformas, incluindo a TA-p63. Entretanto, a expressão da TA-p63 foi evidenciada em 93% do tecido normal de pacientes com câncer e em apenas 57% das amostras carcinomatosas, sugerindo uma inibição dessa isoforma durante a carcinogênese. Os dados sugerem que as alterações ocorrem em um campo maior que a extensão do tumor e, previamente, ao surgimento do tumor.

Chovanec *et al.* (2005) avaliaram a expressão de várias proteínas (incluindo p63 e Ki67) em tecidos normais, displásicos e malignos do trato aerodigestivo alto em vários sítios, incluindo a laringe. Tanto p63 como Ki67 tiveram expressão positiva na camada basal dos carcinomas epidermóides e a expressão da p63 foi estatisticamente significativamente maior em tumores GIII (grau de diferenciação histológico, correspondente aos tumores pouco diferenciados) que nos GI (grau de diferenciação histológico, correspondente aos tumores bem diferenciados). A relação entre o grau de diferenciação e os marcadores estudados foi maior na laringe, mas a amostra reduzida impediu conclusões sobre a influência do sítio tumoral na expressão dos marcadores.

Lo Muzio *et al.* (2005) investigaram o perfil de expressão da proteína p63 na mucosa oral normal e carcinomatosa e corroboraram outros estudos ao evidenciar a expressão da proteína p63 na mucosa oral normal em um padrão nuclear e restrita às camadas basal e parabasal, com coloração mais intensa basal e estimativa de

cerca de 10% de células coradas. Os autores descreveram uma relação estatisticamente significativa entre a expressão da p63 nos carcinomas epidermóides de boca e o grau de diferenciação tumoral. Havia uma amplificação da expressão da p63 nos tumores pouco diferenciados (GIII)¹. Nos tumores orais avaliados por imunoistoquímica quanto à expressão da p63, foi evidenciado que 94,7% dos tumores expressavam a p63 em mais de 10% das células tumorais. Os tumores bem diferenciados e os carcinomas *in situ* tiveram padrão de expressão mais parecido com o epitélio normal. Uma observação importante foi que os tumores completamente desdiferenciados tiveram imunocoloração escassa ou expressão negativa.

Pruneri et al. (2005) avaliaram a prevalência de anormalidades do gene TP63 em linfomas foliculares e evidenciaram que as isoformas TA-p63 são comumente hiperexpressas em tumores de alto grau independente da ocorrência de amplificações gênicas. Os autores não observaram expressão das isoformas truncadas (Δ N-p63), reconhecidas especificamente pelo anticorpo anti-p40.

3.10 Associação com prognóstico

Tannapfel et al. (2001) avaliou a imunoexpressão da proteína p63 em neoplasias malignas de estômago evidenciando que a p63 não se mostrou relacionada ao prognóstico dos pacientes.

¹ **Broders** (1921) descreveu uma classificação dos carcinomas epidermóides, baseada no grau de diferenciação histológica de tumores de lábios, estabelecendo uma relação inversa entre estes graus (I, II, III ou IV) e a proporção de células tumorais bem diferenciadas. O autor evidenciou uma pior evolução nos tumores indiferenciados (Grau IV).

Koga et al. (2003) reportaram que uma expressão reduzida da proteína p63 estaria associada a um fenótipo mais agressivo dos tumores malignos da bexiga e identificaria os doentes com prognóstico pior, podendo atuar junto com o estadiamento dos tumores malignos (TNM) como fator prognóstico.

Massion et al. (2003), com o intuito de analisar o papel do gene TP63, demonstraram que tanto a amplificação genômica como a hiperexpressão da p63 conferem sobrevida prolongada aos pacientes com carcinoma de células escamosas do pulmão independente do estágio e diferenciação do tumor e da imunoexpressão da p53 e do Ki-67.

Lo Muzio et al. (2005) investigaram o papel biológico e o valor prognóstico do TP63 no carcinoma epidermóide de cavidade oral, encontrando uma relação inversamente proporcional entre a expressão da p63 e a sobrevida. Nesse estudo foi igualmente constatado que a sobrevida era menor nos pacientes com estádios mais avançados e infiltração perineural pela neoplasia. Os autores não observaram relação entre a expressão da p63 e fatores clínicos e histológicos como sexo, idade, tamanho e estadiamento tumoral, ou incidência de metástases ou recidiva.

Iwata et al. (2005) não encontraram associação entre a expressão da isoforma Δ Np63 e a sobrevida dos pacientes em 161 casos de câncer de pulmão,

Takahashi et al. (2006) examinaram o impacto clínico da expressão da p63 no carcinoma epidermóide do esôfago e demonstraram que a expressão reduzida da p63, apesar da frequência reduzida, tem impacto prognóstico negativo nesses pacientes. Os autores não encontraram correlação entre a expressão das proteínas

p53 e p63, mas evidenciaram piora do prognóstico nos pacientes com imunoexpressão negativa de ambas as proteínas. Dentre 180 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago, apenas nove (5%) não expressavam a p63, embora se correlacionassem com metástases à distância traduzindo um pior prognóstico.

Oliveira et al. (2007) procuraram avaliar o valor prognóstico da imunoexpressão da proteína p63 nos carcinomas epidermóides da cavidade oral e sugerem que a diminuição da intensidade da imunoexpressão da proteína está associada a um pior prognóstico.

3.11 Associação com neoplasias em geral

Bjorkqvist et al. (1998) e **Massion et al.** (2003) demonstraram, com o auxílio da técnica de hibridização genômica comparativa, que a amplificação genômica no DNA do cromossomo 3q, local onde está mapeado o gene TP63, é uma alteração comum no carcinoma epidermóide do pulmão que pode ser importante na sua patogênese. Este último conclui que tanto a amplificação genômica como a hiperexpressão da p63 conferem sobrevida prolongada aos pacientes com câncer de pulmão 'não-pequenas células'.

Parsa et al. (1999) demonstraram que na epiderme normal, nos folículos pilosos e nas culturas de epiderme estratificada, a proteína p63 está restrita às células com alto potencial proliferativo e ausente das células em processo terminal de diferenciação. Nos carcinomas epidermóides, a expressão e a distribuição da p63

dependem do grau de anaplasia. Em tumores altamente diferenciados (grau I), a p63 está confinada a um halo de células basais a certa distância dos centros de diferenciação terminal, enquanto que nos tumores menos diferenciados, a maioria das células contém p63 e sua distribuição é caótica em relação aos centros de diferenciação terminal.

Signoretti et al. (2000) evidenciaram expressão da p63 *in vitro*, principalmente da isoforma ΔN -p63 α , nas células basais da próstata. A importância do TP63 no desenvolvimento normal prostático é salientada pela ausência da próstata em camundongos destituídos do gene. É igualmente importante a ausência da p63 em adenocarcinomas prostáticos, sugerindo uma expressão tumor-específica da proteína. Esses achados foram reforçados por **Tacha & Miller** (2004), ao descreverem o uso com sucesso da p63, associada com a p504S, proteína citoplasmática superexpressa no câncer de próstata, para a identificação e diagnóstico de condições duvidosas na próstata.

Hibi et al. (2000) recentemente identificaram os genes TP40 e TP73L, situados no braço longo do cromossomo três, como sendo, na verdade, duas isoformas do gene TP63, homólogo do gene TP53, destituído do domínio N-terminal de transativação. A técnica FISH identificou amplificação freqüente desse *locus* gênico em carcinomas epidermóides de pulmão e de cabeça e pescoço, sendo por isso chamado de *Amplified in Squamous Cell Carcinomas* (AIS). Os autores sugeriram um papel oncogênico para o AIS na carcinogênese humana.

De Laurenzi et al. (2000) avaliaram a expressão da p63 e p73 em ceratinócitos humanos em diferenciação. A indução da diferenciação *in vitro* induz um isotipo de

p73 e inibe todas as isoformas de p63. As culturas de ceratinócitos expressam tanto p73 e p63, sendo a isoforma Δ N-p63 a mais evidente. Os autores demonstraram que o TP63 transativava os promotores de loricrina e involucrina, marcadores específicos da diferenciação epidérmica, tanto em ceratinócitos normais como nos transformados. Esses achados foram corroborados por **Levrero et al.** (2000) que também observaram a regulação positiva da p63 sobre a expressão da loricrina e da involucrina, por **Pellegrini et al.** (2001) ao demonstrarem que o padrão de expressão da p63 é capaz de diferenciar as células-tronco ceratinocíticas humanas de suas progenitoras transitoriamente amplificadas e por **Wrone et al.** (2004) que evidenciaram expressão maior e mais difusa da p63 nos carcinomas epidermóides do que na pele normal ou na com lesões ceratóticas, sugerindo um papel para o gene TP63 na diferenciação celular e na carcinogênese cutânea.

Com relação ao trato genital feminino, **O'Connell et al.** (2001) identificaram a expressão da p63 nas células basais do endométrio fetal em uma distribuição similar a das células basais e de reserva do colo uterino. O epitélio metaplásico escamoso ou mucinoso, isoladamente ou associado à hiperplasia ou carcinoma, exibiu a mais intensa coloração pelo p63. **Wang et al.** (2001) correlacionaram a expressão da p63 com o fenótipo morfológico e a presença de HPV em tumores de colo de útero. A expressão da p63 foi útil na distinção entre o carcinoma epidermóide e o adenocarcinoma, onde esteve ausente. Houve forte associação entre o HPV e o TP63, devido ao fato de ambos estarem associados a fenótipos escamosos. Os autores caracterizam a proteína p63 como marcador importante de diferenciação escamosa, sugerindo sua utilização na diferenciação entre carcinomas epidermóides dos carcinomas neuroendócrinos e adenocarcinomas. **Quade et al.** (2001)

corroboraram esses achados após evidenciarem que a mesma é preferencialmente expressa nas células imaturas da linhagem escamosa na zona de transformação cervical humana e nas neoplasias cervicais precoces. Ainda no sistema genital feminino, **Neto** (2003) evidenciou a expressão da p63 predominante em cistoadenomas ovarianos. Em um estudo realizado em nosso país, **Ramalho et al.** (2006) avaliaram a expressão da proteína p63 em quarenta pacientes com doenças trofoblásticas gestacionais, encontrando uma associação estatisticamente significativa que sugere uma possível diferenciação entre os coriocarcinomas, que não expressaram a p63, e as neoplasias benignas com expressão intensa e difusa. Segundo os autores, a p63 cora células mais bem diferenciadas, a exemplo das molas hidatiformes, podendo ser usada na diferenciação de casos difíceis de doenças trofoblásticas gestacionais.

Barbareschi et al. (2001), **Reis-Filho et al.** (2002) e **Werling et al.** (2003), independentemente, demonstraram que as células mioepiteliais - uma característica presente na maioria das lesões benignas mamárias - consistentemente expressam as isoformas protéicas ΔN -p63, sugerindo ser possível utilizar a p63 como marcador diagnóstico tanto nos estudos histológicos como citológicos.

Taniere et al. (2001) avaliaram se existia relação entre a amplificação do TP63 e a inativação do TP53, fato que poderia reforçar o papel oncogênico do TP63. Os autores não encontraram tal relação, visto que a amplificação era encontrada tanto nos tumores com a proteína nativa como nos que tinham a proteína mutada. Contrariando estes achados, **Ribeiro Silva & Zucoloto** (2003) verificaram uma

correlação entre a expressão da p63 e a mutação do TP53 em neoplasias avançadas de esôfago.

Tannapfel et al. (2001) avaliaram a presença de mutações e o padrão de expressão da p63 em cânceres gástricos. Não foram observadas mutações do gene TP63, mas evidenciaram hiperexpressão da p63 em carcinomas de alto grau, de distribuição celular difusa, bem como em casos de metaplasia intestinal e gastrites.

Kaufmann et al. (2001) avaliaram a proteína p63, junto com a citoqueratina 5/6, como marcadores dos carcinomas epidermóides, sugerindo que a imunocoloração positiva para ambos os marcadores em carcinomas metastáticos pouco diferenciados é altamente preditiva de um tumor primário de origem epitelial.

Brinck et al. (2002) avaliaram a expressão do p63 em 59 casos de melanomas malignos, evidenciando expressão em apenas dois casos dentre todos avaliados, além da imunocoloração ter sido caracterizada como fraca.

Di Como et al. (2002) avaliaram, através de imunoistoquímica e da reação em cadeia da polimerase, o padrão de expressão da proteína p63 em tecidos normais e tumorais evidenciando uma expressão nuclear restrita às células epiteliais de epitélios estratificados de tecidos como pele, esôfago, colo uterino, tonsilas e bexiga. A expressão foi predominantemente vista em células basais e em carcinomas epidermóides, mas ausente em adenocarcinomas. Curiosamente, os timomas e os linfomas não-*Hodgkin* expressaram a p63, sendo que apenas as isoformas TA-p63 foram identificadas. Esses achados reforçam o papel do TP63 na carcinogênese dos epitélios escamosos e transicional. Esses achados ganham ressonância com os

relatos de **Ribeiro-Silva & Zucoloto, (2003)** sobre a superexpressão da p63 no carcinoma epidermóide do esôfago, mas não nos adenocarcinomas colo-retal e esofágico, sugerindo que o p63 pode contribuir para a carcinogênese dos tumores escamosos.

Wang et al (2002) constataram a expressão da p63 em células progenitoras brônquicas benignas, em células neoplásicas malignas com diferenciação escamosa e em uma subpopulação de células de adenocarcinomas brônquicos.

Reis-Filho et al. (2003) encontraram resultados em neoplasias em seres humanos que contradizem os achados prévios em linhagens celulares os quais sugeriam que a isoforma ΔN -p63 bloquearia a fosforilação da β -catenina levando a seu acúmulo nuclear e ativação de genes responsivos com papel biológico ligado a oncogênese.

3.12 Associação com neoplasias de cabeça e pescoço ou do trato aerodigestivo superior

Nylander et al. (2000) demonstraram, através de imunoistoquímica, a expressão suprabasal das isoformas p63 α e ΔN -p63 α nos carcinomas orais, sendo a última freqüentemente superexpressa. Os autores sugeriram um papel para o TP63 mais relacionado à oncogênese do que à supressão tumoral no epitélio oral. Chamam atenção para o fato de que, apesar do locus do p63, o cromossomo 3q27 não estar ausente normalmente nos carcinomas humanos, está muito

freqüentemente amplificado nos carcinomas de cabeça e pescoço e de outros sítios de alto e baixo grau (BOCKMUHL, 1996; BJORKQVIST *et al.*, 1998).

Yamaguchi *et al.* (2000) identificaram e mapearam o gene TP40(p51/p63) no braço distal do cromossomo 3q. Investigaram esse gene a procura de alterações em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço através da técnica *Fluorescent in Situ Hybridization* (FISH) e encontraram um aumento do número de cópias.

Glickman *et al.* (2001) avaliaram a expressão imunoistoquímica da proteína p63 no esôfago normal e nas desordens metaplásicas e neoplásicas. Os autores evidenciaram a expressão difusa da p63 nos casos de displasias e neoplasias do esôfago e, por outro lado, não evidenciaram expressão da proteína em adenocarcinomas de esôfago e estômago. A isoforma Δ Np63 foi a mais evidenciada nas análises da expressão do mRNA de todos os tecidos avaliados.

Segundo **Weber *et al.*** (2002) foi observada hiperexpressão da p63 caracterizada por intensa coloração nuclear em tumores benignos de glândulas salivares e ausência de mutações nos genes TP63 e TP73. Todas as isoformas de p63 foram encontradas no tecido parotídeo normal.

Snizek *et al.* (2002) avaliaram a expressão da p63 na mucosa normal e hiperdiferenciada da cabeça e pescoço encontrando uma hipoexpressão dessa em mucosa oral caracterizada por hiperdiferenciação e apoptose, como na condição conhecida por líquen plano, e sugerindo um papel anti-diferenciador do TP63 na mucosa do trato aerodigestivo superior.

Patturajan et al. (2002) sugeriram que as isoformas Δ N-p63 agem como reguladores positivos da via de sinalização da β -catenina, levando ao acúmulo intranuclear de β -catenina e ativação da transcrição dependente da β -catenina nos carcinomas epidermóides da cabeça e pescoço, o que suportaria as propriedades oncogênicas dessas isoformas.

Choi et al. (2002) avaliaram a expressão imunoistoquímica das proteínas p63, p73 e p53 tentando determinar a inter-relação entre esses genes na tumorigênese da cabeça e pescoço. A expressão do p63 foi mais intensa e freqüente tanto nas lesões displásicas, onde se situou em camadas mais suprabasais, como nos carcinomas. Os autores sugeriram que a expressão aberrante do p63 pode ser um evento precoce na carcinogênese da cabeça e pescoço, independente da expressão do p53, funcionando como um oncogene nesses tumores.

Chen et al. (2003) avaliaram através de imunoistoquímica a expressão da proteína p63 em modelos animais de experimentação de carcinogênese oral. Os resultados do estudo sugerem que o gene TP63 pode estar relacionado com a carcinogênese oral. Os autores encontraram expressão periférica da p63 nas ilhas tumorais bem diferenciadas e expressão homogênea uniforme em tumores menos diferenciados, sugerindo com isso que a p63 diminui com a hiperdiferenciação.

Matheny et al. (2003) constataram a diminuição da expressão da p63 *in vitro* em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço de pacientes tratados com ZD1839 (*Iressa*), um inibidor específico do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), sugerindo que o TP63 pode ser um alvo da sinalização do EGFR.

Geddert et al. (2003) examinaram através de imunoistoquímica a expressão da pan-proteína p63 e da sua isoforma Δ N-p63 procurando determinar o seu papel na carcinogênese esofágica, além de avaliar a frequência de amplificação gênica do TP63 em neoplasias do esôfago através da técnica de PCR [Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)]. Os autores identificaram que a expressão da pan proteína p63 e da sua isoforma não transativante foram idênticas na maioria das amostras. Além disso, evidenciaram que uma forte expressão da p63 foi freqüente nas lesões cancerosas escamosas e pré-cancerosas, mas rara e fraca nas lesões oriundas em esôfago de Barrett. Também verificaram que a amplificação gênica do TP63 era rara nas neoplasias de esôfago e não estava associada com a hiperexpressão protéica.

Hara et al. (2004) avaliando o padrão de expressão da p63 em carcinomas epidermóides do esôfago e sua relevância clínico-patológica, encontraram expressão alta e difusa da proteína na maioria dos casos, independente da diferenciação do tumor, porém sem correlações importantes com aspectos clínico-patológicos. Os autores, todavia, sugerem que o gene TP63 tem papel importante na origem e desenvolvimento do câncer do esôfago.

Chen et al. (2004) investigaram a expressão das isoformas de p63 em carcinomas epidermóides bem diferenciados de boca, encontrando uma possível associação das isoformas p63 com a carcinogênese oral e implicando a Δ N-p63 e a hipoexpressão da TA-p63 na tumorigênese oral. A isoforma TA-p63 teve menor expressão no carcinoma epidermóide que na mucosa oral normal sendo essa hipoexpressão mais associada aos tumores mais avançados e recorrentes.

Snizek et al. (2004) também investigaram a expressão diferencial das isoformas do p63 em carcinomas da cabeça e pescoço e em áreas adjacentes não malignas evidenciando que a isoforma truncada α foi predominante, apesar de todas terem sido expressas. Houve maior expressão dela nos tecidos malignos que nos benignos, havendo inclusive uma hipoexpressão dela nos tecidos caracterizados por hiperdiferenciação, como na condição pro-apoptótica do líquen plano, sugerindo um papel antidiferenciador, anti-apoptótico e até carcinogênico da isoforma $\Delta Np63\alpha$ no epitélio da cabeça e pescoço.

Em 2004, **Thurfjell et al.** avaliaram a expressão individual das isoformas do p63 nos carcinomas de cabeça e pescoço encontrando achados que corroboram estudos prévios onde as isoformas ΔN e $p63\alpha$ predominam e estão aumentadas quando comparadas com a expressão em tecidos normais, embora a hiperexpressão de outras isoformas também tenha sido detectada nas lesões carcinomatosas. No ano seguinte, **Thurfjell et al.** (2005) inibiram diferentes isoformas de p63 em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço *in vitro*, levando a diminuição da sobrevida das células tumorais e aumento de sensibilidade dessas células aos efeitos da radiação ionizante e da cisplatina sugerindo propriedades oncogênicas de manutenção da sobrevida da célula tumoral além de possível papel como alvo de terapias gênicas em cabeça e pescoço.

Rocco et al. (2006) defendem a idéia que a ΔN -p63 é um fator essencial para a sobrevida dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço através da supressão da apoptose mediada pela p73.

3.13 Associação com neoplasias de laringe

Existem poucos estudos abordando a associação do TP63 com as neoplasias de laringe. Até o presente momento, encontraram-se apenas duas publicações em língua inglesa versando sobre o tema supracitado e uma publicação em chinês (PRUNERI *et al.*, 2002; DONG *et al.*, 2004; JIA *et al.*, 2006).

Pruneri *et al.* (2002) avaliaram a imunoexpressão da p63 em 150 pacientes com carcinomas epidermóides de laringe tratados cirurgicamente, sendo 81 por laringectomia total e demonstraram a expressão basal e suprabasal das isoformas TA e Δ N-p63 em todas as amostras de mucosa laríngea normal. Os autores documentaram uma alta prevalência de imunoexpressão da proteína p63 tanto nos carcinomas de laringe como nos casos de neoplasia intraepitelial, fazendo-os sugerir uma participação do gene TP63 nas fases iniciais da carcinogênese laríngea. Os dados desse estudo sugerem uma relação positiva entre a maior expressão da p63 e o risco de recidiva e morte. O índice de óbito pelo câncer de laringe foi maior nos pacientes com diminuição da isoforma TA-p63, fato que ocorreu em 22% dos casos avaliados, contrastando com os 100% de expressão da Δ Np63.

Dong *et al.* (2004) avaliaram a imunoexpressão de uma série de possíveis marcadores protéicos, incluindo a proteína p63, em 85 casos de carcinomas de laringe. Os autores não encontraram relação entre a expressão da p63 e o prognóstico dos pacientes. Esses resultados são similares aos evidenciados por **Jia *et al.*** (2006), que avaliaram 63 casos de carcinomas de laringe.

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

Este estudo retrospectivo baseou-se na seleção e avaliação de 133 pacientes consecutivos, portadores de carcinoma epidermóide de laringe, matriculados e tratados na Seção de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital do Câncer do Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, no período compreendido entre os meses de janeiro de 1998 a dezembro de 2000, submetidos a um mesmo tratamento: cirurgia com ou sem radioterapia adjuvante. **ANEXO A**

Os dados referentes aos pacientes incluídos neste estudo foram coletados conforme questionário padronizado pelo autor. **ANEXO B**

Os casos selecionados foram submetidos à avaliação clínica, histopatológica, mensuração da expressão da proteína p63, avaliação do controle clínico e seguimento pós-operatório.

O estudo Imunoistoquímico dos casos analisados para avaliação da expressão da proteína p63 foi realizado por patologista experiente com o uso de anticorpos monoclonais do clone 4A4, sendo todos os casos revisados por um membro titular da Seção de Anatomia Patológica do Instituto Nacional de Câncer.

O protocolo do estudo foi aprovado pelas Comissões Científicas e de Ética do Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ (registrado sob o número 33/04) e pela 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 - USP (registrado sob o número 964/04).

Este projeto de estudo foi dispensado da necessidade de termo de consentimento livre e esclarecido, por não implicar na execução de nenhum procedimento experimental fora das condutas habituais da instituição.

