Raquel Ajub Moysés

**Análise clínica e molecular de pacientes não tabagistas e
não etilistas com carcinoma epidermóide
de cabeça e pescoço**

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

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Pedro Michaluart Junior

SÃO PAULO

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moysés, Raquel Ajub

Análise clínica e molecular de pacientes não tabagistas e não etilistas com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço / Raquel Ajub Moysés. -- São Paulo, 2011.

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

Orientador: Pedro Michaluart Júnior.

Descritores: 1.Neoplasias de cabeça e pescoço 2.Carcinoma de células escamosas
3.Tabagismo 4.Alcoolismo 5.Papillomavirus humano 6.Imunoistoquímica 7.Análise
de sobrevida

USP/FM/DBD-043/11

"Aquilo que Eu não sei, é a minha melhor parte"

Clarice Lispector

*Aos meus pais Jamil e Myrian
e minhas irmãs, Vivian e Nadia,
pelo que sou.*

*Ao meu esposo, Ronaldo,
minha inspiração para ser melhor.*

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, propósito maior desse estudo, que em meio ao sofrimento contribuem com a ciência, meu respeito e gratidão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Michaluart Jr, por ser exemplo de ética, honestidade, amizade e luta. A ele devo minhas melhores oportunidades científicas. Meu amor à pesquisa certamente inspira-se no seu exemplo.

À Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury, verdadeira co-orientadora dessa tese. Por sua amizade verdadeira, por sua paciência ao introduzir uma cirurgia à Patologia, e, sobretudo, seu talento ao fasciná-la.

Ao meu esposo, Dr. Ronaldo Frizzarini, por sua compreensão e incentivo inabaláveis, principalmente às inúmeras revisões dessa tese. Por seu amor, minha inspiração constante.

Ao Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, bem como às Dras. Flávia Caló Aquino Xavier e Camila Rodini, do Departamento de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, onde foram realizadas as reações para a pesquisa do HPV. Obrigada por seu rigor técnico e científico na obtenção e interpretação dos dados. Acima de tudo, obrigada por me tornar parte ativa desse processo.

Ao Prof. Dr. Victor Wünsch Filho, Professor Titular da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, bem como à sua equipe, a estatística Rossana Verónica Mendoza López e ao informata Anderson da Costa, pelos inúmeros levantamentos de dados e análises críticas dos mesmos.

À Dra. Sheila Carvalho, pelo auxílio na seleção dos blocos e orientação nas reações de imunoistoquímica para o p16, bem como seus comentários à qualificação dessa tese.

Ao Dr. Fábio Luiz de Menezes Montenegro, exemplo de competência, ética e altruísmo, por suas inestimáveis sugestões à qualificação e conclusão dessa tese.

À Dra. Elaine Stabenow, exemplo de cirurgiã, pesquisadora e mãe, por inspirar outras cirurgiãs como eu. Agradeço à sua ajuda na concepção desse estudo e na orientação na contagem digital de células imunomarcadas, bem como aos seus valiosos comentários à qualificação dessa tese.

Ao Dr. Gilberto de Castro Junior, oncologista e pesquisador exemplar, por suas preciosas sugestões à qualificação dessa tese.

Aos técnicos e biólogos: Douglas Moreira, Hermogenio Rafael de Oliveira, Juvani Lago, Elaine Keid Martins e Ana Paula Zocchi Frizzera pela ajuda na disponibilização e preparo das amostras desse estudo.

A Viviane Mazza, acadêmica da FMUSP, por sua ajuda na atualização dos dados de seguimento.

Ao Museu de Patologia da FMUSP, em especial ao Prof. Dr. Luiz Fernando "Burns" Ferraz da Silva e à funcionária Ana Luiza Barreiros Silveira, pela disponibilização do equipamento para digitalização das lâminas de microscopia.

A toda equipe do GENCAPO, essa tese é fruto do esforço diário de cada participante, na busca constante pela excelência dos seus dados. Em especial, agradeço à Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara, ilustre pesquisadora e líder unânime desse grupo, do qual me orgulho em participar.

À Dra. Marília D'Elboux Guimarães Brescia, pelo companheirismo verdadeiro e pelas inestimáveis contribuições a essa tese.

Ao Dr Alexandre Bezerra dos Santos, cuja tese também é fruto do GENCAPO, pela parceria amiga e ajuda na obtenção dos blocos de outros serviços.

Ao Dr. Rui Imamura, por seus valiosos comentários para esse estudo.

Ao Dr. Erich Sturgis, por sua atenção e sugestões ao estudo, durante minha permanência em Houston. Cirurgião e pesquisador exemplar em epidemiologia molecular, estuda pacientes não tabagistas e não etilistas com câncer de cabeça e pescoço no *MD Anderson Cancer Center*.

Aos membros atuais e do passado do LIM 28, pelo companheirismo diário e por tornar possível nossa participação no GENCAPO: Olinda Ramos, Cristiane Paraventi, Cirene Silva, Natalia Araújo, Julia Gallo, Daniela Pacheco, Wanessa Morone, Pedro Edson Guimarães, Marcelo Nascimento e Pâmela Soares.

A todos os atuais e ex-residentes da Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMUSP, Hospital Heliópolis, Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por sua colaboração diária no preenchimento dos formulários clínicos e de seguimento dos pacientes do GENCAPO.

Ao Dr. Caio Caliseo, preceptor da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, pelo suporte e amizade.

Às amigas Kariane Peixoto e Lica Arakawa-Sugueno, psicóloga e fonoaudióloga da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, que constantemente contribuem com o GENCAPO atualizando informações de seguimento.

Ao Prof. Alberto Rossetti Ferraz, então Professor Titular da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMUSP ao início dessa tese. Obrigada pela confiança ao me designar para nosso LIM. Esse trabalho é, certamente, fruto de suas decisões.

Ao Prof. Lenine Garcia Brandão, nosso atual Professor Titular, por sua confiança e seu apoio às atividades relacionadas ao LIM e ao GENCAPO.

Aos Profs. Drs. Gilberto Brito Silva, Cláudio Roberto Cernea, Marcos Roberto Tavares e Vergílius Araújo Filho, bem como aos demais médicos assistentes e colaboradores da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMUSP, por participarem da minha formação como cirurgiã.

Ao programa de pós graduação em Clínica Cirúrgica, em especial à secretária Sra Eliane Falconi Monico Gazetto, por seu suporte e dedicação incansáveis a todos os alunos da pós graduação.

Às Sras Francisca Catia de Oliveira, Ana Aparecida da Silva Justino Oliveira e Alessandra Marconato, secretárias da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMUSP, pela ajuda diária nos assuntos referentes ao LIM 28 e ao GENCAPO

Meu sincero agradecimento ao apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e do Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, pelo suporte aos projetos do GENCAPO.

Agradeço ainda ao CNPq, pelo suporte financeiro que propiciou a aquisição dos anticorpos FHIT, VEGF, EGFR, p53 e Ki-67, utilizados nesse estudo.

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1. CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO.....	6
3.1.1. EPIDEMIOLOGIA.....	6
3.1.2. FATORES DE RISCO.....	8
3.1.2.1. TABAGISMO.....	8
3.1.2.2. TABAGISMO PASSIVO.....	10
3.1.2.3. ETILISMO.....	10
3.1.2.4. HPV.....	12
3.1.2.5. HISTÓRIA FAMILIAR.....	19
3.1.2.6. RAÇA.....	20
3.1.2.7. DIETA.....	20
3.1.2.8. ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA (IMC).....	20
3.1.2.9. HIGIENE ORAL E CAUSAS ODONTOGÊNICAS.....	21
3.1.2.10. MATE.....	21
3.1.2.11. BETEL OU ARECA.....	22
3.1.2.12. CANNABIS.....	22
3.1.2.13. EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL.....	22
3.1.2.14. USO DE FORNO A LENHA.....	23
3.1.3. CARCINOGENESE E CANCERIZAÇÃO DE CAMPO.....	23
3.1.4. MARCADORES MOLECULARES.....	25
3.1.4.1. <i>FRAGILE HISTIDINE TRIAD</i> (FHIT).....	25
3.1.4.2. RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR).....	26
3.1.4.3. FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF).....	27
3.1.4.4. Ki-67	28
3.1.4.5. p53..	29
3.1.4.6. p16.....	31
3.2. CARCINOMA EPIDERMÓIDE EM NÃO TABAGISTAS E NÃO ETILISTAS.....	32
3.2.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	32
3.2.2. ASPECTOS CLÍNICOS.....	32
3.2.2.1. APRESENTAÇÃO CLÍNICA.....	32

3.2.2.2. CURSO DA DOENÇA.....	33
3.2.3. ASPECTOS MOLECULARES.....	33
4. MÉTODOS.....	36
4.1. SELEÇÃO DE PACIENTES.....	36
4.2. ÉTICA.....	37
4.3.COLETA DE DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS.....	37
4.4.COMPARAÇÃO DE PACIENTES POR ANÁLISE POR PAREAMENTO.....	38
4.5. ANÁLISE DE SOBREVIDA.....	40
4.6. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	40
4.7. IMUNOISTOQUÍMICA.....	41
4.7.1. ELABORAÇÃO DAS LÂMINAS.....	41
4.7.2. QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO.....	45
4.7.2.1. FHIT.....	45
4.7.2.2. EGFR.....	45
4.7.2.3. VEGF.....	46
4.7.2.4. Ki-67.....	46
4.7.2.5. p53.....	47
4.7.2.6. p16.....	48
4.8. PESQUISA DO GENE DO PAPILOMAVIRUS HUMANO.....	48
4.8.1. EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO PARAFINADO.....	49
4.8.2. PUREZA E QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	49
4.8.3. nPCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO HPV.....	50
4.8.4. PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE CONTROLE.....	51
4.8.5. IDENTIFICAÇÃO POR ELETROFORESE EM GEL AGAROSE 2%.....	51
4.8.6. TABULAÇÃO DOS DADOS.....	52
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5. RESULTADOS.....	55
5.1. DESCRIÇÃO DA AMOSTRA TOTAL DE PACIENTES.....	55
5.2. ANÁLISE POR GRUPOS CONFORME TABAGISMO E ETILISMO.....	58
5.3. ANÁLISE DOS PACIENTES NTNE.....	66
5.3.1. DETECÇÃO DE DNA DO HPV.....	66
5.3.2. ANÁLISE DE SOBREVIDA DOS PACIENTES NTNE.....	68
5.4. ANÁLISE POR PARES.....	77
5.4.1. SOBREVIDA.....	77
5.4.2. MARCADORES BIOLÓGICOS.....	78
5.4.2.1. EM AMOSTRAS TUMORAIS.....	78
5.4.2.1.1. FHIT.....	78
5.4.2.1.2. EGFR.....	80
5.4.2.1.3. VEGF.....	81
5.4.2.1.4. Ki-67.....	82
5.4.2.1.5. p53.....	83

5.4.2.1.6. p16.....	84
5.4.2.1.7. HPV.....	86
5.4.2.2. MARGENS.....	87
5.4.2.2.1. FHIT.....	87
5.4.2.2.2. EGFR.....	89
5.4.2.2.3. VEGF.....	91
5.4.2.2.4. Ki-67.....	92
5.4.2.2.5. p53.....	93
5.4.2.2.6. p16.....	95
6. DISCUSSÃO.....	98
6.1. NOVAS PERSPECTIVAS DE ESTUDOS.....	110
6.1.1. ANÁLISE DA RELAÇÃO DO ÁLCOOL COM METÁSTASES LINFÁTICAS.....	110
6.1.2. ANÁLISE DA RELAÇÃO DO TABACO COM GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL.....	111
6.1.3. ANÁLISE DA RELAÇÃO DO VOLUME TUMORAL COMO PREDITOR DE SOBREVIVÊNCIA.....	111
6.1.4. ANÁLISE DE OUTROS MARCADORES.....	111
6.1.5. APROFUNDAR A ANÁLISE DA MARCAÇÃO NUCLEAR DO FHIT E SUA RELAÇÃO COM INFLAMAÇÃO.....	111
6.1.6. ANÁLISE ESPECÍFICA DE PACIENTES IDOSAS COM TUMORES DE CAVIDADE ORAL.....	112
7. CONCLUSÕES.....	114
8. ANEXOS.....	116
9. REFERÊNCIAS.....	140
Apêndice	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

100x / 200x / 400x	Aumento de 100, 200 e 400 vezes
ADH	Álcool Desidrogenase
ALDH	Aldeído Desidrogenase
<i>apud</i>	Citado por
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP
CB	Camada Basal
CDK	Quinases Ciclina-Dependentes
CDKI	Inibidor de Quinases Ciclina-Dependentes
CECP	Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço
CECPs	Carcinomas Epidermóides de Cabeça e Pescoço
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO	Cavidade Oral
Ct	Citoplasma / Citoplasmática
CYP	Citocromo P450
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desorribonucleotídeo Trifosfatado
DP	Desvio Padrão
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
E1, E2, ...E7	Do inglês: <i>Early</i> (genes precoces do HPV)
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Epidérmico)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Receptor para o Fator de Crescimento Epidérmico)

<i>et al</i>	Do latin <i>et alii</i> (e outros)
EUROCARE	<i>European Cancer Registry-Based Study On Survival And Care Of Cancer Patients</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FHIT	<i>Fragile Histidine Triad</i>
FISH	<i>In Situ Hybridization, Fluorescence</i> (Hibridização In Situ Fluorescente)
G1	Fase G1, de <i>Gap 1</i> (intervalo entre fase M e S)
G2	Fase G2, de <i>Gap 2</i> (intervalo entre fase S e M)
GENCAPO	<i>Brazilian Head and Neck Genome Project</i>
GLOBOCAN	<i>Cancer Incidence and Mortality Worldwide</i>
GP	Glicoproteína
GST, GSTPi	Glutathiona-S-Transferase, Glutathiona-S-Transferase pi
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HF	Hipofaringe
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> (Papilomavírus Humano)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de Confiança
IMC, IMCs	Índice de Massa Corpórea, Índices de Massa Corpórea
IP	Índice de Positividade
L	Laringe
L1 e L2	Do inglês: <i>Late</i> (genes tardios do HPV)
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região Longa Controladora)
M	Fase M de Mitose
MAX	Máximo
mEH	Epóxido Hidrolase Microsomal
MIN	Mínimo

MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i> (Metaloproteinase de Matriz)
MT	Margem Total
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NCHS	<i>National Center for Health Statistics</i>
nPCR	<i>nested-PCR</i>
NTE	Não Tabagistas e Etilistas
NTNE	Não Tabagistas e Não Etilistas
Nu	Núcleo / Nuclear
OF	Orofaringe
PAH / PAHs	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i> - Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pRb	Proteína do retinoblastoma
Prof.	Professor
Profa.	Professora
Rb	Gene do retinoblastoma
RNA, mRNA	Ácido Ribonucleico, Ácido Ribonucleico Mensageiro
RR	Risco Relativo
S	Fase S, de síntese
SEADE	Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
Taq DNA polimerase	Polimerase de DNA assim denominada por ter sido identificada pela primeira vez na bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tabagistas e Etilistas
TGF α e β	<i>Transforming Growth Factor-α</i> e <i>-β</i> (fator de crescimento transformador- α e - β)

TNE	Tabagistas e Não Etilistas
TNM	Sistema TNM de Classificação de Tumores Malignos
UGT	Uridina 5'-diphosphate-glucuronosiltransferases
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular)
wt-p53	<i>Wild-Type P53</i> (Forma Selvagem do Gene p53)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
<	Menor que
=	Igual a
®	Marca Registrada
°C	graus celsius
µL	microlitro
µm	micrômetro
BaP	benzo[a]pyreno
DAB	3,3 Diaminobenzidine
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl	Ácido clorídrico
KCl	cloreto de potássio
kDa	kilodaltons
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	milimol
ng	nanograma
p	Nível descritivo
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato de sódio
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
UI	unidades internacionais
κ	Kappa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estimativa da incidência por 100.000 habitantes de câncer de cavidade oral e laringe no Brasil, em países em desenvolvimento, em países desenvolvidos e no mundo, segundo gênero, 2008.....	7
Tabela 2.	Estimativa da mortalidade por 100.000 habitantes por câncer de cavidade oral e laringe no Brasil, em países em desenvolvimento, em países desenvolvidos e no mundo, segundo gênero, 2008.....	7
Tabela 3.	Comparação entre métodos de detecção do HPV em relação ao padrão ouro.....	18
Tabela 4.	Critérios de pareamento entre NTNE e TE.....	39
Tabela 5.	Características sócio-demográficas da amostra global de pacientes.....	55
Tabela 6.	Distribuição conforme hábitos na amostra global de pacientes.....	56
Tabela 7.	Características clínicas da amostra global de pacientes.....	56
Tabela 8.	Características patológicas da amostra global de pacientes.....	57
Tabela 9.	Comparação entre os grupos classificados segundo consumo de tabaco e álcool para as variáveis sócio-demográficas.....	59
Tabela 10.	Comparação entre os grupos classificados segundo consumo de tabaco e álcool para as variáveis clínicas.....	61
Tabela 11.	Comparação entre os grupos classificados segundo consumo de tabaco e álcool para as variáveis patológicas.....	64
Tabela 12.	Probabilidade de sobrevida para os pacientes NTNE segundo as variáveis demográficas, clínicas e patológicas.....	68
Tabela 13.	Probabilidade de sobrevida para os pacientes NTNE segundo as variáveis categóricas moleculares.....	69
Tabela 14.	Regressão de Cox univariada para predição de risco de óbito para as variáveis demográficas, clínicas e patológicas em pacientes NTNE.....	75
Tabela 15.	Regressão de Cox univariada para predição de risco de óbito para as variáveis moleculares em pacientes NTNE.....	76
Tabela 16.	Tábua de vida para os pacientes NTNE e TE.....	77
Tabela 17.	Análise da marcação nuclear e citoplasmática pelo FHIT em amostras	

	tumorais de pacientes pareados NTNE- TE.....	80
Tabela 18.	Análise da marcação para EGFR em amostras tumorais de pacientes NTNE- TE.....	81
Tabela 19.	Análise da marcação para VEGF em amostras tumorais de pacientes NTNE- TE.....	82
Tabela 20.	Análise da marcação pelo Ki-67 em amostras tumorais de pacientes NTNE- TE.....	83
Tabela 21.	Análise da marcação pelo p53 em amostras tumorais de pacientes NTNE- TE.....	84
Tabela 22.	Análise da marcação pelo p16 pelos dois métodos escolhidos, em amostras tumorais de pacientes NTNE- TE.....	85
Tabela 23.	Análise da detecção do DNA do HPV em amostras de pacientes NTNE- TE.....	87
Tabela 24.	Análise da marcação nuclear e citoplasmática pelo FHIT em amostras não tumorais de pacientes NTNE- TE.....	89
Tabela 25.	Análise da marcação pelo EGFR em amostras não tumorais de pacientes NTNE- TE.....	90
Tabela 26.	Análise da marcação para VEGF em amostras não tumorais de pacientes NTNE- TE.....	92
Tabela 27.	Análise da marcação pelo Ki-67 em amostras não tumorais de pacientes NTNE- TE.....	93
Tabela 28.	Análise da marcação pelo p53 em amostras não tumorais de pacientes NTNE- TE....	95
Tabela 29.	Análise da marcação pelo p16 pelos dois métodos escolhidos, em amostras não tumorais de pacientes NTNE- TE.....	96
Tabela 30.	Crêterios definidores de tabagismo e etilismo rotineiramente utilizados.....	100
Tabela 31.	Métodos de quantificação da imunomarcação pelo p16.....	133
Tabela 32.	Relação da positividade pelo HPV e imunomarcação pelo p16.....	135
Tabela 33.	Pacientes NTNE não passíveis de pareamento.....	138

RESUMO

Moyses RA. *Análise clínica e molecular de pacientes não tabagistas e não etilistas com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 155p.

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) é um problema de saúde relevante no mundo, por sua prevalência e agressividade. Os papéis do tabaco e do álcool estão bem definidos na sua etiologia, mas uma minoria crescente dos pacientes acometidos pela doença não é tabagista ou etilista. A infecção pelo papilomavirus humano (HPV) parece ser responsável por parte desses casos. Sugere-se que o CECP que acomete pacientes não tabagistas e não etilistas (NTNE) tenha processos carcinogênicos e evolução clínica distintos daqueles de pacientes tabagistas e etilistas (TE). Os objetivos desse estudo foram verificar se os aspectos demográficos, clínicos e histopatológicos de pacientes com CECP são diferentes conforme os hábitos tabágico e etílico; verificar se os CECPs de pacientes NTNE e TE diferem em relação à positividade para HPV; e comparar a sobrevida específica pela doença e a expressão de marcadores biológicos em amostras tumorais e de mucosa normal do trato aerodigestório de pacientes NTNE e de pacientes TE. Para tanto, realizamos estudo transversal de pacientes com carcinomas epidermóides de cavidade oral (exceto lábio), orofaringe, laringe e hipofaringe, prospectivamente incluídos em um banco de tumores de CECP de 2001 a 2009, pelo grupo de pesquisa multi-institucional GENCAPO. Seus dados demográficos, clínicos e patológicos foram analisados conforme os hábitos de tabagismo e etilismo. Através de análise de pareamento, pacientes NTNE e TE foram comparados em relação à sobrevida, à positividade para o HPV no tumor por reação em cadeia da polimerase (PCR) e aos marcadores imunohistoquímicos p53, FHIT, Ki-67, VEGF, EGFR e p16 tanto em amostras tumorais como de epitélio não tumoral. Dos 1633 pacientes selecionados, 80 eram NTNE (4,9%), 1374 TE (84,1%), 140 tabagistas atuais ou no passado mas não etilistas (TNE:8,6%) e 39 apenas etilistas atuais ou no passado, mas não tabagistas (NTE:2,4%). O grupo de pacientes NTNE constituiu-se principalmente por mulheres, preferencialmente idosas, com tumores da cavidade oral, diferentemente de pacientes tabagistas e/ou etilistas ($p<0,001$). Considerando os diferentes padrões de hábitos, pacientes TE eram geralmente mais jovens

($p < 0,001$), pacientes TNE apresentaram proporcionalmente mais tumores de laringe ($p < 0,001$) e pacientes NTNE apresentaram menor número de parentes de primeiro grau tabagistas ($p < 0,001$). Observou-se um provável efeito do álcool na ocorrência de metástases ganglionares ($p < 0,001$), enquanto o tabaco pareceu relacionar-se a menor grau de diferenciação tumoral à histologia e a menores índices de massa corpórea ($p < 0,001$). Detectou-se a presença de material genético do HPV em 32,8% dos tumores de pacientes NTNE. Desses tumores positivos para o HPV, metade apresentou também hiperexpressão pelo p16. Foi observado menor risco de óbito pela doença em pacientes NTNE quando apresentavam expressão tumoral intensa do p16 ($p = 0,011$ / RR = 0,07; IC 0,01-0,55) e menor sobrevida se apresentavam marcação pelo FHIT em camada basal de margem não tumoral ($p = 0,031$). Ao comparar pacientes NTNE e TE, não se observaram diferenças na sobrevida específica pela doença ou na positividade para o HPV de forma independente de sexo, idade, sítio tumoral, grau de diferenciação, variante morfológica, estágio T e presença de metástases linfonodais. Pacientes NTNE apresentaram marcação nuclear pelo FHIT em camada basal menos frequentemente do que pacientes TE ($p = 0,021$).

Descritores: Neoplasias de Cabeça e Pescoço; Carcinoma de Células Escamosas; Tabagismo
Alcoolismo; Papillomavirus Humano; Imunoistoquímica; Análise de Sobrevida

SUMMARY

Moyses RA. *Clinical and molecular analysis of non smoking and non drinking patients with head and neck squamous cell carcinoma [thesis]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 155p.