4.1.1 Critérios de Seleção

4.1.1.1 Por Inclusão

Os casos selecionados para o estudo obedeceram aos seguintes critérios de inclusão:

- a) Diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermóide;
- b) Local do tumor primário: laringe com ou sem extensão para hipofaringe;
- c) Pesquisa de metástase à distância: negativa;
- d) Pacientes submetidos à laringectomia total e esvaziamento cervical bilateral;
- e) Tempo mínimo de acompanhamento clínico de 12 meses ou até a ocorrência de um dos eventos a serem estudados: recidiva da doença ou morte do paciente pelo câncer;
- f) Peças cirúrgicas do tumor primário devidamente incluídas em parafina e adequadas para reavaliação histopatológica e Imunoistoquímica.

4.1.1.2 Por Exclusão

Foram excluídos deste estudo seis casos devido à perda de seguimento (cinco casos) e não confirmação histopatológica de carcinoma epidermóide (um caso).

4.1.2 Caracterização da Casuística

4.1.2.1 Dados Epidemiológicos

4.1.2.1.1 Gênero

No estudo epidemiológico, quanto à distribuição por gênero, foram encontrados 111 casos pertencentes ao sexo masculino e 16 casos ao sexo feminino, correspondendo a 87,4 e 12,6 % da casuística, respectivamente. **GRÁFICO 1**

4.1.2.1.2 Raça

Quanto à raça dos doentes, 69 eram da raça branca e 58 da raça não branca, correspondendo respectivamente a 54,3 e 45,7% respectivamente. **GRÁFICO 1**

Gráfico 1- Representação da distribuição por Gênero, Raça e Faixa Etária dos pacientes estudados

4.1.2.1.3 Idade

A idade dos doentes variou de 36 a 93 anos, com uma média de 59 e mediana de 58 anos. **GRÁFICO 2**

Gráfico 2- Distribuição dos doentes por faixa etária

4.1.2.2 Traqueostomia Prévia

Os pacientes submetidos à traqueostomia, antes do tratamento cirúrgico, corresponderam a 77 (60,6%) da casuística, enquanto que em 50 (39,4%) casos não houve traqueostomia prévia. **GRÁFICO 3**

Gráfico 3 - Pacientes submetidos a traqueostomia prévia

4.1.2.3 Duração dos Sintomas

A duração dos sintomas, em meses, variou de zero a 84 meses completo, com uma mediana de seis e uma média de 10,52 meses.

4.1.2.4 Tempo de Tratamento

O intervalo de tempo entre a data da 1ª consulta até a realização do tratamento cirúrgico, em dias, variou de 11 a 1 327 dias, com mediana de 112 e média de 150,4 dias.

4.1.2.5 Hábitos

4.1.2.5.1 Tabagismo e Etilismo

A maioria absoluta dos pacientes era constituída de tabagistas (86%), enquanto que a percentagem de indivíduos etilistas não era tão alta, atingindo 85 pacientes e correspondendo a 67% da casuística. **GRÁFICO 4**

Gráfico 4 - Tabagismo e Etilismo

Dentro do universo dos pacientes analisados, 84 pacientes eram etilistas e tabagistas correspondendo a 66.14%; enquanto 17 pacientes (13.38%) não fumavam nem bebiam; 25 pacientes (19.68%) eram apenas tabagistas; e, somente, 01 paciente (0.78%) era exclusivamente etilista. **GRÁFICO 5**

Gráfico 5 - Organograma do Tabagismo e Etilismo

4.1.2.6 Localização do Tumor Primário

Quanto à localização do tumor primário, 19 situavam-se no compartimento glótico, 16 no supraglótico e 92 acometiam em mais de um subsítio; correspondendo a 15, 13 e 72% respectivamente. **GRÁFICO 6**

Gráfico 6 - Localização do tumor primário

4.1.2.7 Tratamento da Doença

Todos os pacientes incluídos no estudo foram submetidos à laringectomia total e esvaziamento cervical bilateral complementado ou não por tratamento radioterápico adjuvante. O esvaziamento linfático cervical englobou desde os níveis cervicais II, III e IV até aqueles que incluíram níveis adicionais de linfáticos cervicais com ou sem sacrifício de estruturas neuro-vasculares ou musculares.

4.1.2.8 Estadiamento

Foram avaliados o estadiamento clínico (EC) e o patológico (EP), ambos respeitando as normas do sistema TNM – UICC (união internacional contra o câncer)

(BRASIL, 2004). Com relação à extensão local do tumor (T), foram encontrados três casos T1, 24 T2, 88 T3 e 12 T4, correspondendo a 2,4; 18,9; 69,3 e 9,4% respectivamente. **GRÁFICO 7**

Gráfico 7 - Estadiamento T

O estadiamento linfonodal (N) evidenciou 92 casos N0, 22 N1, 11 N2 e dois N3 perfazendo 72,4; 17,3; 8,7 e 1,6% respectivamente. **GRÁFICO 8**

Gráfico 8: Estadiamento N

Quanto ao estadiamento clínico, dois casos eram estágio I (1,6%), 21 do estágio II (16,5%), 82 do estágio III (64,6%) e 22 do IV (17,3%). **GRÁFICO 9**

Gráfico 9: Estadiamento clínico

Ao estratificarmos o estadiamento clínico em dois grupos representados por tumores iniciais (estádio I e II) e tumores avançados (estádio III e IV) detectamos 23 casos iniciais e 104 avançados perfazendo 18,1 e 81,9% respectivamente.

GRÁFICO 10

Gráfico 10: Estadiamento clínico estratificado

O estadiamento ou classificação patológica, também chamada de classificação histopatológica pós-cirúrgica e designada de estadiamento TNM patológico (pTNM), é baseada nas evidências pré-tratamento, complementada ou modificada pelas evidências adicionais obtidas através da cirurgia e do exame histopatológico (TNM, 2004). Esta classificação será demonstrada no capítulo de resultados.

4.1.2.9 Tratamento Radioterápico Complementar

O tratamento radioterápico complementar pós-operatório foi realizado nos casos que apresentaram margens comprometidas ou linfonodos metastáticos no exame histopatológico e nos casos pT4. Ao todo, 96 pacientes (75,6%) tiveram radioterapia complementar com dose total, variando de 4 500 a 7 000 *centi-Gray* (cGY) nos campos dos leitos cirúrgicos do tumor primário e do esvaziamento linfático cervical. **GRÁFICO 11**

Gráfico11: Pacientes submetidos à Radioterapia adjuvante

4.2 Métodos

4.2.1 Método de Avaliação Histopatológica

4.2.1.1 Método de Avaliação Histopatológica Pós-Operatória

Na seção de Cirurgia de cabeça e pescoço do Instituto Nacional de Câncer, após a realização da laringectomia total, as margens do espécime cirúrgico são submetidas a exame anatomopatológico trans-operatório, que inclui macroscopia e histopatologia de congelação.

O esvaziamento linfático cervical ocorre previamente a laringectomia em um mesmo ato. As peças do produto da laringectomia e do esvaziamento cervical são fixadas em solução de formalina a 10%, tamponada com fosfato a 1%.

As amostras mais representativas do tumor são selecionadas pelo patologista responsável, sendo então processadas em parafina. As lâminas são preparadas em cortes de cinco *microns* do material incluído em parafina, e então coradas pelo método da hematoxilina-eosina.

4.2.1.2 Resgate das Lâminas e Seleção dos Blocos

A seleção dos blocos de parafina viáveis para análise Imunoistoquímica foi feita pelo próprio autor com a supervisão de um patologista titular da Divisão de Patologia do Instituto Nacional de Câncer, sem qualquer conhecimento sobre a evolução dos pacientes do estudo.

4.2.1.3 Reavaliação Histopatológica

Foram confeccionadas novas lâminas para coloração por Hematoxilina-Eosina (HE), sendo os casos submetidos à reavaliação histopatológica por um patologista titular da Divisão de Patologia do Instituto Nacional de Câncer, sem qualquer conhecimento sobre a evolução dos pacientes do estudo.

Os aspectos contemplados nessa reavaliação foram os seguintes: invasão de cartilagem; invasão vascular; invasão perineural; acometimento de estruturas adjacentes; infiltrado inflamatório; e grau de diferenciação do tumor.

4.2.2 Método de Análise da Expressão da Proteína p63

4.2.2.1 Análise Imunoistoquímica

Os blocos de parafina enviados foram conferidos, confirmando a sua identificação. Foram realizados dois cortes histológicos de cada bloco, com espessura de 3µm. Esses cortes foram montados em lâminas de vidro, previamente preparadas com o adesivo de poli-L-lisina. Uma lâmina foi corada pela técnica de HE e a outra lâmina foi desparafinada e imunocorada pela técnica Imunoistoquímica padrão avidina-biotina-peroxidase (ABC) com a utilização de anticorpo antiproteína p63.

Após a desparafinização e reidratação, os cortes foram incubados em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e metanol absoluto para impedir a ação da peroxidase endógena. A recuperação do antígeno, para as diferentes isoformas de p63, foi feita

aquecendo as lâminas por 1 hora em uma solução de ácido cítrico com potencial hidrogeniônico (pH) 6.0, resfriando em temperatura ambiente por trinta minutos em cima de uma bancada e lavando em PBS (solução salina tamponada de fosfatos). Subseqüentemente, as lâminas foram incubadas, *overnight*, a 4 graus, com o anticorpo primário e foi usado o *envision mouse*, código k4001 do fabricante Dako - específico para a proteína p63 (anticorpos monoclonais do clone 4A4), em uma diluição de 1:300. Após essa fase, a percentagem de células tumorais imunorreativas foi avaliada por dois observadores, sem conhecimento sobre a evolução clínica dos pacientes. Em todos os casos analisados, apenas os núcleos corados foram considerados positivos.

4.2.3 Quantificação da Expressão da Proteína p63

Procedeu-se a avaliação semiquantitativa visual de toda a lâmina, das células imunocoradas para proteína p63 de cada caso e o percentual de células positivas foi então estimado, sendo então a lâmina em questão classificada de acordo com as seguintes categorias:

- Escore 0: Ausência de imunocoloração; **FIGURA 2**
- Escore 1 (+): Imunocoloração em < 30% das células neoplásicas. Discreta imunocoloração em poucas células; **FIGURA 3**
- Escore 2 (++) : Imunocoloração em > 30% e < 70% das células neoplásicas.

Moderada imunocoloração em moderado número de células; **FIGURA 4**

- Escore 3 (+++): Imunocoloração em > 70% das células neoplásicas. Intensa imunocoloração em numerosas células. **FIGURA 5**

Figura 2 - Escore 0. Coloração nuclear negativa para p63, pelo método Imunoistoquímico (aumento 400X)

Figura 3 - Escore 1. Coloração nuclear positiva para p63 em < 30 % das células neoplásicas, pelo método Imunoistoquímico (aumento 400X)

Figura 4 - Escore 2. Coloração nuclear positiva para p63 em > 30% e < 70% das células neoplásicas, pelo método Imunoistoquímico (aumento 400X)

Figura 5 - Escore 3. Coloração nuclear positiva para p63 em > 70 % das células neoplásicas, pelo método Imunoistoquímico (aumento 400X)

O microscópio usado para leitura das lâminas foi um OLYMPUS BX40 e todas as lâminas foram lidas nos aumentos 40x, 100x, 200x e 400x. O microscópio usado para tirar as fotos foi um OLYMPUS BX51 e a câmera usada para as fotografias foi uma OLYMPUS DP11. As fotos foram tiradas em aumento de 400X.

A exemplo da reavaliação histopatológica, todas as fases da análise Imunoistoquímica foram realizadas por um mesmo patologista sem qualquer conhecimento prévio sobre a evolução clínica dos pacientes do estudo.

4.2.4 Análise do Controle Clínico Pós-Operatório dos Pacientes

O controle clínico dos pacientes desse estudo, no período pós-cirúrgico foi realizado para colher as informações acerca do estado clínico, controle do tumor primário, controle das cadeias linfáticas cervicais, tempo livre de doença e tempo de sobrevida. Todos esses dados foram utilizados para cálculo dos índices de avaliação do comportamento biológico dos tumores e conseqüente delineamento do prognóstico da doença.

Os índices utilizados foram: incidência de recidiva tumoral local, regional ou à distância; o índice de segundos tumores primários; a freqüência de óbitos causados pelo tumor; o tempo livre de doença; e a sobrevida dos doentes.

Foi considerada recidiva local do tumor quando se identificou a presença de carcinoma no local da ressecção prévia do tumor primário, independente do prazo decorrido entre o procedimento cirúrgico e a recorrência da doença.

Foi considerada recidiva regional do tumor quando se identificou a presença de carcinoma metastático para as cadeias linfáticas cervicais, sem evidências de segundo tumor primário, independente do prazo decorrido entre o procedimento cirúrgico e a recorrência da doença.

Foi considerada recidiva à distância do tumor quando se identificou a presença de carcinoma metastático para regiões distantes do tumor primário e das cadeias linfáticas cervicais, sem evidências de segundo tumor primário, independente do prazo decorrido entre o procedimento cirúrgico e a recorrência da doença.

Os óbitos relacionados diretamente com o tumor (óbitos oncológicos) foram caracterizados quando, após o tratamento inicial ou após a tentativa de resgate cirúrgico ou radioterápico da recorrência do carcinoma, os doentes evoluíram para o óbito em função da doença e/ou de suas complicações.

O tempo livre de doença (sobrevida livre de doença) foi expresso em meses e compreende o período entre o tratamento cirúrgico do tumor e o momento do diagnóstico da recidiva do carcinoma identificado pelo exame clínico e comprovado por análise histopatológica.

O tempo até o óbito (sobrevida ligada ao câncer) associado ao câncer (expresso em meses) compreende o período entre o tratamento cirúrgico e o óbito pelo carcinoma (oncológico).

O tempo até o óbito por qualquer causa (sobrevida global) (expresso em meses) compreende o período entre o tratamento cirúrgico e o óbito.

Nos casos em que não foi identificado o evento de interesse (recidiva, óbito pelo carcinoma ou óbito por qualquer causa, dependendo da análise em questão), as observações foram censuradas na data da última avaliação clínica.

4.3 Análise Estatística dos Resultados

4.3.1 Caracterização das Variáveis

A análise estatística contou, inicialmente, de uma análise descritiva dos 127 pacientes, de tal forma a resumir através de tabelas, sendo as variáveis categorizadas descritas através de frequências absolutas e relativas; e as variáveis contínuas, através de média, mediana, desvio padrão, valores mínimo e máximo; segundo o evento de interesse, recidiva, ou óbito. Para estudar o evento recidiva, dividiu-se a amostra em dois grupos: pacientes que desenvolveram ou não recidivas do carcinoma; e para ao evento óbito, dividiu-se também a amostra em dois grupos: pacientes que foram ou não a óbito pelo carcinoma.

Com base nessas divisões procurou-se estudar os possíveis fatores preditivos destes eventos, separadamente, em duas etapas: inicialmente através de uma análise univariada e, em seguida, por meio de uma análise multivariada.

4.3.2 Método de Tratamento Estatístico das Variáveis

As variáveis categorizadas foram descritas através de freqüências absolutas e relativas e as variáveis contínuas, através de média, mediana, desvio padrão, valores mínimo e máximo.

As curvas de sobrevida e sobrevida livre de recidiva foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e as associações com a variável p63 foram estudadas através do teste de Fischer.

As análises estatísticas foram realizadas com os procedimentos FREQ, MEANS, LIFETEST e PHREG do software *Statistical Analysis System* (SAS) versão 9.1.

4.3.2.1 Análise Univariada

Nas análises univariadas, visando identificar dentre as variáveis aferidas neste estudo, quais apresentavam associação positiva com os eventos estudados (óbito oncológico, óbito global e recidiva), foram empregados os seguintes métodos estatísticos: teste de *Wald*, para variáveis contínuas, ou dos testes de *log-rank* e de *Wald*, para variáveis categorizadas (KALBFLEISCH & PRENTICE, 1980).

4.3.2.2 Análise Multivariada

Nas análises multivariadas, modelos de regressão de Cox foram adotados para a identificação das variáveis mais fortemente associadas ao óbito e à recidiva. O método *stepwise* foi utilizado para a seleção das variáveis explicativas mais importantes. A associação das variáveis mais significativas pela análise multivariada

e os eventos foram expressos através do risco relativo, também conhecido como razão de riscos.

As curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida em função do tempo de evolução dos pacientes foram estimadas pelo método de *Kaplan-Meier* (KALBFLEISCH & PRENTICE, 1980).

A sobrevida foi estudada, portanto, levando em consideração o tempo livre de recidiva, óbito relacionado à doença e óbito relacionado a qualquer causa, denominado aqui de óbito total.

As associações entre as variáveis relacionadas aos eventos estudados com a variável expressão da proteína p63 foram estudadas através do teste de Fisher (ROSNER, 2000).

Neste estudo, o nível de significância estabelecido para a análise foi de 5% e as diferenças foram, portanto, consideradas significantes quando o valor de p (nível de significância estatística) era inferior a 0,05.

4.3.3 Banco de Dados

Os dados clínicos, laboratoriais e cirúrgicos dos pacientes incluídos no estudo foram registrados em arquivo digital específico. Tanto esse arquivo digital confeccionado, bem como as planilhas para análise estatística e elaboração das tabelas e gráficos foram criados com os aplicativos *Microsoft Excel* versão 7.0.

4.3.4 Critérios para a Redação do Texto

A redação deste texto foi realizada segundo as normas técnicas da Associação Brasileira de Normas Técnicas, com as modificações sugeridas pelo Serviço de Biblioteca e Documentação através do Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da Universidade de São Paulo, 2005.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados da análise descritiva dos fatores

5.1.1 Invasão de cartilagem

Quanto à invasão de cartilagem dos tumores estudados, encontraram-se 43 casos sem invasão de cartilagem e 84 com invasão, correspondendo respectivamente a 33,9 e 66,1%.

Gráfico 12 - Resultados - Dados Histopatológicos – Invasão de Cartilagem

5.1.2 Invasão vascular

A invasão vascular foi evidenciada em 26 casos (20,5%) e estava ausente em 101 (79,5%) dos 127 casos estudados.

Gráfico 13 - Resultados - Dados Histopatológicos - Invasão Vascular

5.1.3 Invasão perineural

A invasão perineural pelas células neoplásicas foi identificada em 25 casos correspondendo a 19,7% da casuística. Cento e dois casos (80,3%) não apresentaram invasão perineural.

Gráfico 14 - Resultados - Dados Histopatológicos - Invasão Perineural

5.1.4 Acometimento de estruturas adjacentes

Em 82 pacientes ou 64,6% da casuística havia acometimento de estruturas adjacentes, enquanto que em 45 pacientes ou 35,4% desses não houve acometimento de estruturas adjacentes.

Acometimento das estruturas adjacentes

Gráfico 15 - Resultados – Dados Histopatológicos – Acometimento De Estruturas Adjacentes

5.1.5 Infiltrado inflamatório

Foi observada a presença de infiltrado inflamatório em 59 (46,5%) casos. Nos 68 (53,5%) pacientes restantes não havia infiltrado inflamatório.

Infiltrado inflamatório

Gráfico 16 - Resultados - Dados Histopatológicos - Infiltrado Inflamatório

5.1.6 Grau de diferenciação histológica do tumor

Foram identificados dois casos do grau I de diferenciação, 121 casos do grau II e quatro casos do grau III, correspondendo a 1,6; 95,3; e 3,1% da casuística, respectivamente. Não foi observado nenhum caso do grau IV de diferenciação.

Grau de diferenciação histológica

Gráfico 17 - Resultados - Dados Histopatológicos - Grau de Diferenciação Histológica

5.1.7 Margens histológicas

Em 16 casos (12,6%) as margens estavam comprometidas por tumor, enquanto que em 111 (87,4%) dos espécimes cirúrgicos as margens estavam livres de tumor.

Margens Histológicas

Gráfico 18 - Resultados - Dados Histopatológicos - Margens Histológicas

5.1.8 Área tumoral

A mensuração da área tumoral revelou um valor mínimo de 100 mm², valor máximo de 4575mm², mediana de 1100 e média de 1220 mm².

5.1.9 Avaliação histopatológica do tumor primário (pT)

Foram evidenciados 95 casos pT4 (estadiamento patológico tumoral 4), 28 pT3 (estadiamento patológico tumoral 3) e 4 pT2 (estadiamento patológico tumoral 2) perfazendo respectivamente 74,8%, 22% e 3,1%.

Gráfico 19 - Resultados - Dados Histopatológicos - Estadiamento Patológico (pT)

5.1.10 Avaliação histopatológica dos linfonodos regionais (pN)

Identificamos 10 casos pN3 (estadiamento patológico linfonodal 3), 40 pN2 (estadiamento patológico linfonodal 2), 23 pN1 (estadiamento patológico linfonodal 1) e 54 casos pN0 (estadiamento patológico linfonodal 0) correspondendo a 7,9; 31,5; 18,1; e 42,5% respectivamente.

Estadiamento patológico (pN)

Gráfico 20 - Resultados - Dados Histopatológicos - Estadiamento Patológico (pN)

5.1.11 Classificação histopatológica pós-cirúrgica (pTNM)

O estadiamento histopatológico apresenta 102 casos do estágio IV (80,3%), 22 casos do estágio III (17,3%) e três do estágio II (2,4%).

Estadiamento patológico

Gráfico 21 - Resultados - Dados Histopatológicos - Estadiamento Patológico

5.1.12 Quantificação da expressão da proteína p63

A quantificação da imunoexpressão da p63 revelou 126 (99,2%) casos positivos e apenas um (0,8%) caso negativo. **FIGURA 2**

Quando subdivididos em graus ou escores de expressão, observaram-se 62 casos do escore 3 (+++), 60 do escore 2 (++), 4 com 1 (+) e 1 caso sem expressão (0), o que correspondeu respectivamente a 48,8; 47,2; 3,1; e 0,8%. **FIGURAS 2 a 5**

Para fins de análise estatística estratificamos a expressão Imunoistoquímica da proteína p63 em dois grupos. Um grupo representado pelos escores 0 e 1 (+) apresentou cinco casos (3,9%) e outro grupo 122 (96,1%).

5.2 Resultados da análise descritiva do controle clínico e dos índices

5.2.1 Controle clínico pós-operatório

Após a realização do acompanhamento clínico dos doentes, observamos que 68 pacientes dos 127, correspondendo a 53,54 % da casuística, estavam vivos e sem evidências da doença. Dos 57 (44,87%) pacientes que foram a óbito: 44 (77,19%) morreram em consequência do câncer, enquanto que 13 (22,81%) morreram por outras causas. E dois permanecem vivos com câncer.

Dos 44 pacientes mortos pela doença de câncer, 28 morreram em decorrência do carcinoma de células escamosas de laringe, enquanto que 16 morreram em consequência de segundos tumores primários metacrônicos.

Dos 18 pacientes ou 14,17% da casuística, com segundos tumores primários metacrônicos, 16 foram a óbito pela doença neoplásica e dois estão vivos com a doença.

O tempo de sobrevida global ou total aos 24 e aos 60 meses foi estimado em 73,8 e 59,4% respectivamente. O tempo de sobrevida ligada ao câncer aos 24 e aos 60 meses foi estimado em 79 e 67,1% respectivamente. O tempo livre de doença foi estimado em 77,1 e 75% respectivamente.

5.2.2 Recidiva do carcinoma

Dentre os 127 doentes estudados, 31 (24,4%) desenvolveram recidiva da doença, sendo que em 13 (41,9%) pacientes a recidiva foi local, em 11 (35, 4%) pacientes foi regional e em 12 (38,7%) houve recorrência à distância.

Em dois casos houve concomitância de recorrência local e regional e um único paciente apresentou recidiva regional e à distância como sincrônicas.

Todos os 12 (100%) pacientes que apresentaram recidiva à distância evoluíram para o êxito letal.