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a major health problem worldwide, due to its prevalence and aggressiveness. The role of tobacco and alcohol in its etiology is well established; however, a growing minority of patients with HNSCC neither smokes nor consumes alcohol. Human Papillomavirus (HPV) infection seems to be responsible for some of these cases. It is suggested that HNSCC affecting non smoking and non drinking (NSND) patients has different carcinogenesis and outcomes than those in smoking and drinking (SD) subjects. The objectives of this study were to test if demographic, clinical and pathological aspects of patients with HNSCC vary according to smoking and drinking habits; to test if HNSCC in NSND and SD patients differ in terms of HPV positivity; and to compare NSND and SD patients with HNSCC according to survival and biomarkers in tumor and mucosal samples of the aerodigestive tract. We conducted a cross-sectional study of patients with oral cavity (lips excluded), oropharynx, larynx and hypopharynx tumors prospectively included in a multi-institutional HNSCC tumor bank - GENCAPO, from January 2001 to February 2009. Demographic, clinical and pathological data were analyzed in regards of smoking and drinking habits. Using matched-pair analysis, we compared NSND and SD patients in relation to disease-free survival, HPV positivity through polymerase chain reaction (PCR) and Immunohistochemical staining of p53, FHIT, Ki-67, VEGF, EGFR and p16 biomarkers in tumor and mucosal samples. From 1633 patients, 80 were NSND (4,9%), 1374 SD (84,1%), 140 current or past smokers, but non drinkers (SND:8,6%) and 39 current or past drinkers, but non smokers (NSD:2,4%). NSND patients were most frequently women, remarkably elderly, with oral cavity cancers more commonly than the other groups ($p<0,001$). Comparing to the other groups, SD patients were younger ($p<0,001$); SND patients were more frequently affected by larynx tumors

($p < 0,001$) and NSND patients had fewer smoking first degree relatives ($p < 0,001$). We observed that alcohol may influence the presence on node metastasis ($p < 0,001$) whereas tobacco may be related to less differentiated tumors and lower body mass indexes ($p < 0,001$). We found HPV DNA in 32,8% of tumors of NSND subjects. Half of the HPV positive tumors were also positive for p16 staining. A lower risk of death from disease was observed among NSND patients with intense p16 staining ($p = 0,011$ / $RR = 0,07$; $CI\ 0,01-0,55$) and lower survival rates in patients with positive nuclear staining for FHIT at the basal layer of mucosal epithelium ($p = 0,031$). We found no differences in disease-free survival of NSND and SD patients in an independent manner of gender, age, tumor site, differentiation grade at histology, pathological variants, T stage and the presence of node metastasis. NSND patients presented less frequently with nuclear staining for FHIT at the basal layer of mucosal epithelium than SD patients ($p = 0,021$).

Descriptors: Head and Neck Neoplasms; Carcinoma, Squamous Cell; Smoking; Alcoholism; Human papillomavirus; Immunohistochemistry; Survival Analysis

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Entende-se por carcinoma epidermóide do trato aerodigestório de cabeça e pescoço (CECP) os tumores de origem epitelial que se originam nos seios paranasais, cavidade nasal, cavidade oral, faringe e laringe. A incidência mundial é estimada em cerca de 640 mil casos que acarretam aproximadamente 350 mil mortes por ano[1]. Os fatores de risco mais importantes para essas neoplasias são o tabagismo e o etilismo[2], contudo, em uma pequena fração dos casos, esses hábitos não estão presentes[3]. A infecção pelo papilomavirus humano (*human papillomavirus* - HPV) parece ser responsável por parte desses casos[4, 5], mas outros fatores ainda permanecem desconhecidos. Sugere-se que a incidência de CECPs relacionados ao HPV tem aumentado nas últimas décadas[6].

Pacientes com CECP são frequentemente acometidos por mais de um tumor no trato aerodigestório, que podem ser sincrônicos ou metacrônicos – os ditos segundos tumores primários. Esse fato pode ser explicado pela teoria de cancerização de campo. Proposto por Slaughter *et al.* em 1953[7], antes mesmo do conhecimento dos efeitos deletérios do tabaco e álcool sobre a mucosa do trato aerodigestório, esse conceito é ainda hoje amplamente aceito. Consiste no processo pelo qual uma área de mucosa é condicionada por um carcinógeno e, se a exposição for longa e intensa o suficiente, produzirá alterações irreversíveis em grupos de células dessa área, de forma que a transformação em câncer se torna inevitável. Assim, o estudo do epitélio não maligno pode prover informações importantes sobre o processo de carcinogênese desses pacientes.

Desde então, muito se aprendeu a respeito dos processos pelos quais uma célula normal se transforma em uma célula cancerosa[8]. Em CECP, diversos marcadores envolvidos em múltiplos estágios do desenvolvimento tumoral já foram e continuam sendo estudados[9]. Alguns marcadores, contudo, são indicativos de certas exposições ou mecanismos de carcinogênese[10-12]. A imunoistoquímica é o método mais utilizado para o estudo desses marcadores e fornece informações valiosas a respeito de disposição arquitetural nos tecidos.

Sugere-se, contudo, que o CECP que acomete pacientes não tabagistas e não etilistas (NTNE) tenha processos carcinogênicos e evolução clínica distintos em relação àqueles de pacientes tabagistas e etilistas (TE), em especial quando relacionados a fatores de risco

como o HPV[10]. Estudos com essa finalidade costumam ser limitados por número reduzido de casos – dada a pequena proporção de pacientes NTNE entre aqueles com CECP – e são privilégio de grandes instituições, consórcios de grupos de estudo ou bases de bancos de dados[3, 10, 13-17].

Nossa hipótese é de que pacientes NTNE com CECP apresentam perfis clínicos, histopatológicos e moleculares distintos em relação a pacientes TE e que a infecção por HPV é um fator associado ao CECP mais importante em pacientes NTNE. Evoluções clínicas eventualmente distintas podem ser decorrentes dessas diferenças.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- 2.1. Verificar se os aspectos demográficos, clínicos e histopatológicos de pacientes com CECP são diferentes conforme os hábitos tabágico e etílico.
- 2.2. Verificar se os CECPs de pacientes NTNE e TE diferem em relação à positividade para HPV.
- 2.3. Comparar a sobrevida específica pela doença e a expressão dos marcadores imunoistoquímicos p53, FHIT, Ki-67, VEGF, EGFR e p16 em amostras tumorais e de mucosa normal do trato aerodigestório de pacientes NTNE e de pacientes TE.

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

3.1.1. EPIDEMIOLOGIA

O câncer do trato aerodigestório de cabeça e pescoço é o sexto tumor mais frequente no mundo[2]. O Carcinoma Epidermóide constitui cerca de 90% desses tumores[18] e acomete o epitélio de revestimento dos seios paranasais, cavidade nasal, cavidade oral, faringe e laringe.

Os dados mais recentes disponíveis acerca da incidência mundial desses tumores são os do banco de dados GLOBOCAN 2008, construído a partir de informações advindas do Grupo de Epidemiologia Descritiva do IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer[19]. A incidência mundial anual, estimada para o ano de 2008, de cânceres da cavidade oral, laringe, nasofaringe, orofaringe e hipofaringe em ambos os gêneros foi cerca de 635 mil casos novos. Para o mesmo período, estimaram-se cerca de 357 mil mortes em todo o mundo por esses tumores. Para o Brasil, o GLOBOCAN estimou ao redor de 21 mil casos novos e 11 mil mortes para 2008. Em relação aos sítios anatômicos mais comuns na cabeça e pescoço, as taxas de incidência e de mortalidade por câncer, para o Brasil, países desenvolvidos, países em desenvolvimento e para o mundo, segundo gênero, encontram-se nas **tabelas 1 e 2.**

Tabela 1 - Estimativa da incidência por 100.000 habitantes de câncer de cavidade oral e laringe no Brasil, em países em desenvolvimento, em países desenvolvidos e no mundo, segundo gênero, 2008.

		Mundo	Brasil	Países desenvolvidos	Países em desenvolvimento
		W (Ordem) [¶]	W (Ordem) [¶]	W (Ordem) [¶]	W (Ordem) [¶]
Homens	Cavidade oral e lábio [*]	5,3 (10)	7,6 (6)	6,9 (13)	4,6 (9)
	Laringe	4,1 (13)	7,2 (7)	5,5 (14)	3,5 (12)
Mulheres	Cavidade oral e lábio [*]	2,5 (17)	2,3 (15)	2,4 (19)	2,6 (14)
	Laringe	0,6 (24)	1,1 (21)	0,6 (23)	
Ambos	Cavidade oral e lábio [*]	3,9 (15)	4,8 (9)	4,5 (16)	3,6 (11)
	Laringe	2,3 (20)	3,9 (14)	2,9 (22)	2,0 (18)

[¶] W: Taxa padronizada por idade; Ordem: posição no total dos casos de câncer excluindo os carcinomas de pele. ^{*} Exceto pele de lábio. FONTE: GLOBOCAN[19]

Tabela 2 - Estimativa da mortalidade por 100.000 habitantes por câncer de cavidade oral e laringe no Brasil, em países em desenvolvimento, em países desenvolvidos e no mundo, segundo gênero, 2008.

		Mundo	Brasil	Países desenvolvidos	Países em desenvolvimento
		W (Ordem) [¶]	W (Ordem) [¶]	W (Ordem) [¶]	W (Ordem) [¶]
Homens	Cavidade oral e lábio [*]	2,6 (12)	3,3 (12)	2,3 (14)	2,7 (10)
	Laringe	2,2 (15)	4,1 (10)	2,4 (13)	2,1 (14)
Mulheres	Cavidade oral e lábio [*]	1,2 (15)	0,8 (17)	0,6 (19)	1,5 (15)
	Laringe	0,3 (24)	0,4 (22)	0,2 (23)	0,4 (23)
Ambos	Cavidade oral e lábio [*]	1,9 (15)	2,0 (14)	1,4 (20)	2,1 (13)
	Laringe	1,2 (19)	2,1 (13)	1,2 (21)	1,2 (18)

[¶] W: Taxa padronizada por idade; Ordem: posição no total dos casos de câncer excluindo os carcinomas de pele. ^{*} Exceto pele de lábio FONTE: GLOBOCAN [19]

Fontes de dados locais de diferentes países fornecem informações mais recentes. Nos Estados Unidos, a Sociedade Americana de Câncer – *American Cancer Society* – baseada nos dados do *National Center for Health Statistics* (NCHS) e da base de dados *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER) fornece anualmente estimativas de incidência e mortalidade por câncer, bem como compila dados de incidência, mortalidade e sobrevivência de anos anteriores[20]. Para 2010 nos Estados Unidos, foram estimados cerca de 49 mil novos casos e 11 mil mortes.

A análise de dados de incidência e mortalidade por CECP no Brasil é dificultada pela dimensão do país e por deficiências nos sistemas de notificações desses dados. São Paulo tem as maiores taxas de mortalidade por tumores de cabeça e pescoço no Brasil[21].

3.1.2.FATORES DE RISCO

3.1.2.1. TABAGISMO

Desde a invenção da primeira máquina para enrolar cigarros por James Bonsack em 1881, o consumo total de cigarros no mundo vem crescendo de forma constante. Na década de 60, as consequências para a saúde se tornaram incontestáveis. Desde então, em alguns países o consumo de tabaco vem desacelerando ou até decrescendo. Contudo, no mundo, cada vez mais pessoas fumam, devido ao aumento da população mundial[22]. No Brasil, a prevalência do tabagismo caiu de 35 por cento em 1989 para 16 por cento em 2006. Nesse ano, aproximadamente 20 por cento dos homens e 13 por cento das mulheres fumavam. O tabagismo mostra-se consistentemente mais concentrado entre os grupos com menores taxas de escolaridade da população brasileira, que geralmente são também os mais pobres[23].

O tabaco é considerado o único bem de consumo capaz de causar a morte de mais da metade de seus consumidores regulares[22]. Seu efeito devastador é resultado da união de dois fatores: a nicotina, com grande capacidade de indução de dependência, e seus inúmeros compostos carcinógenos. Mais de 60 carcinógenos já foram detectados na fumaça inalada do tabaco e muitos destes também detectados na fumaça eliminada pelo cigarro para o meio ambiente e no fumo de mascar[24]. Dentre esses carcinógenos, destacam-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – PAHs), as nitrosaminas e as aminas

aromáticas, por serem considerados carcinógenos potentes. O benzo [a]pyreno (BaP) é um PAH já extensamente pesquisado, por ter sido o primeiro carcinógeno detectado no tabaco. Desde sua identificação por Cooper *et al.* em 1954¹ *apud* Hecht [24], inúmeros estudos já foram realizados demonstrando seu papel como carcinógeno e sua potencial relação causal com mutações no gene p53 em câncer de pulmão[25].

No que se refere ao CECP, o papel do tabaco é incontestável[26]. Metanálise realizada em 2008 demonstrou que tabagistas apresentam riscos aumentados para câncer de cavidade oral (RR=3,43 – IC: 2,37-4,94), seios paranasais e nasofaringe (RR=1,96 – IC: 1,31-2,91), faringe (RR=6,76 – IC: 2,86-15,98) e laringe (RR=6,98 – IC: 3,14-15,52)[27].

Sabe-se que quanto maior a quantidade de cigarros, mas, principalmente, a duração do hábito, maior o risco de desenvolvimento de CECP[28]. Quando vem acompanhado pelo etilismo, os efeitos sobre o risco são mais que multiplicativos[29, 30]. Considerando-se todos os sítios, indivíduos não tabagistas mas etilistas (NTE) apresentam risco discretamente aumentado (OR=1,06 – IC: 0,88-1,28); indivíduos tabagistas mas não etilistas (TNE) apresentam risco mais consistente (OR= 2,37 – IC: 1,66-3,39), enquanto indivíduos TE apresentam risco significativamente maior (OR: 5,73 – IC: 3,62-9,06). Esse efeito parece ser ainda mais expressivo para tumores de laringe e em mulheres[29].

Estudos sugerem que polimorfismos genéticos que alteram a função das enzimas envolvidas na detoxificação de carcinógenos do tabaco, como as epóxido hidrolases microsomais (mEH), glutathiona-S-transferases (GST), o citocromo P450 (CYP) e a uridina 5'-diphosphate-glucuronosiltransferases (UGT), podem aumentar o risco de CECP, porém os achados ainda são pouco consistentes[31, 32].

¹ Cooper, R. L., Lindsey, A. J. & Waller, R. E. The presence of 3,4-benzopyrene in cigarette smoke. Chem. Ind. 46, 1418 (1954).

3.1.2.2. TABAGISMO PASSIVO

Tabagismo passivo ou a poluição por fumaça de tabaco diz respeito à exposição ambiental aos agentes carcinógenos e outros agentes tóxicos do tabaco. Inclui tanto a fumaça exalada pelo fumante, quanto a liberada pelo cigarro espontaneamente[33]. A composição da fumaça do tabaco inalada involuntariamente varia quantitativamente e depende do padrão de fumo do tabagista e da composição do cigarro, cachimbo, etc[26]. A exposição residencial ao cônjuge tabagista e aquela no ambiente de trabalho são as mais comuns, porém outras exposições, como na infância ou socialmente, não podem ser ignoradas[34]. Os critérios definidores de tabagismo passivo variam, acredita-se que uma exposição superior a uma hora por dia, por mais do que um ano, em casa ou no trabalho, já é significativa[33]. A evidência de marcadores de carcinógenos do tabaco em amostras biológicas de fumantes passivos sugere que esses carcinógenos são metabolizados pelos mesmos, o que potencialmente aumentaria o risco para câncer[26]. Há evidências suficientes denexo causal entre tabagismo passivo e câncer de pulmão[26, 35]. Para o CECP, essa relação é mais discreta e parece ser verdadeira apenas para exposições por longos períodos, superiores a 15 anos[33].

3.1.2.3. ETILISMO

Apesar do consumo leve a moderado de álcool parecer ser benéfico sob o ponto de vista cardiovascular, seu uso em longo prazo e, principalmente, seu abuso podem resultar em riscos à saúde física e psicológica[36]. Enquanto a prevalência do tabagismo diminui, aumenta o etilismo, principalmente entre mulheres[37].

O mecanismo carcinogênico do álcool permanece desconhecido, mas parece propiciar tanto um efeito agressor direto na mucosa, como indireto, ao diluir e, dessa forma, potencializar a ação de outros carcinógenos como

os do tabaco. As deficiências nutricionais e imunológicas de seu uso crônico também podem desempenhar papel na carcinogênese[38]. As duas principais enzimas de metabolização do álcool em humanos são a álcool desidrogenase (ADH) e a aldeído desidrogenase (ALDH)[39]. A **Figura 1** mostra a ação dessas enzimas na metabolização hepática do etanol, que é o álcool presente em bebidas.

Figura 1: representação da ação das enzimas de metabolização do álcool. Adaptado de *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (<http://www.niaaa.nih.gov>). ADH: álcool desidrogenase; ALDH: aldeído desidrogenase; CYP: citocromo P450; H_2O : água; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo; O_2 : oxigênio.

As enzimas catalase e citocromo P450 (CYP) 2E1 também convertem etanol em acetaldeído. Contudo o CYP 2E1 torna-se ativo apenas após ingestões de grandes quantidades de álcool[36].

O acetaldeído é um gerador importante de radicais livres – que prejudicam a homeostase anti-oxidante e levam a danos teciduais – além de ser um conhecido carcinógeno[36]. Sugere-se que pacientes com alterações genéticas que incorrem em menor atividade da ALDH, com conseqüente acúmulo de acetaldeído, sejam mais propensos a desenvolverem câncer do trato aerodigestório[38]. Essas alterações são mais frequentes em pacientes orientais, e a prevalência dessas alterações chega a 45% em populações asiáticas[39].

Isoladamente, o etilismo aumenta significativamente o risco de CECP quando seu consumo é mais intenso[40], acima de três doses ao dia, mas

há dúvidas se esse risco é proporcional à duração do hábito[41]. Os sítios aparentemente mais susceptíveis são principalmente a cavidade oral e a faringe. A laringe é menos acometida, por estar mais intensamente exposta aos carcinógenos do tabaco que à ação direta do álcool[41-43], mas há evidências de que o álcool também aumenta o risco de câncer nesse sítio[44]. Contudo, mulheres etilistas moderadas parecem ter maior risco para carcinomas epidermóides de laringe do que de cavidade oral e faringe[45].

No que se refere aos diferentes tipos de bebidas, quando cerveja, destilados e vinho são estudados, os dois primeiros apresentam riscos maiores que o último para CECP. Aparentemente, o consumo de vinho só aumenta o risco de CECP quando é excessivo[43].

O álcool e o tabaco, associados ou não, são responsáveis por aproximadamente 51% dos tumores de cabeça e pescoço nos Estados Unidos, 84% na Europa e 83% na América Latina[29].

3.1.2.4. HPV

A infecção por HPV é a doença sexualmente transmissível mais comum no mundo. Clinicamente, pode ser assintomática ou pode acarretar na formação de tumores benignos e malignos da mucosa anal, genital, de trato aerodigestório alto ou conjuntival. Estima-se que a infecção por HPV seja responsável por cerca de 6% dos cânceres no mundo, em sua maioria anogenitais[46]. É inequívoca a relação de subtipos do HPV com o câncer de colo uterino.

Além do câncer de colo de útero, há evidências da relação de alguns tumores de cabeça e pescoço com o HPV. Desde a década de 40, alguns autores já relatavam a conversão de papilomas laríngeos em carcinomas epidermóides[47]. Em 1975, já se observava um maior risco de câncer de cavidade oral em mulheres com câncer de colo uterino[48]. Posteriormente,

a demonstração de antígenos do HPV em lesões pré-malignas da cavidade oral e orofaringe forneceu os indícios para o possível papel do HPV em tumores dessas localizações[49]. Foi em 1985, contudo, que as primeiras demonstrações da relação inequívoca do HPV com alguns tumores da cavidade oral e orofaringe foram feitas[50, 51]. Desde então, diversos outros estudos corroboraram essa relação[52-56]. Contudo, a frequência de identificação do vírus entre as séries chega a variar de 9 a 74%[57]. Essa variação pode ocorrer por diferenças nos métodos de detecção, tipos de vírus identificados, tipo de material usado, sítios analisados e diferenças geográficas e culturais. Uma estimativa conservadora, que deve estar próxima da realidade, é de que 25 a 30% dos cânceres de orofaringe sejam causados pelo HPV[47]. As criptas das tonsilas parecem ser particularmente susceptíveis à transformação pelo HPV, de forma análoga à zona de transformação no colo uterino, onde a maioria dos tumores de cérvix se origina[58]. O HPV16 é o tipo encontrado em 90% dos CECPs positivos para o HPV, seguido pelo HPV 18[59].

Uma análise dos dados incluídos no registro americano SEER demonstrou que a proporção de tumores da cabeça e pescoço potencialmente relacionados ao HPV – ou seja, aqueles que acometem as sub-regiões da orofaringe – têm aumentado significativamente nos últimos anos[6]. Isso é devido ao aumento da incidência desses tumores principalmente em indivíduos brancos, com idade entre 20 e 44 anos[60]. Achados semelhantes foram encontrados entre pacientes europeus, pelo grupo EUROCORE, estudando quase 30 mil pacientes de 15 centros[61]. Esse aumento pode ser relacionado a mudanças de comportamento sexual com comportamentos de maior risco para transmissão do HPV, particularmente em indivíduos jovens[62]. Observa-se risco aumentado de câncer de orofaringe em indivíduos com número elevado de parceiros tanto de sexo vaginal como de sexo oral[63]. Apesar do contato oral-genital ser o provável responsável pela transmissão do HPV, não se pode excluir a transmissão oral-oral ou por outros meios. Não são raros os pacientes com

CECP positivo para HPV que relatam nunca terem praticado sexo oral[64]. Além de elevado número de parceiros, outro provável fator de risco para a ocorrência de CECP relacionado ao HPV é o uso de cannabis[65].

Papilomavírus são pequenos DNA vírus, não encapsulados, com afinidade por tecidos epiteliais, presentes em pele e mucosa de diversos animais. Em humanos, mais de 200 subtipos já foram descritos[58, 66]. Cerca de 30 subtipos de papilomavírus são mucosos e dividem-se, de acordo com sua oncogenicidade, em baixo risco (HPVs 6, 11, 42, 43 e 44) e alto risco (HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 e 56)[67]. O genoma viral é uma molécula de DNA com 8000 pares de bases (pb) que codificam até dez proteínas[58]. **(Figura 2)**

Figura 2: Genoma do HPV. O DNA circular (acima) contém genes precoces (de *Early* – E1, E2, E4 a E7), envolvidos na replicação do DNA, regulação da transcrição e transformação celular; os genes tardios (de *Late* – L1 e L2) que codificam proteínas do capsídeo viral e uma região longa controladora (de *long control region* – LCR). Integração do DNA viral ao DNA hospedeiro (meio), a região reguladora E2 é rompida (seta), deixando os genes E6 e E7 desregulados. Ação das oncoproteínas E6 e E7 sobre p53, pRb e p16 (abaixo). Adaptado de Goodman [68] e Hafkamp *et al*[69].

A infecção dos queratinócitos da camada basal – as únicas células em divisão do epitélio - dá-se geralmente através de feridas ou abrasão[70]. O processo de entrada na célula ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que o DNA viral se mantém no núcleo das células basais infectadas como um plasmídeo em baixo número de cópias. As células epiteliais costumam se diferenciar à medida que migram da membrana basal para a superfície e o DNA do HPV se replica para um alto número de cópias apenas nas células já diferenciadas, na superfície do epitélio[58]. Assim como em outros DNA vírus, a replicação do genoma viral é dependente da maquinaria de replicação da célula hospedeira. Apesar das células já diferenciadas normalmente não serem capazes de suportar a síntese de DNA, ocorre a replicação do DNA viral nessas células, graças à proteína E7 codificada pelo vírus, que cria um estado propício à replicação do DNA[71]. A oncoproteína E6, também codificada pelo vírus, liga-se à proteína de supressão tumoral p53 e a induz à degradação[72, 73], enquanto a E7 liga-se à proteína de supressão tumoral do retinoblastoma (pRb) e a outras proteínas a ela relacionadas, desestabilizando-as[74]. As oncoproteínas E6 e E7 também interagem com outros alvos celulares e a somatória desses efeitos é a progressão do ciclo celular e a replicação viral em queratinócitos diferenciados[58]. A inativação das vias das proteínas supressoras tumorais p53 e pRb pelas oncoproteínas virais prescinde da mutação dos genes p53 e Rb. Dessa forma, os tumores induzidos pelo HPV associam-se às formas selvagens (não mutadas) dos genes p53 e Rb, mas com baixos níveis das suas respectivas proteínas, que estão inativadas[58]. O gene supressor tumoral p16 também está regulado para cima nesses casos, pois ele é normalmente regulado negativamente pelo pRb[75]. Não por acaso, a hiperexpressão do gene p16 tem sido constantemente observada em cânceres relacionados ao HPV[76].

Sabe-se que apenas uma pequena parcela dos indivíduos infectados por HPV de alto risco desenvolverão câncer, o que em geral ocorrerá anos

após a infecção[58]. Pacientes com CECP relacionados ao HPV tendem a ser caucasianos e mais jovens, em média cinco anos, do que pacientes com tumores não relacionados ao HPV. Em relação ao gênero, homens e mulheres parecem ser igualmente acometidos[77], porém são descritas diferenças em séries de casos americanas com predomínio no gênero masculino[5]. Indivíduos imunocomprometidos, com antecedente de tumores anogenitais relacionados ao HPV e parceiros de mulheres com câncer de colo uterino são especialmente propensos a desenvolver tumores de orofaringe[78-81]. Histologicamente, costumam ser pouco diferenciados, sem significativa queratinização, com infiltrado linfocitário, e frequentemente basalóides[5, 77]. Tendem a se apresentar em estádios mais avançados, com frequentes metástases linfonodais – em geral císticas[82] – mesmo em tumores primários iniciais.[64] No Brasil, foram relatadas prevalências de infecção pelo HPV de 14% na orofaringe[83] e 10% na cavidade oral[84] de indivíduos sem câncer. Em CECP, foram descritas prevalências de infecção pelo HPV que variaram de 17 a 74% na cavidade oral e ao redor de 37% na laringe[85-88].

A detecção do HPV tem importância diagnóstica, terapêutica e prognóstica. Em relação ao diagnóstico, poderá ser utilizada para identificação de grupos de risco e rastreamento para diagnóstico precoce[89]. Além disso, pode auxiliar na identificação de tumores metastáticos com sítio primário oculto, uma vez que a positividade para o HPV em metástases sugere fortemente uma localização primária em orofaringe[90]. Alguns estudos sugerem que a infecção pelo HPV pode ser preditora de resposta a determinados esquemas terapêuticos[91] e que a permanência do vírus na saliva após o tratamento é indicativa de pior prognóstico[92]. Dessa forma, um método de detecção preciso, facilmente reprodutível e de fácil aplicação clínica é essencial. Contudo, não há consenso sobre o melhor método que atenda a todos esses requisitos. Para cada método, um ou mais tipos de material biológicos podem ser usados:

amostras teciduais fixadas em formol e embebidos em parafina, amostras frescas congeladas, raspado bucal e sangue.

Os métodos mais utilizados são:

- Métodos de amplificação de um alvo: utilizam oligonucleotídeos alvo-específicos (*primers*) para amplificar uma determinada sequência de ácidos nucleicos que poderá ser detectada por um dos diversos métodos de leitura disponíveis. O método de amplificação mais comumente utilizado é a reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction* - PCR), para amplificar partes do DNA viral. Vários ensaios com diferentes *primers* e diferentes formas de amplificação (real time-PCR, que quantifica a carga viral e reverse transcriptase-PCR) e diferentes métodos de detecção têm sido empregados. Podem detectar múltiplos diferentes tipos de HPV em um mesmo ensaio, ou serem específicos para um determinado tipo, de acordo com o *primer* escolhido. Atualmente, considera-se o padrão ouro no diagnóstico de HPV a detecção por PCR da expressão do oncogene E6, ou seja, seu RNA mensageiro (mRNA), em amostras frescas congeladas de tumor[5, 93, 94].
- Métodos de amplificação de sinal: baseia-se em um passo inicial de hibridização de ácidos nucleicos (de DNA ou RNA) da amostra com *probe* alvo-específico. O sinal gerado, ou seja a hibridização, é amplificada e visualizada por um dos diversos métodos disponíveis para tal. A hibridização *in situ* para DNA de tipos específicos do HPV e a captura híbrida são os métodos de amplificação de sinal mais usados[5, 93].
- Detecção de anticorpos séricos contra epítomos do HPV, em especial contra as proteínas E6 e E7[95]
- Detecção por imunoistoquímica de marcadores substitutos: o marcador mais aceito como indicativo de infecção pelo HPV é a proteína p16[5].

Importante também é a distinção entre infecções clinicamente relevantes, em que o vírus está sendo transcrito, e aquelas sem significado clínico, ou seja, o vírus está presente, mas não ativamente transcrito. A detecção do mRNA da oncoproteína E6 é indicativa da expressão do oncogene E6 e, por isso, considerada ideal. Contudo, é um método pouco disponível e que requer tecido fresco congelado. Combinações de técnicas mais simples podem ser apropriadas, uma vez que propiciam maior sensibilidade e especificidade na detecção do HPV[5, 93, 94]. Uma dessas combinações, que não requer tecido fresco congelado é a realização de imunoistoquímica para o p16 e, nos casos positivos, a realização de PCR com o *primer* GP5+/6+ com DNA extraído de tecido parafinado. Essa proposta é baseada em um estudo[94] que comparou a sensibilidade e especificidade de diversos métodos diagnósticos em relação à detecção por PCR do mRNA do oncogene E6 em amostras frescas congeladas (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Comparação entre os métodos de detecção do HPV em relação ao padrão ouro (E6 mRNA)

	E6mRNA	p16	GP5+/6+	FISH	CV (real-time PCR)	anti-L1,E6 e E7*
Sensibilidade (%)	100	100	100	83	92	91
Especificidade (%)	100	79	89	100	97	30

CV: carga viral.* anticorpos séricos; FISH: Hibridização In Situ Fluorescente. Adaptado de Smeets *et al* [94].

Diversos estudos demonstraram que pacientes com tumores relacionados ao HPV apresentam sobrevida global e livre de doença melhores que aqueles com tumores não relacionados[57, 96-101]. Especulam-se as razões para tal. Uma possibilidade seria a ausência do processo de cancerização de campo nesses tumores, uma vez que esses pacientes não costumam ser tabagistas ou etilistas. Outra hipótese é que os tumores associados ao HPV contêm p53 selvagem, ou seja, não mutado, apesar da proteína estar inativa e acumulada no núcleo[102, 103]. Isso

parece ser um dos fatores responsáveis pela aparente maior radio e quimiossensibilidade desses tumores[62, 104]. Uma imunovigilância a antígenos virais, como as proteínas E6 e E7, também poderia contribuir com seu melhor prognóstico[77, 105]. Nota-se, contudo, que entre pacientes com CECP relacionados ao HPV, os tabagistas apresentam piores taxas de sobrevida[100].

Especula-se se pacientes com tumores relacionados ao HPV poderiam ser submetidos a tratamentos menos intensos, de modo a diminuir a toxicidade tardia, sem que se comprometam os resultados de sobrevida. Alguns ensaios clínicos encontram-se em andamento na tentativa de testar essa e outras hipóteses relacionadas[106].

Acredita-se que a vacinação profilática contra HPVs de alto risco possa prevenir um número significativo de tumores de colo uterino[107] e, possivelmente, de CECP[108]. Contudo, esse impacto deve ser observado a longo prazo, dado o curso prolongado da carcinogênese relacionada ao HPV[58].

3.1.2.5. HISTÓRIA FAMILIAR

O antecedente familiar de CECP parece ser relevante, com aumento do risco relativo quando positivo, em especial quando o familiar é irmão, mas também em outros parentes de primeiro grau[109], principalmente se há mais de um familiar acometido[110]. Há controvérsias se antecedentes familiares de outros cânceres aumentariam o risco de CECP, em especial casos de câncer de pulmão e melanoma[110, 111].

3.1.2.6. RAÇA

A avaliação da raça é motivo de controvérsia no Brasil, dada a intensa miscigenação da população brasileira[112] e pela observação de que a cor da pele nem sempre se relaciona à ancestralidade[113]. Nos Estados Unidos, onde esse fenômeno é menos intenso, há diversos estudos que buscam analisar pacientes com CECP de acordo com as disparidades raciais e de etnia. Ainda sim, esse estudo é complexo, já que fatores socioeconômicos geralmente interferem nessa análise. Um estudo de mais de 20 mil pacientes[114], demonstrou que afro-americanos apresentaram pior evolução que brancos, de forma independente da condição social. Evoluções piores são marcadamente observadas em pacientes afro-americanos com tumores de orofaringe. Sugere-se que isso ocorra pela menor frequência de infecção pelo HPV nesses pacientes[115]. Contudo, estudo de pacientes afro-americanos e brancos, pareados inclusive por modalidade terapêutica, demonstrou evolução similar, indicando que o tipo de tratamento recebido pode ser o fator determinante de algumas das disparidades de evolução clínica observadas[116].

3.1.2.7. DIETA

Alguns estudos com grande número de indivíduos conseguiram demonstrar diminuição significativa do risco de CECP em pacientes que adotam dietas ricas em frutas e vegetais[117-119]. Produtos como vegetais em conserva, laticínios e gordura animal, contudo, parecem aumentar o risco de CECP [120, 121].

3.1.2.8. ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA (IMC)

Apesar de limitado como preditor de estado nutricional, valores baixos de IMC têm sido recentemente associados ao risco de CECP. É de difícil

pesquisa, uma vez que seu estudo envolve diversas variáveis de confusão de ordem dietética, de limitações da alimentação acarretadas pelo tumor e da associação com outros hábitos que influenciam na composição corpórea, como tabagismo e etilismo[122].

Alguns estudos demonstraram aumento significativo do risco de câncer de cavidade oral em doentes com IMC abaixo de 18,5[123] e 22[124], tanto ao diagnóstico, como dois anos antes da doença. Outro estudo, com achados semelhantes, demonstrou um aumento de 19% no risco de desenvolvimento de CECP para homens e de 15% para mulheres para cada decréscimo de 5kg no peso[125].

3.1.2.9. HIGIENE ORAL E CAUSAS ODONTOGÊNICAS

Há evidências significativas de que a má higiene oral confere maior risco para CECP[126]. A presença de periodontite crônica[127], o uso de enxaguatórios bucais[126, 128] e lesões orais por próteses mal ajustadas[129] parecem ser fatores de risco independentes para lesões orais e faríngeas.

3.1.2.10. MATE

Consumido principalmente no Sul do Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai, é obtido a partir da infusão de *Ilex paraguariensis*. Seu uso já foi relacionado com tumores da cavidade oral, orofaringe, laringe e esôfago[130]. Seu mecanismo de carcinogênese pode ser químico, térmico ou ambos[131].

3.1.2.11. BETEL OU ARECA

As sementes dessa palmeira (*Areca catechu*) formam a base para um produto de mascar estimulante, consumido na Índia, Sudeste da Ásia e África do Sul por 200 a 400 milhões de pessoas. Pode ser combinada com outras substâncias, como tabaco ou especiarias[130]. Há evidências significativas na literatura associando seu uso ao surgimento de lesões pré-malignas (leucoplasias e fibrose submucosa) e carcinoma epidermóide em cavidade oral[132, 133].

3.1.2.12. CANNABIS

A cannabis, ou *cannabis sativa*, popularmente conhecida no Brasil como maconha, é a droga ilícita mais consumida no mundo. Seus produtos de combustão contém carcinógenos comuns ao tabaco. De fato, a maioria dos usuários de cannabis também é tabagista e isso dificulta a análise do seu risco individual para o CECP[134]. Os estudos divergem a respeito da relação do uso de cannabis e CECP. Apesar de já se sugerir que seu uso associava-se significativamente ao CECP em pacientes mais jovens[135], estudos com casuísticas maiores não encontraram essa relação[134].

3.1.2.13. EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

A exposição a carcinógenos em locais de trabalho, tais como manufatura de isopropanol e exposição a névoas de ácido inorgânico contendo ácido sulfúrico e gás mostarda, são considerados potenciais fatores de risco para o câncer de laringe[136].

A exposição a pó de madeira, apesar de mais claramente associada a tumores de pulmão e traquéia, parece também aumentar o risco de CECP, em especial de cavidade nasal, nasofaringe e hipofaringe[137].

3.1.2.14. USO DE FORNO A LENHA

Apesar de escassa literatura a respeito, estudo realizado na região Sudeste do Brasil demonstrou relação significativa entre o uso de forno a lenha e carcinoma epidermóide da cavidade oral[138].

3.1.3.CARCINOGENESE E CANCERIZAÇÃO DE CAMPO

Mesmo quando o tratamento do CECP é satisfatório, outros carcinomas do trato aerodigestório superior podem aparecer. Tumor metacrônico, ou habitualmente conhecido como segundo tumor primário ou primário múltiplo, é aquele que, segundo a definição de Warren e Gates² *apud* Rennemo[139]:

- tem natureza maligna, assim como o primeiro tumor;
- é anatomicamente distinto do primeiro;
- não se trata de uma metástase do primeiro

A ocorrência de tumores metacrônicos varia de 3 a 7% ao ano, após o tratamento inicial[140] e representa significativa causa de mortalidade para esses pacientes[139]. A primeira hipótese para explicar esse fato foi a proposta por Slaughter *et al.*[7] que, em 1953, elaboraram o conceito de cancerização de campo, baseando-se em algumas observações histológicas, sugestivas de uma origem tumoral multicêntrica:

- Focos tumorais distintos em um mesmo produto de ressecção;
- As margens de mucosa ao redor de um tumor frequentemente apresentavam-se alteradas à histologia
- Os tumores apresentavam-se sempre maiores em extensão que em profundidade.

² Warren S, Gates O. Multiple primary malignant tumors: a survey of the literature and a statistical study. Am J Cancer 1932;16:1358–1414

Desde então, diversos estudos buscaram elucidar os mecanismos biológicos envolvidos nesse processo. Há controvérsias se isso se dá por tumores independentes que se desenvolvem simultaneamente ou se há migração lateral de clones celulares alterados[141]. Uma das estratégias usadas para responder a isso é estabelecer uma relação clonal entre os múltiplos tumores de um mesmo indivíduo. Essa não é tarefa simples, uma vez que mutações ao longo do tempo podem modificar de formas distintas tumores com a mesma origem. Assim, se diferentes lesões apresentam as mesmas alterações, fica demonstrada a origem clonal comum, contudo, a existência de diferenças não a exclui[141].

Outra estratégia é o estudo de lesões pré-malignas, a fim de estabelecer um modelo de progressão genética. Sabe-se que consecutivas alterações genéticas determinam a progressão de uma mucosa normal para uma lesão pré-maligna, até um tumor invasivo[8, 142]. (**Figura 3**)

Figura 3: Modelos de Instabilidade genética e progressão no CECP. COX2: ciclooxygenase 2; EGFR: do inglês: *epidermal growth factor receptor* ou receptor para o fator de crescimento epidérmico; FGF, do inglês: *fibroblast growth factor* ou fator de crescimento do fibroblasto. LOH: perda de heterozigose; MMP: do inglês: *matrix metalloproteinase* ou metaloproteinase de matriz. PDGF: do inglês: *platelet-derived growth factor* ou fator de crescimento derivado das plaquetas; PTEN: do inglês: *phosphatase and tensin homolog*, TGF α/β : do inglês: *transforming growth factor- α e β* ou fator de crescimento transformador- α e β ; VEGF: do inglês: *vascular endothelial growth factor* ou fator de crescimento do endotélio vascular; Adaptado de Haddad e Shin[143].

O estudo de tecidos considerados normais, ou seja, não cancerosos, também tem sido realizado, usando como marcadores mutações no gene TP53[144], instabilidade cromossômica[145], análise de perda de

heterozigossidade e alterações microssatélites[146]. Já se observaram alterações moleculares em tecidos considerados patologicamente normais, que são geralmente coincidentes com as alterações dos tumores ressecados[144, 146]. Braakhuis *et al.*[147] propuseram um modelo baseando-se na teoria de células tronco tumorais. Esse modelo prevê que uma célula tronco adquire uma ou mais alterações genéticas formando, com suas células filhas alteradas, um *patch*, ou seja, uma pequena porção do epitélio com alterações. Como resultado das alterações genéticas subsequentes, a célula tronco adquire vantagem proliferativa e se desenvolve, formando um “campo” ou região que vai deslocando o epitélio normal. Conforme a lesão aumenta, novas alterações genéticas dão origem a outros subclones nesse campo. Após certo tempo, esses clones podem ser diferentes em relação ao seu perfil genético, mas compartilham a mesma origem clonal. Assim, haveria um número significativamente grande de células tronco geneticamente alteradas em um campo e um desses subclones eventualmente poderia evoluir para o câncer[147]. (Figura 4)

Figura 4: modelo de progressão de um epitélio normal até um tumor invasivo, baseado na teoria das células tronco tumorais. Adaptado de Braakhuis *et al.*[147]

3.1.4.MARCADORES MOLECULARES

3.1.4.1. FRAGILE HISTIDINE TRIAD (FHIT)

O gene FHIT é um gene supressor tumoral, localizado no cromossomo 3p14.2, no sítio FRA3B. Esse é um dos mais comuns locais de fragilidade cromossômica em seres humanos[148]. Está frequentemente alterado em tumores malignos do pulmão, trato gastrointestinal, mama, colo uterino,

pâncreas, rim, fígado e CEC[149-151]. Sua perda de heterozigosidade, deleção homozigótica ou alterações de sua expressão são frequentes em tumores relacionados ao tabaco, que parece induzir à sua metilação[152-154]. Pode ser considerado como um alvo molecular precoce dos carcinógenos do tabaco[155]. A transfecção do gene selvagem em culturas de células tumorais leva à inibição do crescimento das mesmas, o que sugere sua ação como supressor tumoral [156]. A função biológica exata do gene ou de sua proteína ainda é incerta. Contudo, sugere-se que sua função supressora tumoral ocorre através da indução de apoptose e controle do ciclo celular[157]. Além da função como supressor tumoral, sugere-se um efeito como molécula de sinalização do sistema imune, uma vez que é expressa em células derivadas de monócitos[151]. Sabe-se que a falta da sua expressão proteica relaciona-se com alterações do gene e da sua expressão[151]. Recentemente têm sido descritas múltiplas interações da proteína com outras proteínas citoplasmáticas, mitocondriais e nucleares, mas suas repercussões biológicas ainda não estão completamente claras[158].

Alguns estudos do gene e da expressão de sua proteína em CEC foram realizados. A alteração da sua função parece ser importante para o desenvolvimento e a progressão desses tumores[159]. A diminuição da sua expressão proteica está associada a pior prognóstico, mas a maior sensibilidade ao tratamento radioterápico[149, 150, 160].

3.1.4.2. RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR)

O fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor* - EGF) foi originalmente isolado de glândulas submandibulares de ratos por Stanley Cohen em 1962[161]. O nome EGF lhe foi dado posteriormente, ao se descobrir sua ação estimulante sobre células epiteliais. Em 1972, sua sequência de aminoácidos foi determinada e em 1975 confirmou-se a

presença de um sítio de ligação específico (*Epidermal Growth Factor Receptor* - EGFR). A atividade de tirosina quinase resultante da união do ligante ao receptor foi descoberta em 1980. Em 1984, seu DNA foi isolado e caracterizado[162, 163].

É um receptor transmembrânico a que se ligam, além do EGF, o fator de crescimento transformador α (*Transforming Growth Factor Alfa* TGF- α) e outras proteínas regulatórias[143]. Os sinais mediados por esses receptores resultam em uma complexa cascata de vias que influenciam a proliferação e diferenciação celular e levam a uma intensa atividade mitótica[164]. A família do EGFR consiste em quatro membros: EGFR (também conhecido como ERBB1 / HER1), ERBB2 / HER2/NEU, ERBB3 / HER3 e ERBB4 / HER4[163]. Acredita-se que a hiperexpressão do EGFR influencie etapas importantes em invasão tumoral e disseminação metastática, através de aumento na motilidade celular, regulação de alterações no citoesqueleto, alterações na adesão celular, produção de enzimas proteolíticas de degradação de matriz e promoção de angiogênese[165]. Observa-se hiperexpressão de EGFR em 42 a 80% dos CECF [166]. A maioria dos estudos mostrou, em análises multivariadas, pior prognóstico em tumores com hiperexpressão de EGFR [164, 167].

3.1.4.3. FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF)

Para o crescimento de tumores sólidos, é necessário que haja o desenvolvimento de um suprimento vascular, processo genericamente conhecido como neovascularização ou angiogênese[168]. O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF) é considerado o mais importante e potente entre os fatores de neovascularização. A família VEGF é composta por proteínas angiogênicas que aumentam a permeabilidade vascular, o crescimento, a proliferação, a migração e a diferenciação das células endoteliais[164, 169].

Diversos estudos buscaram associar a expressão de VEGF ao comportamento clínico em CECP. A maioria deles mostra significativa associação da sua hiperexpressão à maior disseminação metastática linfonodal e a pior prognóstico [164, 170-172].

3.1.4.4. Ki-67

Descoberta em 1983[173], a proteína Ki-67 encontra-se expressa exclusivamente em núcleos de células em proliferação, especificamente nas fases G1 tardia, S e G2 do ciclo celular, sejam elas normais ou tumorais[174] (**Figura 5**). Apresenta-se em duas isoformas: de 320 e 359 kDa. Sua função exata ainda permanece incerta, mas seu papel na proliferação celular já é estabelecido[174], de forma que a intensidade de proliferação costuma ser aferida em função da porcentagem de células que expressam a proteína. Os estudos, contudo, diferem ao estabelecer os critérios que caracterizem uma intensidade de proliferação elevada ou não. Isso parece colaborar para as controvérsias acerca de seu valor prognóstico em CECP [164].

Na cavidade oral, a expressão da proteína Ki-67 é menor em mucosa oral normal e aumenta conforme progride para displasia e carcinoma[175].

A expressão do Ki-67 parece estar diminuída em tumores positivos para o HPV, em relação a tumores negativos[176].

Figura 5: representação das fases do ciclo celular. G1: Fase Gap 1; G2: Fase Gap 2; M: fase de mitose; S: Fase de síntese de DNA. Adaptado de Alberts *et al*[177].

3.1.4.5. p53

Descoberto em 1979, o gene supressor tumoral p53[178], também conhecido como TP53 ou Trp53, localiza-se na banda 13.1 do braço curto do cromossomo 17[179, 180]. A fosfoproteína p53 de 53 kDa por ele codificada, em sua forma dita selvagem, é uma proteína de curta meia-vida que existe em uma conformação latente nas células. Ativa-se em resposta a diversas agressões que possam danificar a integridade do genoma celular[181], como dano ao DNA, hipóxia, ativação de oncogenes, replicação viral e depleção de oligonucleotídeos[182]. Ao se ativar, o wt-p53 (de *wild-type* p53) exerce seus efeitos antitumorais como parada de crescimento, envelhecimento e apoptose (morte celular programada)[181]. Por essas características, o p53 é amplamente conhecido como o guardião

do genoma, apesar de alguns estudos sugerirem que pode comandar diversos outros processos além dessa função[183].

Acredita-se que o p53 seja o gene mais comumente mutado em tumores humanos[179]. Diferentemente do que ocorre em outros genes supressores tumorais, em que as mutações são de deleção, as suas são em geral *missense*, ou seja, mutações em que um *codon* é mudado para outro, o que direciona a incorporação de um aminoácido diferente[181]. Quando mutado, ou de alguma forma inativado, na presença de uma agressão, as células não são “detidas” nem caminham para a apoptose, ganhando vantagem proliferativa[184]. Uma hipótese mais recente é a de que a proteína resultante do p53 mutado não apenas perde as funções de supressão tumoral, mas pode também ter efeito pró-oncogênico[181]. A meia vida dessa proteína é significativamente maior do que a codificada pelo wt-p53[185], sendo dessa forma detectada em estudos imunoistoquímicos, por acumular-se na célula. Contudo, fatores metodológicos e biológicos fazem com que a expressão da proteína detectada por imunoistoquímica não reflita a mutação do gene na totalidade das vezes [186].

Em CECP, a perda da função da proteína p53 – seja por mutação do gene, por perda de heterozigosidade ou por interação com proteínas virais – é uma das alterações moleculares mais comuns[187]. O seu valor prognóstico nesses tumores, contudo, é controverso. Isso muito provavelmente se deva a limitações metodológicas de estudos que abordam essa questão[188]. Estudo recente com grande número de pacientes com CECP mostrou relação significativa entre mutações mais complexas do gene e pior sobrevida global [187].