5.3 Análise estatística

5.3.1 Recidiva da doença

A análise univariada da associação entre a recorrência da doença e os fatores epidemiológicos, clínicos, histopatológicos e da expressão da proteína p63 foi realizada com o auxílio do teste de Wald e de Log Rank. Nessa análise, observamos que as variáveis que apresentavam associação com a recorrência do carcinoma, com significância estatística, foram a dimensão do tumor ($p=0,0234$), o tabagismo ($p=0,0462$), o etilismo ($p=0,0220$), glote ($p=0,0434$), supraglote ($p=0,0432$), envolvimento da hipofaringe ($p=0,0127$), invasão de cartilagem ($p=0,0298$), invasão vascular ($p=0,0171$), acometimento de estruturas adjacentes ($p=0,0070$), estadiamento N patológico ($p<.0001$), estadiamento patológico ($p=0,0300$) e imunexpressão da proteína p63 ($<.0001$). Esses dados encontram-se representados nas tabelas 1, 2 e 3.

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RECIDIVA DA DOENÇA, SEGUNDO POSSÍVEIS FATORES PREDITIVOS. VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS CLÍNICAS

Variável	Recidiva	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP	p
Idade	Não	96	36	93	61	60,39	10,99	0,8533
	Sim	31	42	77	60	59,52	9,65	
	Total	127	36	93	61	60,17	10,65	
Duração Sintomas	Não	96	0	84	6	10,86	14	0,5423
	Sim	31	1	72	6	9,45	13,2	
	Total	127	0	84	6	10,52	13,77	
Área tumoral	Não	96	150	4575	975	1143	732	0,0234
	Sim	31	100	4200	1200	1460	930	
	Total	127	100	4575	1100	1220	793	
Tempo de tratamento	Não	96	11	1327	111	159,1	205,7	0,4674
	sim	31	27	281	126	123,5	65,1	
	Total	127	11	1327	112	150,4	182,1	

DP: desvio padrão

RR: razão de riscos de recidiva

IC(95%): intervalo de confiança da RR com 95% de confiança.

p: nível descritivo do teste de Wald

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RECIDIVA DA DOENÇA, SEGUNDO POSSÍVEIS FATORES PREDITIVOS. VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS CLÍNICAS

	Recidiva								
			Não		Sim		Total		
	Variável	Categoria	n	%	n	%	n	%	P
	Sexo	Feminino	14	87,5	2	12,5	16	12,6	0,2181
		Masculino	82	73,9	29	26,1	111	87,4	
	Raça	branco	54	78,3	15	21,7	69	54,3	0,5329
		Não branco	42	72,4	16	27,6	58	45,7	
	Tabagismo	Não	17	94,4	1	5,6	18	14,2	0,0462 *0.0797
		Sim	79	72,5	30	27,5	109	85,8	
	Etilismo	Não	37	88,1	5	11,9	42	33,1	0,0220
		Sim	59	69,4	26	30,6	85	66,9	
Sítio	Glote	Não	24	64,9	13	35,1	37	29,1	0,0434
		Sim	72	80,0	18	20,0	90	70,9	
	Supraglote	Não	29	87,9	4	12,1	33	26,0	0,0432 *0.0531
		Sim	67	71,3	27	28,7	94	74,0	
	Subglote	Não	84	73,7	30	26,3	114	89,8	0,1665
		Sim	12	92,3	1	7,7	13	10,2	
	Hipofaringe	Não	78	80,4	19	19,6	97	76,4	0,0127
		Sim	18	60,0	12	40,0	30	23,6	
	T	1	3	100,0	.	.	3	2,4	0,7014
		2	17	70,8	7	29,2	24	18,9	
		3	66	75,0	22	25,0	88	69,3	
		4	10	83,3	2	16,7	12	9,4	
	N	0	71	77,2	21	22,8	92	72,4	0,7936
		1	16	72,7	6	27,3	22	17,3	
		2	8	72,7	3	27,3	11	8,7	
		3	1	50,0	1	50,0	2	1,6	
E.Clinico	Estadiamento Clínico	I	2	100,0	.	.	2	1,6	0,8868
		II	15	71,4	6	28,6	21	16,5	
		III	62	75,6	20	24,4	82	64,6	
	Precoce Avançado	IV	17	77,3	5	22,7	22	17,3	0,9889
		I/II	17	73,9	6	26,1	23	18,1	
		III/IV	79	76,0	25	24,0	104	81,9	

p: nível descritivo do teste de log-rank

p*: nível descritivo do teste de Wald

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RECIDIVA, SEGUNDO POSSÍVEIS FATORES PREDITIVOS. VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS E BIOLÓGICAS (IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA p63)

	Recidiva							
		não		sim		Total		
Variável	Categoria	n	%	n	%	n	%	p
Margens	Comprometidas	11	68,8	5	31,3	16	12,6	0,3857
	Livres	85	76,6	26	23,4	111	87,4	
Invasão de cartilagem	Não	37	86,0	6	14,0	43	33,9	0,0298
	Sim	59	70,2	25	29,8	84	66,1	
Invasão vascular	Não	81	80,2	20	19,8	101	79,5	0,0171
	Sim	15	57,7	11	42,3	26	20,5	
Invasão perineural	Não	78	76,5	24	23,5	102	80,3	0,8004
	Sim	18	72,0	7	28,0	25	19,7	
Acometimento de estruturas adjacentes	Não	40	88,9	5	11,1	45	35,4	0,0070
	Sim	56	68,3	26	31,7	82	64,6	
Infiltrado inflamatório	Não	54	79,4	14	20,6	68	53,5	0,3291
	Sim	42	71,2	17	28,8	59	46,5	
Grau de diferenciação	bom	2	100,0	.	.	2	1,6	0,7188
	moderado	91	75,2	30	24,8	121	95,3	
	pouco	3	75,0	1	25,0	4	3,1	
Estadiamento patológico T (PT)	pT2	4	100,0	.	.	4	3,1	0,1395
	pT3	24	85,7	4	14,3	28	22,0	
	pT4	68	71,6	27	28,4	95	74,8	
Estadiamento patológico N (PN)	pN0	47	87,0	7	13,0	54	42,5	<.0001
	pN1	21	91,3	2	8,7	23	18,1	
	pN2	23	57,5	17	42,5	40	31,5	
	pN3	5	50,0	5	50,0	10	7,9	
Estadiamento patológico	II	3	100,0	.	.	3	2,4	0,0300
	III	21	95,5	1	4,5	22	17,3	
	IV	72	70,6	30	29,4	102	80,3	
p63	0+	.	.	1	100,0	1	0,8	<.0001
	1+	1	25,0	3	75,0	4	3,1	
	2+	47	78,3	13	21,7	60	47,2	
	3+	48	77,4	14	22,6	62	48,8	
p63	0+ ou 1+	1	20,0	4	80,0	5	3,9	<.0001
	2+ ou 3+	95	77,9	27	22,1	122	96,1	

p: nível descritivo do teste de log-rank

Os resultados obtidos nessa etapa da análise estatística possibilitaram a seleção de um subconjunto de variáveis que expressaram diferença estatística entre

os grupos de doentes que tiveram ou não recidiva do carcinoma. Este grupo de variáveis foi o ponto de partida para a análise multivariada. Esses dados encontram-se representados na tabela 4.

TABELA 4 – VARIÁVEIS SELECIONADAS NA ANÁLISE UNIVARIADA PARA RECIDIVA DA DOENÇA

Variáveis		P
Área tumoral		0,0234
Tabagismo		0,0462
		*0.0797
Etilismo		0,0220
Sítio	Glote	0,0434
	Supraglote	0,0432
		*0.0531
	Hipofaringe	0,0127
Invasão de cartilagem		0,0298
Invasão vascular		0,0171
Acometimento de estruturas adjacentes		0,0070
Estadiamento patológico N (PN)		<.0001
Estadiamento patológico		0,0300
p63 (0, 1, 2 e 3+)		<.0001
p63 (0 e 1+ x 2 e 3+)		<.0001

p: nível descritivo do teste de log-rank

p*: nível descritivo do teste de Wald

A análise multivariada foi realizada a partir do subgrupo de variáveis extraídas da análise univariada que selecionou os principais fatores de risco para a ocorrência de recorrência do carcinoma. Empregou-se então o método de seleção de variáveis *stepwise* que elegeu a imunoexpressão da proteína p63, o estadiamento N patológico, o etilismo e o envolvimento da hipofaringe para a análise multivariada. Esses dados encontram-se representados nas tabelas 4 e 5.

TABELA 5 – PASSOS DO MÉTODO “STEPWISE” DE SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS PARA ANÁLISE MULTIVARIADA

Recidiva	N
Sim	31
Não	96
Total	127
Passo	Variáveis
1	P63
2	PN
3	Etilismo
4	Hipofaringe

A análise multivariada demonstrou que todas as variáveis selecionadas pela análise univariada e pelo método “stepwise” apresentavam valores preditivos para a recidiva do carcinoma (imunoexpressão da proteína p63 com $p=0,0013$, o estadiamento N patológico com $p=0,0002$, o etilismo com $p=0,0383$ e o envolvimento da hipofaringe com $p=0,0475$) para a análise multivariada, conforme demonstrado pela tabela 6.

TABELA 6 – ANÁLISE MULTIVARIADA DAS VARIÁVEIS MAIS IMPORTANTES NA PREDIÇÃO DO EVENTO “RECIDIVA DO CARCINOMA”

Variável		RR	IC (95%)			p
p63	2+ ou 3+ x 0+ ou 1+	0,15	0,05	-	0,48	0,0013
PN	0 ou 1 x 2 ou 3	4,69	2,11	-	10,43	0,0002
Etilismo	sim x não	2,80	1,06	-	7,42	0,0383
Hipofaringe	sim x não	2,16	1,01	-	4,63	0,0475

RR: razão de riscos de recidiva

IC(95%): intervalo de confiança da RR com 95% de confiança.

5.3.2 Óbito pelo carcinoma

A análise univariada da associação entre o óbito pelo carcinoma e os fatores epidemiológicos, clínicos, histopatológicos e da expressão da proteína p63 foi realizada com o auxílio do teste de Wald e de Log Rank. Nessa análise, observamos que as variáveis que apresentavam associação com óbito causado pelo carcinoma, com significância estatística, foram o tabagismo ($p=0,0262$), o etilismo ($p=0,0186$), a dimensão do tumor ($p=0,0163$), supraglote ($p=0,0476$), envolvimento da hipofaringe ($p=0,0205$), invasão de cartilagem ($p=0,0019$), invasão vascular ($p=0,0262$), acometimento de estruturas adjacentes ($p=0,0008$), estadiamento T patológico ($p=0,0337$), estadiamento N patológico ($p<.0001$) estadiamento patológico ($p<.0001$), recidiva da doença, ocorrência de segundo tumor primário ($p<.0001$) e imunexpressão da proteína p63 ($p<.0001$). Esses dados encontram-se representados nas tabelas 7, 8 e 9.

TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO DA OCORRÊNCIA DE ÓBITO SEGUNDO POSSÍVEIS FATORES PREDITIVOS. VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS

Variável	Óbito Oncológico	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP	p
Idade	Não	83	36	82	61	60,27	10,75	0,8431
	Sim	44	42	93	59,5	60	10,56	
	Total	127	36	93	61	60,17	10,65	
Duração Sintomas	Não	83	0	84	7	11,57	14,77	0,1493
	Sim	44	1	72	6	8,55	11,57	
	Total	127	0	84	6	10,52	13,77	
Área tumoral	Não	83	150	4575	924	1134	737	0,0163
	Sim	44	100	4200	1240	1382	877	
	Total	127	100	4575	1100	1220	793	
Tempo de tratamento	Não	83	11	1327	112	167,2	219,8	0,3531
	Sim	44	27	281	110	118,8	58,6	
	Total	127	11	1327	112	150,4	182,1	

DP: desvio padrão

RR: razão de riscos de recidiva

TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO DA OCORRÊNCIA DE ÓBITO SEGUNDO POSSÍVEIS FATORES PREDITIVOS. VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS

		Óbito Oncológico							
	Variável		Não		Sim		Total		p
		Categoria	n	%	n	%	n	%	
	Sexo	Feminino	13	81,3	3	18,8	16	12,6	0,2057
		Masculino	70	63,1	41	36,9	111	87,4	
	Raça	Branco	49	71,0	20	29,0	69	54,3	0,2074
		Não branco	34	58,6	24	41,4	58	45,7	
	Tabagismo	Não	16	88,9	2	11,1	18	14,2	0,0262
		Sim	67	61,5	42	38,5	109	85,8	
	Etilismo	Não	34	81,0	8	19,0	42	33,1	0,0186
Sim		49	57,6	36	42,4	85	66,9		
Traqueostomia prévia	Não	32	64,0	18	36,0	50	39,4	0,7235	
	Sim	51	66,2	26	33,8	77	60,6		
Perda de peso	Não	72	66,7	36	33,3	108	85,0	0,4588	
	Sim	11	57,9	8	42,1	19	15,0		
Sítio	Glote	Não	21	56,8	16	43,2	37	29,1	0,1465
		Sim	62	68,9	28	31,1	90	70,9	
	Supraglote	Não	26	78,8	7	21,2	33	26,0	0,0476 *0.0538
		Sim	57	60,6	37	39,4	94	74,0	
	Subglote	Não	73	64,0	41	36,0	114	89,8	0,2809
		Sim	10	76,9	3	23,1	13	10,2	
	Transglote	Não	66	66,7	33	33,3	99	78,0	0,5059
		Sim	17	60,7	11	39,3	28	22,0	
	Hipofaringe	Não	68	70,1	29	29,9	97	76,4	0,0205
		Sim	15	50,0	15	50,0	30	23,6	
	Estádio T	1	3	100,0	.	.	3	2,4	0,7347
		2	15	62,5	9	37,5	24	18,9	
		3	57	64,8	31	35,2	88	69,3	
		4	8	66,7	4	33,3	12	9,4	
	Estádio N	0	61	66,3	31	33,7	92	72,4	0,7168
		1	13	59,1	9	40,9	22	17,3	
		2	8	72,7	3	27,3	11	8,7	
		3	1	50,0	1	50,0	2	1,6	
	Estadiamento clínico	I	2	100,0	.	.	2	1,6	0,8463
		II	13	61,9	8	38,1	21	16,5	
		III	53	64,6	29	35,4	82	64,6	
		IV	15	68,2	7	31,8	22	17,3	
Estadiamento clínico	Precoce	I/II	15	65,2	8	34,8	23	18,1	0,8601
	Avançado	III/IV	68	65,4	36	34,6	104	81,9	

p: nível descritivo do teste de log-rank

p*: nível descritivo do teste de Wald

TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DA OCORRÊNCIA DE ÓBITO SEGUNDO POSSÍVEIS FATORES PREDITIVOS. VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS E BIOLÓGICAS (IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA p63)

		Óbito Oncológico						
		Não		Sim		Total		
Variável	Categoria	n	%	n	%	n	%	p
Margens	Comprometidas	8	50	8	50	16	12,6	0,1203
	Livres	75	67,6	36	32,4	111	87,4	
Invasão de cartilagem	Não	36	83,7	7	16,3	43	33,9	0,0019
	Sim	47	56	37	44	84	66,1	
Invasão vascular	Não	70	69,3	31	30,7	101	79,5	0,0262
	Sim	13	50	13	50	26	20,5	
Invasão perineural	Não	69	67,6	33	32,4	102	80,3	0,5197
	Sim	14	56	11	44	25	19,7	
Acometimento de estruturas adjacentes	Não	38	84,4	7	15,6	45	35,4	0,0008
	Sim	45	54,9	37	45,1	82	64,6	
Infiltrado inflamatório	Não	48	70,6	20	29,4	68	53,5	0,2944
	Sim	35	59,3	24	40,7	59	46,5	
Grau de diferenciação	Bom	2	100	.	.	2	1,6	0,6404
	Moderado	78	64,5	43	35,5	121	95,3	
	Pouco	3	75	1	25	4	3,1	
Estadiamento patológico T (PT)	pT2	4	100	.	.	4	3,1	0,0337
	pT3	23	82,1	5	17,9	28	22	
	pT4	56	58,9	39	41,1	95	74,8	
Estadiamento patológico N (PN)	pN0	42	77,8	12	22,2	54	42,5	<.0001
	pN1	19	82,6	4	17,4	23	18,1	
	pN2	18	45	22	55	40	31,5	
	pN3	4	40	6	60	10	7,9	
Estadiamento patológico	II	3	100	.	.	3	2,4	0,0093
	III	20	90,9	2	9,1	22	17,3	
	IV	60	58,8	42	41,2	102	80,3	
p63	0+	.	.	1	100	1	0,8	<.0001
	1+	1	25	3	75	4	3,1	
	2+	41	68,3	19	31,7	60	47,2	
	3+	41	66,1	21	33,9	62	48,8	
P63	0+ ou 1+	1	20	4	80	5	3,9	<.0001
	2+ ou 3+	82	67,2	40	32,8	122	96,1	

p: nível descritivo do teste de log-rank

p*: nível descritivo do teste de Wald

Os resultados obtidos nessa etapa da análise estatística possibilitaram a seleção de um subconjunto de variáveis que expressaram diferença estatística entre os grupos de doentes que morreram ou não pelo carcinoma. Este grupo de variáveis foi o ponto de partida para a análise multivariada. **TABELA 10**

TABELA 10 – VARIÁVEIS SELECIONADAS NA ANÁLISE UNIVARIADA PARA O EVENTO “ÓBITO”

Variável	P
Área tumoral	0,0163
Tabagismo	0,0262
Etilismo	0,0186
Supraglote	0,0476
	*0.0538
Hipofaringe	0,0205
Invasão de cartilagem	0,0019
Invasão vascular	0,0262
Acometimento de estruturas adjacentes	0,0008
Estadiamento patológico T (PT)	0,0337
Estadiamento patológico N (PN)	<.0001
Estadiamento patológico	0,0093
p63 (0, 1, 2 e 3+)	<.0001
p63 (0 e 1+ x 2 e 3+)	<.0001

p: nível descritivo do teste de log-rank

p*: nível descritivo do teste de Wald

A análise multivariada foi realizada a partir do subgrupo de variáveis extraídas da análise univariada que selecionou os principais fatores de risco para a ocorrência de óbito pelo carcinoma. Empregou-se então o método de seleção de variáveis “stepwise” que elegeu a recidiva da doença, ocorrência de segundo tumor primário ($p < .0001$), imunoexpressão da proteína p63 e envolvimento da hipofaringe para a análise multivariada. **TABELA 11**

TABELA 11 – PASSOS DO MÉTODO “STEPWISE” DE SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS PARA ANÁLISE MULTIVARIADA

Óbito Oncológico	N
Sim	44
Não	83
Total	127
Passo	Variáveis
1	Recidiva
2	SegPrim
3	P63
4	Hipofar

A análise multivariada demonstrou que todas as variáveis selecionadas pela análise univariada e pelo método *stepwise* apresentavam valores preditivos para o óbito pelo carcinoma (recidiva da doença com $p<0.0001$, ocorrência de segundo tumor primário com $p<0.0001$, imunoeexpressão da proteína p63 com $p=0.0002$ e envolvimento da hipofaringe com $p=0,0158$), conforme demonstrado pela tabela 12.

TABELA 12 – ANÁLISE MULTIVARIADA DAS VARIÁVEIS MAIS IMPORTANTES NA PREDIÇÃO DO EVENTO “ÓBITO PELO CARCINOMA”

Variável		RR	IC (95%)	P
Recidiva	sim x não	16,94	8,49 - 33,78	<.0001
SegPrim	sim x não	4,85	2,45 - 9,58	<.0001
P63	2+ ou 3+ x 0+ ou 1+	0,10	0,03 - 0,34	0,0002
Hipofar	sim x não	2,28	1,17 - 4,46	0,0158

RR: razão de riscos de óbito oncológico

IC(95%): intervalo de confiança da RR com 95% de confiança

Adicionalmente, o pesquisador realizou novas análises multivariadas impondo a presença das variáveis margens cirúrgicas (comprometidas ou não) e radioterapia realizada (sim ou não). Previamente essas não demonstraram significância

estatística nas análises univariadas para pleitearem novas avaliações. Entretanto, devido à relevância clínica de ambas, procederam-se os testes estatísticos.

A análise multivariada demonstrou que as variáveis impostas não apresentavam valores preditivos para a recidiva da doença e, apenas, a radioterapia foi preditiva para o óbito pelo carcinoma ($p= 0,0254$ e $RR=0,41$). Nesse caso, a realização de radioterapia adjuvante diminuiu a chance de óbito, sugerindo uma espécie de efeito protetor, esperado após os tratamentos adjuvantes.

TABELAS 13 e 14

TABELA 13 – ANÁLISE DAS VARIÁVEIS EXPLICATIVAS COM RESULTADOS DAS ANÁLISES UNIVARIADAS MAIS IMPORTANTES NA PREDIÇÃO DE ÓBITO POR QUALQUER CAUSA, FORÇANDO A PRESENÇA DAS VARIÁVEIS MARGENS E RXT

Variável		RR	IC(95%)	p
Margens	compr. x livres	1,34	0,67 - 2,68	0,4120
RxT	sim x não	0,41	0,19 - 0,90	0,0254
Recidiva	sim x não	7,19	3,93 - 13,16	<.0001
PN	2 ou 3 x 0 ou 1	3,06	1,64 - 5,72	0,0004
SegPrim	sim x não	2,39	1,28 - 4,45	0,0062

RR: razão de riscos de óbito por qualquer causa

IC(95%): intervalo de confiança da RR com 95% de confiança

TABELA 14 - SELEÇÃO POR *STEPWISE* DAS VARIÁVEIS EXPLICATIVAS COM RESULTADOS DAS ANÁLISES UNIVARIADAS MAIS IMPORTANTES NA PREDIÇÃO DE RECIDIVA, FORÇANDO A PRESENÇA DAS VARIÁVEIS MARGENS E RXT

Variável		RR	IC(95%)	p
Margens	compr. x livres	1,04	0,38 - 2,81	0,9445
RxT	sim x não	1,37	0,44 - 4,27	0,5843
P63	2+ ou 3+ x 0+ ou 1+	0,14	0,04 - 0,47	0,0014
PN	0 ou 1 x 2 ou 3	4,27	1,81 - 10,08	0,0009
Etilismo	sim x não	2,80	1,05 - 7,44	0,0389
Hipofar	sim x não	2,25	1,04 - 4,88	0,0401

RR: razão de riscos de recidiva

IC(95%): intervalo de confiança da RR com 95% de confiança

5.3.3 Sobrevida, sobrevida livre de doença e probabilidade de óbito pelo carcinoma

A sobrevida foi estudada sob três prismas: tempo livre de doença, óbito relacionado à doença e óbito relacionado a qualquer causa. Para estimação desses intervalos foi usado o método de Kaplan-Meier.

A estimativa da probabilidade de sobrevida relacionada ao óbito por qualquer causa foi de 73,9% em 24 meses e de 59,5% em 60 meses. Esses dados encontram-se registrados na tabela 15 e a curva de sobrevida relacionada ao óbito total encontra-se no gráfico 22.

TABELA 15 – ESTIMATIVA DA PROBABILIDADE DE SOBREVIDA (MÉTODO DE KAPLAN-MEIER). EVENTO: “ÓBITO TOTAL”

Tempo (anos)	P(sobreviver)	EP
2	0,7387	0,0391
5	0,5948	0,0445

EP: erro padrão da probabilidade de não ir a óbito

Gráfico 22 - Estimativa Da Probabilidade De Sobrevida (Método De Kaplan-Meier). Evento: “Óbito Total”

A estimativa da probabilidade de sobrevida livre de recorrência do carcinoma foi de 77,2% em 24 meses e de 75,1% em 60 meses. Esses dados encontram-se na tabela 16 e a curva de sobrevida livre de recorrência encontra-se no gráfico 23.