3.1.4.6. p16

Descoberto em 1993[189], o inibidor de Quinase Ciclina-Dependente (CDKI) p16 é uma proteína de 156 aminoácidos que interage com a Quinase Ciclina-Dependente 4 (CDK4) [190]. É codificada pelo *locus* INK4a, no cromossomo 9p21[191]. Seu efeito supressor tumoral[178] se deve à sua habilidade de inibir a atividade catalítica do complexo CDK4-6/ciclina D, que é necessário para a fosforilação da proteína Rb e, dessa forma, bloquear a progressão do ciclo celular no ponto de restrição G1/S[190, 191] (**Figura 5**). O principal mecanismo de sua inativação em tumores humanos é por deleções homozigóticas, mas mutações pontuais e metilação de seu promotor já foram observadas[190].

Em CECP, tem se destacado por ser um marcador para a infecção pelo HPV e sua atividade[94]. A oncoproteína viral E7 degrada a proteína supressora tumoral pRb, aumentando a regulação do p16^{INK4a}[69].

Sua inativação parece ser um evento precoce no processo de cancerização oral[192] e já se observou perda significativamente maior de sua expressão em tumores relacionados ao álcool e ao tabaco, especialmente por longos períodos [191, 193].

Seu valor prognóstico é questionável. Alguns autores acreditam que não tem relação com a evolução clínica[194], exceto em tumores de orofaringe, pois reflete uma relação causal com o HPV, o que sabidamente se relaciona a melhor evolução [11, 195]. Contudo, dados sugerem que relaciona-se com prognóstico de forma independente da infecção pelo HPV[196].

3.2. CARCINOMA EPIDERMÓIDE EM NÃO TABAGISTAS E NÃO ETILISTAS

3.2.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Enquanto a incidência de CECP em pacientes TE vem decaindo, reflexo da diminuição dos hábitos tabágico e etílico em alguns países, a de tumores de cavidade oral e orofaringe aumenta, principalmente em pacientes com menor ou nenhuma exposição ao tabaco[60] e em mulheres[197]. Cerca de 2 a 14% dos pacientes com CECP não fumam e, desses, a maioria também não consome álcool[14-17]. São múltiplos os fatores de risco nesse grupo de pacientes, como a infecção por HPV, imunossupressão, história de xeroderma pigmentoso e susceptibilidade genética. Contudo, em uma significativa parte desses casos, nenhum fator de risco pode ser identificado[10].

A proporção de mulheres costuma ser maior entre pacientes NTNE do que entre aqueles TE[17]. Elas tendem a apresentar uma distribuição bi-modal de idade, com picos na 5ª e 8ª década de vida. Quanto aos homens, geralmente são mais jovens do que aqueles TE[3].

3.2.2. ASPECTOS CLÍNICOS

3.2.2.1. APRESENTAÇÃO CLÍNICA

Pacientes NTNE e TE apresentam-se de formas distintas. Os primeiros têm mais frequentemente tumores de cavidade oral e orofaringe e, em menor proporção, tumores de laringe e hipofaringe[3, 17]. Em pacientes TE, a distribuição entre os sítios cavidade oral, faringe e laringe é mais homogênea.

Dessa forma, são três as apresentações mais frequentes em NTNE[3]:

- mulheres jovens com câncer de língua oral
- mulheres idosas com câncer de rebordo alveolar e mucosa jugal

- homens jovens e de meia-idade, com câncer de orofaringe

Quanto ao estágio clínico do tumor, pacientes NTNE têm maior proporção de casos iniciais[14]. Isso pode ser devido ao fato de muitos se apresentarem com tumores de cavidade oral – sítio com possibilidade de diagnóstico precoce – e serem mulheres, que em geral procuram atenção médica mais precocemente[198]. Além disso, principalmente o etilismo e possivelmente o tabagismo relacionam-se com atraso no diagnóstico e consequentemente, estádios mais avançados[199].

3.2.2.2. CURSO DA DOENÇA

Estudos comparando a evolução clínica de pacientes NTNE não são frequentes, já que as séries são limitadas. Além disso, as séries estudadas diferem em relação à definição dos hábitos, à distribuição etária e por sítios. Isso talvez explique o fato de alguns estudos não encontrarem diferenças de evolução entre NTNE e TE[14], ou encontrarem pior[200] ou melhor sobrevida[15, 201, 202] em pacientes NTNE.

Em relação à ocorrência de tumores metacrônicos, alguns estudos não observaram diferenças[10, 16, 203] em relação a pacientes TE enquanto um estudo encontrou menor taxa em NTNE[204].

3.2.3.ASPECTOS MOLECULARES

Não está claro se os mecanismos carcinogênicos em pacientes NTNE e TE com CECP são diferentes, já que pouco se sabe sobre esses mecanismos em pacientes NTNE. O principal foco de estudo nesses casos é o p53, uma vez que está frequentemente mutado em CECP de pacientes TE. Estudos de sequenciamento do gene p53 sugerem que a mutação do mesmo é um evento bem menos frequente em pacientes NTNE[14, 205]. Contudo, esses estudos

podem não identificar casos em que não haja mutação, mas a proteína esteja inativada[10]. De fato, em pacientes NTNE com imunomarcção pelo p53 nem sempre se identificam mutações no gene p53 [102, 206]. Um dos possíveis mecanismos para inativação da proteína p53 é o mediado pela oncoproteína E6 do HPV[69]. A proteína p53 ligada à oncoproteína E6 acumula no núcleo celular e pode, dessa forma, ser detectada por técnicas convencionais de imunoistoquímica[103].

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. SELEÇÃO DE PACIENTES

Os pacientes incluídos nesse estudo são provenientes de dois projetos de pesquisa. De 2001 a 2003, o Projeto Genoma Clínico, programa especial com suporte da FAPESP e do Instituto Ludwig e, como continuação deste, o projeto temático “Marcadores de Agressividade em Tumores de Cabeça e Pescoço”, financiado pelas mesmas instituições, além de 2004 a 2009. Com este último, formou-se um grupo multi-institucional e multidisciplinar intitulado GENCAPO, atualmente financiado como novo projeto temático da FAPESP. Dessa forma, desde 2001, coletaram rotineiramente dados clínicos e epidemiológicos, além de amostras tumorais e de sangue de pacientes com CECP, provenientes de cinco instituições: Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho de São Paulo, Hospital Heliópolis de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), Universidade do Vale do Paraíba de São José dos Campos e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto (<http://ctc.fmrp.usp.br/ClinicalGenomics/cp/>).

A fim de se obter tempo de seguimento suficiente para avaliação de sobrevida, para esse projeto, foram estudados pacientes incluídos no GENCAPO até fevereiro de 2009. A partir desse banco de dados, selecionaram-se todos os pacientes com carcinomas epidermóides de cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe. Não foram selecionados os casos de carcinoma de nasofaringe, cavidade nasal e seios paranasais por sua relação questionável com tabagismo e etilismo. Tumores metastáticos com sítio primário desconhecidos não foram selecionados pela possibilidade de origem na nasofaringe. Dentre os tumores da cavidade oral, foram excluídos os de lábio, dada sua conhecida relação com exposição solar. Carcinomas epidermóides de pele, sistematicamente coletados por alguns dos centros participantes, foram igualmente excluídos.

4.2. ÉTICA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do HCFMUSP, como subprojeto do Protocolo de Pesquisa inscrito sob o número 0511/07, intitulado: “Busca de marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço” previamente aprovado pela mesma instituição. O projeto temático também foi aprovado nos respectivos comitês de ética de cada instituição participante (**APÊNDICE 1**). Foram incluídos os pacientes que concordaram e assinaram Termo de Consentimento livre esclarecido no momento de sua inclusão no projeto.

4.3. COLETA DE DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS

Os pacientes pertencentes ao GENCAPO são, no momento de sua inclusão, questionados por entrevistadores treinados que preencheram formulários padronizados contendo informações pessoais, profissionais, de escolaridade, familiares e de hábitos tabágico e etilílico (**APÊNDICE 2**). Dados a respeito de hábitos dietéticos, de higiene oral, de exposição a tabaco ambiental ou a outros carcinógenos não são rotineiramente pesquisados. Os formulários com dados clínicos são rotineiramente preenchidos pelos médicos cirurgiões responsáveis pelo atendimento dos pacientes. (**APÊNDICE 3**) As informações provenientes dos laudos histopatológicos são coletadas por médicos cirurgiões pertencentes ao GENCAPO. (**APÊNDICE 4**)

Os critérios adotados para determinação da classificação quanto ao tabagismo e etilismo foram elaborados pelo grupo de epidemiologistas pertencentes ao GENCAPO, em conformidade com padrões adotados por outros consórcios internacionais[41]:

- Tabagista: Fumante atual ou no passado de pelo menos um cigarro, charuto ou cachimbo, diariamente, por pelo menos um ano.
- Etilista: Consumo de bebidas alcoólicas pelo menos uma vez ao mês.

Os pacientes selecionados foram, assim, classificados em 4 grupos: NTNE, TE, TNE e NTE. Esses grupos foram então comparados em relação a:

- Gênero
- Idade
- Raça
- Grau de escolaridade
- IMC
- Número de parentes de 1º grau com câncer sobre o total de parentes de 1º grau
- Número de parentes de 1º grau tabagistas
- Sítio tumoral
- Estádio clínico e patológico da doença
- Presença de metástases linfonodais clinicamente e à patologia
- Características histopatológicas: variantes morfológicas; grau de diferenciação tumoral; invasão sanguínea; invasão linfática; invasão Peri-neural; infiltrado inflamatório peri-tumoral.

4.4. COMPARAÇÃO DE PACIENTES NTNE E TE POR ANÁLISE POR PAREAMENTO

Para redução da amostra a fim de viabilizar o estudo de dados de seguimento e do material biológico, optou-se pelo sistema de análise por pares. Para tanto, selecionou-se para cada paciente NTNE um paciente TE, pareando-se conforme os critérios expostos na **tabela 4**.

Tabela 4 - Critérios de pareamento entre NTNE e TE

Critério	Pareamento
Idade	Mais ou menos 5 anos
Gênero	Feminino
	Masculino
Sítio tumoral	Cavidade oral
	Orofaringe
	Cavidade oral e orofaringe†
	Laringe
	Hipofaringe
Estádio clínico (TNM)*	T1 e T2
	T3, T4a, T4b
	N0
	N1, 2a, 2b, 2c, 3
Grau de diferenciação	Bem ou Moderadamente
	Pouco Diferenciado
Variante morfológica	Clássico
	Verrucoso
	Escamoso Basalóide.
	Papilífero

† casos em que o tumor acometia ambos os sítios e não foi possível a identificação precisa da origem. *sistema de classificação de tumores malignos TNM 5ª[207] (até 2002) e 6ª edição[208] (a partir de 2003).

Quando mais de um paciente TE era passível de pareamento, os critérios de desempate foram, em ordem: exatamente o mesmo grau de diferenciação, exatamente o mesmo estágio e idade mais próxima.

Uma vez que na análise por pareamento, cada par é analisado isoladamente, foi possível, em casos em que só se encontrou um par TE para mais de um paciente NTNE, formar pares diferentes com o mesmo paciente TE. Essa estratégia é análoga à utilizada em estudos de caso-controle em que se pareia um caso a dois ou mais controles.

4.5. ANÁLISE DE SOBREVIDA

Os dados de seguimento clínico dos pacientes inseridos no projeto temático foram sistematicamente coletados em consultas ambulatoriais pós-tratamento pela equipe médica, através de preenchimento de formulário padronizado (**APÊNDICE 5**). As informações acerca de persistência/recidivas tumorais locais ou regionais, metástases à distância ou óbito – relacionado ou não à doença – são inseridas no sistema eletrônico do projeto, com as respectivas datas.

Em caso de perda de seguimento, foram realizadas tentativas de contato por telefone ou carta pela equipe de epidemiologistas da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, responsáveis pela vigilância desses dados. Também são pesquisadas informações de óbitos que vão para os sistemas de verificação de óbitos do estado de São Paulo, fornecidos anualmente pela Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (SEADE).

Para esse estudo, foram analisados os dados de seguimento dos pacientes NTNE como um todo e de forma pareada (NTNE:TE), no que se refere ao tempo de sobrevida específica pela doença.

4.6. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Foram recuperados blocos de parafina provenientes de biópsias e intervenções cirúrgicas dos pacientes NTNE e de seus pares TE selecionados, junto aos serviços de Anatomia Patológica de cada instituição participante. Quando possível, selecionaram-se os blocos que representavam tanto o tumor quanto a margem de tecido não tumoral. Se necessário, mais de um bloco foi selecionado com essa finalidade.

4.7. IMUNOISTOQUÍMICA

Os serviços de patologia das instituições participantes do GENCAPO padronizaram seus métodos rotineiros de fixação em formalina e embebição em parafina de amostras teciduais, a fim de evitar que diferenças metodológicas influenciassem a análise futura dessas amostras.

4.7.1. ELABORAÇÃO DAS LÂMINAS

A confecção das lâminas e as reações imunoistoquímicas para os anticorpos FHIT, EGFR, VEGF, p53 E Ki-67 foram realizadas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Os anticorpos foram adquiridos através do projeto "Correlação entre marcadores moleculares e fatores prognósticos clínicos e patológicos em carcinomas de cabeça e pescoço e de pulmão" com suporte do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sob o número 480654/2007-7, do qual esse estudo também participa. A partir dos blocos selecionados, realizaram-se cortes de 3µm de espessura para a confecção de lâminas previamente silanizadas. As lâminas foram deixadas para secar e ficaram em estufa de um dia para o outro. Procedeu-se então à desparafinização por imersão em xilol por 5 minutos, duas vezes. A seguir, o tecido foi hidratado em sequência de banhos rápidos com álcool absoluto, álcool 96% e novamente, álcool 96%. As lâminas foram lavadas em água corrente.

Seguiu-se a recuperação antigênica, com a colocação das lâminas em tampão específico para cada anticorpo usado, já aquecido, em panela de pressão, por três minutos após o estabelecimento de pressão:

- P53 – tampão Tris EDTA pH 9.0
- Ki67 – tampão EDTA pH 8.0
- FHIT – tampão Tris EDTA pH 9.0
- EGFR – tampão Tris EDTA pH 9.0

- VEGf – tampão Tris EDTA ph 9.0

As lâminas foram então retiradas da panela de pressão e deixadas para resfriarem por 20 minutos até temperatura ambiente. Seguiu-se a lavagem em tampão fosfato de sódio (PBS), com dois banhos de três minutos cada. Realizado então o bloqueio da peroxidase endógena com a lavagem das lâminas em Metanol (47,5mL), PBS (47,5mL) e peróxido de hidrogênio 6% (5ml), por 20 minutos. Seguiram-se dois banhos de três minutos cada em PBS.

O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito através da cobertura da lâmina com uma gota de *Background Sniper* do Kit *Starr Trek Detection* (Biocare®, Califórnia) por 10 minutos.

Os anticorpos primários foram então diluídos, de acordo com as orientações dos fabricantes e gotejados nas lâminas por 1 hora:

- P53 – 1/600 - mouseXp53 Clone BP53.12 mouse monoclonal (Zymed® Califórnia, USA)
- Ki-67 – 1/200 - Ncl-Ki-67-MM1 mouse monoclonal (Novocastra® / Leica® - Wetzlar, Germany)
- FHIT – 1/400 - rabbitXFHIT - polyclonal (Zymed® Califórnia, USA)
- EGFr – 1/50 - rabbitXEGFR - polyclonal (Zymed® Califórnia, USA)
- VEGf – 1/100 - Ncl- L- VEGFR-3 Clone KLT9 - mouse monoclonal (Novocastra® / Leica® - Wetzlar, Germany)

As lâminas foram novamente lavadas em PBS por 3 minutos, duas vezes e, a seguir, foi gotejado o anticorpo secundário do Kit *Starr Trek Detection* (Biocare®, Califórnia, EUA), em duas etapas:

- 1 - *Trekkie Universal Link*: uma gota sobre cada lâmina por 30 minutos
 - 2 - *Trekavidin – HRP Label*: uma gota sobre a lâmina por 30 minutos
- Lavagem das lâminas com 2 banhos de PBS entre uma etapa e outra.

Procedeu-se então à revelação com cromógeno *Betazoid DAB Substrate Buffer* + *Betazoid DAB chromogen* do *Kit Starr Trek Detection* (Biocare®, Califórnia, EUA), gotejando-se o DAB preparado de acordo com o fabricante aguardando em média 03 minutos pela revelação.

Mais dois banhos em PBS de 3 minutos cada foram realizados e as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina por 10 segundos. Foram então lavadas em água corrente e sucedeu-se uma bateria de hidratação e clareamento pré-montagem das lâminas:

- Álcool 96% - 5 banhos rápidos
- Álcool 96% - 5 banhos rápidos
- Álcool 96% - 5 banhos rápidos
- Álcool absoluto – 5 banhos rápidos
- Xilol II – 5 banhos rápidos
- Xilol I – até a montagem das lâminas

Por fim, as lâminas foram montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha)

Os controles externos negativos foram submetidos a todos os passos do processo, exceto a exposição ao anticorpo.

Os controles externos positivos utilizados para cada anticorpo foram amostras teciduais sabidamente positivas para os anticorpos:

- P53: cancer de mama
- Ki-67: tonsila
- FHIT: endométrio
- EGFR: mama
- VEGF: placenta

Para o anticorpo p16, as lâminas foram confeccionadas e coradas na Divisão de Anatomia Patológica do HCFMUSP.

A partir dos mesmos blocos, realizaram-se cortes de 3µm de espessura para a confecção de lâminas previamente silanizadas. As lâminas foram deixadas para secar e ficaram em estufa de um dia para o outro. Procedeu-se então à

desparafinização à quente por imersão em xilol 60°C por 30 minutos e à frio, em xilol à temperatura ambiente, por 10 minutos. A seguir, o tecido foi hidratado em sequência de banhos rápidos com álcool absoluto (duas vezes), álcool 95% (duas vezes) e álcool 70%. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada. Seguiu-se o bloqueio das peroxidases endógenas com a lavagem das lâminas em peróxido de hidrogênio 6% (5ml), por 20 minutos.

Seguiu-se a recuperação antigênica, com a colocação das lâminas em solução de ácido cítrico (pH 6.0) em panela de pressão, por cinco minutos após o estabelecimento de pressão.

As lâminas foram então retiradas da panela de pressão e deixadas para resfriarem por 20 minutos até temperatura ambiente. Seguiu-se a lavagem em (PBS), com três banhos de três minutos cada.

Gotejou-se sobre as lâminas o anticorpo primário monoclonal anti-p16 clone SPM304, código BSB5832 (*Bio SB*, Califórnia) em uma diluição de 1:500 em câmara úmida por 18 horas a 4°C. A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS por três vezes e procedeu-se à incubação com anticorpo secundário do *kit Picture Max*, código 878983 (Invitrogen, Carlsbad) em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. Após três novos banhos em PBS, seguiu-se a incubação em câmara úmida com o polímero do mesmo kit por 30 minutos a 37°C, seguidos por mais três banhos de PBS. Procedeu-se então à revelação com cromógeno DAB 60% em 100 mL de PBS e 1,5mL de peróxido de hidrogênio 20 volumes, por 3 minutos. As lâminas foram então lavadas em água corrente e destilada, sendo então submetidas a contracoloração com Hematoxilina por 10 segundos. Foram novamente lavadas em água corrente e sucedeu-se uma bateria de hidratação e clareamento pré-montagem das lâminas, com álcool 70%, 95% (dois banhos), álcool absoluto (dois banhos) e xilol (três banhos).

Por fim, as lâminas foram montadas com resina para microscopia *Entellan* (Merck, Darmstadt, Alemanha)

O controle externo negativo foi submetido a todos os passos do processo, exceto a exposição ao anticorpo. O controle externo positivo utilizado foi uma amostra de colo uterino sabidamente positiva para o anticorpo p16.

4.7.2. QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO

A leitura das lâminas coradas foi realizada em microscópio óptico (Nikon ECLIPSE E200, Tóquio, Japão) sob aumento de 100, 200 e 400x, por dois examinadores.

4.7.2.1. FHIT

Foram avaliados todo o tecido tumoral invasivo e margem não tumoral presentes em cada lâmina. A marcação foi estimada conforme a área de cada tecido marcada. Foram usados os parâmetros previamente descritos na literatura[149, 150, 160], pelos quais a marcação é considerada normal (ou positiva) se mais de 10% da área está corada e diminuída (ou negativa), se há marcação em menos de 10% da área. As marcações nuclear e citoplasmática foram contabilizadas separadamente, bem como a marcação da camada basal do tecido não tumoral. Dados discordantes entre os observadores foram discutidos até um consenso.

4.7.2.2. EGFR

Foram avaliados todo o tecido tumoral invasivo e margem não tumoral presentes em cada lâmina. A marcação, predominantemente de membrana celular, foi estimada conforme a área de cada tecido marcada. Na medida em que a literatura não tem padrão estabelecido para essa quantificação, graduamos a marcação de forma semi-quantitativa em negativa (nenhuma marcação); 1+ (inferior a 10% de marcação); 2+ (entre 10 e 25%); 3+ (entre 26 e 50%) e 4+ (superior a 50% de marcação). Dados discordantes entre os observadores foram discutidos até um consenso.

4.7.2.3. VEGF

Os mesmos métodos de avaliação e graduação utilizados para a avaliação da imunomarcção do EGFR foram utilizados para a avaliação do VEGF, pelos mesmos motivos. Contudo, o padrão de imunomarcção do VEGF é basicamente citoplasmático.

4.7.2.4. Ki-67

Foram delimitadas as áreas de tumor invasivo e margem não tumoral presentes em cada lâmina. Foram então fotografados dois campos distintos de grande aumento (400x) nas áreas de maior marcação (*hot spots*)[209] de cada área de tumor e margem não tumoral previamente selecionados. As imagens foram adquiridas no museu de Patologia da Faculdade de Medicina da universidade de São Paulo, através de um microscópio óptico Leica DMR (Leica Microsystems gmbH, Wetzlar, Germany) com câmera digital Axioca mcR 5 (Carls Zeiss MicroImagins GmbH, Göttingen, Alemanha) acoplada a computadores padrão IBM contendo o programa Image Pro-Plus® versão 4.5.0.29 para Windows XP® (Media Cybernetics Inc®).

As imagens foram então analisadas através do Sistema de Processamento e Análise de Imagem ImageLab® (Softium Informática®, São Paulo, Brasil), versão 2.4, calibrado para utilizar a escala em micrômetro. As células eram manualmente marcadas como positivas ou negativas, de acordo com a sua marcação nuclear (**Figura 6**). Pelo menos 500 células foram contadas em campos consecutivos, não coincidentes. Para a quantificação da imunoexpressão foi estabelecido um índice de

positividade (IP)[210], que representa a porcentagem de células positivas em relação ao total de células contadas (positivas e negativas).

Figura 6: Quantificação da marcação nuclear com o programa ImageLab®. Abaixo e à direita, observa-se a contagem das células positivas e negativas.

4.7.2.5. p53

À semelhança do Ki-67, a imunomarcação do p53 também apresenta padrão fundamentalmente nuclear. Dessa forma, a mesma metodologia empregada para o Ki-67 foi utilizada para o p53, utilizando-se os mesmos parâmetros.

4.7.2.6. p16

Foram avaliados todo o tecido tumoral invasivo e margem não tumoral presentes em cada lâmina. A imunomarcção do p16 tem padrão citoplasmático e nuclear. São diversas as formas de avaliação descritas na literatura. Optamos por duas análises distintas do material:

- avaliação dicotômica: casos positivos (marcação em área maior ou igual a 5%) ou negativos (área marcada inferior a 5%)
- positividade estimada em cruces: adotando os valores mais usados na literatura: negativa (inferior a 5%); 1+ (entre 5 e 25%); 2+ (entre 26 e 70%) e 3+ (superior a 70%)

Dados discordantes entre os observadores foram discutidos até um consenso.

Para todos os marcadores, as quantificações foram realizadas por pesquisadores cegos aos dados clínicos e os dados foram tabulados com o auxílio do programa Excel (Microsoft® Office Professional Plus 2007).

4.8. PESQUISA DO GENE DO PAPILOMAVIRUS HUMANO

Para a escolha do método de detecção do HPV, optamos pela pesquisa de DNA por PCR, uma vez que seriam utilizadas amostras embebidas em parafina.