TABELA 16 – ESTIMATIVA DA PROBABILIDADE DE SOBREVIDA (MÉTODO DE KAPLAN-MEIER). EVENTO: “RECORRÊNCIA DO CARCINOMA”

Tempo (anos)	P(sobreviver)	EP
2	0,7901	0,0374
5	0,6717	0,0439

n: número de indivíduos em risco

Gráfico 23 - Estimativa da Probabilidade de Sobrevida (Método De Kaplan-Meier). Evento: “Recorrência do Carcinoma”

A estimativa da probabilidade de sobrevida livre relacionada ao óbito pelo carcinoma foi de 79% em 24 meses e de 67% em 60 meses. Esses dados encontram-se na tabela 17 e a curva de sobrevida livre de recorrência encontra-se no gráfico 24.

TABELA 17 – ESTIMATIVA DA PROBABILIDADE DE SOBREVIDA (MÉTODO DE KAPLAN-MEIER). EVENTO: “ÓBITO RELACIONADO AO CARCINOMA”

Tempo (anos)	P(não recidivar)	EP
2	0,7717	0,0387
5	0,7508	0,0404

EP: erro padrão da probabilidade de não recidivar

Gráfico 24 - Estimativa da Probabilidade de Sobrevida (Método De Kaplan-Meier). Evento: “Óbito Relacionado ao Carcinoma”

5.3.4 Análise Complementar de Outros Fatores

Adicionalmente, foram considerados mais alguns elementos na análise estatística, alicerçados pelos resultados encontrados nas análises estatísticas prévias, tais como: a análise da associação entre a imunoeexpressão da proteína p63

com os fatores preditivos de recorrência e de óbito pelo carcinoma identificados nas análises univariadas.

Foi realizada com esse fim uma análise da associação entre as variáveis selecionadas na análise univariada com a expressão da proteína p63. Para tanto empregamos o teste exato de Fischer (ROSNER, 2000).

Nesta análise observamos que a expressão da proteína p63 não estava associada a nenhum dos fatores preditivos para a recorrência ou óbito pelo carcinoma, previamente selecionado através das análises univariadas anteriores ($p > 0,05$), com exceção da variável recidiva em relação ao evento óbito pelo carcinoma. Esses dados encontram-se contabilizados nas tabelas 18, 19 e 20.

TABELA 18 – DISTRIBUIÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA p63 DE ACORDO COM VARIÁVEIS ASSOCIADAS AOS EVENTOS RECORRÊNCIA E/OU ÓBITO PELO CARCINOMA. VARIÁVEIS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS

	p63				
	N	0/1	2/3	Total	p
	%				
Tabagismo	Não	0	18	18	1,0000
		0.00	14.75		
	Sim	5	104	109	
		100.00	85.25		
	Total	5	122	127	
Etilismo	Não	0	42	42	0,1698
		0.00	34.43		
	Sim	5	80	85	
		100.00	65.57		
	Total	5	122	127	
Glote	Não	1	36	37	1,0000
		20.00	29.51		
	Sim	4	86	90	
		80.00	70.49		
	Total	5	122	127	
Supraglote	Não	1	32	33	1,0000
		20.00	26.23		
	Sim	4	90	94	
		80.00	73.77		
	Total	5	122	127	
Hipofaringe	Não	4	93	97	1,0000
		80.00	76.23		
	Sim	1	29	30	
		20.00	23.77		
	Total	5	122	127	
Radioterapia	Não	2	29	31	0,5949
		40.00	23.77		
	Sim	3	93	96	
		60.00	76.23		
	Total	5	122	127	

p: nível descritivo do teste de Fischer

TABELA 19 – DISTRIBUIÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA p63 DE ACORDO COM VARIÁVEIS ASSOCIADAS AOS EVENTOS RECORRÊNCIA E/OU ÓBITO PELO CARCINOMA. VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS

	p63				
	N	0/1	2/3	Total	p
	%				
Invasão de Cartilagem	Não	1	42	43	0,6617
		20.00	34.43		
	Sim	4	80	84	
		80.00	65.57		
	Total	5	122	127	
Invasão Vascular	Não	4	97	101	1,0000
		80.00	79.51		
	Sim	1	25	26	
		20.00	20.49		
	Total	5	122	127	
Acometimento de estruturas adjacentes	Não	2	43	45	1,0000
		40.00	35.25		
	Sim	3	79	82	
		60.00	64.75		
	Total	5	122	127	
Estadiamento patológico tumoral (PT)	pT2	1	3	4	0,0972
		20.00	2.46		
	pT3	0	28	28	
		0.00	22.95		
	pT4	4	91	95	
		80.00	74.59		
	Total	5	122	127	
Estadiamento patológico nodal (PN)	Pn0	1	53	54	0,2106
		20.00	43.44		
	Pn1	0	23	23	
		0.00	18.85		
	Pn2	3	37	40	
		60.00	30.33		
	pN3	1	9	10	
		20.00	7.38		
	Total	5	122	127	
Estadiamento patológico	II	1	2	3	0,1486
		20.00	1.64		
	III	0	22	22	
		0.00	18.03		
	IV	4	98	102	
		80.00	80.33		
	Total	5	122	127	

p: nível descritivo do teste de Fischer

TABELA 20 – DISTRIBUIÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA p63 DE ACORDO COM AS VARIÁVEIS ASSOCIADAS AOS EVENTOS RECORRÊNCIA E/OU ÓBITO PELO CARCINOMA. VARIÁVEIS DE CONTROLE CLÍNICO

	p63				
	N	0/1	2/3	Total	p
	%				
Recidiva	Não	1	95	96	0,0125
		20.00	77.87		
	Sim	4	27	31	
		80.00	22.13		
	Total	5	122	127	
Local	Não	4	110	114	0,4226
		80.00	90.16		
	Sim	1	12	13	
		20.00	9.84		
	Total	5	122	127	
Regional	Não	3	113	116	0,0593
		60.00	92.62		
	Sim	2	9	11	
		40.00	7.38		
	Total	5	122	127	
Distância	Não	2	113	115	0,0059
		40.00	92.62		
	Sim	3	9	12	
		60.00	7.38		
	Total	5	122	127	
Segundo Primário	Não	5	104	109	1,0000
		100.00	85.25		
	Sim	0	18	18	
		0.00	14.75		
	Total	5	122	127	

p: nível descritivo do teste de Fischer

6 DISCUSSÃO

A busca de fatores biológicos que possua impacto prognóstico e possibilite estratificar os doentes, quanto à evolução clínica, e ajude na seleção terapêutica tem merecido atenção por parte de vários estudos (DIAS, 1999; CERNEA, 2001).

A descoberta de genes com estrutura muito parecida ao gene TP53 (especialmente o TP63) associada aos estudos com camundongos destituídos do TP63 - que reforçam o papel crítico deste gene na regulação da proliferação epitelial e renovação das células-tronco nas fases precoces do desenvolvimento - fizeram surgir especulações sobre a possibilidade do gene TP63 funcionar como regulador do crescimento celular nos tecidos normais e neoplásicos (KAELIN; MILLS *et al.*, 1999).

A partir desse ponto, surgiram vários estudos demonstrando a expressão dos produtos protéicos do gene TP63 em diversos tecidos normais e tumorais, especialmente nas neoplasias malignas do trato aerodigestivo superior (YANG & MCKEON, 2000; QUADE *et al.*, 2001). A complexidade estrutural e multiplicidade de isoformas do gene TP63 fizeram transparecer as imbricadas inter-relações que existem entre os genes, seus isótipos distintos e os genes alvos de cada um deles (PARSA *et al.*, 1999). Surge a suposição de que as ações desses produtos gênicos, incluindo a p63, dependem de desequilíbrios gerados a partir de amplificações gênicas e/ou de hiper ou hipoexpressões dessas proteínas.

O presente estudo avaliou a imunoexpressão da proteína p63 em uma série homogênea de 127 casos de carcinoma epidermóide de laringe.

A homogeneidade da amostra é comprovada pela ocorrência de mais de 95% de casos com estadiamento histopatológico avançado e grau II de diferenciação histológica (moderadamente diferenciados) e pelo fato de todos os pacientes terem sido submetidos ao mesmo tipo de tratamento.

A similaridade dos pacientes, tanto do ponto de vista clínico, como em relação à terapêutica, restringe ao mínimo possíveis interferências desses fatores na evolução clínica e ajudam na identificação mais fidedigna do perfil de expressão da proteína p63 nos carcinomas de laringe, além da contribuição, através do tratamento estatístico multivariado, para a avaliação do impacto prognóstico da p63 nos carcinomas epidermóides de laringe.

A invasão de cartilagem ocorreu em 66,1% dos casos analisados. O acometimento de estruturas adjacentes ocorreu em 64,6% da amostra e constatou-se a presença de infiltrado inflamatório em 46,5% dos casos.

A avaliação do infiltrado inflamatório peritumoral, além da constatação da sua presença ou não, é normalmente complementada pela gradação desse infiltrado em leve, moderado e intenso, a exemplo de outros estudos que analisaram aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares como fatores prognósticos (DIAS, 1999; CERNEA, 2001). O desenho retrospectivo desse estudo inviabilizou o acesso aos graus da reação inflamatória em uma grande parte da série. O infiltrado inflamatório tem uma relação diretamente proporcional à competência imunológica do hospedeiro e geralmente se reflete em melhor prognóstico. Entretanto, não foi possível comprovar essa associação no nesse estudo, mesmo levando em

consideração apenas a presença a do infiltrado, que poderia traduzir uma suposta melhor evolução clínica quando comparada com a ausência de reação inflamatória.

A invasão vascular e perineural foram observadas em 20,5 e 19,7% dos casos respectivamente. **Lo Muzio** (2005) encontrou uma associação estatisticamente significativa entre a presença de infiltração perineural e a percentagem de células positivas para p63 na imunocoloração. Os resultados contrastam com os achados de Lo Muzio (2005), visto que não se encontrou associação estatisticamente significativa entre a invasão vascular ou perineural e a imunoexpressão da proteína p63. Tampouco foi observada, após as análises multivariadas, significância estatística entre essas duas variáveis e os eventos óbito ou recidiva da doença.

Cerca de 95,3% dos casos foram classificados como moderadamente diferenciados (grau II de diferenciação), de acordo com os critérios de **Broders** (1921). Não houve nenhum caso de grau histológico indiferenciado. Esses resultados diferem dos apresentados por Nadal *et al* (1995) que relataram a ocorrência predominante de graus III e IV de diferenciação em uma série de 88 pacientes com carcinoma epidermóide de laringe. **Lo Muzio** (2005) ao avaliar 94 casos de carcinoma epidermóide de cavidade oral evidenciou que a expressão da p63 estava aumentada, mais intensa e mais difusa nos tumores pouco diferenciados. Vários estudos corroboram esses achados que estabelecem uma relação diretamente proporcional entre a expressão da proteína p63 e o grau histopatológico ou indiferenciação do tumor, de modo que quanto mais indiferenciado o tumor, maior a expressão da p63 (TANNAPFEL *et al.*, 2001;

CHOI *et al.*; PRUNERI *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003). A literatura reforça, com esses achados de maior expressão da p63 nas camadas histológicas basais mais proliferativas, o provável papel crítico da p63 na manutenção de populações de células-tronco e no crescimento neoplásico. Esses achados ficaram prejudicados neste estudo, provavelmente pela extrema homogeneidade da amostra, inclusive com relação ao grau histológico de diferenciação, onde quase todos os casos eram moderadamente diferenciados.

As margens histológicas estavam comprometidas no laudo histopatológico definitivo em 12,6% dos casos. Apesar disso, a ocorrência desse achado não apresentou associação estatisticamente significativa com os indicadores prognósticos ou com a expressão da proteína p63.

Aproximadamente, 97,9% dos casos eram constituídos por tumores com estadiamento patológico avançado, tal qual a casuística de **Nadal *et al.*** (1995) e cerca de 40% não tinham linfonodos comprometidos histopatologicamente. Contrastando com nossos casos, a série relatada por **Pruneri *et al.*** (2002), possuía metade dos pacientes com tumores de estadiamento avançado e o restante com estadiamento grau I e II. Entretanto nesse mesmo estudo de Pruneri *et al.* (2002), cerca de 73 pacientes foram estadiados como graus III e IV, enquanto 81 pacientes foram submetidos à laringectomia total. Isso significa que oito pacientes dos estádios I e II foram submetidos à laringectomia total. Esses resultados se alinham com os nossos achados de três casos com estadiamento histopatológico pós-cirúrgico do estágio II, perfazendo 2,4% da amostra.

É digno de nota em nosso estudo, o achado pré-operatório de 23 casos (18%) de tumores iniciais (estádios I e II) implicando em reflexões na tentativa de explicar esses resultados.

A primeira observação quando comparamos os estadiamentos clínicos e histopatológicos é que existe uma diferença significativa entre os 23 casos com estádios clínicos I e II e três casos com estadiamento histopatológico II. Essa diferença pode ser explicada por um estadiamento clínico equivocado, por uma mudança no estadiamento determinada pela progressão da doença ou até pela mescla dessas duas possibilidades. Em estudo realizado no INCA, **Barbosa** (2004) demonstrou que o estadiamento clínico-endoscópico falhou em cerca de 60% dos 52 casos avaliados de tumores laríngeos, reconhecendo o papel da tomografia computadorizada como mais acurada na determinação da extensão da doença. Há cerca de nove anos a possibilidade de não realização de exame tomográfico em todos os pacientes com tumores de laringe que procuram os serviços públicos que prestam assistência em cirurgia de cabeça e pescoço não parece uma idéia distante da realidade. A hipótese da progressão da doença é reforçada ao analisarmos o intervalo de tempo entre a data da 1ª consulta (momento do estadiamento clínico) até a realização do tratamento cirúrgico (momento do estadiamento histopatológico), que variou de 11 a 1 320 dias, com mediana de 112 e média de 150,4 dias. A ampla variação do intervalo de tempo até o tratamento cirúrgico pode refletir grandes desigualdades sociais, econômicas e culturais dos pacientes do nosso estudo. Ainda com relação aos pacientes submetidos à laringectomia total e que efetivamente o exame histopatológico classificou como estágio II, sua ocorrência provavelmente não invalida os achados desse estudo devido à reduzida incidência.

Nesses pacientes provavelmente existiu algum fator impeditivo de outro tratamento não cirúrgico ou houve um estadiamento clínico piorado errôneo, fato que não é impossível como demonstrado no estudo de **Barbosa** (2004).

A imunoexpressão positiva da proteína p63 ocorreu praticamente em quase todos os casos avaliados, com exceção de um, correspondendo a 99,2% da nossa série. Vários estudos prévios também encontraram alto percentual de imunorreatividade à p63 em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (NYLANDER *et al.*, 2000; GLICKMAN *et al.*, 2001; CHOI *et al.*; WEBER *et al.*, 2002; CHEN *et al.* 2004)

Alguns estudos sobre a imunoexpressão da proteína p63 nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço apresentaram resultados que aparentemente traduziam uma manutenção do perfil de hiperexpressão da p63 encontrada nas camadas basal e suprabasal da mucosa normal de onde o tumor se originou, ao invés de representarem uma verdadeira hiperexpressão da p63 durante a carcinogênese epitelial (GLICKMAN *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2003; THURFJELL *et al.*, 2004).

Os graus ou escores de imunoexpressão da p63, que refletem a percentagem de células imunocoradas positivamente, dividiram os casos em 48,8% do escore três (3), 47,2% do escore dois (2) e 3,1% para o escore um (1). Constatamos então que cerca de 96% dos casos tinham no mínimo mais de 30% das suas células com seus núcleos imunocorados positivamente para a proteína p63. Esses resultados se alinham com aqueles encontrados por **Parsa et al.** (1999); **Quade et al.**;

Tannapfel *et al.* (2001); **Choi *et al.***; **Pruneri *et al.*** (2002); **Hara *et al.*** (2004) e **Takahashi *et al.*** (2006).

Especificamente no tocante aos tumores malignos de laringe, apenas três estudos investigaram o perfil de imunoexpressão da proteína p63 nos carcinomas epidermóides de laringe. Dentre esses estudos, dois foram publicados em língua inglesa e um em chinês (PRUNERI *et al.*, 2002; DONG *et al.*, 2004; JIA *et al.*, 2006). Em nosso meio, para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia o perfil de expressão da proteína p63, produto de um gene crucial para o desenvolvimento dos epitélios, na carcinogênese laríngea.

Pruneri *et al.* (2002) evidenciaram imunoexpressão positiva para a p63 em todos os 150 casos avaliados de câncer de laringe, com uma percentagem de células coradas, maior que 50% em 121 (81,3%) dos casos avaliados. Aliado a isso, o acúmulo de células p63 imunorreativas em pacientes com neoplasias intra-epiteliais laríngeas sugere que anormalidades do gene TP63 possam estar vinculadas às etapas iniciais da carcinogênese laríngea.

Takahashi (2006) avaliou 180 pacientes com carcinomas epidermóides do esôfago e apenas nove casos (5%) tiveram imunocoloração negativa, embora os autores tenham definido a imunopositividade para a p63 como presente quando o percentual de núcleos corados foi maior que 50%.

A sobrevida global no nosso estudo foi de 73,8% em dois anos e 59,4% em cinco anos, enquanto que a sobrevida ligada ao câncer foi de 79 e 67,1% em dois e cinco anos respectivamente e a sobrevida livre de doença foi de 77,1% e cerca de

75% respectivamente em dois e cinco anos. Esses resultados descritos não levam em conta a estratificação em termos de localização tumoral ou de acordo com o estadiamento TNM, embora especificamente com relação a esta última variável, nosso estudo tem a sua casuística composta basicamente por tumores avançados. O estudo de **De Jong et al.** (2001) chama atenção para uma sobrevida global em cinco anos de 69% e 51% para carcinomas epidermóides de laringe do andar glótico e supraglótico respectivamente, independente do estadiamento.

Dentre os 127 pacientes avaliados, 31 pacientes (24,4%) tiveram recidivas quase que igualmente distribuídas a nível local, regional e à distância. É digna de nota a percentagem de 100% de óbito dentre aqueles casos recidivados à distância.

Os resultados da análise univariada para a ocorrência de recidiva selecionaram um subconjunto de variáveis que foi submetido ao modelo de seleção de variáveis *stepwise* e à análise multivariada. Dentre o subconjunto de variáveis selecionadas que incluía a imunoexpressão da proteína p63, o estadiamento linfonodal patológico, o etilismo e o envolvimento da hipofaringe - foram consideradas estatisticamente significativas ao final da análise multivariada.

O estadiamento linfonodal patológico e a imunoexpressão da p63 foram as variáveis com valores de “p” mais significativos. O impacto prognóstico negativo da presença de linfonodos metastáticos já foi destacado em outros estudos, como o de **Vielba et al.** (2003).

Com relação aos resultados da análise univariada e multivariada para o evento óbito, as variáveis selecionadas pelo método *stepwise* incluíram a ocorrência de

recidiva, ocorrência de segundos tumores primários e novamente a imunoexpressão da proteína p63 e o envolvimento da hipofaringe. Todas essas variáveis se mostraram estatisticamente significativas para a predição do evento óbito.

A variável imunoexpressão da proteína p63, objeto principal do nosso estudo, mostrou-se estatisticamente significativa tanto para a predição do evento recidiva, como para o evento óbito dos pacientes, quando avaliadas após a estratificação em quatro grupos representados pelos escores de imunoexpressão isoladamente e quando divididos em dois grupos distintos que agruparam os escores zero e um e os escores dois e três. O agrupamento dos escores foi usado para minimizar o efeito do pequeno número de casos que os escores zero e um possuíam isoladamente.

A hipoexpressão da p63 nos carcinomas epidermóides de laringe foi preditiva de um pior prognóstico nesses doentes. Esses resultados estão em desacordo com os achados de **Pruneri et al.** (2002) e de **Lo Muzio et al.** (2005) que sugerem uma associação entre a hiperexpressão e um pior desfecho clínico. **Pruneri** (2002) sugere esta associação a partir dos resultados encontrados em 81 pacientes com carcinoma de laringe submetidos à laringectomia total, embora sem alcançar significância estatística. **Dong** (2004) e **Jia** (2006), especificamente no tocante aos carcinomas epidermóides de laringe, não conseguiram encontrar associação entre a expressão da p63 e os indicadores prognósticos. **Hara et al.** (2004) não encontraram correlações significativas entre a expressão da p63 e os aspectos clínicos e patológicos ao avaliar 65 casos de carcinomas epidermóides esofágicos. Nessa mesma linha, **Iwata et al.** (2005) avaliaram especificamente a expressão Imunoistoquímica das isoformas truncadas (Δ Np63) da p63 e demonstraram não

haver nenhum impacto prognóstico da expressão positiva dessas isoformas nos carcinomas epidermóides de pulmão. Em contrapartida vários estudos com carcinomas epidermóides do trato aerodigestivo superior sugerem que, embora incomum, a expressão reduzida da p63 tem um impacto prognóstico negativo (TAKAHASHI *et al.*, 2006). Sob um prisma parecido, **Massion *et al.*** (2003) relataram uma associação estatisticamente significativa entre a hiperexpressão Imunoistoquímica da proteína p63 e a amplificação gênica do TP63 com uma melhor sobrevida para os pacientes com carcinoma epidermóide de pulmão. Nesse ponto, embora os autores ressalvem que a interpretação funcional da p63 pela Imunoistoquímica é questionável e conferem limitação a esse estudo, a amplificação gênica, de certa forma, embasa e reforça esse impacto prognóstico positivo, especialmente em relação às isoformas truncadas, que foram as mais prevalentes no estudo.

A hiperexpressão da p63 - nos carcinomas epidermóides - pode ser reflexo da incapacidade de diferenciação terminal presente nas células cancerosas.

De acordo com o que foi previamente mencionado por alguns estudos (YANG *et al.*, 1998; LITTLE *et al.*, 2002), a proteína p63 pode ser expressa por no mínimo seis isoformas diferentes que podem ser divididas em dois grupos: aquele contendo o domínio transativante (isoformas transativantes) e aquele que não possui esse domínio (isoformas truncadas).

O presente estudo utilizou o anticorpo monoclonal do clone 4A4, que reconhece todas as isoformas da p63, e reforçou os achados de hiperexpressão da p63 visto em outros estudos sobre a p63 em carcinomas epidermóides da cabeça e pescoço

(NYLANDER *et al.*, 2000; GLICKMAN *et al.*, 2001). Entretanto, o uso desse anticorpo não garante com certeza absoluta que ambos os grupos de isoformas foram identificados, visto que a identificação do RNA mensageiro da TA-p63 em músculo esquelético, na ausência de imunorreatividade para o clone 4A4, já foi relatada (DI COMO *et al.*, 2002).

Por outro lado, existem inúmeros estudos que identificaram as isoformas truncadas (Δ N-p63), através de anticorpos específicos, como sendo as predominantes nos tecidos normais e principalmente nos tecidos carcinomatosos (GLICKMAN *et al.*, 2001; GEDDERT, *et al.*, 2003).

Foschini *et al* (2004) sugeriram que a falta de associação entre a expressão da p63 e o prognóstico em alguns estudos se devia ao fato do anticorpo mais comumente usado contra a p63, o 4A4 não discriminar entre as diferentes isoformas. Estes autores identificaram um melhor prognóstico nos casos onde havia maior expressão das isoformas transativas.

Em muitos estudos, o conceito de carcinogênese a partir de um desequilíbrio entre as frações de isoformas transativas e as truncadas, foi estabelecido. Esse desequilíbrio favorável as isoformas truncadas, seja pelo seu aumento, seja pela diminuição das isoformas transativas ou por ambos os fenômenos, poderia exercer ação oncogênica. Esse questionamento deve estar na lista de indagações a serem pesquisadas em estudos futuros.

Ao estudarmos complementarmente a associação entre a variável imunoexpressão da proteína p63 e aquelas identificadas nas análises univariadas,

identificamos associação positiva apenas com a variável recidiva em relação ao óbito pelo câncer de laringe, principalmente nos casos de recidiva à distância.

Existem estudos que sugerem papéis diferentes para as isoformas protéicas transativas e truncadas da p63, podendo a hiperexpressão das isoformas truncadas ou a hipoexpressão das transativas estar relacionadas a carcinogênese na cabeça e pescoço (NYLANDER *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004).