4.8.1. EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO PARAFINADO

Foram realizados 20 cortes de 5 µm de cada bloco de parafina selecionado, com o emprego de micrótomo histológico. Entre cada bloco, realizou-se a anti-sepsia com álcool 70% do aparelho, da lâmina e da pinça utilizados, a fim de não contaminar as diferentes amostras entre si. Os cortes foram acondicionados em microtubos de polipropileno (Eppendorf®, Hamburg, Germany) de 1,5 mL, devidamente codificados, mas não passíveis de identificação quanto ao grupo de estudo. As amostras foram submetidas à desparafinização em xilol e hidratação em escala descendente de álcool (100%, 90% e 70%). Procedeu-se então à extração do DNA para o qual se utilizou o sistema comercial QIAamp DNA minikit® (QIAGEN Ltda, Crawley, UK). Após a desparafinização, acrescentaram-se 100 µL de tampão ATL (QIAGEN Ltda, Crawley, UK) e 20 µL de Proteinase K (QIAGEN Ltda, Crawley, UK). Os tubos foram mantidos à temperatura de 56°C para ocorrer a digestão enzimática por 18 horas. Após completa lise tecidual, foram realizadas etapas de lavagens e centrifugações em sistemas de minicolunas, até a etapa de eluição do DNA genômico.

4.8.2. PUREZA E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A quantidade de DNA genômico e a pureza das amostras foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop™ (*Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA*). As amostras foram então armazenadas a -20°C até a realização da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

4.8.3.nPCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO HPV

As reações de amplificação do DNA de HPV foram realizadas através de PCR-nested (nPCR) como descrito por Simonato *et al.* [88]. Foram utilizados iniciadores específicos que reconhecem segmento conservado da região L1 do genoma viral. Para tanto, empregaram-se os oligonucleotídeos MY11/MY09 e GP5+/GP6+, que permitem a amplificação do DNA de diversos tipos de HPV: 1A, 2, 3, 5, 6-8, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 20, 31, 33, 35, 39, 45, 49, 50, 52-54, 57, 62, 66, 70, CP8304 e LVX82/MM7 [211, 212]. As reações foram realizadas em termociclador MasterCycler (Eppendorf®, Hamburg, Germany).

Para a primeira amplificação, foi utilizado o par de iniciadores MY09/11 (F: 5' CGTCCMARRGGAWACTGATC 3'; R: 5' GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3') que gera um produto de 450pb. A reação é composta de 2,5 µl de tampão de PCR 10x (Tris-HCl 10mM, pH 8,0, KCl 50 mM), 3 mM de MgCl₂, 0,24 mM de cada dNTP, 2 UI de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 10 pmol de cada oligonucleotídeo e 300 ng de amostra de DNA genômico, em um volume final de 25 µL. Condições de ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, associação a 55,4°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 40 segundos, com extensão final a 72°C por 4 minutos.

Na segunda etapa da nPCR, foram empregados os iniciadores GP5+/6+ (F: 5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3'; R: 5' CAACTTCATCCACGTTCCACC 3') gerando um produto de 150pb. A mistura de amplificação é composta de 2,5 µl de tampão de PCR 10x (Tris-HCl 10mM, pH 8,0, KcL 50 mM), 2 mM de MgCl₂, 0,24 mM de cada dNTP, 2 UI de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 5 pmol de cada oligonucleotídeo e 2 µl do produto de PCR obtido na primeira etapa, totalizando um volume final de 25 µL. Os fragmentos de 150 pb foram amplificados a partir de uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, associação a 44,6°C

por 50 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos, com extensão final a 72°C por 4 minutos.

Como controle positivo, utilizaram-se amostras de biópsia de papiloma de orofaringe. O controle negativo foi composto pela mistura de amplificação e substituição da amostra de DNA por água ultrapura (Milli-Q Biocell, Millipore, Billerica, MA, USA), em mesmo volume.

4.8.4. PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE CONTROLE

A fim de verificar a viabilidade do DNA nas amostras obtidas, realizou-se a PCR para amplificação do gene que codifica a cadeia da β -globina humana, que supostamente está presente em todas as amostras teciduais. As reações foram realizadas em termociclador Eppendorf MasterCycler.

A reação de amplificação foi realizada com 2,5 μ L de tampão de PCR 10x (Tris-HCl 10mM, pH 8,0, K₂SO₄ 50 mM), 2 mM de MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 pmol de cada oligonucleotídeo (F: 5'AGCAACCTCAAACAGACACC 3'; R: 5'CCCAGGGCCTCACCACCAAC 3') e 300 ng de amostra de DNA genômico, totalizando um volume final de 25 μ L. Os fragmentos de 150 pb foram amplificados a partir de uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, associação a 44,6°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos, com extensão final a 72°C por 4 minutos.

4.8.5. IDENTIFICAÇÃO POR ELETROFORESE EM GEL AGAROSE 2%

Os resultados obtidos das reações foram avaliados em gel de agarose 2% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo brometo de etídeo (Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA) e visualizados em um transiluminador (Foto/Prep Transiluminator, Fotodyne Incorporated, Hartland, WI, USA) com luz ultravioleta. A seguir as imagens foram adquiridas através de um sistema de captura digital (AlphaDigiDoc® RT Gel Documentation System, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA).

Nos casos em que o gene da β -globina não fosse amplificado, os blocos foram novamente cortados e o material obtido submetido a todos os passos de extração, quantificação, amplificação e identificação. Se continuassem negativas, eram excluídas, pois denotam falta de material genético suficiente na amostra. Exceção foi dada aos casos que fossem negativos para β -globina, mas positivos para HPV, uma vez que o método de nPCR (usado para amplificar o DNA do HPV) consegue amplificar de forma mais eficiente o material genético que o PCR, usado para amplificar a β -globina.

4.8.6. TABULAÇÃO DOS DADOS

Os dados foram tabulados com o auxílio do programa Excel (Microsoft® Office Professional Plus 2007)

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis contínuas foram calculadas as médias e desvios padrões. Frequências e porcentagens são apresentadas para as variáveis categóricas. O teste de associação qui-quadrado de Pearson foi utilizado para testar associação entre variáveis categóricas. Comparação entre médias dos grupos de estudo foi testada usando a análise de variância de um fator (*ANOVA one-way*) e seguida pelo teste de Tukey para comparações entre pares de grupos[213].

O tempo de sobrevida para os pacientes NTNE foi analisado pelo método atuarial (tábuas de vida) e calculou-se a probabilidade de sobrevida a 1, 2, 3, 4 e 5 anos para os dados gerais e por variável de estudo. Curvas de Kaplan-Meier foram calculadas e o teste log-rank foi utilizado para comparação das curvas de sobrevida. Para o cálculo da razão de riscos (*hazard ratio*) foi utilizada a regressão de Cox[214].

Pacientes NTNE foram pareados com pacientes TE, e, para a comparação entre pares de pacientes, foi utilizado o teste Mc Nemar quando a variável tinha duas categorias. No caso de variáveis com mais de duas categorias foi calculado o estatístico de concordância Kappa (κ). Para as variáveis contínuas o teste não-paramétrico de Wilcoxon permitiu a comparação entre dados pareados[213].

Foram utilizados os programas estatísticos *PASW Statistics 18.0* (IBM, Somers, NY) e *Stata 9.0 for Windows* (StataCorp, Texas). O nível descritivo (valor de p) inferior a 5% foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

De Janeiro de 2001 a Fevereiro de 2009, foram incluídos no banco de dados do projeto 2007 pacientes. Aplicando-se os critérios previamente expostos, foram identificados 1659 pacientes elegíveis para análise. Desses, 26 casos foram excluídos por não apresentarem dados completos sobre tabagismo ou etilismo, até uma amostra final de 1633 pacientes.

5.1. DESCRIÇÃO DA AMOSTRA TOTAL DE PACIENTES

Os dados sociodemográficos, clínicos e patológicos dos 1633 pacientes selecionados para o estudo constam nas **tabelas 5 a 8**.

Tabela 5 - Características sócio-demográficas da amostra global de pacientes

Característica		N=1633 N (%)
Gênero	Feminino	231 (14,1)
	Masculino	1402 (85,9)
Idade (em anos)	Média (DP)	57,96 (10,69)
	Mediana (min-max)	57 (21-93)
Raça	Branco	1191 (72,9)
	Pardo	270 (16,5)
	Preto	114 (7,2)
	Amarelo	13 (0,8)
	Indígena	4 (0,2)
	S/I	41 (2,5)
Escolaridade	Alfabetizado	67 (4,1)
	Primário incompleto	422 (25,8)
	Primário completo	583 (35,7)
	Secundário incompleto	113 (6,9)
	Secundário completo	186 (11,4)
	Técnico	28 (1,7)
	Superior	49 (3,0)
Número de parentes tabagistas	S/I	185 (11,3)
Número de parentes com câncer/ número total de parentes	Média (DP)	4,07 (3,00)
	Mediana (min-max)	3 (0-20)
	Média (DP)	0,10 (0,13)
	Mediana (min-max)	0,07 (0-1,5)

DP: desvio padrão, min: mínimo, Max: máximo, S/I: sem informação

Tabela 6 - Distribuição conforme hábitos na amostra global de pacientes

Característica		N=1633 N (%)
Consumo de tabaco	Nunca fumou	119 (7,3)
	Somente no passado	391 (23,9)
	Ainda fuma	1123 (68,8)
Consumo de álcool	Nunca bebeu	220 (13,5)
	Somente no passado	575 (35,2)
	Ainda bebe	838 (51,3)
Categoria de caso	NTNE	80 (4,9)
	TE	1374 (84,1)
	TNE	140 (8,6)
	NTE	39 (2,4)

Tabela 7 - Características clínicas da amostra global de pacientes

Característica		N=1633 N (%)
IMC	Média (DP)	24,18 (4,06)
	Mediana (min-max)	23,73 (13,29-46,28)
Sítio anatômico	Cavidade oral	600 (36,7)
	Cavidade oral+faringe	148 (9,1)
	Orofaringe	264 (16,2)
	Laringe	468 (28,7)
	Hipofaringe	130 (8,0)
	Vários sítios	23 (1,4)
cT*	1, 1a, 1b	160 (9,8)
	2, r2	398 (24,4)
	3, r3	362 (22,2)
	4, 4a, 4b	633 (38,8)
	S/I	80 (4,9)
cN*	0	738 (45,2)
	1	236 (14,5)
	2a, 2b, 2c	483 (29,6)
	3, r3	96 (5,9)
	S/I	80 (4,9)
Estádio clínico*	0	1 (0,1)
	I	113 (6,9)
	II	251 (15,4)
	III	317 (19,4)
	IV	874 (53,5)
	S/I	77 (4,7)

DP: desvio padrão, S/I: sem informação, min: mínimo, Max: máximo, *estádio clínico conforme sistema TNM[207, 208]

Tabela 8 - Características patológicas da amostra global de pacientes

Característica		N=1633
		N (%)
pT*	0, <i>is</i> , <i>Ris</i> , R1	15 (0,9)
	1, 1a, 1b	174 (10,7)
	2, r2	348 (21,3)
	3, r3	239 (14,6)
	4a, 4b	596 (36,5)
	S/I	261 (16,0)
pN*	0	592 (36,3)
	1	174 (10,7)
	2a, 2b, 2c	500 (30,6)
	3, r3	53 (3,2)
	S/I	314 (19,2)
Estádio patológico*	0	5 (0,3)
	I	128 (7,8)
	II	195 (11,9)
	III	217 (13,3)
	IV	856 (52,4)
	S/I	232 (14,2)
Variante morfológica	Clássico	1360 (83,3)
	Verrucoso	9 (0,6)
	Escamoso	2 (0,1)
	Escamoso adenóide	2 (0,1)
	Escamoso basaloide	28 (1,7)
	Papilífero	4 (0,2)
	Fusocelular	6 (0,4)
	Linfoepitelial	1 (0,1)
	Pequenas células	1 (0,1)
	Acantolítico	2 (0,1)
	Adenoide	1 (0,1)
	Sólido	16 (1,0)
	S/I	201 (12,3)
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	523 (32,0)
	Moderadamente diferenciado	820 (50,2)
	Pouco diferenciado	127 (7,8)
	S/I	163 (10,0)
Invasão sanguínea	Ausente	1125 (68,9)
	Presente	179 (11,0)
	S/I	329 (20,1)
Invasão linfática	Ausente	808 (49,5)
	Presente	444 (27,2)
	S/I	381 (23,3)
Invasão perineural	Ausente	763 (46,7)
	Presente	540 (33,1)
	S/I	330 (20,2)
Infiltrado inflamatório	Ausente	117 (7,2)
	Escasso	419 (25,7)
	Moderado	501 (30,7)
	Intenso	103 (6,3)
	S/I	493 (30,2)

S/I: sem informação, *estádio patológico conforme sistema TNM[207, 208]

5.2. ANÁLISE POR GRUPOS CONFORME TABAGISMO E ETILISMO

Dos 1633 casos restantes, 80 pacientes não eram tabagistas ou etilistas (NTNE:4,9%), 1374 eram tabagistas e etilistas (TE:84,1%), 140 eram tabagistas atuais ou no passado mas não etilistas (TNE:8,6%) e 39 eram apenas etilistas atuais ou no passado, mas não tabagistas (NTE:2,4%). Os dados sociodemográficos, clínicos e patológicos dos pacientes pertencentes aos quatro grupos estão nas **tabelas 9 a 11**. As variáveis contínuas foram comparadas grupo a grupo pelo Teste de Tukey e foram atribuídas letras iguais a grupos sem diferença estatística significativa. As variáveis categóricas que mostraram diferença estatística foram comparadas duas a duas pelo teste qui-quadrado e os resultados estão detalhados nas **figuras 7 a 11 e 13 a 15**. Na **Figura 12** observa-se o gráfico de dispersão dos pacientes em cada grupo, segundo gênero, idade e sítio anatômico.

Tabela 9 - Comparação entre os grupos classificados segundo consumo de tabaco e álcool para as variáveis sócio-demográficas.

Característica	NTNE N=80 N (%)	TE N=1374 N (%)	TNE N=140 N (%)	NTE N=39 N (%)	Valor p
Gênero					<0,001 [§]
Feminino	57 (71,3)	96 (7,0)	67 (47,9)	11 (28,2)	
Masculino	23 (28,8)	1278 (93,0)	73 (52,1)	28 (71,8)	
Idade (em anos)					<0,001 [§]
Média (DP)	62,79 (16,30)	57,13 (9,79)	62,21 (11,74)	62,33 (15,12)	
Comparação [¶]	b	a	b	b	
Raça					<0,001 [§]
Branco	65 (82,3)	988 (74,0)	106 (76,8)	32 (82,1)	
Pardo	5 (6,3)	242 (18,1)	22 (15,9)	1 (2,6)	
Preto	4 (5,1)	99 (7,4)	6 (4,3)	5 (12,8)	
Amarelo	4 (5,1)	4 (0,3)	4 (2,9)	1 (2,6)	
Indígena	1 (1,3)	3 (0,2)	0	0	
Escolaridade					0,001 [§]
Alfabetizado	10 (14,5)	47 (3,8)	8 (7,3)	2 (5,9)	
Primário incompleto	20 (29,0)	363 (29,4)	33 (30,3)	6 (17,6)	
Primário completo	16 (23,2)	509 (41,2)	40 (36,7)	18 (52,9)	
Secundário incompleto	4 (5,8)	102 (8,3)	6 (5,5)	1 (2,9)	
Secundário completo	11 (15,9)	151 (12,2)	18 (16,5)	6 (17,6)	
Técnico	2 (2,9)	26 (2,1)	0	0	
Superior	6 (8,7)	38 (3,1)	4 (3,7)	1 (2,9)	
Número de parentes tabagistas					<0,001 [§]
Média (DP)	2,39 (2,38)	4,17 (2,93)	4,44 (3,76)	3,16 (2,52)	
Comparação [¶]	a	b	b	a, b	
Número de parentes com câncer/ número total de parentes					0,406 [§]
Média (DP)	0,08 (0,10)	0,10 (0,14)	0,09 (0,13)	0,10 (0,14)	

DP: desvio padrão. [§] Teste de associação qui-quadrado. [¶] Análise de variância (ANOVA *one-way*) para comparação de médias entre grupos. [¶] Teste de Tukey para comparações múltiplas entre grupos, grupos com a mesma letra não têm diferenças significativas ($p>0,05$).

Figura 7: Comparação da distribuição de gênero em relação aos hábitos de tabagismo e etilismo, grupo a grupo. [§] Teste de associação qui-quadrado de Pearson.

Figura 8: Comparação da distribuição de raça em relação aos hábitos de tabagismo e etilismo, grupo a grupo. * Teste de associação qui-quadrado de Pearson.

Figura 9: Comparação da distribuição de escolaridade em relação aos hábitos de tabagismo e etilismo, grupo a grupo. * Teste de associação qui-quadrado de Pearson.

Tabela 10 - Comparação entre os grupos classificados segundo consumo de tabaco e álcool para as variáveis clínicas.

	NTNE N=80 N (%)	TE N=1374 N (%)	TNE N=140 N (%)	NTE N=39 N (%)	Valor p
IMC					<0,001 [*]
Média (DP)	26,81 (4,89)	23,92 (3,88)	24,58 (4,53)	26,62 (4,06)	
Comparação [¶]	b	a	a	b	
Sítio anatômico¹					<0,001 [§]
Cavidade oral	50 (62,5)	493 (35,9)	43 (30,7)	14 (35,9)	
Cavidade oral+faringe	7 (8,8)	114 (8,3)	20 (14,3)	7 (17,9)	
Orofaringe	11 (13,8)	241 (17,5)	7 (5,0)	5 (12,8)	
Laringe	11 (13,8)	384 (27,9)	62 (44,3)	11 (28,2)	
Hipofaringe	1 (1,3)	119 (8,7)	8 (5,7)	2 (5,1)	
Vários sítios	0	23 (1,7)	0	0	
cT*					0,369 [§]
1, 1a, 1b	11 (14,9)	129 (9,8)	14 (10,9)	6 (16,2)	
2, r2	24 (32,4)	326 (24,8)	40 (31,0)	8 (21,6)	
3, r3	13 (17,6)	310 (23,6)	29 (22,5)	10 (27,0)	
4, 4a, 4b	26 (35,1)	548 (41,7)	46 (35,7)	13 (35,1)	
cN*					<0,001 [§]
0	46 (62,2)	586 (44,6)	84 (65,1)	22 (59,5)	
1	7 (9,5)	212 (16,1)	11 (8,5)	6 (16,2)	
2a, 2b, 2c	20 (27,0)	426 (32,4)	30 (23,3)	7 (18,9)	
3, r3	1 (1,4)	89 (6,8)	4 (3,1)	2 (5,4)	
cM*					0,563 [§]
0	72 (100,0)	1202 (99,1)	118 (100,0)	34 (100,0)	
1	0	11 (0,9)	0	0	
Metástase linfonodal clínica					<0,001
Não	46 (62,2)	586 (44,6)	84 (65,1)	22 (59,5)	
Sim	28 (37,8)	727 (55,4)	45 (34,9)	15 (40,5)	
Estádio clínico^{*2}					0,029 [§]
0	0	1 (0,1)	0	0	
I	10 (13,5)	87 (6,6)	13 (10,1)	3 (8,1)	
II	16 (21,6)	199 (15,1)	30 (23,3)	6 (16,2)	
III	13 (17,6)	266 (20,2)	29 (22,5)	9 (24,3)	
IV	35 (47,3)	763 (58,0)	57 (44,2)	19 (51,4)	

DP: desvio padrão. ¹Excluindo "vários sítios". ²Excluindo EC=0. *estádio clínico conforme sistema TNM[207, 208]. [§] Teste de associação qui-quadrado. ^{*} Análise de variância (ANOVA *one-way*) para comparação de médias entre grupos. [¶] Teste de Tukey para comparações múltiplas entre grupos, grupos com a mesma letra não têm diferenças significativas (p>0,05).

Figura 10: Comparação da distribuição de sítios anatômicos em relação aos hábitos de tabagismo e etilismo, grupo a grupo. * Teste de associação qui-quadrado de Pearson.

Figura 11: Comparação da distribuição de metástases linfonodais clínicas em relação aos hábitos de tabagismo e etilismo, grupo a grupo. * Teste de associação qui-quadrado de Pearson.

Figura 12: Distribuição por gênero, idade e sítio conforme hábitos. **CO:** cavidade oral; **HF:** hipofaringe; **L:** Laringe; **OF:** orofaringe; **vários:** outras combinações de sítios

Tabela 11 - Comparação entre os grupos classificados segundo consumo de tabaco e álcool para as variáveis patológicas.

	NTNE N=80 N (%)	TE N=1374 N (%)	TNE N=140 N (%)	NTE N=39 N (%)	Valor p [§]
pT*					0,160
0, <i>is</i> , <i>Ris</i>	1 (1,4)	12 (1,1)	1 (0,8)	1 (3,0)	
1, 1a, 1b	15 (20,5)	140 (12,3)	15 (12,1)	4 (12,1)	
2, r2	26 (35,6)	280 (24,5)	34 (27,4)	8 (24,2)	
3, r3	11 (15,1)	196 (17,2)	23 (18,5)	9 (27,3)	
4a, 4b	20 (27,4)	514 (45,0)	51 (41,1)	11 (33,3)	
pN*					0,006
0	37 (54,4)	473 (42,8)	67 (57,8)	15 (48,4)	
1	5 (7,4)	143 (13,0)	21 (18,1)	5 (16,1)	
2a, 2b, 2c	25 (36,8)	441 (39,9)	25 (21,6)	9 (29,0)	
3, r3	1 (1,5)	47 (4,3)	3 (2,6)	2 (6,5)	
Metástase linfonodal à patologia					0,006
Não	37 (54,4)	473 (42,8)	67 (57,8)	15 (48,4)	
Sim	31 (45,6)	631 (57,2)	49 (42,2)	16 (51,6)	
Estádio patológico*[†]					0,005
0	0	4 (0,3)	1 (0,8)	0	
I	12 (16,2)	99 (8,5)	14 (11,1)	3 (8,6)	
II	15 (20,3)	152 (13,0)	21 (16,7)	7 (20,0)	
III	11 (14,9)	169 (14,5)	30 (23,8)	7 (20,0)	
IV	36 (48,6)	742 (63,6)	60 (47,6)	18 (51,4)	
Variante morfológica					0,123
Clássico	70 (94,6)	1151 (95,4)	106 (89,1)	33 (100,0)	
Verrucoso	2 (2,7)	5 (0,4)	2 (1,7)	0	
Escamoso	0	1 (0,1)	1 (0,8)	0	
Escamoso adenóide	0	2 (0,2)	0	0	
Escamoso basaloide	1 (1,4)	24 (2,0)	3 (2,5)	0	
Papilífero	1 (1,4)	2 (0,2)	1 (0,8)	0	
Fusocelular	0	4 (0,3)	2 (1,7)	0	
Linfoepitelial	0	0	1 (0,8)	0	
Pequenas células	0	1 (0,1)	0	0	
Acantolítico	0	1 (0,1)	1 (0,8)	0	
Adenoide	0	1 (0,1)	0	0	
Sólido	0	14 (1,2)	2 (1,7)	0	
Grau de diferenciação					0,005
Bem diferenciado	42 (55,3)	419 (34,0)	46 (35,9)	16 (45,7)	
Moderadamente diferenciado	29 (38,2)	702 (57,0)	70 (54,7)	19 (54,3)	
Pouco diferenciado	5 (6,6)	110 (8,9)	12 (9,4)	0	
Invasão sanguínea					0,571
Ausente	62 (91,2)	934 (85,8)	103 (88,0)	26 (83,9)	
Presente	6 (8,8)	154 (14,2)	14 (12,0)	5 (16,1)	
Invasão linfática					0,001
Ausente	50 (78,1)	653 (62,2)	86 (77,5)	19 (67,9)	
Presente	14 (21,9)	396 (37,8)	25 (22,5)	9 (32,1)	
Invasão perineural					0,495
Ausente	40 (58,8)	626 (57,8)	75 (62,5)	22 (68,8)	
Presente	28 (41,2)	457 (42,2)	45 (37,5)	10 (31,3)	
Infiltrado inflamatório					0,397
Ausente	5 (8,5)	100 (10,4)	12 (12,2)	0	
Escasso	21 (35,6)	355 (36,9)	35 (35,7)	8 (38,1)	
Moderado	23 (39,0)	428 (44,5)	40 (40,8)	10 (47,6)	
Intenso	10 (16,9)	79 (8,2)	11 (11,2)	3 (14,3)	

[§] Teste de associação qui-quadrado. [†] Excluindo EP=0. *estádio patológico conforme sistema TNM[207, 208]

Figura 13: Comparação da distribuição por estágio patológico em relação aos hábitos de tabagismo e etilismo, grupo a grupo. * Teste de associação qui-quadrado de Pearson.