Estudos prévios sugeriram que a hiperexpressão das isoformas truncadas da p63 alfa inativariam os produtos do TP53 e do TP73 levando a inibição do apoptose e posterior efeito oncogênico (YANG *et al.*, 1998; CHOI *et al.*, 2002; ROCCO *et al.*, 2006).

Em termos práticos, nosso estudo delineia um perfil de expressão da proteína p63 nos carcinomas epidermóides de laringe, que indubitavelmente não esgota o assunto, mas constitui o ponto de partida para futuras investigações. Fica evidente a expressão quase universal da pan-proteína p63 nos tumores avançados de laringe. A hiperexpressão da pan-proteína p63 pode abrigar, além da hiperexpressão das formas truncadas da p63, uma hipoexpressão das isoformas transativas. Em meio a isso, a associação da expressão da p63 com o prognóstico é sugerida, devendo ser avaliada com o uso de anticorpos específicos e por meios de estudos prospectivos e randomizados de série homogênea de casos. Os passos seguintes provavelmente dizem respeito à associação de técnicas que promovam uma análise do perfil gênico do TP63.

A complexidade funcional do gene TP63 e da família do TP53 leva a persistência de inúmeras interrogações, principalmente no papel do TP63 e seus homólogos na carcinogênese. Essas dúvidas reforçam a necessidade de novos estudos nessa linha de pesquisa. É preciso avaliar o perfil de expressão de todas as isoformas da p63, bem como dos produtos do TP73 e do TP53, nos carcinomas das vias aerodigestivas superiores. Análises mutacionais e a pesquisa de alterações protéicas em lesões pré-neoplásicas e em carcinomas com graus de diferenciação distintos devem ser realizadas.

A carcinogênese epitelial é provavelmente regulada por uma rede interativa altamente complexa de proteínas pro e anti-apoptótica. Estudos futuros devem tentar estabelecer uma relação entre as características que compõem o perfil biológico dos carcinomas epidermóides de laringe, incluindo um conjunto de proteínas relevantes, e a evolução da doença. Provavelmente esse painel gênico e protéico não será imutável, podendo até ser individualizado de acordo com a necessidade.

O crescente entendimento sobre a carcinogênese vem permitindo o desenvolvimento de drogas anticancerosas que atuem na inibição seletiva de alvos terapêuticos moleculares através do uso de anticorpos monoclonais.

A utilização da imunoistoquímica e da imunocitoquímica em novas frentes, como a definição de doença residual mínima e estudo de margens cirúrgicas, bem como a junção de várias técnicas para a detecção de tumores combinando diversos marcadores moleculares é extremamente promissora, pois a complexidade das relações entre as moléculas envolvidas com o câncer revela que a inibição de um

único alvo parece ser insuficiente no controle dos tumores malignos epiteliais, por serem estes o fruto de múltiplas alterações genéticas.

Nesse panorama caracterizado por grande complexidade de interrelações, mas também pela aquisição de novas tecnologias que se somam, pela caracterização de novos padrões moleculares tumorais, pelo conhecimento de novos perfis de sensibilidade e resistência a esquemas terapêuticos, é que as perspectivas de emprego dos conhecimentos adquiridos com os estudos acerca do gene TP63 e de seus produtos peptídicos - a proteína p63 com suas diferentes isoformas – se tornam cada vez menos distantes.

O uso presente da p63 e dos anticorpos monoclonais anti-p63 no diagnóstico de tumores epiteliais, sua atuação no diagnóstico claramente pode se expandir até o uso como adjuvante no diagnóstico da origem epitelial de tumores metastáticos com primário desconhecido, distinção de casos difíceis entre tumores epiteliais ou de outra origem, além do possível papel, já citado, da p63 no diagnóstico de doença residual mínima ou no estudo de margens cirúrgicas.

Além disso, novos estudos podem vislumbrar perspectivas quanto ao real valor prognóstico da p63, especialmente se pudermos utilizar esses resultados em biópsias, visando orientar na seleção de tratamentos mais ou menos agressivos. As novas terapias moleculares emergentes também nos permitem “sonhar” com o uso de anticorpos monoclonais específicos para a p63 direcionados contra moléculas na superfície de células tumorais, assim como a transfecção de genes TP63 ou da proteína p63 nativos, isoladamente ou em conjunção a outros genes e/ou produtos protéicos, em tumores com genes TP63 mutados.

7 CONCLUSÕES

A proteína p63 se mostrou altamente expressa nos carcinomas epidermóides de laringe.

A hipoexpressão da p63 nos carcinomas epidermóides de laringe foi preditiva de um pior prognóstico nesses doentes.

8 INFERÊNCIAS

A expressão da proteína p63 se associou positivamente com a ocorrência de recidiva, principalmente à distância, nos carcinomas de laringe.

O estadiamento patológico linfonodal crescente, o etilismo, o envolvimento da hipofaringe, a ocorrência de recidiva e/ou de segundo tumor primário foram preditivos de pior evolução clínica nos doentes desse estudo.

9 ANEXOS

ANEXO A: Banco de Dados da Casuística

N	Nome	Registro	DtPrim	Idade	Sexo	MesSint	Raça	Tabagismo	Etilismo	DtTqTpre	Glote
1	JAD	1205042	2-Feb-99	64	M	3	B	S	N	N	N
2	GCPL	1211368	1-Sep-98	69	M	7	B	S	S	26-Oct-98	S
3	MC	1255788	17-Aug-95	77	M	12	NB	N	S	29-Sep-98	S
4	ECN	1264802	16-Sep-96	57	M	2	B	N	N	3-Nov-98	N
5	GAS	1266890	19-Dec-96	69	M	48	B	S	S	20-Jun-00	S
6	GMS	1270149	28-May-97	45	M	6	NB	S	S	28-May-97	N
7	FPS	1273761	11-Nov-97	80	M	7	B	S	N	10-Feb-98	S
8	AB	1273884	19-Nov-97	69	M	2	NB	S	S	N	N
9	JGS	1274106	20-Nov-97	49	M	2	B	S	S	19-Mar-98	S
10	VCM	1274322	3-Dec-97	42	M	6	B	S	S	11-Feb-98	S
11	EFO	1274389	8-Dec-97	43	M	4	NB	S	S	9-Jan-98	S
12	NJGO	1274396	8-Feb-97	53	M	5	B	S	S	22-Dec-97	N
13	JCA	1274529	10-Dec-97	68	M	8	NB	S	S	N	S
14	GC	1274566	15-Dec-97	72	M	6	NB	S	S	28-Oct-98	S
15	SPS	1274660	18-Dec-97	56	M	12	NB	S	S	N	N
16	JM	12775040	23-Dec-97	64	M	10	NB	S	S	N	N
17	DRS	1275068	26-Dec-97	73	F	3	NB	S	S	N	S
18	JFC	1275121	2-Jan-98	59	M	84	B	S	S	15-Apr-98	N
19	HML	1275154	12-Jan-98	73	M	72	NB	S	S	27-Dec-97	S
20	DGC	1275668	19-Jan-98	66	M	6	B	S	S	2-Apr-98	N
21	FPG	1276034	10-Feb-98	57	M	5	B	S	S	N	N
22	TRM	1276135	29-Jan-98	71	M	24	B	S	S	N	N
23	MGS	1276219	19-Feb-98	66	M	4	NB	S	S	4-Feb-98	S
24	MGLL	1276804	29-Sep-98	63	F	1	B	S	N	N	S
25	ER	1277347	19-Feb-98	61	M	2	NB	S	S	10-Mar-98	S
26	NDC	1277450	13-Mar-98	68	M	3	NB	S	S	21-May-98	S
27	BBS	1277465	17-Mar-98	64	F	12	NB	S	N	17-Mar-98	S

N	Nome	Registro	DtPrim	Idade	Sexo	MesSint	Raça	Tabagismo	Etilismo	DtTqTpre	Glote
28	JRO	1278886	15-Apr-98	79	M	60	B	N	N	1-Feb-98	S
29	CLSB	1278915	1-Jul-98	51	M	6	NB	S	S	N	S
30	AMS	1279402	17-Apr-98	58	M	36	NB	S	S	13-Jan-00	S
31	AAS	1280426	29-Apr-98	55	M	4	NB	S	S	N	S
32	MSM	1280481	11-May-98	71	M	12	B	S	N	30-Apr-98	N
33	VSSJ	1280484	30-Apr-98	58	M	5	B	S	S	15-Mar-98	S
34	JÁ	1280724	6-May-98	74	M	2	B	S	S	N	N
35	AS	1281922	3-Jun-98	54	M	8	NB	S	S	N	S
36	MLMD	1282159	9-Jun-98	52	F	2	NB	S	N	N	N
37	WMP	1282428	17-Jun-98	60	M	2	B	S	S	2-May-98	S
38	JCC	1282618	22-Jun-98	64	M	2	B	S	S	N	N
39	JSP	1284204	20-Jul-98	77	F	12	B	N	N	29-Jul-98	S
40	IJA	1284932	29-Jul-98	61	M	1	NB	S	N	N	N
41	AGR	1285035	3-Jul-98	58	M	8	NB	S	S	3-Jul-98	N
42	JRL	1285046	3-Aug-98	59	M	6	NB	S	S	15-Jul-98	S
43	JMF	1285983	18-Aug-98	63	M	2	NB	S	S	N	N
44	ST	1286402	1-Sep-98	67	M	3	B	S	S	20-Oct-98	S
45	SSW	1286863	9-Sep-98	50	M	8	B	S	S	N	N
46	JIM	1287824	30-Sep-98	61	M	12	NB	N	N	N	S
47	OF	1288847	5-Oct-98	66	M	2	B	S	N	N	N
48	MV	1289087	8-Oct-98	36	M	5	NB	N	N	8-Oct-98	N
49	MMM	1289448	29-Sep-98	60	M	0	B	N	N	N	S
50	FBL	1289550	19-Oct-98	67	M	3	B	N	N	N	S
51	AR	1289832	9-Oct-98	66	M	3	B	S	S	9-Oct-98	S
52	IVS	1290657	17-Nov-98	68	M	12	B	S	S	17-Nov-98	N
53	EB	1290918	18-Nov-98	63	M	24	NB	S	S	10-Feb-99	S
54	JRL	1290987	24-Nov-98	53	M	6	B	S	S	24-Nov-98	S
55	AFR	1291043	2-Dec-98	67	M	6	B	S	S	N	S
56	SLB	1291060	25-Nov-98	42	M	2	B	S	S	N	N

N	Nome	Registro	DtPrim	Idade	Sexo	MesSint	Raça	Tabagismo	Etilismo	DtTqTpre	Glote
57	JJS	1291657	15-Dec-98	59	M	29	NB	S	S	N	S
58	JMRT	1292058	21-Dec-98	60	M	3	B	S	S	N	S
59	PPF	1292463	29-Dec-98	67	M	3	B	S	S	N	N
60	ASC	1292564	5-Jan-99	56	F	12	B	S	N	18-Mar-99	S
61	JGSL	1293055	15-Jan-99	36	M	12	NB	S	N	2-Feb-99	S
62	RO	1293061	5-Mar-99	59	M	12	B	N	N	15-Jan-99	S
63	JF	1293127	18-Jan-99	65	M	3	B	S	S	19-Jan-99	S
64	JB	1294754	4-Mar-99	55	M	24	B	S	N	13-Feb-99	S
65	PJT	1295637	26-Mar-99	54	M	24	B	S	S	25-Mar-99	N
66	JMS	1295647	29-Mar-99	46	M	2	NB	S	N	N	N
67	MGSP	1295650	26-Mar-99	62	F	3	NB	S	S	26-Mar-99	S
68	PSP	1296038	8-Apr-99	48	M	6	B	S	S	N	S
69	DGH	1296203	13-Apr-99	59	M	2	B	S	S	N	S
70	JLR	1296204	13-Apr-99	71	M	8	NB	S	S	N	S
71	CHS	1296425	19-Apr-99	43	M	4	B	S	S	23-Apr-99	S
72	GVDA	1296510	20-Apr-99	61	F	3	B	S	N	6-Oct-99	S
73	JLN	1296574	22-Apr-99	37	M	4	NB	S	N	22-Apr-99	S
74	ECA	1296627	30-Apr-99	48	M	7	B	S	S	23-Apr-99	S
75	FVR	1296829	29-Apr-99	48	M	1	B	S	S	N	N
76	HC	1297155	10-May-99	54	M	3	NB	S	S	24-May-99	S
77	FS	1297405	17-May-99	56	M	12	NB	N	N	31-Jan-00	S
78	JLJM	1297575	21-May-99	59	M	12	B	S	S	8-Oct-99	S
79	CAAS	1297731	1-Jun-99	40	M	2	NB	S	N	N	S
80	MM	1297752	26-May-99	76	F	8	B	N	N	N	S
81	AS	1298172	7-Jun-99	55	M	8	B	N	N	N	S
82	EP	1298435	23-Jun-99	61	M	24	NB	S	S	14-Jun-99	S
83	NA	1298445	15-Jun-99	62	M	6	NB	S	N	N	S
84	ETS	1298448	15-Jun-99	69	M	12	NB	S	N	15-Jun-99	S
85	SSC	1298454	15-Jun-99	61	F	36	B	S	N	10-Jun-99	N

N	Nome	Registro	DtPrim	Idade	Sexo	MesSint	Raça	Tabagismo	Etilismo	DtTqTpre	Glote
86	JGF	1298831	30-Jun-99	67	M	2	B	S	S	30-Jun-99	S
87	FACA	1298842	30-Jun-99	75	M	1	B	N	N	26-Aug-99	S
88	AMA	1298941	14-Jul-99	64	M	1	NB	S	N	12-Sep-99	S
89	JÂ	1299092	21-Jul-99	69	F	12	NB	S	S	1-Jul-99	S
90	MGS	1299291	13-Jul-99	67	M	11	B	S	S	8-Jul-99	S
91	EJA	1299411	28-Jul-99	59	M	24	NB	S	S	17-Sep-99	S
92	SJS	1299458	13-Jul-99	93	F	6	NB	S	N	13-Jun-99	S
93	ECC	1299557	11-Aug-99	72	M	3	B	S	S	1-Jul-99	S
94	MSG	1299740	20-Jul-99	47	M	24	B	S	S	20-Jul-99	S
95	JPJ	1300093	11-Aug-99	49	M	6	NB	S	S	10-Nov-99	S
96	SFSN	1301744	27-Aug-99	58	M	4	B	N	N	4-Feb-00	S
97	NAS	1302059	8-Sep-99	49	M	4	B	S	S	N	S
98	ZSM	1302926	16-Sep-99	66	F	60	B	S	S	N	S
99	AMB	1304365	15-Oct-99	50	M	12	NB	S	S	N	S
100	FBS	1305085	26-Oct-99	50	M	10	NB	S	S	26-Oct-99	S
101	ARA	1305539	5-Nov-99	52	M	5	NB	N	N	5-Nov-99	S
102	SVB	1305540	25-Feb-00	47	M	8	B	S	N	25-Feb-00	N
103	GSF	1306899	7-Dec-99	67	M	9	NB	S	S	N	N
104	HFO	1306913	14-Dec-99	67	M	3	B	S	S	N	N
105	SPN	1307197	10-Dec-99	46	F	36	B	S	N	N	S
106	JR	1307347	13-Dec-99	57	M	2	NB	S	S	N	S
107	JMB	1308513	12-Jan-00	51	M	5	B	S	S	3-Feb-00	S
108	JEMP	1309866	1-Feb-00	43	M	5	B	S	S	N	S
109	NOS	1310664	15-Jun-00	82	M	8	NB	N	N	13-Jun-00	S
110	FDS	1310744	18-Feb-00	61	M	12	B	S	N	29-Feb-00	S
111	VRR	1311732	15-Mar-00	58	M	10	B	S	S	1-Mar-00	N
112	JRSF	1312241	22-Mar-00	58	M	4	B	S	S	15-Mar-00	S
113	FPG	1313058	11-May-00	65	M	9	NB	S	S	6-Jun-00	N
114	JBS	1315284	10-May-00	79	F	3	NB	S	S	30-May-00	S

N	Nome	Registro	DtPrim	Idade	Sexo	MesSint	Raça	Tabagismo	Etilismo	DtTqTpre	Glote
115	NAC	1315739	16-May-00	65	M	3	NB	S	S	16-May-00	S
116	ARS	1315993	8-Jun-00	71	M	8	NB	S	N	N	N
117	OVM	1316314	25-May-00	44	M	6	NB	S	S	7-Jun-00	S
118	JRB	1316710	1-Jun-00	70	M	12	NB	S	S	N	N
119	ELF	1316966	6-Jun-00	69	M	4	B	S	S	14-Jun-00	S
120	JBP	1317174	20-Jun-00	63	M	24	B	S	S	4-Jul-00	S
121	JM	1318336	30-Jun-00	43	M	24	NB	S	S	N	S
122	GGs	1318864	12-Jul-00	46	M	2	B	S	S	N	S
123	SMLG	1319219	18-Jul-00	57	M	10	B	S	S	14-Sep-00	S
124	OAS	1319312	21-Jul-00	72	F	36	B	N	N	21-Jul-00	S
125	MS	1319754	27-Jul-00	64	M	4	NB	S	N	N	N
126	ASS	1320154	8-Aug-00	77	M	8	B	N	N	26-Sep-00	S
127	ALP	1356088	13-Oct-00	48	M	1	NB	S	S	N	N

N	Supraglote	Subglote	Hipofar	T	N	EstClin	DtCirurg	Margens	InvCartil	InvVasc	EnvPerin	AcEstAdj
1	S	N	S	4	0	IV	30-Sep-99	LIVRES	S	N	N	S
2	S	N	S	3	0	III	5-Jan-99	LIVRES	S	N	N	S
3	N	N	N	3	0	III	5-Apr-99	LIVRES	S	S	S	S
4	S	N	N	1	0	I	7-Dec-98	LIVRES	N	S	S	N
5	N	N	N	3	0	III	3-Jul-00	LIVRES	N	N	N	N
6	S	N	N	3	1	III	5-Mar-98	LIVRES	S	S	N	S
7	S	N	N	3	0	III	13-Feb-98	LIVRES	N	N	S	N
8	S	N	S	2	0	II	19-Feb-98	LIVRES	N	N	S	S
9	N	S	N	2	1	III	11-May-98	LIVRES	N	N	N	N
10	S	S	N	3	2	IV	16-Feb-98	LIVRES	N	N	N	N
11	S	N	N	3	1	III	20-Feb-98	LIVRES	S	N	N	S
12	S	N	N	3	0	III	27-Jan-98	COMPROMETIDAS	S	S	N	S
13	S	N	N	3	0	III	20-Feb-98	LIVRES	S	N	N	S
14	N	N	N	2	0	II	12-Jan-99	LIVRES	N	N	N	N
15	S	N	S	4	0	IV	23-Mar-98	LIVRES	N	N	N	N
16	S	N	N	3	0	III	14-Apr-98	LIVRES	S	N	N	S
17	S	N	N	3	2	IV	7-May-98	LIVRES	N	N	N	S
18	S	N	N	3	0	III	23-Apr-98	LIVRES	S	N	N	N
19	S	N	N	3	0	III	19-Jun-98	LIVRES	S	N	N	S
20	S	N	S	3	0	III	22-May-98	COMPROMETIDAS	S	N	S	S
21	S	N	N	4	2	IV	12-Mar-98	COMPROMETIDAS	S	N	N	S
22	S	N	N	3	1	III	26-May-98	LIVRES	S	N	N	S
23	N	S	N	3	0	III	2-Jul-98	LIVRES	S	N	N	S
24	S	N	N	4	2	IV	28-Jan-99	LIVRES	N	N	N	S
25	N	N	N	3	0	III	3-Jul-98	LIVRES	N	N	N	S
26	S	N	S	3	0	III	18-Jun-98	LIVRES	N	N	N	N
27	S	N	N	3	0	III	12-Jun-98	LIVRES	S	N	N	S
28	S	S	N	3	0	III	20-Jul-98	LIVRES	N	N	N	N
29	S	N	N	3	0	III	10-Nov-98	LIVRES	S	N	N	S
30	S	N	N	2	0	II	7-Jul-00	LIVRES	S	N	N	S
31	N	N	N	2	0	II	14-Aug-98	LIVRES	S	N	N	S
32	S	N	S	3	1	III	13-Oct-98	LIVRES	S	N	N	S
33	S	N	N	3	0	III	11-Sep-98	COMPROMETIDAS	N	S	S	N
34	S	N	N	2	0	II	17-Jul-98	LIVRES	S	N	N	S
35	S	N	S	3	2	IV	24-Aug-98	LIVRES	S	N	S	S
36	S	N	N	2	0	II	30-Jul-98	LIVRES	N	N	N	N
37	S	N	N	3	0	III	19-Nov-98	LIVRES	S	N	N	S

N	Supraglote	Subglote	Hipofar	T	N	EstClin	DtCirurg	Margens	InvCartil	InvVasc	EnvPerin	AcEstAdj
38	S	N	S	3	1	III	13-Oct-98	LIVRES	N	N	N	S
39	S	N	N	3	0	III	20-Oct-98	LIVRES	S	N	N	S
40	S	N	N	2	0	II	19-Apr-99	LIVRES	S	N	N	S
41	S	N	N	3	2	IV	8-Dec-98	COMPROMETIDAS	S	S	N	S
42	S	N	N	2	0	II	8-Dec-98	COMPROMETIDAS	S	S	N	S
43	S	N	N	2	1	III	14-Jan-99	LIVRES	S	N	S	S
44	S	N	N	3	0	III	21-Jan-99	LIVRES	S	S	N	N
45	S	N	S	2	0	II	14-Dec-98	LIVRES	N	N	N	N
46	N	N	N	4	0	IV	10-May-99	LIVRES	S	N	N	S
47	N	N	S	1	1	III	22-Apr-99	COMPROMETIDAS	N	N	N	S
48	S	N	S	3	1	III	12-Feb-99	COMPROMETIDAS	N	N	N	S
49	S	N	N	4	0	IV	28-Jan-99	COMPROMETIDAS	S	N	N	S
50	N	N	N	3	0	III	12-Jan-99	LIVRES	N	N	N	N
51	S	N	N	3	0	III	1-Jul-99	LIVRES	S	N	N	S
52	S	N	N	3	0	III	5-Apr-99	LIVRES	S	N	N	S
53	S	N	N	3	0	III	1-Apr-99	COMPROMETIDAS	S	N	N	S
54	S	N	S	3	1	III	26-Jul-99	COMPROMETIDAS	S	N	N	S
55	N	S	N	2	0	II	4-May-99	LIVRES	S	N	N	S
56	S	N	N	2	2	IV	21-Jun-99	LIVRES	S	N	S	S
57	N	N	N	1	0	I	17-May-99	LIVRES	S	N	N	S
58	S	N	N	3	0	III	18-Feb-99	LIVRES	N	N	N	S
59	S	N	S	3	0	III	25-Mar-99	LIVRES	S	N	N	S
60	N	N	N	2	0	II	3-May-99	COMPROMETIDAS	N	N	N	N
61	N	N	N	2	0	II	13-Apr-99	COMPROMETIDAS	S	S	S	S
62	N	N	N	3	0	III	3-Oct-99	LIVRES	N	N	N	N
63	N	N	S	3	0	III	18-May-99	LIVRES	S	S	S	S
64	N	N	N	3	0	III	7-May-99	LIVRES	S	N	N	N
65	S	N	N	3	0	III	22-Apr-99	LIVRES	S	N	N	S
66	N	N	S	3	2	IV	22-Jun-99	LIVRES	N	N	N	S
67	S	N	S	3	1	III	20-Jul-99	LIVRES	N	N	N	N
68	S	S	N	3	0	III	16-Jul-99	LIVRES	S	N	N	S
69	S	N	N	3	2	IV	19-Jul-99	LIVRES	S	S	N	S
70	S	N	N	3	0	III	12-Jul-99	LIVRES	S	N	N	N
71	N	N	N	3	0	III	29-Jun-99	LIVRES	S	N	N	S
72	S	N	N	3	0	III	21-Oct-99	LIVRES	S	S	S	S
73	S	N	N	3	1	III	7-May-99	LIVRES	S	N	S	S
74	S	N	N	3	0	III	2-Sep-99	LIVRES	S	S	S	S