Figura 14: Comparação da distribuição por grau de diferenciação histológica em relação aos hábitos de tabagismo e etilismo, grupo a grupo. * Teste de associação qui-quadrado de Pearson.

Figura 15: Comparação da distribuição da presença de invasão linfática à histologia em relação aos hábitos de tabagismo e etilismo, grupo a grupo. * Teste de associação qui-quadrado de Pearson.

5.3. ANÁLISE DOS PACIENTES NTNE

5.3.1. DETECÇÃO DE DNA DO HPV

Dos 80 pacientes NTNE, quatro foram excluídos das análises patológicas e moleculares por terem sido submetidos a tratamentos prévios à inclusão no banco de dados do GENCAPO. Dos 76 pacientes NTNE elegíveis, foi possível recuperar material parafinado de 64 deles. Três casos apresentaram reação negativa para β -globina, e foram excluídos

Dos 61 casos restantes, em 20 foi possível detectar a presença do HPV (32,8%), sendo 15 mulheres e cinco homens. Dos 20 casos em que foi possível detectar a presença do HPV, em 10 foi observada alguma marcação pelo p16 (maior que 5%) em: cavidade oral (5 casos); laringe (3 casos); orofaringe (1 caso) e cavidade oral e faringe (1 caso). **(Figura 16)**

Figura 16: Esquema gráfico do fluxo de material e resultados da pesquisa pelo DNA de HPV em NTNE

Entre os 41 pacientes NTNE HPV negativos, 31 eram mulheres e 10, homens. A **figura 17** mostra o gráfico de dispersão dos pacientes com tumores positivos e negativos para DNA do HPV, de acordo com sexo, idade e sítio anatômico.

Figura 17: Distribuição por gênero, idade e sítio em pacientes com tumores positivos e negativos para o HPV. **CO:** cavidade oral; **HF:** hipofaringe; **L:** Laringe; **OF:** orofaringe.

5.3.2. ANÁLISE DE SOBREVIDA DOS PACIENTES NTNE

Inicialmente foram considerados 76 pacientes NTNE, mas foram excluídos dois pacientes sem informação de seguimento. Dessa forma, 74 pacientes foram analisados em relação à sobrevida específica pela doença, de acordo com as variáveis demográficas, clínicas, patológicas e moleculares. Apenas variáveis categóricas são passíveis de análise por esses métodos. As tábuas de vida encontram-se nas **tabelas 12 e 13**.

Tabela 12 - Probabilidade de sobrevida para os pacientes NTNE segundo as variáveis demográficas, clínicas e patológicas.

Variável	Probabilidade de sobrevida					Tempo mediano*(anos)	p [†]
	1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos		
Geral	0,71	0,63	0,58	0,56	0,56	7,00	
Sexo							0,582
Feminino	0,75	0,65	0,58	0,58	0,58	7,00	
Masculino	0,64	0,59	0,59	0,51	0,51	5,00	
Sítio							0,061
Cavidade oral	0,66	0,55	0,47	0,47	0,47	2,64	
Cav.oral+faringe	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	6,00	
Orofaringe	0,76	0,64	0,64	0,64	0,64	7,00	
Laringe	0,91	0,91	0,91	0,76	0,76	6,00	
pT1*							0,013
pT1	0,93	0,86	0,86	0,86	0,86	7,00	
pT2	0,69	0,61	0,52	0,52	0,52	7,00	
pT3	0,56	0,33	0,33	0,33	0,33	1,25	
pT4	0,71	0,66	0,60	0,51	0,51	6,00	
pN*							0,002
pN0	0,88	0,75	0,70	0,70	0,70	7,00	
pN+	0,48	0,45	0,41	0,36	0,36	0,97	
Variante							0,895
Clássico	0,73	0,64	0,58	0,58	0,58	7,00	
Verrucoso	1,00	1,00	1,00	1,00	-	3,00	
Escamoso basalóide	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	6,00	
Grau de diferenciação							0,618
Bem Diferenciado	0,68	0,62	0,52	0,48	0,48	3,49	
Moderado	0,70	0,55	0,55	0,55	0,55	7,00	
Pouco Diferenciado	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	6,00	

*Tempo em que metade dos pacientes estão vivos. [†]Teste *log-rank*. *estádio patológico conforme sistema TNM[207, 208]

Tabela 13 - Probabilidade de sobrevida para os pacientes NTNE segundo as variáveis categóricas moleculares.

Variável	Probabilidade de sobrevida					Tempo mediano* (anos)	p [†]
	1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos		
HPV							0,965
Negativo	0,75	0,64	0,59	0,59	0,59	7,00	
Positivo	0,73	0,67	0,60	0,60	0,60	6,00	
FHIT Nu tumor							0,459
Negativo	0,75	0,65	0,58	0,58	0,58	7,00	
Positivo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	3,00	
FHIT Ct tumor							0,423
Negativo	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	6,00	
Positivo	0,75	0,64	0,56	0,56	0,56	7,00	
FHIT Nu MT							0,532
Negativo	0,84	0,76	0,67	0,67	0,67	7,00	
Positivo	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	4,00	
FHIT Ct MT							0,983
Negativo	0,89	0,77	0,64	0,64	0,64	7,00	
Positivo	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	7,00	
FHIT Nu CB							0,031
Negativo	0,88	0,82	0,72	0,72	0,72	7,00	
Positivo	0,54	0,36	0,36	0,36	0,36	1,21	
FHIT Ct CB							0,474
Negativo	0,92	0,83	0,74	0,74	0,74	7,00	
Positivo	0,79	0,71	0,63	0,63	0,63	7,00	
EGFR tumor							0,189
Negativo	1,00	0,83	0,83	0,83	0,83	5,00	
1+	1,00	1,00	0,80	0,80	0,80	6,00	
2+	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,75	
3+	0,73	0,55	0,45	0,45	0,45	2,50	
4+	0,77	0,69	0,64	0,64	0,64	6,00	
EGFR MT							0,157
Negativo	0,86	0,75	0,71	0,71	0,71	7,00	
1+	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	2,50	
2+	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	5,00	
3+	0,33	0,33	0,33	0,33	-	0,75	
VEGF tumor							0,319
Negativo	0,79	0,69	0,57	0,57	0,57	7,00	
1+	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,83	
2+	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	6,00	
3+	0,80	0,40	0,40	0,40	0,40	1,75	
4+	0,73	0,66	0,58	0,58	0,58	5,00	
VEGF MT							0,924
Negativo	0,81	0,73	0,65	0,65	0,65	7,00	
1+	1,00	1,00	1,00	-	-	2,00	
2+	0,80	0,60	0,60	0,60	0,60	6,00	
3+	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	5,00	
4+	0,67	0,67	0,67	-	-	2,00	
p16 tumor							0,046
Negativo	0,62	0,54	0,45	0,45	0,45	2,40	
Positivo	0,86	0,75	0,71	0,71	0,71	7,00	
p16 MT							0,540
Negativo	0,82	0,62	0,55	0,55	0,55	7,00	
Positivo	0,71	0,67	0,67	0,67	0,67	6,00	
p16 tumor*							0,004
0	0,62	0,54	0,45	0,45	0,45	2,40	
1	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	5,00	
2	0,63	0,38	0,23	0,23	0,23	1,50	
3	1,00	0,94	0,94	0,94	0,94	7,00	

Tabela 13, continuação.

Variável	Probabilidade de sobrevida					Tempo mediano* (anos)	p†
	1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos		
p16 MT*							0,507
0	0,82	0,62	0,55	0,55	0,55	7,00	
1	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	6,00	
2	0,86	0,71	0,71	0,71	0,71	6,00	
3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	6,00	
HPV e p16							0,301
HPV- p16-	0,63	0,52	0,40	0,40	0,40	2,18	
HPV- p16+	0,82	0,71	0,71	0,71	0,71	7,00	
HPV+ p16-	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	6,00	
HPV+ p16+	0,89	0,78	0,65	0,65	0,65	6,00	

*Tempo em que metade dos pacientes estão vivos. [†]Teste *log-rank*. * medição em cruzes **CB**: camada basal; **Ct**: citoplasma; **MT**: margem total; **Nu**: núcleo.

As curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para as variáveis categóricas estudadas que apresentaram diferença significativa estão representadas nas **figuras 18 a 22**. No **ANEXO A**, encontram-se as demais curvas de sobrevida para as variáveis categóricas testadas em pacientes NTNE.

Figura 18: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo estágio T. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 19: Curvas de sobrevivida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo estágio N. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 20: Curvas de sobrevivida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo marcação nuclear pelo FHIT em camada basal de amostras não tumorais. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 21: Curvas de sobrevivida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo marcação pelo p16 em amostras tumorais, pelo método dicotômico com nível de corte em 5%. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 22: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo marcação pelo p16 em amostras tumorais, pelo método de contagem em cruces. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

As variáveis patológicas que influenciaram significativamente a sobrevida de pacientes NTNE foram o estágio T e a presença de metástases linfonodais, fatores sabidamente relacionados à sobrevida. Em relação às variáveis moleculares, observamos que:

- a imunomarcção nuclear pelo FHIT em camada basal de tecidos não tumorais relacionou-se a pior sobrevida;
- quanto maior a imunomarcção pelo p16 em tecidos tumorais, maior a sobrevida, por ambos os métodos adotados de classificação. Na análise por cruces, consideraram-se principalmente os pacientes com nenhuma marcação ou com marcação 3+, pois poucos pacientes apresentaram 1+ ou 2+ de marcação para o p16 em amostras tumorais.

Estabeleceu-se ainda, através do Modelo de Regressão de Cox, a estimativa da razão de risco de óbito relacionado à doença, para cada categoria das variáveis numéricas e categóricas. (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14 - Regressão de Cox univariada para predição de risco de óbito para as variáveis demográficas, clínicas e patológicas em pacientes NTNE.

Variável	Razão de Risco	IC95	p
Sexo			
Feminino	1,00		
Masculino	1,24	0,52-2,63	0,583
Idade (em anos)*			
	1,03	1,00-1,05	0,053
Estadio			
T1	1,00		
T2	4,39	0,98-19,64	0,053
T3	7,44	1,49-37,00	0,014
T4	4,12	0,89-19,11	0,070
N			
N0	1,00		
N+	2,97	1,43-6,15	0,003
Sítio			
Cavidade oral	1,00		
Cav.oral+faringe	0,27	0,04-2,02	0,204
Orofaringe	0,64	0,19-2,13	0,469
Laringe	0,27	0,06-1,16	0,079
Hipofaringe	4,70	0,60-36,69	0,140
Grau de diferenciação			
Bem Diferenciado	1,00		
Moderado	0,90	0,43-1,87	0,774
Pouco Diferenciado	0,38	0,05-2,86	0,349

* aumento do risco para cada ano de acréscimo, IC95: intervalo de confiança, 95%

Tabela 15 - Regressão de Cox univariada para predição de risco de óbito para as variáveis moleculares em pacientes NTNE.

Variável [§]	Razão de Risco	IC95	p	n
HPV				
Negativo	1,00			59
Positivo	1,02	0,42-2,48	0,965	
p53 tumor*	0,59	0,15-2,27	0,443	49
p53 MT*	1,98	0,10-40,35	0,657	38
p53 CB*	1,86	0,16-22,01	0,622	38
Ki-67 tumor*	0,66	0,02-17,68	0,803	46
Ki-67 MT *	0,08	0,00-36,79	0,426	37
FHIT Ct tumor				53
Negativo	1,00			
Positivo	1,80	0,42-7,73	0,429	
FHIT Nu MT				41
Negativo	1,00			
Positivo	1,90	0,25-14,64	0,539	
FHIT Ct MT				41
Negativo	1,00			
Positivo	1,01	0,31-3,29	0,983	
FHIT Nu CB				41
Negativo	1,00			
Positivo	3,42	1,04-11,24	0,042	
FHIT Ct CB				41
Negativo	1,00			
Positivo	1,60	0,44-5,80	0,478	
EGFR tumor				53
Negativo	1,00			
1+	0,97	0,06-15,51	0,983	
2+	8,26	0,75-91,48	0,085	
3+		0,48-33,18	0,200	
4+	2,52	0,32-19,93	0,380	
p16 tumor				55
Negativo	1,00			
Positivo	0,42	0,18-1,01	0,053	
p16 MT				38
Negativo	1,00			
Positivo	0,72	0,25-2,06	0,542	
p16 tumor[†]				55
0	1,00			
1	0,73	0,10-5,56	0,762	
2	1,47	0,56-3,83	0,430	
3	0,07	0,01-0,55	0,011	
HPV e p16				52
HPV- p16-	1,00			
HPV- p16+	0,41	0,14-1,20	0,104	
HPV+ p16-	0,97	0,27-3,50	0,966	
HPV+ p16+	0,48	0,13-1,71	0,256	

[§]Apenas as variáveis em que o cálculo foi possível, por número suficiente em cada categoria.* aumento do risco para cada 1% de acréscimo. [†]medição em cruces. **CB**: camada basal; **Ct**: citoplasma; **IC95**: intervalo de confiança, 95%. **Nu**: núcleo; **MT**: margem total.

As variáveis associadas a aumento significativo do risco de óbito em pacientes NTNE foram:

- estágio T, em especial T3.
- a presença de metástases linfonodais

- a marcação nuclear pelo FHIT na camada basal de amostras não tumorais
- a marcação intensa (3+) pelo p16 em amostras tumorais

5.4. ANÁLISE POR PARES

Após pareamento conforme hábitos de tabagismo e etilismo (NTNE:TE), por sexo, idade, estágio T, presença de metástases linfonodais, grau de diferenciação, variante morfológica e sítio, formaram-se a partir dos 76 pacientes NTNE e dos 34 pacientes TE, 47 pares de pacientes. Esses pares foram comparados, cada par como uma unidade, em relação à sobrevida específica à doença, à marcação imunohistoquímica e à positividade ao HPV.

5.4.1. SOBREVIDA

Os dados de sobrevida específica à doença dos pacientes NTNE e TE do pareamento encontram-se na tabela de vida e curvas de sobrevida abaixo. (**tabela 16 e figura 23**) Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as curvas de sobrevida dos pacientes NTNE e TE (teste *log-rank*, valor de $p=0,975$).

Tabela 16 - Tábua de vida para os pacientes NTNE e TE.

Hábito	Probabilidade de sobrevida					Tempo mediano* (em anos)
	1-ano	2-anos	3-anos	4-anos	5-anos	
NTNE	0,70	0,61	0,55	0,52	0,52	7,00
TE	0,78	0,78	0,45	0,45	0,45	2,86

*Tempo em que metade dos pacientes estão vivos

Figura 23: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE e TE. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP

5.4.2.MARCADORES BIOLÓGICOS

5.4.2.1. EM AMOSTRAS TUMORAIS

5.4.2.1.1. FHIT

Foram passíveis de análise 55 tumores de pacientes NTNE e 26 tumores de pacientes TE. Todos os pacientes que apresentaram marcação nuclear também apresentavam marcação citoplasmática, porém, muitos pacientes com marcação citoplasmática não apresentaram marcação nuclear. A **figura 24** exemplifica a marcação nuclear e citoplasmática em amostra tumoral de um paciente.

Figura 24: marcação nuclear e citoplasmática pelo FHIT em amostras tumorais (400x)

A **tabela 17** mostra a análise dos dados de positividade para o FHIT em amostras tumorais dos pares. Nessa tabela, dispõem-se os dados de pacientes TE (na horizontal e acima) e NTNE (na vertical e à esquerda), a fim de se estabelecer a quantidade de pares (NTNE:TE) em que os pacientes foram concordantes (positivo:positivo ou negativo:negativo) ou discordantes (positivo:negativo ou negativo:positivo). Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os pares discordantes da expressão citoplasmática ou nuclear do FHIT em amostras tumorais.

Tabela 17 - Análise da marcação nuclear e citoplasmática pelo FHIT em amostras tumorais de pacientes pareados NTNE- TE

		TE		Total	Valor p [¶]
		Negativo	Positivo		
NTNE	FHIT nuclear				
	Negativo	25 (92,6)	1 (3,7)	26 (96,3)	1,000
	Positivo	1 (3,7)	0	1 (3,7)	
	FHIT citoplasmática				0,375
	Negativo	0	14 (14,3)	14 (14,3)	
	Positivo	1 (3,6)	23 (82,1)	24 (85,7)	

[¶] Teste *McNemar*

5.4.2.1.2. EGFR

Foram passíveis de análise 55 tumores de pacientes NTNE e 24 tumores de pacientes TE. A **figura 25** exemplifica a marcação de membrana celular em amostra tumoral de um paciente.

Figura 25: marcação de membrana celular pelo EGFR em amostra tumoral (200x)

A **tabela 18** mostra a análise dos dados de positividade para o EGFR em amostras tumorais dos pares. Não foi possível calcular o valor estatístico de

Kappa, pois não se tinha informação disponível em algumas das categorias para um dos grupos analisados (informação por pares).

Tabela 18 - Análise da marcação para EGFR em amostras tumorais de pacientes pareados NTNE- TE

		TE					Total	Valor p
	EGFR	Negativo	1+	2+	3+	4+		
NTNE	Negativo	0	0	0	1 (4,0)	1 (4,0)	2 (8,08)	-
	1+	0	0	0	0	4 (16,0)	4 (16,0)	
	2+	0	0	0	0	1 (4,0)	1 (4,0)	
	3+	1 (4,0)	0	0	0	3 (12,0)	4 (16,0)	
	4+	2 (8,0)	0	0	4 (16,0)	8 (32,0)	14 (56,0)	

Estatística de concordância Kappa

5.4.2.1.3. VEGF

Foram passíveis de análise 52 tumores de pacientes NTNE e 27 tumores de pacientes TE. A **figura 26** exemplifica a marcação citoplasmática em amostra tumoral de um paciente.

Figura 26: marcação citoplasmática pelo VEGF em amostra tumoral (200x)

A **tabela 19** mostra a análise dos dados de positividade para o VEGF em amostras tumorais dos pares. Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os pares discordantes na expressão do VEGF em amostras tumorais.

Tabela 19 - Análise da marcação para VEGF em amostras tumorais de pacientes pareados NTNE- TE

		TE					Total	Valor p
		Negativo	1+	2+	3+	4+		
NTNE	VEGF							0,425
	Negativo	2 (7,4)	2 (7,4)	2 (7,4)	0	2 (7,4)	8 (29,6)	
	1+	1 (3,7)	1 (3,7)	0	2 (7,4)	1 (3,7)	5 (18,5)	
	2+	0	1 (3,7)	0	0	1 (3,7)	2 (7,4)	
	3+	0	1 (3,7)	1 (3,7)	0	2 (7,4)	4 (14,8)	
	4+	1 (3,7)	3 (11,1)	1 (3,7)	2 (7,4)	1 (3,7)	8 (29,6)	

Estatística de concordância Kappa

5.4.2.1.4. Ki-67

Foram passíveis de análise 47 tumores de pacientes NTNE e 21 tumores de pacientes TE. A **figura 27** exemplifica a marcação nuclear em amostra tumoral de um paciente.

Figura 27: marcação nuclear pelo Ki-67 em amostra tumoral (200x)

A **tabela 20** mostra a análise dos dados de positividade para o Ki-67 em amostras tumorais dos pares. Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os pares discordantes na expressão do Ki-67 em amostras tumorais.

Tabela 20 - Análise da marcação pelo Ki-67 em amostras tumorais de pacientes pareados NTNE- TE

Variável		Média (DP)	Mediana	Estatístico Z [‡]	Valor p
Ki-67	NTNE	0,26 (0,14)	0,28	-0,821	0,411
	TE	0,29 (0,18)	0,28		

[‡] Teste não paramétrico de Wilcoxon para grupos pareados.

5.4.2.1.5. p53

Foram passíveis de análise 51 tumores de pacientes NTNE e 26 tumores de pacientes TE. A **figura 28** exemplifica a marcação nuclear em amostra tumoral de um paciente.

Figura 28: marcação nuclear pelo p53 em amostra tumoral (200x)

A **tabela 21** mostra a análise dos dados de positividade para o p53 em amostras tumorais dos pares. Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os pares discordantes na expressão do p53 em amostras tumorais.

Tabela 21 - Análise da marcação pelo p53 em amostras tumorais de pacientes pareados NTNE- TE

Variável		Média (DP)	Mediana	Estatístico Z [‡]	Valor p
p53	NTNE	0,58 (0,34)	0,69	-0,865	0,387
	TE	0,45 (0,35)	0,49		

[‡] Teste não paramétrico de Wilcoxon para grupos pareados.

5.4.2.1.6. p16

Foram passíveis de análise 56 tumores de pacientes NTNE e 25 tumores de pacientes TE. A **figura 29** exemplifica a marcação nuclear e citoplasmática em amostra tumoral de um paciente. A marcação nuclear foi coincidente com a citoplasmática em todos os casos e, por esse motivo, não foram analisadas separadamente.

Figura 29: marcação nuclear e citoplasmática pelo p16 em amostra tumoral (100x)

A **tabela 22** mostra a análise dos dados de positividade para o p16 em amostras tumorais dos pares, a partir dos dois métodos de análise: avaliação dicotômica em positivo e negativo com nível de corte em 5% e avaliação em cruzes. Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os pares discordantes na expressão do p16 em amostras tumorais.

Tabela 22 - Análise da marcação pelo p16 pelos dois métodos escolhidos, em amostras tumorais de pacientes pareados NTNE- TE

NTNE		TE				Total	Valor p
	p16						
	Negativo	Negativo	Positivo (>5%)				
	Negativo	12 (44,4)	5 (18,5)			17 (63,0)	1,000 [¥]
	Positivo (>5%)	4 (14,8)	6 (22,2)			10 (37,0)	
NTNE	p16	Negativo	1+	2+	3+		- [¶]
	Negativo	12 (44,4)	2 (7,4)	2(7,4)	1 (3,7)	17 (63,0)	
	1+	1 (3,7)	0	0	0	1 (3,7)	
	2+	1 (3,7)	0	3(11,1)	0	4 (14,8)	
	3+	2 (7,4)	0	2 (7,4)	1 (3,7)	5 (18,5)	

¥ Teste McNemar para comparação de amostras pareadas. ¶ Estatística de concordância Kappa, não foi possível a análise pela ausência de casos em algumas categorias.

5.4.2.1.7. HPV

Dos 34 pacientes TE selecionados como pares, em 4 não foi possível recuperar o material biológico. Dos 30 casos restantes, não foi possível amplificar o DNA da β -globina, restando para análise, 29 casos (**Figura 30**)

Figura 30: Esquema gráfico do fluxo de material e resultados da pesquisa pelo DNA de HPV em TE

A **tabela 23** mostra a análise da positividade para o HPV nos pares NTNE-TE. Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os pares discordantes na detecção do HPV em amostras tumorais.

Tabela 23 - Análise da detecção do DNA do HPV em amostras de pacientes pareados NTNE-TE

NTNE		TE		Total	Valor p [¥]
		Negativo	Positivo		
	HPV				0,180
	Negativo	24 (72,7)	2 (8,7)	26 (78,8)	
	Positivo	7 (21,2)	0	7 (21,2)	

¥ teste McNemar

5.4.2.2. MARGENS

5.4.2.2.1. FHIT

Foram passíveis de análise 42 amostras de epitélio normal em margens não tumorais de pacientes NTNE e 24 de pacientes TE. As **figuras 31A e 30B** exemplificam a marcação nuclear e citoplasmática de camada basal e de toda a margem em amostras não tumorais de pacientes. Todos os pacientes que apresentaram marcação nuclear também apresentavam marcação citoplasmática, porém, muitos pacientes com marcação citoplasmática não apresentaram marcação nuclear.