N	Supraglote	Subglote	Hipofar	T	N	EstClin	DtCirurg	Margens	InvCartil	InvVasc	EnvPerin	AcEstAdj
75	S	N	S	3	1	III	2-Jul-99	LIVRES	S	N	N	N
76	S	N	S	3	1	III	19-Oct-99	LIVRES	S	N	N	N
77	N	S	N	2	0	II	25-Apr-00	LIVRES	N	N	N	N
78	S	N	N	3	2	IV	14-Oct-99	COMPROMETIDAS	N	N	N	N
79	S	N	N	3	0	III	16-Aug-99	LIVRES	N	S	N	N
80	N	N	N	2	0	II	23-Sep-99	LIVRES	N	N	N	N
81	N	N	N	3	0	III	29-Jul-99	LIVRES	S	N	N	N
82	S	N	N	3	0	III	8-Oct-99	LIVRES	N	N	N	N
83	S	N	N	2	0	II	12-Aug-99	LIVRES	N	S	S	N
84	N	N	N	3	0	III	25-Oct-99	COMPROMETIDAS	S	N	S	S
85	S	N	S	3	0	III	19-Aug-99	LIVRES	N	N	N	S
86	S	N	N	3	0	III	25-Nov-99	LIVRES	N	N	N	N
87	S	N	N	2	0	II	22-Oct-99	LIVRES	N	N	N	N
88	S	N	N	4	0	IV	2-Dec-99	LIVRES	S	N	N	S
89	N	N	N	3	0	III	30-Sep-99	LIVRES	S	N	N	S
90	S	N	S	3	0	III	24-Sep-99	LIVRES	S	S	N	N
91	N	N	N	2	0	II	29-Oct-99	LIVRES	N	N	N	S
92	S	N	N	3	1	III	6-Dec-99	LIVRES	S	N	N	S
93	N	N	N	3	0	III	25-Nov-99	LIVRES	S	N	S	N
94	N	S	N	3	0	III	8-Nov-99	LIVRES	N	N	N	N
95	S	N	N	3	1	III	17-Apr-00	LIVRES	S	N	S	N
96	S	N	N	3	0	III	26-Mar-00	LIVRES	S	N	N	S
97	S	N	N	3	0	III	21-Feb-00	LIVRES	N	N	N	N
98	S	S	N	3	0	III	26-Nov-99	LIVRES	S	N	N	N
99	S	N	N	4	2	IV	26-Oct-99	LIVRES	S	S	N	S
100	S	S	N	2	0	II	24-Feb-00	LIVRES	S	N	N	S
101	S	N	N	3	0	III	9-Mar-00	LIVRES	S	N	S	S
102	N	N	S	3	1	III	15-Jun-00	LIVRES	S	N	N	S
103	S	N	N	2	0	II	14-Mar-00	LIVRES	S	N	N	N
104	S	N	S	4	0	IV	28-Feb-00	COMPROMETIDAS	S	S	S	S
105	S	N	N	3	3	IV	24-Mar-00	LIVRES	S	N	N	S
106	S	N	N	3	3	IV	29-Feb-00	LIVRES	N	S	S	N
107	S	N	N	3	0	III	28-Mar-00	LIVRES	S	S	S	S
108	S	N	N	2	0	II	16-Jun-00	LIVRES	S	N	N	S
109	S	N	N	3	0	III	22-Sep-00	LIVRES	S	N	N	N
110	N	N	N	3	0	III	10-Aug-00	LIVRES	S	N	N	S
111	S	N	S	3	0	III	7-Jul-00	LIVRES	S	S	N	S

N	Supraglote	Subglote	Hipofar	T	N	EstClin	DtCirurg	Margens	InvCartil	InvVasc	EnvPerin	AcEstAdj
112	S	N	N	3	0	III	29-Jun-00	LIVRES	S	N	N	S
113	S	N	S	3	1	III	16-Jun-00	LIVRES	N	S	N	S
114	N	S	N	3	0	III	25-Jul-00	LIVRES	N	N	N	N
115	S	N	N	3	0	III	14-Sep-00	LIVRES	S	N	N	S
116	S	N	S	2	0	II	29-Sep-00	LIVRES	N	N	N	S
117	S	N	S	3	0	III	18-Jul-00	LIVRES	S	N	N	S
118	S	N	N	3	0	III	8-Sep-00	LIVRES	S	N	N	N
119	S	S	N	4	0	IV	20-Jul-00	LIVRES	S	N	N	N
120	N	N	N	4	0	IV	11-Sep-00	LIVRES	S	N	N	S
121	S	N	N	3	1	III	12-Sep-00	LIVRES	S	S	N	S
122	S	N	N	3	0	III	14-Sep-00	LIVRES	N	N	N	N
123	N	S	N	4	0	IV	9-Oct-00	LIVRES	S	S	S	S
124	S	N	N	3	0	III	6-Nov-00	LIVRES	N	N	N	N
125	S	N	S	3	1	III	19-Oct-00	LIVRES	S	N	N	S
126	N	N	S	3	1	III	2-Oct-00	LIVRES	S	S	S	S
127	S	N	S	3	1	III	14-Dec-00	LIVRES	S	S	S	S

N	Inflnfl	Dimens	Área (mm ²)	GrDif	PT	PN	Classif	Nbiop	p63	RxT
1	N	45x30mm	1350	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99-011155	2+	S
2	N	35x30mm	1050	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99-000079	2+	S
3	S	25x22mm	550	BEM DIFERENCIADO	pT4	pN0	IV	H99-003458	2+	S
4	S	30x25mm	750	POUCO	pT3	pN1	III	H98-012334	2+	S
5	S	30x23mm	690	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H00-008356	2+	N
6	S	40x30mm	1200	MODERADAMENTE	pT4	pN3	IV	H98-001888	2+	S
7	N	30x25mm	750	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H98001440	3+	N
8	N	20x15mm	300	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H98-001618	3+	S
9	N	40x30mm	1200	MODERADAMENTE	pT2	pN0	II	H98004221	3+	S
10	S	40x20mm	800	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H98 - 001 470	2+	N
11	N	40x35mm	1400	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H98 - 001 683	2+	S
12	N	30x25mm	750	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H98 - 000 757	3+	N
13	N	37x30mm	1110	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H98 - 001 688	3+	S
14	N	15x10mm	150	MODERADAMENTE	pT2	pN0	II	H99 - 330	2+	N
15	N	40x40mm	1600	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H98 - 002166	3+	N
16	N	40x30mm	1200	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H98 - 003217	3+	S
17	N	30X30mm	900	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H98 - 004116	3+	S
18	S	25x20mm	500	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H98 - 003593	2+	S
19	N	60x20mm	1200	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H98 - 005755	2+	N
20	N	60x50mm	3000	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H98 - 004770	3+	S
21	N	40x30mm	1200	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H98 - 002129	2+	S
22	N	30x20mm	600	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H98 - 006014	2+	S
23	N	50x35mm	1750	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H98 - 006295	2+	S
24	N	50x30mm	1500	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H99 - 000954	3+	S
25	S	25x25mm	625	POUCO	pT3	pN0	III	H98 - 006332	2+	N
26	N	25x15mm	375	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H98 - 005694	3+	S
27	N	35x20mm	700	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H98 - 005507	3+	S
28	S	30x22mm	660	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H98 - 006909	2+	N
29	S	55x20mm	1100	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H98 - 011140	3+	S

N	Inflnfl	Dimens	Área (mm ²)	GrDif	PT	PN	Classif	Nbiop	p63	RxT
30	S	50x35mm	1750	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H00 - 008676	2+	S
31	N	20x22mm	440	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H98 - 008000	3+	S
32	S	25x15mm	375	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H98 - 010082	3+	N
33	S	35x25mm	875	MODERADAMENTE	pT3	pN3	IV	H98 - 008958	2+	S
34	N	50x50mm	2500	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H98 - 006884	2+	S
35	N	40x28mm	1120	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H98 - 008346	2+	S
36	S	30x20mm	600	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H98 - 007375	3+	N
37	N	45x35mm	1575	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H98 - 011576	2+	S
38	N	20x15mm	300	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H98 - 010094	2+	S
39	S	15X17mm	255	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H98-010369	3+	S
40	S	70x60mm	4200	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99 - 004006	3+	S
41	S	40x20mm	800	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H98 - 012394	2+	S
42	S	50X38MM	1900	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H98 - 012368	1+	S
43	N	32x27mm	864	MODERADAMENTE	pT4	pN3	IV	H99 - 000444	3+	S
44	S	30x20mm	600	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H99 - 000640	2+	S
45	N	60x30mm	1800	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H98 - 009336	2+	N
46	N	40x40mm	1600	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H99 - 004852	3+	S
47	N	40x25mm	1000	MODERADAMENTE	pT3	pN2	IV	H99 - 004111	3+	S
48	N	20x15mm	300	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H99 - 001570	2+	N
49	S	66x42mm	2772	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H99 - 000934	3+	S
50	N	40x30mm	1200	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H99 - 000327	3+	N
51	N	50x40mm	2000	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99 - 006977	2+	S
52	S	30x25mm	750	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H99 - 003412	3+	S
53	S	35x30mm	1050	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99 - 003392	3+	S
54	N	75x61mm	4575	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H99 - 007955	2+	S
55	S	60x40mm	2400	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H99 - 004582	2+	N
56	S	50x40mm	2000	POUCO	pT4	pN3	IV	H99 - 006535	0+	N
57	N	25x25mm	625	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H99 - 005101	3+	S
58	S	45x35mm	1575	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H99 - 001630	2+	S

N	Inflnfl	Dimens	Área (mm ²)	GrDif	PT	PN	Classif	Nbiop	p63	RxT
59	S	52x25mm	1300	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99 - 003075	2+	S
60	S	45X30mm	1350	MODERADAMENTE	pT3	pN1	III	H99 - 004535	3+	S
61	N	50x37mm	1850	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H99 - 003755	2+	S
62	N	30x20mm	600	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H99 - 011597	2+	N
63	N	38x25mm	950	BEM DIFERENCIADO	pT4	pN0	IV	H99 - 005696	3+	N
64	N	30x20mm	600	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99 - 004784	3+	S
65	S	33x40mm	1320	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99 - 004122	3+	S
66	N	25x15mm	375	MODERADAMENTE	pT4	pN3	IV	H99 - 006573	2+	S
67	N	40x40mm	1600	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99 - 007630	3+	N
68	S	40x32mm	1280	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H99 - 007565	2+	S
69	N	50x40mm	2000	MODERADAMENTE	pT4	pN3	IV	H99 - 007596	3+	N
70	S	34x30mm	1020	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H99 - 007322	2+	S
71	N	45x25mm	1125	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99 - 006826	2+	S
72	N	55X30mm	1650	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99 - 012092	3+	S
73	N	50x20mm	1000	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99 - 004787	2+	S
74	S	50x30mm	1500	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H99 - 009907	2+	S
75	N	60x24mm	1440	MODERADAMENTE	pT4	pN3	IV	H99 - 007057	2+	S
76	N	70x10mm	700	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99 - 011923	1+	S
77	N	33x28mm	924	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H00 - 005185	2+	S
78	N	35x30mm	1050	MODERADAMENTE	pT3	pN2	IV	H99 - 011768	2+	N
79	S	35x20mm	700	MODERADAMENTE	pT2	pN2	IV	H99 - 009014	2+	S
80	S	23x18mm	414	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H99 - 006038	3+	N
81	S	30x25mm	750	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H99 - 008144	3+	S
82	N	30x15mm	450	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H99 - 011608	2+	N
83	N	45x25mm	1125	MODERADAMENTE	pT3	pN1	III	H99 - 008887	2+	S
84	N	50x27mm	1350	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H99 - 012192	3+	S
85	S	60x50mm	3000	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H99 - 009226	3+	N
86	S	40x20mm	800	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H99 - 013524	2+	N
87	N	50x27mm	1350	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H99 - 012163	2+	N

N	Inflnfl	Dimens	Área (mm ²)	GrDif	PT	PN	Classif	Nbiop	p63	RxT
88	S	30x15mm	450	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H99 - 013833	2+	S
89	S	50x40mm	2000	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H99 - 008206	2+	S
90	S	70x50mm	3500	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99 - 010889	3+	S
91	N	15x15mm	225	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H99 - 012465	3+	N
92	S	80x40mm	3200	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H99 - 013997	3+	N
93	S	40x20mm	800	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H99 - 013492	3+	S
94	S	20x20mm	400	MODERADAMENTE	pT2	pN0	II	H99 - 012694	1+	N
95	S	65x35mm	2275	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H00 - 004822	3+	S
96	N	25x20mm	500	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H00 - 003290	2+	S
97	N	15x15mm	225	MODERADAMENTE	pT3	pN1	III	H00 - 002302	2+	S
98	N	40x40mm	1600	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H99 - 013631	3+	S
99	N	50x30mm	1500	MODERADAMENTE	pT4	pN3	IV	H99 - 012281	3+	S
100	S	48x48mm	2304	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H00 - 002482	3+	S
101	S	50x25mm	1250	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H00 - 002985	2+	S
102	N	53x48mm	2544	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H00 - 007700	3+	S
103	N	45x38mm	1710	MODERADAMENTE	pT3	pN2	IV	H00 - 003135	2+	S
104	S	40x20mm	800	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H00 - 002630	3+	S
105	N	40x30mm	1200	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H00 - 003746	3+	S
106	S	10x10mm	100	MODERADAMENTE	pT3	pN2	IV	H00 - 002730	3+	S
107	S	30x20mm	600	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H00 - 003866	2+	S
108	S	60x40mm	2400	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H00 - 007747	1+	S
109	N	40x20mm	800	POUCO	pT4	pN0	IV	H00 - 012198	3+	S
110	N	45x20mm	900	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H00 - 010208	2+	S
111	S	50x35mm	1750	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H00 - 008651	3+	S
112	S	40x35mm	1400	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H00 - 008268	2+	S
113	N	60x35mm	2100	MODERADAMENTE	pT3	pN2	IV	H00 - 007739	2+	S
114	S	28x20mm	560	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H00-9487	3+	N
115	S	50X30mm	1500	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H00-11778	2+	S
116	N	40X38mm	1520	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H00-12543	3+	S

N	Inflnfl	Dimens	Área (mm ²)	GrDif	PT	PN	Classif	Nbiop	p63	RxT
117	N	40X30mm	1200	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H00-9194	3+	S
118	S	35X25mm	875	MODERADAMENTE	pT3	pN1	III	H0011536	3+	S
119	N	30X30mm	900	MODERADAMENTE	pT4	pN1	IV	H009310	3+	S
120	S	50x40mm	2000	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H0011587	3+	S
121	S	42X27mm	1134	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H0011631	3+	S
122	N	40x35mm	1400	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H00-11826	3+	S
123	S	30x25mm	750	MODERADAMENTE	pT4	pN0	IV	H0012925	3+	S
124	S	20x12mm	240	MODERADAMENTE	pT3	pN0	III	H0014186	2+	N
125	S	35x25mm	875	MODERADAMENTE	pT4	pN2	IV	H00-13409	3+	S
126	N	25x10mm	250	MODERADAMENTE	pT4	pN3	IV	H00-12606	3+	S
127	S	45x20mm	900	MODERADAMENTE	pT4	pN3	IV	H00-15989	2+	S

N	UltContCP	SitUltContCP	Recidiva	Local	Regional	Dist	SegPrim	Obito	DtObito	ObitoOnc	DtFinal
1	25-Apr-00	3	19-Apr-00	N	N	S	N	S	30-May-00	S	30-May-00
2	5-Oct-99	3	5-Oct-99	S	N	N	N	S	16-Feb-00	S	16-Feb-00
3	6-May-03	1	N	N	N	N	N	N		N	6-May-03
4	4-Sep-01	4	N	N	N	N	N	S	4-Sep-01	N	4-Sep-01
5	11-Mar-03	1	N	N	N	N	N	N		N	11-Mar-03
6	28-Sep-99	3	20-Jul-99	S	N	N	N	S	31-Dec-99	S	31-Dec-99
7	26-Aug-04	1	N	N	N	N	N	N		N	26-Aug-04
8	18-Jan-02	3	N	N	N	N	S	S	15-Mar-02	S	15-Mar-02
9	15-Aug-05	1	N	N	N	N	N	N		N	15-Aug-05
10	12-May-06	1	N	N	N	N	N	N		N	12-May-06
11	9-Nov-98	3	N	N	N	N	N	S	9-Nov-98	S	9-Nov-98
12	8-Feb-98	4	N	N	N	N	N	S	8-Feb-98	N	8-Feb-98
13	10-Apr-03	1	N	N	N	N	N	N		N	10-Apr-03
14	8-Nov-04	1	N	N	N	N	N	N		N	8-Nov-04
15	9-Sep-04	1	N	N	N	N	N	N		N	9-Sep-04
16	11-Jan-05	1	N	N	N	N	N	N		N	11-Jan-05
17	17-Oct-03	1	N	N	N	N	N	N		N	17-Oct-03
18	13-Apr-06	1	N	N	N	N	N	N		N	13-Apr-06
19	29-Mar-99	3	4-Jan-99	S	N	N	N	S	18-Apr-99	S	18-Apr-99
20	10-Feb-00	3	21-Jan-99	N	S	N	N	S	10-Feb-00	S	10-Feb-00
21	15-Oct-99	3	3-Aug-99	N	N	S	N	S	27-Oct-99	S	27-Oct-99
22	17-Feb-05	1	N	N	N	N	N	N		N	17-Feb-05
23	5-Jan-99	4	N	N	N	N	N	S	5-Jan-99	N	5-Jan-99
24	8-Feb-00	4	N	N	N	N	N	S	4-Mar-00	N	4-Mar-00
25	21-Jan-02	1	N	N	N	N	N	N		N	21-Jan-02
26	8-Sep-04	3	12-Mar-04	N	N	S	N	S	8-Sep-04	S	8-Sep-04
27	12-Feb-01	1	N	N	N	N	N	N		N	12-Feb-01
28	2-May-06	1	N	N	N	N	N	N		N	2-May-06
29	6-May-99	2	6-May-99	S	N	N	N	S	27-Jun-99	S	27-Jun-99

N	UltContCP	SitUltContCP	Recidiva	Local	Regional	Dist	SegPrim	Obito	DtObito	ObitoOnc	DtFinal
30	18-Oct-06	1	N	N	N	N	N	N		N	18-Oct-06
31	15-Dec-05	3	N	N	N	N	S	S	14-Apr-06	S	14-Apr-06
32	19-Jan-99	4	N	N	N	N	N	S	19-Jan-99	N	19-Jan-99
33	6-Jul-00	3	25-May-00	N	S	N	S	S	3-Oct-00	S	3-Oct-00
34	18-May-00	1	N	N	N	N	N	N		N	18-May-00
35	18-May-06	2	N	N	N	N	S	N		N	18-May-06
36	25-Nov-03	1	N	N	N	N	N	N		N	25-Nov-03
37	1-Mar-02	3	31-Jan-02	N	N	S	N	S	14-Mar-02	S	14-Mar-02
38	8-Nov-04	1	N	N	N	N	N	N		N	8-Nov-04
39	8-Jul-02	4	N	N	N	N	N	S	19-Sep-02	N	19-Sep-02
40	8-Aug-00	3	12-Jun-00	S	N	N	N	S	28-Dec-00	S	28-Dec-00
41	23-Aug-00	3	23-Aug-00	N	N	S	N	S	16-Mar-01	S	16-Mar-01
42	29-Nov-99	3	29-Nov-99	S	S	N	N	S	18-Dec-99	S	18-Dec-99
43	11-Jul-06	1	N	N	N	N	N	N		N	11-Jul-06
44	29-Apr-03	4	N	N	N	N	N	S	29-Apr-03	N	29-Apr-03
45	14-Mar-06	1	N	N	N	N	N	N		N	14-Mar-06
46	22-Aug-06	1	N	N	N	N	N	N		N	22-Aug-06
47	24-Apr-06	4	N	N	N	N	N	S	24-Apr-06	N	24-Apr-06
48	28-Sep-06	1	N	N	N	N	N	N		N	28-Sep-06
49	21-Mar-06	1	N	N	N	N	N	N		N	21-Mar-06
50	9-Mar-99	4	N	N	N	N	N	S	9-Mar-99	N	9-Mar-99
51	20-Jun-05	1	N	N	N	N	N	N		N	20-Jun-05
52	4-Apr-06	1	24-Aug-99	N	S	N	N	N		N	4-Apr-06
53	11-Feb-05	3	N	N	N	N	S	S	15-Feb-05	S	15-Feb-05
54	30-Jan-01	1	N	N	N	N	N	N		N	30-Jan-01
55	19-May-00	3	13-Dec-99	N	S	N	N	S	8-Aug-00	S	8-Aug-00
56	13-Oct-99	3	10-Aug-99	N	S	S	N	S	28-Oct-99	S	28-Oct-99
57	27-Dec-05	1	N	N	N	N	N	N		N	27-Dec-05
58	22-Aug-06	1	N	N	N	N	N	N		N	22-Aug-06

N	UltContCP	SitUltContCP	Recidiva	Local	Regional	Dist	SegPrim	Obito	DtObito	ObitoOnc	DtFinal
59	14-May-00	3	3-Mar-00	S	S	N	N	S	14-May-00	S	14-May-00
60	7-Nov-06	1	N	N	N	N	N	N		N	7-Nov-06
61	13-Nov-06	1	N	N	N	N	N	N		N	13-Nov-06
62	28-Jun-06	1	N	N	N	N	N	N		N	28-Jun-06
63	21-Aug-06	1	N	N	N	N	N	N		N	21-Aug-06
64	17-Jul-06	1	N	N	N	N	N	N		N	17-Jul-06
65	9-Feb-06	3	30-Jan-06	N	N	S	N	S	16-Oct-06	S	16-Oct-06
66	3-Jul-06	1	N	N	N	N	N	N		N	3-Jul-06
67	11-Oct-03	4	N	N	N	N	N	S	16-Oct-03	N	16-Oct-03
68	5-Mar-06	3	N	N	N	N	S	S	5-Mar-06	S	5-Mar-06
69	30-Jul-99	4	N	N	N	N	N	S	17-Sep-00	N	17-Sep-00
70	26-May-03	1	N	N	N	N	N	N		N	26-May-03
71	23-Jun-06	1	N	N	N	N	N	N		N	23-Jun-06
72	1-Jul-01	3	22-Jun-01	N	S	N	S	S	1-Jul-01	S	1-Jul-01
73	27-Jul-06	1	N	N	N	N	N	N		N	27-Jul-06
74	18-Aug-06	1	N	N	N	N	N	N		N	18-Aug-06
75	10-Jul-02	3	N	N	N	N	S	S	26-Jul-02	S	26-Jul-02
76	31-May-00	3	7-Jan-00	N	N	S	N	S	31-May-00	S	31-May-00
77	15-Aug-05	1	N	N	N	N	N	N		N	15-Aug-05
78	13-Dec-99	4	N	N	N	N	N	S	13-Dec-99	N	13-Dec-99
79	27-Jun-06	1	N	N	N	N	N	N		N	27-Jun-06
80	29-Nov-05	1	N	N	N	N	N	N		N	29-Nov-05
81	2-Oct-06	1	N	N	N	N	N	N		N	2-Oct-06
82	18-Jun-05	1	N	N	N	N	N	N		N	18-Jun-05
83	2-Feb-04	1	N	N	N	N	N	N		N	2-Feb-04
84	22-May-03	3	N	N	N	N	S	S	23-May-03	S	23-May-03
85	4-Apr-06	1	N	N	N	N	N	N		N	4-Apr-06
86	5-Sep-06	1	N	N	N	N	N	N		N	5-Sep-06
87	17-Nov-05	1	N	N	N	N	N	N		N	17-Nov-05

N	UltContCP	SitUltContCP	Recidiva	Local	Regional	Dist	SegPrim	Obito	DtObito	ObitoOnc	DtFinal
88	7-Mar-06	1	N	N	N	N	N	N		N	7-Mar-06
89	8-Feb-04	3	16-Dec-03	S	N	S	S	S	8-Feb-04	S	8-Feb-04
90	10-Oct-00	3	6-Jul-00	S	N	N	N	S	10-Oct-00	S	10-Oct-00
91	27-Mar-02	3	18-Oct-01	N	S	N	N	S	20-Dec-02	S	20-Dec-02
92	24-Feb-02	3	N	N	N	N	S	S	24-Feb-02	S	24-Feb-02
93	16-Apr-06	1	N	N	N	N	N	N		N	16-Apr-06
94	18-Jul-02	1	N	N	N	N	N	N		N	18-Jul-02
95	16-Aug-05	1	N	N	N	N	N	N		N	16-Aug-05
96	27-Feb-04	3	N	N	N	N	S	S	27-Feb-04	S	27-Feb-04
97	7-Mar-06	1	N	N	N	N	N	N		N	7-Mar-06
98	5-Feb-04	1	N	N	N	N	N	N		N	5-Feb-04
99	30-Jun-06	1	N	N	N	N	N	N		N	30-Jun-06
100	28-Mar-06	1	N	N	N	N	N	N		N	28-Mar-06
101	5-Oct-06	1	N	N	N	N	N	N		N	5-Oct-06
102	9-Jun-06	1	N	N	N	N	N	N		N	9-Jun-06
103	30-Aug-05	1	N	N	N	N	N	N		N	30-Aug-05
104	10-Jul-01	3	N	N	N	N	S	S	10-Jul-01	S	10-Jul-01
105	5-Jan-06	2	N	N	N	N	S	N		N	5-Jan-06
106	1-Feb-02	3	14-Jan-02	N	S	N	N	S	1-Mar-02	S	1-Mar-02
107	31-Jul-06	1	N	N	N	N	N	N		N	31-Jul-06
108	17-Sep-01	3	9-Aug-01	N	N	S	N	S	17-Oct-01	S	17-Oct-01
109	16-Feb-06	1	N	N	N	N	N	N		N	16-Feb-06
110	19-Oct-01	1	N	N	N	N	N	N		N	19-Oct-01
111	31-Aug-06	1	N	N	N	N	N	N		N	31-Aug-06
112	21-Feb-06	3	N	N	N	N	S	S	25-Feb-06	S	25-Feb-06
113	21-Sep-01	3	18-Jul-01	S	S	N	N	S	21-Sep-01	S	21-Sep-01
114	4-Sep-06	1	N	N	N	N	N	N		N	4-Sep-06
115	15-Oct-01	3	N	N	N	N	S	S	15-Oct-01	S	15-Oct-01
116	6-Oct-01	3	8-Oct-01	S	N	N	N	S	16-Oct-01	S	16-Oct-01

N	UltContCP	SitUltContCP	Recidiva	Local	Regional	Dist	SegPrim	Obito	DtObito	ObitoOnc	DtFinal
117	22-Nov-01	3	2-Nov-01	N	N	S	N	S	22-Nov-01	S	22-Nov-01
118	12-Jan-03	3	N	N	N	N	S	S	12-Jan-03	S	12-Jan-03
119	23-Aug-06	1	N	N	N	N	N	N		N	23-Aug-06
120	17-May-05	1	N	N	N	N	N	N		N	17-May-05
121	5-Nov-01	3	31-Jul-01	S	N	N	N	S	5-Nov-01	S	5-Nov-01
122	25-Aug-06	1	N	N	N	N	N	N		N	25-Aug-06
123	8-Jan-03	3	N	N	N	N	S	S	8-Jan-03	S	8-Jan-03
124	1-Sep-05	1	N	N	N	N	N	N		N	1-Sep-05
125	2-Oct-01	4	N	N	N	N	N	S	11-Oct-01	N	11-Oct-01
126	16-Sep-04	3	23-Aug-02	N	N	S	N	S	16-Sep-04	S	16-Sep-04
127	22-Mar-02	3	30-Nov-01	S	N	N	N	S	22-Mar-02	S	22-Mar-02

AcEstAdj = Acometimento de estruturas adjacentes

Classif = classificação histopatológica

Dimens = Dimensões

Dist = metástase à distância

DtCirurg = Data da cirurgia

DtObito = data de óbito

DtPrim = Data da primeira consulta do paciente

DtFinal = data final do acompanhamento do paciente

DtTqTpre = Data de realização de traqueostomia

EnvPerin = Envolvimento perineural

EstClin = Estadiamento Clínico

GrDif = Grau de diferenciação

Hipofar = Comprometimento da hipofaringe

InflInfl = Infiltrado inflamatório

InvCartil = Invasão de Cartilagem

InvVasc = Invasão vascular e/ou linfática

MesSint = Tempo (em meses) dos sintomas

N = Número do caso no estudo

N = Estadiamento linfonodal

Nbiop = número da biópsia

ObitoOnc = óbito oncológico

PN = Estadiamento patológico linfonodal
PT = Estadiamento patológico tumoral
Registro = Número do prontuário do paciente
RxT = radioterapia
SegPrim = ocorrência de segundo tumor primário
SitUltContCP = situação no último controle
T = Estadiamento tumoral
UltContCP = data do último controle

ANEXO B: Questionário de Pesquisa; Análise do Valor Prognóstico da Proteína p63 no Carcinoma Epidermóide de Laringe

1. **DATA COLETA DADOS:** __/__/__ **DATA PRIMEIRA VEZ:** __/__/__ **TEMPO SINTOMAS (MESES):** ____ **REG:** _____ **TEL:** _____
2. **NOME:** _____ **IDADE (DIAGNÓSTICO):** ____ ANOS **DN:** __/__/__ **SEXO:** (1)MASC (2)FEM **RAÇA:** (1)BRANCA (2)MULATA (3)NEGRA (4) AMARELA (5) OUTRAS (99)IGNORADA/**NATURALIDADE:** (1)RIO DE JANEIRO (2)INTERIOR (3)OUTRO ESTADO
3. **OCUPAÇÃO:** _____ **HÁBITOS:** (1) TABAGISMO (2) ETILISMO (3) AMBOS (4) OUTROS (99) IGNORADO
4. **SINAIS E SINTOMAS:** (1) AUMENTO VOLUME (2) DOR (3) DISPNEIA (4) DISFONIA (5) ULCERAÇÃO (6) OUTROS (7) TRAQUEO PRÉVIA (99) IGNORADO
5. **ANTECEDENTES:** (1) CA PRÉVIO (2) CA FAMÍLIA (3) RXT PRÉVIA (4) DÇS SISTÊMICAS (5) OUTROS
6. **LOCAL:** (1) GLOTE (2) SUPRAGLOTE (3) SUBGLOTE (4) TRANSGLOTE (5) HIPOFARINGE (99) IGNORADO **TNM** _____ **EC** _____
7. **MACROSCOPIA:** (1) ULCERADO (2) VEGETANTE (3) SUPERFICIAL (4) VERRUCOSO (5) OUTROS (99) IGNORADO
8. **CIRURGIA(DESCREVER):** _____

CIRURGIÃO: _____ **DATA:** __/__/__ **TIPO:** (1)TOTAL (2)PARCIAL (3)SUBTOTAL (4)QUASE TOTAL (5)OUTRA (99)IGNORADA **ESV. CERV.:** (1) SIM (2) NÃO (99) IGNORADO **TIPO:** (1) RADICAL (2) RAD. CLÁSS. (3) SELETIVO (4) ATÍPICO (5) OUTRO (99) IGNORADO **LADO:** (1) DIR (2) ESQ (3) BILATERAL **NÍVEIS LFN RESSECADOS (DIR)** (1) I (2) II (3) III (4) IV (5) V (6) VI (99) IGNORADO **(ESQ)** (1) I (2) II (3) III (4) IV (5) V (6) VI (99) IGNORADO **RESS.TOTAL:** (1) SIM (2) NÃO (3) IGNORADO

9. ANATOMO-PATOLOGIA

A. BIÓPSIA: _____ **LÂMINA:** _____ **GRAU HISTOLÓGICO:** (1) BEM DIFERENCIADO (2) MOD. DIF (3) POUCO DIF (4) INDIFERENCIADO (5) PLEOMÓRFICO (6) INDEFINIDO

B. PEÇA CIR (TUMOR): **NÚMERO LÂMINAS:** **GRAU HISTOLÓGICO:** (1) BEM DIFERENCIADO (2) MOD. DIF (3) POUCO DIF (4) INDIFERENCIADO (5) PLEOMÓRFICO (6) INDEFINIDO

- **MARGENS RESSECÇÃO:** (1) LIVRES (2) EXÍGUAS (3) COMPROMETIDAS (4) INDEFINIDAS
- **INVASÃO CARTILAGEM:** (1) SIM (2) NÃO (3) INDEFINIDO
- **INVASÃO E/OU EMBOLIZAÇÃO VASCULAR:** (1) SIM (2) NÃO (3) INDEFINIDA
- **INVASÃO NEURAL:** (1) SIM (2) NÃO (3) INDEFINIDA
- **INFILTRAÇÃO ESTRUTURAS ADJACENTES:** (1) SIM (2) NÃO (3) INDEFINIDA SE (SIM) ESPECIFICAR: _____
- **NECROSE:** (1) SIM (2) NÃO (3) INDEFINIDO / **CALCIFICAÇÃO:** (1) SIM (2) NÃO (3) INDEFINIDO / **HIALINIZAÇÃO:** (1) SIM (2) NÃO (3) INDEFINIDO / **INFILTRADO INFLAMATÓRIO:** (1) SIM (2) NÃO (3) INDEFINIDO
- **DIMENSÕES:** SUPERFÍCIE: ____mm x ____mm / **INVASÃO E/OU ESPESSURA:** ____mm

C. PEÇA CIR (LFNS) **NÚMERO LÂMINAS:** _____

- **NÍVEIS LFN METASTÁTICOS (NÚMERO): DIR:** (1) I(____) (2) II(____) (3) III(____) (4) IV(____) (5) V(____) (6) VI(____) (99) IGNORADO / **(ESQ)** (1) I(____) (2) II(____) (3) III(____) (4) IV(____) (5) (____) V(____) (6) VI(____) (99) IGNORADO
- **TOTAL LFNS:** _____
- **EXTRAVALZAMENTO CAPSULAR:** (1) SIM (2) NÃO (3) INDETERMINADO ONDE: _____
- **PTNM:** _____
- **PATOLOGISTA(S):** _____

BIÓPSIA _____

CONGELAÇÃO _____

CIRURGIA _____

REVISÃO _____

10. **QUIMIOTERAPIA:** (1) SIM (2) NÃO **TIPO:** (1) ADJUVANTE (2) NEOADJUVANTE **DROGAS USADAS:** _____

11. **RADIOTERAPIA ADJUVANTE:** (1) SIM (2) NÃO

- **TEMPO INÍCIO:** ____MESES ____DIAS/ **DURAÇÃO:** ____SEMANAS ____MESES ____FRAÇÕES
- **DOSAGEM TOTAL:** ____CGY **LOCAL**____CGY
REGIONAL____CGY
- **MODALIDADE:** (1) CONVENCIONAL (2) HIPERFRACIONAMENTO (3)OUTRAS

12. **DADOS SEGUIMENTO DOS DOENTES: TEMPO ENTRE DIAGNÓSTICO E CIRURGIA:** ____MESES

- **DATA ÚLTIMO CONTROLE:** __/__/__ **SITUAÇÃO ATUAL:** (1) VIVO SED (2) VIVO COM DOENÇA (3) MORTO P/DOENÇA (4) MORTO P/OUTRAS CAUSAS (ESPECIFICAR SE POSSÍVEL) _____(5) PERDA DE SEGUIMENTO / **ÓBITO:** (1) SIM (2) NÃO **ÓBITO:** __/__/__
- **SINTOMAS:** (1) SIM (2) NÃO
- **RECIDIVA:** (1) SIM (2) NÃO (3) INDEFINIDO **DATA DIAG. RECIDIVA:** __/__/__
- **RECIDIVA LOCAL:** (1) SIM (2) NÃO TEMPO ____MESES
- **RECIDIVA REGIONAL:** (1) SIM (2) NÃO TEMPO ____MESES
NÍVEL(IS)/LADO(S): _____
- **RECIDIVA DISTÂNCIA:** (1) SIM (2) NÃO **ONDE:** _____ **TRATAMENTO RECIDIVA:** (1)SIM (2)NÃO/
QUAL: _____ **SITUAÇÃO PÓS TRAT.RECIDIVA:** _____

REFERÊNCIAS

ALMADORI, G.; GALLI, J.; CADONI, G.; BUSSU, F.; MAURIZI, M. Human papillomavirus infection and cyclin D1 gene amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: biologic function and clinical significance. **Head Neck** 2002; 24(6):597-604.

AMERICAN CANCER SOCIETY disponível em:

<http://www.cancer.org/docroot/PRO/content/PRO_1_1_Cancer_Statistics_2007_Presentation.asp>. Acesso em: 18 Abr. 2007.

AUGUSTIN, M.; BAMBERGER, C.; PAUL, D.; SCHMALE, H. *Cloning and chromosomal mapping of the human p53-related KET gene to chromosome 3q27 and its murine homolog Ket to mouse chromosome 16*. **Mamm. Genome**, 1998; 9(11): 899-902.

BAMBERGER, C.; HAFNER, A.; SCHMALE, H.; WERNER, S. *Expression of different p63 variants in healing skin wounds suggests a role of p63 in reepithelialization and muscle repair*. **Wound Repair Regen.**, 2005; 13(1): 41-50.

BARBARESCHI, M.; PECCIARINI, L.; CANGI, M. G.; MACRI, E.; RIZZO, A.; VIALE G. *ET AL. p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast*. **Am. J. Surg. Pathol.**, 2001; 25(8):1054-60.

BARBOSA, M.M. **Diagnóstico do câncer laríngeo com invasão da comissura vocal anterior**. São Paulo: 2004. 84 p. Tese para obtenção do título de doutor - Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2004.

BIAN, J.; SUN, Y. *p53CP, a putative p53 competing protein that specifically binds to the consensus p53 DNA binding sites: a third member of the p53 family?* **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 1997; 94 (26): 14753-8.

BJORKQVIST, A.M.; HUSGAFVEL-PURSIAINEN, K.; ANTTILA, S.; KARJALAINEN, A.; TAMMILEHTO, L.; MATTSON, K. *ET AL. DNA gains in 3q occur frequently in squamous cell carcinoma of the lung, but not in adenocarcinoma*. **Genes Chromosomes Cancer**, 1998; 22(1): 79-82.

BOCKMUHL, U.; SCHWENDEL, A.; DIETEL, M.; PETERSEN, I. *Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas*. **Cancer Res.**, 1996; 56(23): 5325-9.

BOLDROP, L.; COATES, P. J.; HEDBERG, Y.; SJOSTROM, B.; DAHLQVIST, A.; NYLANDER, K. *Expression of p63, COX-2, EGFR and beta-catenin in smokers and patients with squamous cell carcinoma of the head and neck reveal variations in non-neoplastic tissue and no obvious changes in smokers.* **Int. J. Oncol.**, 2005; 27(6): 1661-7.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Rotina Interna do INCA**; serviço de cirurgia de cabeça e pescoço. Rio de Janeiro: 2007.

_____, Ministério da Saúde. Secretária de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **TNM** – Classificação dos Tumores Malignos. 6ª ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004.

BRINCK, U.; RUSCHENBURG, I.; DI COMO, C.J.; BUSCHMANN, N.; BETKE, H.; STACHURA, J. *ET AL. Comparative study of p63 and p53 expression in tissue microarrays of malignant melanomas.* **Int. J. Mol. Med.**, 2002; 10(6): 707-11.

BRODERS, A. C. *Squamous-cell epithelioma of the skin. A study of 256 cases.* **Ann. Surg.**, v. 73, p. 141-160, 1921.

CELLI, J.; DUIJF, P.; HAMEL, B.C.; BAMSHAD, M.; KRAMER, B.; SMITS, A.P. *ET AL. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome.* **Cell**, 1999; 99(2): 143-53.

CERNEA, C.R. **Carcinomas cutâneos com acometimento suspeito ou comprovado da base do crânio: fatores clínicos, histopatológicos e biológicos.** São Paulo, 2001. 190 p. Tese para obtenção do título de Professor Livre-Docente - Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2001.

CHEN, Y.K.; HSUE, S.S.; LIN, L.M. *Immunohistochemical demonstration of p63 in DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinogenesis.* **Oral Dis.**, 2003; 9(5): 235-40.

_____. *Expression of p63 (TA and deltaN isoforms) in human primary well differentiated buccal carcinomas.* **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, 2004; 33(5): 493-7.

CHOI, H.R.; BATSAKIS, J.G.; ZHAN, F.; STURGIS, E.; LUNA, M.A.; EL-NAGGAR, A.K. *Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis.* **Hum. Pathol.**, 2002; 33(2): 158-64.

- CHOVANEC, M.; SMETANA, K. JR.; BETKA, J.; PLZAK, J.; BRABEC, J.; MOYA-ALVAREZ, V. *ET AL.* Correlation of expression of nuclear proteins pKi67 and p63 with lectin histochemical features in head and neck squamous cell cancer. **Int. J. Oncol.**, 2005; 27(2):409-15.
- COOPER, G.M. **A célula: uma abordagem molecular**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.712p.
- DE JONG, R.; HERMANS, J.; MOLENAAR, J.; BRIAIRE, J.; CESSIE, S. *Prediction of survival in patients with head and neck cancer*. **Head and Neck**, 2001; 719-24.
- DE LAURENZI, V.; COSTANZO, A.; BARCAROLI, D.; TERRINONI, A.; FALCO, M.; ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M. *ET AL.* Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. **J. Exp. Med.**, 1998; 188(9): 1763-8.
- DE LAURENZI, V.; ROSSI, A.; TERRINONI, A.; BARCAROLI, D.; LEVRERO, M.; COSTANZO, A. *ET AL.* p63 and p73 transactivate differentiation gene promoters in human keratinocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 2000; 273(1): 342-6.
- DIAS, F.L. **Análise do valor prognóstico de fatores histopatológicos e da expressão da proteína p53 em carcinomas epidermóides estágio I da língua e soalho bucal**. São Paulo, 1999. 181 p. Tese para obtenção do título de doutor - Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1999.
- DI COMO, C.J.; GAIDDON, C.; PRIVES, C. *p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells*. **Mol. Cell. Biol.**, 1999; 19(2): 1438-49.
- DI COMO, C.J.; URIST, M.J.; BABAYAN, I.; DROBNJAK, M.; HEDVAT, C.V.; TERUYA-FELDSTEIN, J. *ET AL.* p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. **Clin. Cancer Res.**, 2002; 8(2): 494-501.
- DONEHOWER, L.A.; HARVEY, M.; SLAGLE, B.L.; MCARTHUR, M.J.; MONTGOMERY, C.A.; JR., BUTEL, J.S. *ET AL.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature**, 1992; 356(6366): 215-21.

DONG, P.; LI, X.; ZHU, Z.; YU, Z.; LU, G.; SUN, Z. *ET AL.* Application of tissue microarray: evaluation of the expression of S-100-positive dendritic cells, tumor suppressor gene p63 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in laryngeal carcinoma. **Acta Otolaryngol.**, 2004; 124(10): 1204-7.

FOSCHINI, M.P.; GAIBA, A.; COCCHI, R.; PENNESI, M.G.; GATTO, M.R.; FREZZA, G.P. *ET AL.* Pattern of p63 expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Virchows Arch.**, 2004; 444(4): 332-9.

GEDDERT, H.; KIEL, S.; HEEP, H.J.; GABBERT, H.E.; SARBIA, M. *The role of p63 and deltaNp63 (p40) protein expression and gene amplification in esophageal carcinogenesis.* **Hum. Pathol.**, 2003; 34(9): 850-6.

GREGOR, R.T. Tumors of the Larynx. in: JONES, A S; PHILLIPS, D E; HILGERS, F J. Editors. **Diseases of the Head and Neck, Nose and Throat.** London: Arnold; 1998. p207-29.

GLICKMAN, J.N.; YANG, A.; SHAHSAFAEI, A.; MCKEON, F.; ODZE, R.D. Expression of p53-related protein p63 in the gastrointestinal tract and in esophageal metaplastic and neoplastic disorders. **Hum. Pathol.**, 2001;32(11):1157-65.

HAGIWARA, K.; MCMENAMIN, M.G.; MIURA, K.; HARRIS, C.C. Mutational analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET gene in human cancer cell lines using intronic primers. **Cancer Res** 1999;59(17):4165-9.

HARA, T.; KIJIMA, H.; YAMAMOTO, S.; KENMOCHI, T.; KISE, Y.; TANAKA, H. *ET AL.* Ubiquitous p63 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. **Int. J. Mol. Med.**, 2004; 14(2):169-73.

HIBI, K.; TRINK, B.; PATTURAJAN, M.; WESTRA, W.H.; CABALLERO, O.L.; HILL, D. *ET AL.* AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 2000; 97(10): 5462-7.

IANAKIEV, P.; KILPATRICK, M.W.; TOUDJARSKA, I.; BASEL, D.; BEIGHTON, P.; TSIPOURAS, P. Split-hand/split-foot malformation is caused by mutations in the p63 gene on 3q27. **Am. J. Hum. Genet.**, 2000; 67(1): 59-66.

IWATA, T.; URAMOTO, H.; SUGIO, K.; FUJINO, Y.; OYAMA, T.; NAKATA, S. *ET AL.* A lack of prognostic significance regarding δ Np63 immunoreactivity in lung cancer. **Lung Cancer**, 2005; 50(1):67-73.

- JARES, P.; FERNANDEZ, P.L.; CAMPO, E.; NADAL, A. BOSCH, F.; AIZA, G. *ET AL. PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. Cancer Res.*, 1994; 54(17): 4813-7.
- JIA, H.; WANG, J.; SHAN, Y.; HOU, J. *The clinical significance of the expression of p63 gene in laryngeal squamous cell carcinoma. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, 2006; 20(3): 119-21.
- KAELIN, W.G. JR. *The emerging p53 gene family. J. Natl. Cancer Inst.*, 1999; 91(7): 594-8.
- KAGHAD, M.; BONNET, H.; YANG, A.; CREANCIER, L.; BISCAN, J.C.; VALENT, A. *ET AL. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. Cell*, 1997; 90(4):809-19.
- KALBFLEISCH, J.D.; PRENTICE, R.L. *The Statistical Analysis of Failure Time Data*, John Wiley and Sons, New York, 1980.
- KAUFMANN, O.; FIETZE, E.; MENGES, 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(6): 823-30.
- KOGA, F.; KAWAKAMI, S.; FUJII, Y.; SAITO, K.; OHTSUKA, Y.; IWAI, A. *ET AL. Impaired p63 expression associates with poor prognosis and uroplakin III expression in invasive urothelial carcinoma of the bladder. Clin. Cancer Res.*, 2003; 9(15): 5501-7.
- KOUFMAN, J.A.; BURKE, A.J. *The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. Otolaryngol. Clin. North Am.*, 1997; 30(1): 1-19.
- LEVINE, A.J. *p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell*, 1997; 88(3): 323-31.
- LEVRERO, M.; DE LAURENZI, V.; COSTANZO, A.; GONG, J.; WANG, J.Y.; MELINO, G. *The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. J. Cell Sci.*, 2000; 113 (Pt 10): 1661-70.