Figura 31: marcação nuclear e citoplasmática em camada basal (A) e em toda a margem (B) pelo FHIT em amostras não tumorais de pacientes pareados NTNE-TE (100 e 400x)

A **tabela 24** mostra a análise dos dados de positividade para o FHIT em amostras não tumorais dos pares. Encontraram-se diferenças estatisticamente

significativas entre os pares discordantes na expressão nuclear em camada basal de amostras não tumorais entre os pacientes NTNE e TE ($p=0,021$).

Tabela 24 - Análise da marcação nuclear e citoplasmática pelo FHIT em amostras não tumorais de pacientes pareados NTNE- TE

		TE		Total	Valor p [¥]
		Negativo	Positivo		
NTNE	FHIT nuclear margem total				1,000
	Negativo	15 (83,3)	2 (11,1)	17 (94,4)	
	Positivo	1 (5,6)	0	1 (5,6)	
	FHIT citoplasma margem total				0,180
	Negativo	5 (27,8)	7 (38,9)	12 (66,7)	
	Positivo	2 (11,1)	4 (22,2)	6 (33,3)	
	FHIT nuclear camada basal				0,021
	Negativo	7 (38,9)	9 (50,0)	16 (88,9)	
	Positivo	1 (5,6)	1 (5,6)	2 (11,1)	
	FHIT citoplasma camada basal				-
	Negativo	0	5 (27,8)	5 (27,8)	
	Positivo	0	13 (72,2)	13 (72,2)	

[¥] Teste McNemar

5.4.2.2.2. EGFR

Foram passíveis de análise 39 margens não tumorais de pacientes NTNE e 21 de pacientes TE. A **figura 32** exemplifica a marcação de membrana celular em amostra não tumoral de um paciente.

Figura 32: marcação de membrana celular pelo EGFR em amostra não tumoral (200x)

A **tabela 25** mostra a análise dos dados de positividade para o EGFR em amostras tumorais dos pares. Não foi possível calcular o estatístico de Kappa, pois essa análise é prejudicada pela ausência de casos em algumas das categorias para um dos grupos analisados.

Tabela 25 - Análise da marcação pelo EGFR em amostras não tumorais de pacientes pareados NTNE- TE

		TE					Total	Valor p
	EGFR margem total	Negativo	1+	2+	3+	4+		-
NTNE	Negativo	6 (40,0)	0	3 (20,0)	2 (13,3)	1 (6,7)	12 (80,0)	
	1+	1 (6,7)	0	0	0	0	1 (6,7)	
	2+	0	0	1 (6,7)	0	0	1 (6,7)	
	3+	0	0	1 (6,7)	0	0	1 (6,7)	
	4+	0	0	0	0	0	0	

Estatística de concordância Kappa

5.4.2.2.3. VEGF

Foram passíveis de análise 38 margens não tumorais de pacientes NTNE e 17 de pacientes TE. A **figura 33** exemplifica a marcação citoplasmática em amostra não tumoral de um paciente.

Figura 33: marcação citoplasmática pelo VEGF em amostra não tumoral (200x)

A **tabela 26** mostra a análise dos dados de positividade para o VEGF em amostras não tumorais dos pares. Não foi possível calcular o estatístico de Kappa, pois não se tinha informação disponível em algumas das categorias para um dos grupos analisados (informação por pares).

Tabela 26 - Análise da marcação para VEGF em amostras não tumorais de pacientes pareados NTNE- TE

NTNE		TE					Total	Valor p
	VEGF margem total	Negativo	1+	2+	3+	4+		-
	Negativo	4 (36,4)	0	0	2 (18,2)	0	6 (54,5)	
	1+	1 (9,1)	0	0	0	0	1 (9,1)	
	2+	0	0	0	0	0	0	
	3+	0	0	0	1 (9,1)	0	1 (9,1)	
	4+	3 (27,3)	0	0	0	0	3 (27,3)	

Estatística de concordância Kappa

5.4.2.2.4. Ki-67

Foram passíveis de análise 38 margens não tumorais de pacientes NTNE e 16 de pacientes TE. A **figura 34** exemplifica a marcação nuclear em amostra não tumoral de um paciente.

Figura 34: marcação nuclear pelo Ki-67 em amostra não tumoral (100x)

A **tabela 27** mostra a análise dos dados de positividade para o Ki-67 em amostras não tumorais dos pares. Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os pares discordantes na expressão de Ki-67 em amostras não tumorais.

Tabela 27 - Análise da marcação pelo Ki-67 em amostras não tumorais de pacientes pareados NTNE- TE

Variável		Média (DP)	Mediana	Estatístico Z [‡]	Valor p
Ki-67 margem total	NTNE	0,17 (0,10)	0,15	-1,478	0,139
	TE	0,12 (0,12)	0,12		

[‡] Teste não paramétrico de Wilcoxon para grupos pareados.

5.4.2.2.5. p53

Foram passíveis de análise 39 margens não tumorais de pacientes NTNE e 19 de pacientes TE. A **figura 35** exemplifica a marcação nuclear em camada basal e todo o epitélio em amostra não tumoral de um paciente.

Figura 35: marcação nuclear pelo p53 em camada basal (A) e toda a margem (B) de amostra não tumoral (200x)

A **tabela 28** mostra a análise dos dados de positividade para o p53 em amostras não tumorais dos pares. Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os pares discordantes na expressão de p53 em amostras não tumorais.

Tabela 28 - Análise da marcação pelo p53 em amostras não tumorais de pacientes pareados NTNE- TE

Variável		Média (DP)	Mediana	Estatístico Z [‡]	Valor p
p53 margem total	NTNE	0,19 (0,23)	0,10	-0,734	0,463
	TE	0,15 (0,16)	0,10		
p53 camada basal	NTNE	0,27 (0,26)	0,14	-0,874	0,382
	TE	0,17 (0,21)	0,10		

[‡] Teste não paramétrico de Wilcoxon para grupos pareados.

5.4.2.2.6. p16

Foram passíveis de análise 40 margens não tumorais de pacientes NTNE e 24 de pacientes TE. A **figura 36** exemplifica a marcação nuclear e citoplasmática em amostra não tumoral de um paciente. A marcação nuclear foi coincidente com a citoplasmática em todos os casos e, por esse motivo, não foram analisadas separadamente.

Figura 36: marcação nuclear e citoplasmática pelo p16 em amostra não tumoral (100x)

A **tabela 29** mostra a análise dos dados de positividade para o p16 em amostras não tumorais dos pares, a partir dos dois métodos escolhidos para

análise. Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os pares discordantes na expressão do p16 em amostras não tumorais.

Tabela 29 - Análise da marcação pelo p16 pelos dois métodos escolhidos, em amostras não tumorais de pacientes pareados NTNE- TE

NTNE		TE				Total	Valor p
	p16 margem total	Negativo	Positivo				0,754 [¥]
	Negativo	1 (6,3)	4 (25,0)			5 (31,3)	
	Positivo	6 (37,5)	5 (31,3)			11 (68,8)	
NTNE	p16 margem total	Negativo	1+	2+	3+		0,052 [¶]
	Negativo	1 (6,3)	0	4 (25,0)	0	5 (31,3)	
	1+	2 (12,5)	0	2 (12,5)	1 (6,3)	5 (31,3)	
	2+	2 (12,5)	1 (6,3)	0	0	3 (18,8)	
	3+	2 (12,5)	1 (6,3)	0	0	3 (18,8)	

¥ Teste McNemar para comparação de amostras pareadas. ¶ Estatística de concordância Kappa.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O CECP é um problema de saúde epidemiologicamente relevante no mundo, por sua frequência e agressividade. A importância do tabaco e do álcool está bem definida na sua etiologia, mas uma minoria dos pacientes acometidos pela doença não é tabagista ou etilista. Por ser uma doença relacionada a hábitos, espera-se que diferenças geográficas e culturais sejam observadas no perfil de pacientes com CECP. Desde o início desse projeto e até os dias atuais, desconhecemos estudos no Brasil especificamente sobre pacientes NTNE com CECP. Esse grupo, por ser pouco frequente, permanece ainda mal caracterizado, pois são necessárias grandes séries de casos para se obter um número significativo de pacientes NTNE com CECP.

O GENCAPO, entre 2001 e 2009 incluiu 2007 pacientes tratados em cinco serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e constituiu um banco de dados padronizados e prospectivamente coletados de pacientes, acompanhados por longo período. Esse grupo, financiado atualmente pela FAPESP e formado por cirurgiões, patologistas, epidemiologistas e pesquisadores básicos, viabilizou a realização desse estudo. Nesse contexto, desenvolvemos um estudo multi-institucional, prospectivo, observacional, longitudinal, de indivíduos expostos ao risco e não expostos e de natureza exploratória.

Para esse estudo, selecionamos apenas sítios cujos tumores são classicamente relacionados ao tabaco e álcool. Assim, tumores de lábio, cavidade nasal, nasofaringe e seios paranasais foram excluídos. Apesar de tumores metastáticos com sítio primário desconhecido serem frequentemente originários da orofaringe, optamos por não incluí-los, pois a origem em nasofaringe não poderia ser excluída. Assim, os pacientes participantes do GENCAPO, com CECP em sítios potencialmente relacionados ao cigarro e álcool, são em sua maioria homens, em uma relação de 6:1, com média de idade de 57 anos, mais frequentemente da raça branca e com baixos índices de escolaridade. Esse último achado é compatível com a maior concentração do tabagismo entre indivíduos com menores taxas de escolaridade, o que pode refletir também menores níveis socioeconômicos[23, 215]. De fato, as instituições participantes do GENCAPO prestam atendimento pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Isso também pode ter influenciado na menor proporção de pacientes NTNE com tumores de orofaringe

relacionados ao HPV, já que esses tumores parecem afetar pacientes de camadas sociais mais elevadas.

Mais de 90% dos pacientes são tabagistas atuais ou no passado e mais de 85% são ou foram etilistas. Os sítios mais frequentemente acometidos são a cavidade oral, seguida pela laringe e orofaringe. Chama atenção que mais de 70% dos casos são diagnosticados em estádios avançados (III e IV). Esses dados são compatíveis com estudos prévios e de estatísticas regionais e nacionais[21, 197, 216, 217]. É importante ressaltar que essa não pode ser considerada uma amostra populacional brasileira de pacientes com CECP. Trata-se de pacientes encaminhados para serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço de cinco instituições do Estado de São Paulo. Assim, pacientes com CECP tratados por outras especialidades médicas, em que não foi necessária intervenção por cirurgião de cabeça e pescoço dessas instituições, não foram incluídos no banco de tumores. Além disso, por se tratarem de instituições de cuidado terciário e quaternário, pacientes com lesões iniciais que puderam ser tratados em instituições de menor complexidade, podem igualmente não terem sido contemplados, da mesma forma que pacientes em estádios avançados, sem perspectiva de tratamento curativo.

Pela quantidade e qualidade dos dados coletados, foi possível analisar de forma mais ampla as diversas características estudadas em pacientes com padrões de hábitos distintos, ou seja, aqueles que apresentavam apenas um dos hábitos de tabagismo ou etilismo, nenhum deles ou ambos. A maior parte das séries previamente relatadas avalia apenas pacientes tabagistas versus não tabagistas, ou NTNE versus tabagistas e/ou etilistas. Acreditamos que essa separação em quatro grupos foi oportuna, já que pudemos não apenas descrever o perfil dos pacientes em cada grupo, mas propor efeitos específicos do álcool ou tabaco sobre determinadas características. Existe grande variabilidade entre os estudos no que se refere a critérios definidores de tabagismo e etilismo, bem como suas graduações (tabagistas ou etilistas leves, moderados ou intensos). **(Tabela 30)** Para esse estudo, optou-se por critérios já estabelecidos pelo grupo de epidemiologistas do GENCAPO, que são habitualmente adotados por outros consórcios e banco de dados internacionais[41].

Tabela 30 - Critérios definidores de tabagismo e etilismo rotineiramente utilizados
Critério definidor de tabagismo

Fumou mais do que 100 cigarros durante a vida[218-223]

Fumou um ou mais cigarros por dia por ao menos um ano[224-228]

Fumou ao menos meio pacote por semana por ao menos um ano[229]

Fumou “regularmente”[230]

Critério definidor de etilismo

Se qualquer consumo de álcool[218, 224-226, 230]

Consumiu mais do que quatro doses ao ano[219]

Consumiu uma ou mais doses por mês, por ao menos seis meses[221]

Consumiu 12 ou mais doses na vida[223]

Consumiu ao menos uma dose ao mês[228]

Consumiu uma ou mais doses por semana por ao menos um ano[222, 227, 229]

Entendemos que os critérios adotados, principalmente para classificação de etilismo, foram rigorosos. Contudo, garantiram a pureza da amostra de não etilistas. Além disso, a maioria dos pacientes etilistas consumia quantidade muito superior de álcool do que as estipuladas como critérios definidores de etilismo nesse estudo.

Os pacientes NTNE representaram 4,9% do total estudado. Essa proporção é similar à encontrada nos poucos estudos que analisam pacientes que não fumam e que também não consomem álcool[16, 17]. Nessa casuística, entre os NTNE predominaram as mulheres, preferencialmente idosas, com tumores da cavidade oral. Além de intrigante, esse parece ser um grupo constante em todos os estudos com pacientes NTNE com CECP, porém ainda pouco estudado. Recentemente, especula-se que fatores hormonais possam associar-se a esses tumores[231]. Pacientes TE apresentaram média de idade inferior à dos outros grupos, possivelmente pela aceleração do processo de carcinogênese, dada a ação combinada do tabaco e álcool. Em algumas séries, pacientes NTNE apresentaram-se mais jovens que pacientes TE[3]. Isso provavelmente ocorra devido à maior fração de pacientes jovens com tumores de orofaringe. Em nossa série podemos ter incluído menor número de pacientes com tumores de orofaringe, já que esses podem ter realizado tratamento exclusivamente radio e quimioterápico.

Pacientes TNE foram mais frequentemente acometidos por tumores de laringe que os TE, NTNE e NTE. Isso já foi constatado em outros estudos[41, 42] e é compatível com o efeito potencializador do álcool na carcinogênese da mucosa da cavidade oral e faringe, aumentando a frequência de tumores nesses sítios, e com a maior sensibilidade da laringe ao tabaco que ao álcool.

Alguns autores chamam atenção para diferenças na terminologia usada na designação de sítios anatômicos[59]. Um motivo de confusão comum ocorre na classificação de tumores da porção posterior da língua, classificados como da cavidade oral ou orofaringe por diferentes centros. No GENCAPO, tumores avançados, que compreendiam tanto a orofaringe como a cavidade oral, em que não foi possível se determinar a origem precisa do tumor, foram classificados como uma categoria à parte, de forma a não incorrer em erro de classificação. Entre os pacientes TE, alguns possuíam tumores avançados, compreendendo mais de um sítio que não a cavidade oral e orofaringe. Esses pacientes, dado o pequeno número, também foram analisados separadamente.

Observou-se maior frequência de indivíduos brancos entre os NTNE. Apesar de acreditarmos que essa observação é real, compatível com outros estudos[202], entendemos que a divisão em raças é controversa no Brasil, graças à miscigenação intensa, o que nos dificulta tirar conclusões a esse respeito. Os entrevistadores pertencentes ao GENCAPO perguntam como o paciente classifica a própria raça e qual a raça de seus pais e avós, mas a classificação final é dada pelo entrevistador.

Apesar de demonstrada diferença estatística na distribuição dos níveis de escolaridade entre NTNE e TE, não identificamos nenhum grupo com clara tendência a maiores ou menores níveis de escolaridade. Para a determinação desses níveis em pacientes pertencentes ao GENCAPO, a categoria correspondente ao menor nível de escolaridade é a de alfabetizado, que foi definido como aquele que se diz capaz de escrever o próprio nome. Acreditamos que muitos desses pacientes assim classificados sejam, de fato, analfabetos funcionais.

Pacientes tabagistas, sendo eles etilistas ou não, apresentaram menores médias de IMC que não tabagistas. Esse é um fato já previamente observado por outros autores[124, 125]. Apesar do conhecido papel do álcool sobre estados de desnutrição, não observamos esse

efeito em pacientes apenas etilistas. Isso pode ter ocorrido por pequeno número de pacientes nessa situação.

Quanto à exposição ambiental ao tabaco, buscamos estimá-la pelo número de parentes de primeiro grau tabagistas. Entendemos, contudo, que a exposição ocupacional, social ou a um cônjuge tabagista não foram contempladas, uma vez que esses dados também não são rotineiramente coletados pelo GENCAPO. Observamos, contudo, que pacientes NTNE têm, em média, menor número de parentes de primeiro grau que fumam que pacientes tabagistas, o que sugere que esse hábito segue um padrão familiar. Especula-se se há uma predisposição herdada ao hábito ou apenas influência do ambiente familiar para o início do vício[232]. Não observamos diferença entre a história familiar de câncer entre os grupos. Para identificar, contudo, se tanto o tabagismo passivo como a história familiar de câncer são fatores de risco para CECP em pacientes NTNE, seria necessário comparar esses fatores entre pacientes NTNE com e sem CECP.

Um achado interessante é a maior frequência de metástases linfonodais e do achado patológico de invasão linfática tumoral em pacientes TE que em pacientes NTNE e TNE. Os dados sugerem que esse evento possa estar relacionado mais ao álcool do que ao tabaco e essa observação parece ser inovadora. Já se aventou, em um estudo prévio, o papel do tabaco na ocorrência de metástases linfonodais[233], contudo, não foi considerado o hábito etílico como variável na análise. Isso nos estimula a investigar essa relação com estudo específico, desenhado com esse propósito. Talvez como consequência dessa observação, pacientes TE apresentaram-se com estádios mais avançados que NTNE e TNE. Tanto o tabagismo quanto o etilismo em excesso já foram associados ao atraso no diagnóstico de CECP, isto é, em estádios mais avançados, mas em relação ao estágio T de forma mais importante que ao estágio N[199].

Outro achado também interessante foi que os tumores em NTNE apresentaram-se mais diferenciados à histologia que aqueles em TE e TNE. De fato, em linhas gerais, os pacientes tabagistas apresentaram tumores menos diferenciados que os não tabagistas, o que pode sugerir um efeito direto do tabagismo sobre o grau de diferenciação tumoral. Dahlstrom *et al.* observaram que a maioria dos pacientes NTNE apresentava-se ou com tumores de cavidade oral bem diferenciado ou com tumores de orofaringe pouco diferenciados, enquanto pacientes

TE apresentavam-se com tumores em sua maioria moderadamente diferenciados[3]. Dessa forma, os achados em ambos os estudos são, de fato, similares, já que a maioria dos nossos pacientes NTNE apresentava tumores bem diferenciados de cavidade oral.

A partir da melhor caracterização demográfica, clínica e patológica dos pacientes NTNE, entendemos que seria interessante investigar ainda dois aspectos: quantos desses pacientes tinham tumores potencialmente causados pela infecção pelo HPV e como era a evolução clínica desses pacientes, de acordo com suas características demográficas, clínicas, patológicas e moleculares e sua associação ao HPV.

Para o estudo dos marcadores moleculares, optamos pelo método de imunoistoquímica. Desde a década de 90, quando começou a fazer parte da rotina da patologia cirúrgica, a imunoistoquímica tem evoluído e é cada vez mais corriqueira na prática clínica, como método diagnóstico, prognóstico e preditivo[234]. Tem como vantagens ser de uso universal, ter baixo custo em geral e usar amostras fixadas em formol e embebidas em parafina, que são as formas convencionais de processamento e armazenagem de amostras teciduais. Contudo, esse método tem limitações que merecem nota. A técnica depende da integridade da interação entre antígeno e anticorpo e de como o antígeno foi preservado durante a fixação e o processamento da amostra[235]. Outro aspecto a ser considerado é a interpretação dos achados e o modo de reportá-los. Ambos dependem da experiência do patologista e do conhecimento dos padrões de marcação de dado anticorpo, principalmente quanto à localização do antígeno nos compartimentos celulares[235]. As reações envolvidas no processo devem ser meticulosamente realizadas, a fim de minimizar resultados falsos, uma vez que podem sofrer influência de diversos fatores. A interpretação das imunomarcações para os anticorpos estudados é motivo frequente de controvérsia. Uma análise desejável é considerar a porcentagem de marcação (seja por contagem de células, seja por área marcada), associada à intensidade da coloração. Essa última análise, contudo, só merece crédito se as lâminas forem coradas de forma automatizada, de maneira a garantir que nenhuma lâmina ficou exposta mais ou menos tempo a cada um dos reagentes do processo de imunoistoquímica. Como não dispúnhamos de tal método, não consideramos a intensidade de marcação em nossa análise. Os estudos variam muito em relação aos critérios de positividade para cada anticorpo, ao tipo de anticorpo usado e às técnicas do processo. Procuramos adotar os critérios mais comumente

usados em CECp para cada anticorpo. A análise da marcação pelo p16, contudo, foi mais complexa, já que a maioria dos estudos analisa a marcação de forma semi-quantitativa, porém o número de categorias (em cruzes) e os pontos de corte que as separam variam enormemente. No **ANEXO B** são listados alguns dos diferentes critérios utilizados em CECp para graduação da marcação pelo p16.

Já para o estudo do HPV, optamos pela pesquisa de DNA, uma vez que seriam utilizadas amostras embebidas em parafina. O método utilizado foi escolhido por apresentar melhor desempenho em relação a outros métodos disponíveis[236]. A associação entre a positividade para o HPV por PCR e a imunomarcação pelo p16 não foi concordante em todos os casos, independentemente do critério de positividade para o p16 adotado (**ANEXO C**). Isso pode ser devido a alguns fatores:

- Casos em que apenas o PCR foi positivo: vírus presente, mas provavelmente seu material genético não é transcrito. Uma vez que todos os cuidados foram tomados para evitar contaminação entre as amostras, não acreditamos que sejam falsos positivos;
- Casos em que apenas o p16 foi positivo: alguns autores acreditam que a expressão do p16 em CECp não é frequente, por ser um gene comumente inativado por mutações e alterações epigenéticas[237]. Contudo, observa-se expressão do p16 em tecidos tumorais e não tumorais negativos para o HPV[101, 238-240]. Considerando que nosso método de detecção por nPCR amplifica praticamente todos os tipos de HPV encontrados no trato aerodigestório alto, essa diferença não é devida a tipos de HPV menos comuns, como sugerido por outros estudos que usam métodos específicos apenas para HPV de alto risco e em que essa diferença é observada[239]. Assim, sugere-se que outros mecanismos possam estar envolvidos na expressão do p16 em CECps não relacionados ao HPV, como outros mecanismos de inativação da proteína pRB[5] que não pelo HPV.

Foi possível detectar a presença de DNA do HPV em 32,8% dos pacientes NTNE. A maioria desses pacientes HPV positivos apresentava tumores de cavidade oral. Se

considerarmos a expressão do p16 como marcador de atividade do HPV, podemos atribuir o CECP ao HPV provavelmente em apenas 10 (16,4%) dos 61 pacientes NTNE.

Devemos ser cuidadosos ao assumir o HPV como um fator de risco importante para esses pacientes NTNE, já que não temos um grupo controle comparável de pacientes sem CECP. Contudo, essa prevalência de 32,8% é superior à previamente encontrada em indivíduos sem câncer no Brasil, que fica ao redor de 14% na orofaringe[83] e 10% na cavidade oral[84]. Já em pacientes com CECP, mas não estratificados por hábitos, estudos brasileiros demonstraram uma prevalência que variou entre 17 a 74% em tumores da cavidade oral e 37% em tumores da laringe[85-88]. Contudo, diferenças metodológicas entre esse estudo e os outros já publicados limitam a comparação direta desses dados (**tabela 3**).

Buscamos, então, identificar fatores preditores de sobrevida entre os pacientes NTNE. A relação dos estádios T e N com a sobrevida era previsível. Contudo, o estágio T3 foi o único que significativamente aumentou o risco, enquanto o estágio T4 não se associou a pior sobrevida. Tumores estágio T3 são em geral volumosos, enquanto aqueles T4 podem ser volumosos ou não, mas invadem estruturas adjacentes, como por exemplo, um tumor não tão volumoso de soalho de boca que invade a mandíbula. Pode-se especular que a medida do volume tumoral seja um preditor de sobrevida importante. Contudo, deve-se considerar que, dada a amostra naturalmente reduzida de pacientes NTNE, não foi possível realizar análise multivariada da sobrevida. Essa análise poderia esclarecer se os tumores T3 são realmente mais agressivos ou, nessa amostra, apenas associavam-se a outro fator com valor prognóstico isolado significativo, como por exemplo a metástases linfáticas.