LITTLE, N.A.; JOCHEMSEN, A.G. *Hdmx and Mdm2 can repress transcription activation by p53 but not by p63*. **Oncogene**, 2001; 20(33): 4576-80.

_____. *p63*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 2002; 34(1): 6-9.

LO MUZIO, L.; SANTARELLI, A.; CALTABIANO, R.; RUBINI, C.; PIERAMICI, T.; TREVISIOL, L. *ET AL. p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma*. **Hum. Pathol.**, 2005; 36(2): 187-94.

LOHRUM, M.A.; VOUSDEN, K.H. *Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules*. **Trends Cell Biol.**, 2000; 10(5): 197-202.

MARIN, M.C.; JOST, C.A.; IRWIN, M.S.; DE CAPRIO, J.A.; CAPUT, D.; KAE LIN, W. G. JR. *Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53 homolog p73*. **Mol. Cell Biol.**, 1998; 18(11): 6316-24.

MARIN, M.C.; KAE LIN, W.G. JR. *p63 and p73: old members of a new family*. **Biochim. Biophys. Acta**, 2000; 1470(3): M93-M100.

MASSION, P.P.; TAFLAN, P.M.; JAMSHEDUR RAHMAN, S.M.; YILDIZ, P.; SHYR, Y.; EDGERTON, M. *ET AL. Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis*. **Cancer Res.**, 2003; 63(21): 7113-21.

MATHENY, K.E.; BARBIERI, C.E.; SNIEZEK, J.C.; ARTEAGA, C.L.; PIETENPOL, J. A. *Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling decreases p63 expression in head and neck squamous carcinoma cells*. **Laryngoscope**, 2003; 113(6): 936-9.

MCGRATH, J.A.; DUIJF, P.H.; DOETSCH, V.; IRVINE, A.D.; DE WAAL, R.; VANMOLKOT, K.R. *ET AL. Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63*. **Hum. Mol. Genet.**, 2001; 10(3): 221-9.

MILLS, A.A.; ZHENG, B.; WANG, X.J.; VOGEL, H.; ROOP, D.R.; BRADLEY, A. *p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis*. **Nature**, 1999; 398(6729): 708-13.

_____. Instituto Nacional de Câncer. Câncer de Laringe. 2005; <disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=332>. Acesso em: 21 dez. 2007.

MUSCAT, J.E.; WYNDER, E.L. *Tobacco, alcohol, asbestos, and occupational risk factors for laryngeal cancer*. **Cancer**, 1992; 69(9): 2244-51.

NADAL, A.; CAMPO, E.; PINTO, J.; MALLOFRE, C.; PALACIN, A.; ARIAS, C. *ET AL. p53 expression in normal, dysplastic, and neoplastic laryngeal epithelium. Absence of a correlation with prognostic factors*. **J. Pathol.**, 1995; 175(2): 181-8.

NETO, O.B. **Expressão do P63 em tumores epiteliais do ovário: uma nova evidência da origem alternativa dos tumores mucinosos**. Ribeirão Preto. 2003; (Tese), 82p. Tese. São Paulo, 2003.

NISHI, H.; ISAKA, K.; SAGAWA, Y.; USUDA, S.; FUJITO, A.; ITO, H. *ET AL. Mutation and transcription analyses of the p63 gene in cervical carcinoma*. **Int. J. Oncol.**, 1999; 15(6): 1149-53.

NOGUEIRA, C.P.; DOLAN, R.W.; GOOEY, J.; BYAHATTI, S.; VAUGHAN, C.W.; FULEIHAN, N.S. *ET AL. Inactivation of p53 and amplification of cyclin D1 correlate with clinical outcome in head and neck cancer*. **Laryngoscope**, 1998; 108(3): 345-50.

NOSZCZYK, B.H.; MAJEWSKI, S.T. *p63 expression during normal cutaneous wound healing in humans*. **Plast. Reconstr. Surg.**, 2001; 108(5): 1242-7; discussion 1248-50.

NYLANDER, K.; SCHILDT, E.B.; ERIKSSON, M.; ROOS, G. *PCNA Ki-67, p53, bcl-2 and prognosis in intraoral squamous cell carcinoma of the head and neck*. **Anal. Cell Pathol.**, 1997; 14(2): 101-10.

NYLANDER, K.; COATES, P.J.; HALL, P.A. *Characterization of the expression pattern of p63 alpha and delta Np63 alpha in benign and malignant oral epithelial lesions*. **Int. J. Cancer**, 2000; 87(3): 368-72.

NYLANDER, K.; VOJTESEK, B.; NENUTIL, R.; LINDGREN, B.; ROOS, G.; ZHANXIANG, W. *ET AL. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells*. **J. Pathol.**, 2002; 198(4): 417-27.

O'CONNELL, J.T.; MUTTER, G.L.; CVIKO, A.; NUCCI, M.; QUADE, B.J.; KOZAKEWICH, H.P. *ET AL.* Identification of a basal/reserve cell immunophenotype in benign and neoplastic endometrium: a study with the p53 homologue p63. **Gynecol. Oncol.**, 2001; 80(1): 30-6.

OLIVEIRA, L.R.; RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLOTO, S. Prognostic significance of p53 and p63 immunolocalisation in primary and matched lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Acta Histochem.**, 2007; 109(5): 388-96.

OREN, M. Lonely no more: p53 finds its kin in a tumor suppressor haven. **Cell**, 1997; 90(5): 829-32.

OSADA, M.; OHBA, M.; KAWAHARA, C.; ISHIOKA, C.; KANAMARU, R.; KATOH, I. *ET AL.* Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. **Nat. Med.**, 1998; 4(7): 839-43.

PARSA, R.; YANG, A.; MCKEON, F.; GREEN, H. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, 1999; 113(6): 1099-105.

PATTURAJAN, M.; NOMOTO, S.; SOMMER, M.; FOMENKOV, A.; HIBI, K.; ZANGEN, R. *ET AL.* δ Np63 induces beta-catenin nuclear accumulation and signaling. **Cancer Cell.**, 2002; 1(4): 369-79.

PELLEGRINI, G.; DELLAMBRA, E.; GOLISANO, O.; MARTINELLI, E.; FANTOZZI, I.; BONDANZA, S. *ET AL.* p63 identifies keratinocyte stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 2001; 98(6): 3156-61.

PRUNERI, G.; PIGNATARO, L.; CARBONI, N.; RONCHETTI, D.; CESANA, B.M.; OTTAVIANI, A. *ET AL.* Clinical relevance of p53 and bcl-2 protein over-expression in laryngeal squamous-cell carcinoma. **Int. J. Cancer**, 1998; 79(3): 263-8.

PRUNERI, G.; PIGNATARO, L.; MANZOTTI, M.; CARBONI, N.; RONCHETTI, D.; NERI, A. *ET AL.* p63 in laryngeal squamous cell carcinoma: evidence for a role of TA-p63 down-regulation in tumorigenesis and lack of prognostic implications of p63 immunoreactivity. **Lab. Invest.**, 2002; 82(10): 1327-34.

- PRUNERI, G.; FABRIS, S.; DELL'ORTO, P.; BIASI, M.O.; VALENTINI, S.; DEL CURTO, B. *ET AL.* *The transactivating isoforms of p63 are overexpressed in high-grade follicular lymphomas independent of the occurrence of p63 gene amplification.* **J. Pathol.**, 2005; 206(3): 337-45.
- QUADE, B.J.; YANG, A.; WANG, Y.; SUN, D.; PARK, J.; SHEETS, E. *ET AL.* *Expression of the p53 homologue p63 in early cervical neoplasia.* **Gynecol. Oncol.**, 2001; 80(1): 24-9.
- RAMALHO, L.N.; MAGGIORI, M.S.; RIBEIRO-SILVA, A.; PERES, L.C. *P63 expression in hydropic abortion and gestational trophoblastic diseases.* **Placenta**, 2006; 27(6-7): 740-3.
- RATOVITSKI, E.A.; PATTURAJAN, M.; HIBI, K.; TRINK, B.; YAMAGUCHI, K.; SIDRANSKY, D. *p53 associates with and targets $\delta Np63$ into a protein degradation pathway.* **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001;98(4):1817-22.
- REIS-FILHO, J.S.; ALBERGARIA, A.; MILANEZI, F.; AMENDOEIRA, I.; SCHMITT, F.C. *Naked nuclei revisited: p63 Immunoexpression.* **Diagn. Cytopathol.**, 2002; 27(3): 135-8.
- REIS-FILHO, J.S.; SIMPSON, P.T.; FULFORD, L.G.; MARTINS, A.; SCHMITT, F.C. *P63-driven nuclear accumulation of beta-catenin is not a frequent event in human neoplasms.* **Pathol. Res. Pract.**, 2003; 199(12): 785-93.
- RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLOTO, S. A família do p53: Aspectos estruturais e funcionais do p73 e do p63. **J. Bras. Patol. Méd. Lab.**, (periódico na Internet). 2003 Jun(citado 2007 Jan 08); 39(2): 179-184. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442003000200014&lng=pt&nrm=isso.doi:10.1590/S1676-24442003000200014> Acesso em: 11 Jun. 2006.
- ROCCO, J.W.; LEONG, C.O.; KUPERWASSER, N.; DEYOUNG, M.P.; ELLISEN, L. W. *p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis.* **Cancer Cell**, 2006; 9(1): 45-56.
- ROSNER, B. **Fundamentals of Bioeststatistics**. 2ed. Massachussets, Plus Publishers, 2000, p326-32.

ROTH, J.; DOBBELSTEIN, M. *Failure of viral oncoproteins to target the p53-homologue p51A*. **J. Gen. Virol.**, 1999; 80 (Pt 12): 3251-5.

SASAKI, Y.; ISHIDA, S.; MORIMOTO, I.; YAMASHITA, T.; KOJIMA, T.; KIHARA, C. *ET AL. The p53 family member genes are involved in the Notch signal pathway*. **J. Biol. Chem.**, 2002; 277(1): 719-24.

SCHMALE, H.; BAMBERGER, C. *A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53*. **Oncogene**, 1997; 15(11): 1363-7.

SCHWARTZ, M.R. Pathology of Laryngeal tumors, in: Thawley SE, Panje WR, Batsakis JG, Lindberg RD, Editors. **Comprehensive Management of Head and Neck Tumors**. Philadelphia. WB Saunders Company; 1999, p950-78.

SENOO, M.; SEKI, N.; OHIRA, M.; SUGANO, S.; WATANABE, M.; INUZUKA, S. *ET AL. A second p53-related protein, p73L, with high homology to p73*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 1998; 248(3): 603-7.

SIGNORETTI, S.; WALTREGNY, D.; DILKS, J.; ISAAC, B.; LIN, D.; GARRAWAY, L. *ET AL. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development*. **Am. J. Pathol.**, 2000; 157(6):1769-75.

SINARD, R.J.; NETTERVILLE, J.L.; GARRET, C.E.; OSSOF, R.H. In: **Myers EN, Suen JY. Cancer of the Head and Neck**. Philadelphia: WB Saunders Company.1996. p381-421.

SNIEZEK, J.C.; MATHENY, K.E.; BURKEY, B.B.; NETTERVILLE, J.L.; PIETENPOL, J.A. *Expression of p63 and 14-3-3sigma in normal and hyperdifferentiated mucosa of the upper aerodigestive tract*. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, 2002; 126(6): 598-601.

SNIEZEK, J.C.; MATHENY, K.E.; WESTFALL, M.D.; PIETENPOL, J.A. *Dominant negative p63 isoform expression in head and neck squamous cell carcinoma*. **Laryngoscope**, 2004; 114(12): 2063-72.

SPAFFORD, M.F.; KOEPPE, J.; PAN, Z.; ARCHER, P.G.; MEYERS, A.D.; FRANKLIN, W.A. *Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma*. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, 1996; 122(6): 627-32.

STRANO, S.; ROSSI, M.; FONTEMAGGI, G.; MUNARRIZ, E.; SODDU, S.; SACCHI, A. *ET AL.* From p63 to p53 across p73. **FEBS Lett.**, 2001; 490(3): 163-70.

TACHA, D.E.; MILLER, R.T. *Use of p63/P504S monoclonal antibody cocktail in immunohistochemical staining of prostate tissue.* **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, 2004; 12(1): 75-8.

TAKAHASHI, Y.; NOGUCHI, T.; TAKENO, S.; KIMURA, Y.; OKUBO, M.; KAWAHARA, K. *Reduced expression of p63 has prognostic implications for patients with esophageal squamous cell carcinoma.* **Oncol. Rep.**, 2006; 15(2): 323-8.

TAN, M.; BIAN, J.; GUAN, K.; SUN, Y. *p53CP is p51/p63, the third member of the p53 gene family: partial purification and characterization.* **Carcinogenesis**, 2001; 22(2): 295-300.

TANIERE, P.; MARTEL-PLANCHE, G.; SAURIN, J.C.; LOMBARD-BOHAS, C.; BERGER, F.; SCOAZEC, J.Y. *ET AL.* TP53 mutations, amplification of P63 and expression of cell cycle proteins in squamous cell carcinoma of the oesophagus from a low incidence area in Western Europe. **Br. J. Cancer**, 2001; 85(5): 721-6.

TANNAPFEL, A.; SCHMELZER, S.; BENICKE, M.; KLIMPFINGER, M.; KOHLHAW, K.; MOSSNER, J. *ET AL.* Expression of the p53 homologues p63 and p73 in multiple simultaneous gastric cancer. **J. Pathol.**, 2001; 195(2): 163-70.

THURFJELL, N.; COATES, P.J.; UUSITALO, T.; MAHANI, D.; DABELSTEEN, E.; DAHLQVIST, A. *ET AL.* Complex p63 mRNA isoform expression patterns in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Int. J. Oncol.**, 2004; 25(1): 27-35.

THURFJELL, N.; COATES, P.J.; VOJTESEK, B.; BENHAM-MOTLAGH, P.; EISOLD, M.; NYLANDER K. *Endogenous p63 acts as a survival factor for tumour cells of SCCHN origin.* **Int. J. Mol. Med.**, 2005; 16(6): 1065-70.

TRINK, B.; OKAMI, K.; WU, L.; SRIURANPONG, V.; JEN, J.; SIDRANSKY, D. *A new human p53 homologue.* **Nat. Med.**, 1998; 4(7): 747-8.

TUYNS, A.J.; SASCO, A.J. *Incidence of tobacco and alcohol-related cancers in western Europe.* **Eur. J. Cancer Prev.**, 1997; 6(6): 560-1.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. **Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias**. 2ª ed. São Paulo; 2005.

VALENTE, G.; GIUSTI, U.; KERIM, S.; GABRIELE, P.; MOTTA, M.; RAGONA, R. *ET AL. High prognostic impact of growth fraction parameters in advanced stage laryngeal squamous cell carcinoma*. **Oncol. Rep.**, 1999; 6(2): 289-93.

VIELBA, R.; BILBAO, J.; ISPIZUA, A.; ZABALZA, I.; ALFARO, J.; REZOLA, R. *ET AL. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx*. **Laryngoscope**, 2003; 113(1): 167-72.

WANG, T.Y.; CHEN, B.F.; YANG, Y.C.; CHEN, H.; WANG, Y.; CVIKO, A. *ET AL. Histologic and immunophenotypic classification of cervical carcinomas by expression of the p53 homologue p63: a study of 250 cases*. **Hum. Pathol.**, 2001; 32(5): 479-86.

WANG, B.Y.; GIL, J.; KAUFMAN, D.; GAN, L.; KOHTZ, D.S.; BURSTEIN, D.E. *P63 in pulmonary epithelium, pulmonary squamous neoplasms, and other pulmonary tumors*. **Hum. Pathol.**, 2002; 33(9): 921-6.

WEBER, A.; LANGHANKI, L.; SCHUTZ, A.; GERSTNER, A.; BOOTZ, F.; WITTEKIND, C. *ET AL. Expression profiles of p53, p63, and p73 in benign salivary gland tumors*. **Virchows Arch.**, 2002; 441(5): 428-36.

WEINSTEIN, G.S.; NUAMAH, I.F.; TUCKER, J.; MONTONE, K. Evaluation of HER-2/neu (c-erbB-2) oncogene expression in whole organ sections of supraglottic squamous cell carcinoma. **Ann Otol Rhinol Laryngol** 1996;105(4):275-9

WERLING, R.W.; HWANG, H.; YAZIJI, H.; GOWN, A.M. *Immunohistochemical distinction of invasive from noninvasive breast lesions: a comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain*. **Am. J. Surg. Pathol.**, 2003; 27(1): 82-90.

WESSAGOWIT, V.; MELLERIO, J.E.; PEMBROKE, A.C.; MCGRATH, J.A. *Heterozygous germline missense mutation in the p63 gene underlying EEC syndrome*. **Clin. Exp. Dermatol.**, 2000; 25(5): 441-3.

WESTFALL, M.D.; PIETENPOL, J. A. *p63: Molecular complexity in development and cancer*. **Carcinogenesis**, 2004; 25(6): 857-64.

WESTFALL, M.D; JOYNER, A.S.; BARBIERI, C.E.; LIVINGSTONE, M.; PIETENPOL, J.A. *Ultraviolet radiation induces phosphorylation and ubiquitin-mediated degradation of $\delta Np63\alpha$* . **Cell Cycle**, 2005; 4(5): 710-6.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours**. Barnes L., Eveson J.W., Reichart P., Sidransky D. (editors), IARC Press: Lyon, 2005.

WHITE, E.; PRIVES, C. *DNA damage enables p73*. **Nature**, 1999; 399(6738): 734-5, 737.

WRONE, D.A; YOO, S.; CHIPPS, L.K.; MOY, R.L. *The expression of p63 in actinic keratoses, seborrheic keratosis, and cutaneous squamous cell carcinomas*. **Dermatol. Surg.**, 2004; 30(10): 1299-302.

WU, G.; NOMOTO, S.; HOQUE, M.O.; DRACHEVA, T.; OSADA, M.; LEE, C.C. *ET AL. $\delta Np63\alpha$ and TAp63 α regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development*. **Cancer Res.**, 2003; 63(10): 2351-7.

YAMAGUCHI, K.; WU, L.; CABALLERO, O.L.; HIBI, K.; TRINK, B.; RESTO, V. *ET AL. Frequent gain of the p40/p51/p63 gene locus in primary head and neck squamous cell carcinoma*. **Int. J. Cancer**, 2000; 86(5): 684-9.

YANG, A.; KAGHAD, M.; WANG, Y.; GILLETT, E.; FLEMING, M.D.; DOTSCHE, V. *ET AL. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities*. **Mol. Cell**, 1998; 2(3): 305-16.

YANG, A.; SCHWEITZER, R.; SUN, D.; KAGHAD, M.; WALKER, N.; BRONSON, R.T. *ET AL. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development*. **Nature**, 1999; 398(6729): 714-8.

YANG, A.; MCKEON, F. *p63 and p73: p53 mimics, menaces and more*. **Nat Rev Mol. Cell Biol.**, 2000; 1(3): 199-207.

YANG, A.; KAGHAD, M.; CAPUT, D.; MCKEON, F. *On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53*. **Trends Genet.**, 2002; 18(2): 90-5.

ZATONSKI, W.; BECHER, H.; LISSOWSKA, J.; WAHRENDORF, J. *Tobacco, alcohol, and diet in the etiology of laryngeal cancer: a population-based case-control study*. **Cancer Causes Control.**, 1991; 2(1): 3-10.

ZENG, X.; ZHU, Y.; LU, H. *NBP is the p53 homolog p63*. **Carcinogenesis** 2001; 22(2):215-9.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Classificação TNM Laringe

Supraglote

- T1 – uma sub-localização anatômica, mobilidade normal
- T2 – mucosa de mais de uma sub-localização adjacente da supraglote ou da glote, ou de região adjacente fora da supraglote; sem fixação
- T3 – fixação da corda, ou invasão da área pós-cricóide, tecidos pré-epiglóticos, espaço paraglótico, erosão da cartilagem tireóide
- T4a – toda a cartilagem tireóide; traquéia, partes moles do pescoço: músculos profundos/extrínsecos da língua, alça muscular, tireóide e esôfago
- T4b – espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais, artéria carótida

Glote

- T1 – limitado à(s) corda(s) vocal(is), mobilidade normal
 - (a) uma corda
 - (b) ambas as cordas
- T2 – supraglote, subglote, mobilidade de corda vocal diminuída
- T3 – fixação da corda, espaço paraglótico, erosão de cartilagem tireóide
- T4a – toda a cartilagem tireóide; traquéia, partes moles do pescoço: músculos profundos/extrínsecos da língua, alça muscular, tireóide e esôfago
- T4b – espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais, artéria carótida

Subglote

- T1 – limitado à subglote
- T2 – extensão à(s) corda(s) vocal(is) com mobilidade normal ou diminuída
- T3 – fixação da corda vocal
- T4a – toda a cartilagem tireóide ou cricóide; traquéia, músculos profundos/extrínsecos da língua, alça muscular, tireóide e esôfago
- T4b – espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais, artéria carótida

Adenopatia cervical (N) – todas as localidades

- N0 – ausência de um linfonodo cervical clínico.
- N1 – homolateral, único ≤ 3 cm
 - N2a – homolateral, único > 3 cm e < 6 cm.
 - N2b – homolateral, múltiplo ≤ 6 cm
 - N2c – bilateral, contralateral, ≤ 6 cm
- N3 – > 6 cm

Metástase à distância (M) – todas as localidades

- Mx – a presença de metástase à distância não pode ser avaliada
- M0 – ausência de metástase à distância
- M1 – metástase à distância

APÊNDICE A: Classificação TNM Laringe

Grupamento por estádios

Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Estádio IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Estádio IVB	T4b	Qualquer N	M0
	Qualquer T	N3	M0
Estádio IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

APÊNDICE B: Carta de aprovação da Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao

Departamento de Cirurgia

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 198.11.04 tomou conhecimento da execução do Protocolo de Pesquisa nº 964/04, intitulado: "Análise do valor prognóstico da expressão da proteína P63 e de fatores clínicos e histológicos em carcinomas epidermóides da laringe".

No que tange a sua parte empírica, será desenvolvido no Instituto Nacional do Câncer (INCA-MS/RJ), tendo o comitê de Ética local aprovado o estudo em 22.09.04.

Pesquisador Responsável: Dr. Cláudio Roberto Cernea

Pesquisador Executante: Dr. Marcus Antônio de Mello Borba

CAPPesq, 19 de Novembro de 2004.

PROF. DR. EUGLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

APÊNDICE C: Ata de Exame de Qualificação

Comissão de Pós-Graduação

ATA DE EXAME DE QUALIFICAÇÃO

O(A) aluno (a) **MARCUS ANTONIO DE MELLO BORBA** - matrícula **5083573** - curso de **Doutorado** do Programa de Pós-Graduação em CLÍNICA CIRÚRGICA, submeteu-se ao exame de qualificação, perante a Comissão Examinadora, atendendo ao disposto no Regimento da Pós-Graduação da Universidade de São Paulo (Res.CoPGr.4678/99 - Capítulo III - Seção IV).

A Comissão Examinadora, indicada pela Comissão de Pós-Graduação da FMUSP, é de parecer que:

Ata de qualificação adequada e condizente com o assunto do trabalho. O candidato apresentou conhecimento sobre o assunto e o trabalho encontra-se em fase de desenvolvimento final, adequada para qualificação.

Membros Participantes da Comissão Examinadora
Assinale com um "X" - Aprovado (APR) ou Reprovado (REP) e assine

São Paulo, 18 de Julho de 2007

☒ APR () REP - *Fernando Walder* - Titular

☒ APR () REP - *Gilberto de Britto e Silva Filho* - Titular

() APR () REP - *Marcelo Doria Durazzo* - Titular

() APR () REP - *Donival de Carlucci Junior* - Suplente

☒ APR () REP - *Pedro Michaluart Junior* - Suplente