A expressão tumoral intensa do p16 relacionou-se a melhor sobrevida em pacientes NTNE, fato que, embora controverso, já foi previamente demonstrado[196]. Acreditamos que essa marcação intensa, ou seja superior a 70%, possa ser um bom preditor de sobrevida para esses pacientes, de fácil utilização na prática clínica. Contudo, a infecção pelo HPV não levou a alteração significativa de sobrevida nessa análise. Isso pode ter ocorrido, uma vez que há dúvidas em relação à infecção pelo HPV com real valor biológico na carcinogênese ou apenas a presença casual do vírus no tecido. Para elucidar essa questão, categorizamos os pacientes de acordo com a positividade para o HPV associado ao p16 (marcador de atividade do vírus),

mas, provavelmente pela redução do número de casos em cada categoria, não foi possível observar diferenças de sobrevida conforme esses critérios.

Constatamos relação interessante entre a expressão nuclear do FHIT na camada basal de margens não tumorais e pior sobrevida em pacientes NTNE. A imensa maioria dos estudos com imunoistoquímica para o FHIT analisa apenas sua imunomarcação citoplasmática. Na realidade, não encontramos estudos que analisassem a imunomarcação nuclear pelo FHIT em CECP, talvez por não ser frequente o seu achado e passar despercebida. Contudo, ao analisarmos a marcação em nossas amostras, observamos que alguns casos apresentavam marcação apenas citoplasmática enquanto outros – uma minoria – apresentavam também marcação nuclear. Apesar de desconhecido o significado clínico desse achado, optamos por não ignorá-lo e prosseguir em sua análise de forma isolada. O mesmo ocorreu com a observação de alguns casos que expressavam a proteína apenas na camada basal do epitélio não tumoral, enquanto outros apresentavam em toda a espessura do epitélio.

Chegamos então a um ponto em que duas questões careciam de explicação:

1. Qual o significado da marcação nuclear pelo FHIT
2. Qual o papel do FHIT em amostras de mucosa não tumoral, notadamente na camada basal do epitélio

O papel da proteína no núcleo celular foi escassamente estudado. Um dos primeiros estudos a relatar a localização nuclear da proteína foi o de Golebiowski *et al.*[241] que analisou sua expressão em diversos tecidos normais de ratos e constatou a presença por *imunoblot* do FHIT em membrana plasmática e núcleo de células do fígado, cérebro, baço, pulmão e rim. Essas localizações nuclear e em membrana plasmática são compatíveis com sua provável ação como supressor tumoral e molécula sinalizadora. Os autores atribuem a identificação citoplasmática por imunoistoquímica encontrada em outros estudos, ao tipo de preparo do material e não por real efeito biológico nesse compartimento. Em outro estudo, os mesmos autores demonstraram que a proteína FHIT é direcionada ao núcleo da célula quando interage com outra molécula, a proteína recombinante humana Ubc9. Essa interação parece diminuir significativamente a atividade da proteína FHIT[242].

Já em relação à expressão em mucosas não tumorais, poucos são os estudos que analisam mais profundamente a imunomarcação do FHIT nesse tipo de amostra. Kitamura *et al.*[243] analisaram a imunomarcação citoplasmática pelo FHIT em amostras tumorais, pré-neoplásicas e não tumorais de carcinoma epidermóide de esôfago. Seus achados sobre a marcação em amostras não tumorais foram escassamente relatados, mas os autores observaram que a maioria dos casos mostrou imunomarcação em amostras não tumorais, em geral em camada basal. Da mesma forma, Guerin *et al.*[149] em estudo da expressão citoplasmática do FHIT em carcinoma epidermóide da cavidade oral, comentaram que, quando havia margem de tecido não-tumoral nas lâminas estudadas, essas apresentavam moderada ou intensa marcação pelo FHIT. Já van Heerden *et al.*[244] analisaram amostras de carcinomas epidermóides de cavidade oral e margens não tumorais. Assim como os outros, não analisou profundamente os achados em mucosa normal, mas observou, diferentemente do geralmente encontrado, marcação citoplasmática mais importante nas camadas espinhosas do epitélio, enquanto as camadas basal e parabasal mostravam pouca marcação. Outro achado interessante mas não explorado pelos autores foi a associação da menor marcação com a presença de intenso infiltrado inflamatório logo acima da lâmina própria e a presença de linfócitos no epitélio. Esse achado pode se relacionar ao efeito sugerido da proteína do FHIT como sinalizador da resposta imune[151]. Outros dois estudos do mesmo serviço, com tumores de cavidade oral, também encontraram marcação mais intensa nos extratos espinhosos e menores em camada basal, mas apenas considerando a marcação citoplasmática pelo FHIT[150, 160]. Pode-se constatar que a tendência dos estudos até então realizados tem sido valorizar a imunomarcação pelo FHIT apenas em amostras tumorais, em detrimento daquela encontrada nas margens não tumorais, admitindo-se que são normais do ponto de vista molecular. Contudo, acreditamos que não se pode ignorar que diversas alterações moleculares podem estar presentes em epitélio não tumoral em CECP[146] e essa análise pode trazer informações interessantes.

O achado significativo da pior sobrevida associada à marcação nuclear pelo FHIT na camada basal é inédito. Contudo, ainda carece de maiores esclarecimentos, principalmente acerca da função da proteína no núcleo celular e no significado de sua localização em camada basal. Apesar de estudos ainda muito preliminares, é possível especular que a detecção da proteína no núcleo seria um indicativo de menor atividade da mesma. Considerando sua

suposta atividade de supressão tumoral, esses achados são compatíveis com pior sobrevida entre esses pacientes.

Um aspecto não analisado em nosso estudo foi o tratamento realizado a esses pacientes, em suas diversas modalidades. Acreditamos que sua análise é relevante, principalmente no estudo de sobrevida. Contudo, por se tratar de um estudo multi-institucional, diferenças técnicas e, eventualmente de conduta, podem ocorrer, tornando essa análise complexa e com múltiplas variáveis. Deve-se, entretanto, salientar que todos os pacientes foram tratados com intenção curativa pelas diferentes instituições.

Após a caracterização mais detalhada dos pacientes NTNE, procedemos então à busca pela diferenciação entre esses e aqueles TE, em relação à sobrevida relacionada à doença e aos aspectos moleculares estudados.

Escolhemos para essa análise a estratégia de pareamento dos pacientes NTNE com pacientes TE. Isso foi necessário para diminuir nossa amostra de pacientes TE, pela inviabilidade da pesquisa molecular em centenas desses pacientes. Os critérios escolhidos para o pareamento foram rigorosos, porém, o objetivo era selecionar pares altamente comparáveis em relação às principais variáveis demográficas e patológicas e diferenciá-los apenas pelos hábitos. Apesar de número muito maior de pacientes TE em nossa amostra, não foi possível esse pareamento para boa parte dos pacientes NTNE (**ANEXO D**). Essa constatação já indica as diferenças no perfil desses pacientes, especialmente em relação ao gênero e idade. Essa dificuldade de pareamento já foi observada previamente, em estudo de sobrevida em que foi possível o pareamento de apenas 50 dos 83 pacientes não tabagistas identificados[15]. O pareamento, contudo, reduziu nossa amostra, o que pode acarretar na presença de achados falsamente negativos no estudo, ou seja, um erro tipo II. Esse sistema de análise em pares tem outra limitação: cada par é analisado como uma unidade com dois “braços”. Porém, se em um dos braços uma informação não estiver presente, todo o par é desconsiderado da análise. Isso foi especialmente difícil em análises de imunoistoquímica e do HPV, pois as taxas, mesmo que reduzidas, de erros nas reações implicaram em diminuição significativa dos pares elegíveis para análise. Entretanto, acreditamos que o pareamento da amostra foi decisivo no processo de alocação da população estudada, evitando-se assim a interferência das principais possíveis variáveis de confusão em nossos desfechos avaliados.

Tomamos o cuidado de nos certificar que todas as etapas do estudo em que a subjetividade do avaliador pudesse interferir nas suas mensurações foram realizadas de maneira cega, sem que o mesmo soubesse quais amostras pertenciam ao grupo TE ou NTNE, a fim de evitar vieses de avaliação.

Ao parearmos os pacientes NTNE com pacientes TE não encontramos diferenças nas taxas de sobrevida específica pela doença entre os grupos. O único estudo que compara pacientes não tabagistas a tabagistas por análise de pareamento foi o desenvolvido por Pytynia[15] *et al.* Esses autores parearam 50 pacientes não tabagistas a 50 tabagistas, por sexo, idade (com até 10 anos de diferença e não 5 como em nosso estudo), sítio, estágio da doença (I/II vs III/IV), presença de metástases linfonodais e tipo de tratamento realizado. Observaram sobrevidas global, específica e livre de doença maiores para pacientes tabagistas. Contudo, ao analisarem a sobrevida corrigindo os resultados por etilismo e sintomas associados à doença, a diferença passou a não ser significativa. Dessa forma, em nosso estudo, podemos admitir que não é possível dizer que os hábitos de tabagismo e etilismo associados conferem melhor ou pior sobrevida específica pela doença de forma independente de sexo, idade, sítio tumoral, grau de diferenciação, variante morfológica, estágio T e presença de metástases linfonodais.

Já em relação às análises moleculares realizadas entre os pares, tanto em amostras tumorais como não-tumorais, o único critério que se mostrou significativamente diferente entre NTNE e TE foi, novamente, a imunomarcção nuclear pelo FHIT em camada basal de tecido não-tumoral. Pacientes NTNE mais frequentemente perderam essa marcação, enquanto os TE foram positivos. Esse achado também é inédito. Primeiramente, desconhecemos análises de aspectos moleculares por pareamento de pacientes NTNE com pacientes TE com CECP. Também desconhecemos descrição prévia da imunomarcção nuclear pelo FHIT em amostras humanas.

Esse estudo demonstrou que a imunomarcção nuclear pelo FHIT em camada basal de tecido não tumoral foi preditora de sobrevida entre pacientes NTNE, bem como foi diferente de forma significativa entre NTNE e TE, sendo menos frequente em NTNE. Acreditamos que nossos achados, mesmo que não completamente explicados, possam auxiliar na elucidação

dos processos carcinogênicos mediados pela proteína FHIT, cujo mérito na carcinogênese desses e de outros tumores vem chamando crescente atenção da comunidade científica.

Um achado que merece destaque é a ausência de diferença entre NTNE e TE em relação à positividade para o HPV. Nesse trabalho, demos destaque apenas à taxa de detecção do HPV em NTNE, que foi de 32,8%. Não podemos afirmar que a positividade pelo HPV em TE foi de 2 em 29 casos (6,9%), como pode sugerir a **Figura 30**, uma vez que esses pacientes TE não foram selecionados aleatoriamente do total de pacientes TE do estudo e sim como pares dos NTNE. Desse modo, o único modo de analisar esses dados é pelo pareamento. O principal objetivo da pesquisa do HPV nessa análise não foi buscar esclarecer uma etiologia diferenciada em ambos os grupos, mesmo porque o HPV pode ser um agente carcinógeno também em pacientes TE, que podem apresentar os mesmos hábitos de risco para a infecção. Mais que isso, era certificar-nos que as eventuais diferenças encontradas entre os grupos não poderiam ser influenciadas por uma eventual diferença na positividade pelo HPV. Ao início desse estudo, já se sugeria uma melhor evolução clínica para pacientes com tumores HPV positivos, em especial de orofaringe[245]. Desde então, novos estudos têm corroborado essas hipóteses, e o status em relação ao HPV vem se tornando pesquisa obrigatória em estudos prognósticos ou de predição de resposta terapêutica em CECP[100, 246]. Assim, nesse estudo, podemos dizer que o HPV não foi um possível fator de confusão na análise de dados de pareamento.

6.1. NOVAS PERSPECTIVAS DE ESTUDOS

Pelo caráter exploratório desse estudo, entendemos que algumas questões mereçam ser especificamente abordadas:

6.1.1. ANÁLISE DA RELAÇÃO DO ÁLCOOL COM METÁSTASES LINFÁTICAS

Esse estudo revelou uma possível relação entre o consumo de álcool e a ocorrência de metástases linfonodais. Pretendemos desenhar um estudo com esse propósito, estratificando os pacientes pela quantidade de álcool consumida e averiguar se essa relação é real.

6.1.2. ANÁLISE DA RELAÇÃO DO TABACO COM GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL

Da mesma forma, pretendemos estudar essa relação em estudo voltado para esse fim.

6.1.3. ANÁLISE DA RELAÇÃO DO VOLUME TUMORAL COMO PREDITOR DE SOBREVIDA

A observação entre pacientes NTNE de que aqueles com tumores de estágio T3 apresentaram pior sobrevida específica pela doença do que aqueles com tumores de estágio T4 nos fez pensar a respeito de um possível efeito independente do volume tumoral sobre a evolução dos pacientes. Da mesma forma, estudo desenhado com esse propósito merece ser realizado.

6.1.4. ANÁLISE DE OUTROS MARCADORES

Estão em andamento análises de outros marcadores moleculares, relacionados ao metabolismo do tabaco nessa mesma amostra de pacientes, sugeridos por pesquisadores do GENCAPO durante o desenvolvimento desse estudo. Um desses marcadores, o Glutathione S-Transferase pi (GSTPi) é uma enzima que já mostrou fornecer proteção celular contra danos mediados por radicais livres e pode ser um marcador interessante de susceptibilidade a câncer nesses pacientes[247].

6.1.5. APROFUNDAR A ANÁLISE DA MARCAÇÃO NUCLEAR DO FHIT E SUA RELAÇÃO COM INFLAMAÇÃO

O significado da marcação nuclear do FHIT merece ser explorado, tanto em tumores, quanto em amostras não tumorais, em série maior de casos. A associação da sua marcação ao infiltrado inflamatório tecidual também pode ser interessante.

6.1.6. ANÁLISE ESPECÍFICA DE PACIENTES IDOSAS COM TUMORES DE CAVIDADE ORAL

Pacientes idosas NTNE com CECP são claramente um grupo a ser melhor estudado. A etiologia desses tumores ainda é obscura, já que fatores possivelmente associados, como uso de próteses mal adaptadas ou tabagismo passivo não apenas falham em explicar muitos dos casos, como também não elucidam a preferência por mulheres em detrimento de homens.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Nesse estudo, os hábitos tabágico e etílico relacionaram-se a diferenças demográficas, clínicas e histopatológicas em pacientes acometidos por CECP. Pacientes NTNE foram em sua maioria mulheres, preferencialmente idosas, com tumores da cavidade oral, diferentemente de pacientes que são tabagistas e/ou etilistas. Considerando os diferentes padrões de hábitos, pacientes TE foram geralmente mais jovens, pacientes TNE apresentaram proporcionalmente mais tumores de laringe e pacientes NTNE apresentaram menor número de parentes de primeiro grau tabagistas. Há um provável efeito do álcool na ocorrência de metástases ganglionares, enquanto o tabaco parece relacionar-se a menor grau de diferenciação tumoral à histologia e a menores IMCs.

Em relação ao HPV, não se observaram diferenças significativas na positividade para o HPV entre pacientes NTNE e TE pareados. O achado de 32,8% de positividade para o HPV em pacientes NTNE é superior ao encontrado em casuísticas nacionais de infecção pelo vírus em trato aerodigestório de pacientes sem câncer. Pacientes NTNE com expressão intensa do p16 no tumor ou sem marcação pelo FHIT em camada basal de margem não tumoral apresentaram melhor sobrevida.

Os hábitos de tabagismo e etilismo associados não conferem maior ou menor sobrevida específica pela doença de forma independente de sexo, idade, sítio tumoral, grau de diferenciação, variante morfológica, estágio T e presença de metástases linfonodais. A marcação nuclear pelo FHIT em camada basal de epitélio não tumoral foi menos frequente em pacientes NTNE que em pacientes TE.

ANEXOS

ANEXO A - Curvas de sobrevida de pacientes NTNE

Figura 37: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo gênero. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECp.

Figura 38: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo sítio. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 39: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para os NTNE segundo variante morfológica. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 40: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo grau de diferenciação. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 41: Curvas de sobrevivida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo HPV. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 42: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo marcação nuclear pelo FHIT no tumor. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 43: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo marcação citoplasmática pelo FHIT no tumor. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 44: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo marcação nuclear pelo FHIT em toda a margem. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 45: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo marcação citoplasmática pelo FHIT em toda a margem. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECp.

Figura 46: Curvas de sobrevivida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo marcação citoplasmática pelo FHIT em camada basal. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 47: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo marcação pelo EGFR no tumor. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 48: Curvas de sobrevivida de Kaplan-Meier para os NTNE segundo marcação pelo EGFR na margem. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 49: Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo marcação pelo VEGF no tumor. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 50: Curvas de sobrevivida de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo marcação pelo VEGF em margem. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 51: Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo marcação pelo p16 em margem pelo método dicotômico, com nível de corte em 5%. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 52: Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para os pacientes NTNE segundo marcação pelo p16 em margem pelo método de contagem em cruzes. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

Figura 53: Curvas de sobrevivida de Kaplan-Meier para os pacientes com tumores de cabeça e pescoço NTNE segundo HPV e p16, este pelo método dicotômico. Censuras: pacientes vivos, perdidos de seguimento e falecidos por outras causas que não o CECP.

ANEXO B

Tabela 31 - Métodos de quantificação da imunomarcação pelo p16

Estudo	Técnica	CrITÉRIOS adotados
Fischer <i>et al.</i> [248]	<i>"monoclonal antibody was used for p16 detection (Clone E6h4, MTM Laboratories AG, Heidelberg, Germany)"</i>	<ul style="list-style-type: none"> positivo (>5%) negativo
Lassen <i>et al.</i> [246]	<i>"p16INK4A was detected by incubating sections with antibody clone JC8 (sc-56330; Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) diluted 1:25 for 32 minutes. This is amousemonoclonal immunoglobulinG2a antibody raised against full-length human p16, particularly suitable for use on formalin-fixed, paraffin-embedded sections".</i>	<ul style="list-style-type: none"> positivo (>10%) negativo
Rischin <i>et al.</i> [101]	<i>"mouse monoclonal anti-p16 (Lab Vision/NeoMarkers, Fremont, CA), and then EnVision_ System HRP anti-mouse (Dako), followed by diaminobenzidine chromogen (Dako) and counterstaining with hematoxylin"</i>	<ul style="list-style-type: none"> 0 (nenhuma) 1 (fraca) 2 (moderada), 3 (intensa) <p>0 ou 1 definido com negativo e 2 ou 3 como positivo</p>
Lewis <i>et al.</i> [196]	<i>"Monoclonal antibody to p16 (MTM Laboratories; monoclonal; 1:1 dilution) on a Ventana Benchmark LT automated immunostainer (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ) according to standard protocols. Detection involved Ventana's ultraView Universal DAB Detection Kit that uses a cocktail of enzyme-labeled secondary antibodies that locate the bound primary antibody. The complex is then visualized with hydrogen peroxide substrate and a 3, 30—diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) chromogen. No biotin is involved. Antigen retrieval, standard on the machine, used the Ventana CC1, EDTA-Tris, pH 8.0 solution."</i>	<ul style="list-style-type: none"> 0=negativo; 1+=1% a 25% de células positivas; 2+=26% a 50%; 3+=51% a 75%; 4+=76% a 100%. <p>0 definido como negativo e 1 a 4+ definidos como positivo</p>
Hoffmann <i>et al.</i> [76]	<i>"Primary monoclonal mouse anti p16INK4a antibody (MTMLaboratories AG, Heidelberg, Germany) was added to the slides for 60 min at room temperature followed by incubation with a secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (MTM Laboratories) at room temperature for 1 h. After counterstaining of the peroxidase complex, sections were dehydrated and embedded with Eukitt (Fluka, Deisenhofen, Germany)."</i>	<ul style="list-style-type: none"> negativo (<1% de células positivas), esporádico (células isoladas positivas, mas <5%), focal (pequenos aglomerados celulares, mas <25% das células positivas) difuso (>25%). <p>Dependendo desses critérios, eram posteriormente classificados como negativos, fracos, moderados e intensos, respectivamente.</p>
Kumar <i>et al.</i> [249]	<i>"tissue microarray (TMA), ... , p16/16P04, p53/DO1, and Bcl-xL/7D9 (Lab-Vision, Fremont CA)"</i>	<ul style="list-style-type: none"> 1= < 5%; 2= 5% a 20%; 3=21% a 50%; 4=51% a 100% <p>Intensidade de marcação:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1: sem marcação; 2: baixa intensidade; 3:moderada 4:intensa
Laco <i>et al.</i> [250]	<i>"CINtecTM p16INK4a Histology Kit (DakoCytomation) containing primary mouse monoclonal antibody against human p16 (clone E6H4), visualization reagent (dextran polymer conjugated with horseradish peroxidase and goat anti-mouse immunoglobulins),</i>	<ul style="list-style-type: none"> (0) ausente, (+) 1–5% (++) 6–20% (+++) 21–50%

	<i>and diaminobenzidine (DAB) as chromogene according to the manufacturer's manual"</i>	<ul style="list-style-type: none"> • (+++++) 51–100%
Hafkamp et al. [251]	<i>"The monoclonal antibody E6H4 (Dako, Glostrup, Denmark) was used to detect the p16INK4A protein"</i>	<ul style="list-style-type: none"> • positivo (>25%) • negativo
Smith et al. [252]	<i>"p16 mouse anti human monoclonal antibody E6H4 from CINtec p16INK4a histology kits (Dako Corporation, CA)"</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 1 = negativo; • 2 = leve, • 3 = 10–80% • 4 = > 80% • 5 = todas as células
König et al. [253]	<i>"The specific primary (mouse monoclonal) antibody (p16, clone E6H4, Dako, Carpinteria, USA) was applied in a dilution of 1:50 overnight at 4°C"</i>	<ul style="list-style-type: none"> • % de células positivas (software específico)
Kim et al. [254]	<i>"Immunoperoxidase staining was performed using the streptavidin–biotin peroxidase complex method (LSAB universal kit; Dako, Carpinteria, CA)"</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 0 (ausente), • 11 (fraca e focal) • 21 (fraca e difusa ou intensa e focal), • 31 (forte e difusa).
Suzuki et al. [255]	<i>"The p16INK4A monoclonal antibody E6H4 (DakoCytomation, Copenhagen, Denmark) was used"</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Negativo: ausência de células marcadas • Positivo: maioria das células marcadas
Singhi et al. [239]	<i>"a mouse monoclonal antibody against p16 (MTM Laboratories, Heidelberg, Germany)"</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo se marcação intensa e difusa em ≥70% das células
Kluschmann et al. [11]	<i>"two different anti-p16 mouse monoclonal antibodies (16P04 and 16P07; NeoMarkers, Fremont, CA)"</i>	<ul style="list-style-type: none"> • negativo (<1% de células positivas), • esporádico (células isoladas positivas, mas <5%), • focal (pequenos aglomerados celulares, mas <25% das células positivas) • difuso (>25%). • Dependendo desses critérios, eram posteriormente classificados como negativos, fracos, moderados e intensos, respectivamente
Smeets et al. [94]	<i>"CINtec™ Histology Kit (DakoCytomation B.V., Heverlee, Belgium)"</i>	<p>Intensidade acima de um controle determinado como fundo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Intensidade (0 a 3) • Porcentagem de células positivas
Lau et al. [256]	<i>"p16 antibody (Clone JC8; Novus Biologicals, Littleton, CO)."</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 0 = negativo; • 1 = fraco (<5%); • 2 = focal intensa (5% to 80%); • 3 = difusa e intensa (>80%)
Weinberger et al. [98]	<i>"monoclonal p16 antibody kit (DAKO Cytomation, Carpinteria, CA)"</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo: intensa e difusa • Negativo: fraca ou ausente
Ang et al. [100]	<i>"mouse monoclonal antibody (MTM Laboratories) visualized with use of an autostainer (Ventana XT, Ventana) and a one-view secondary detection kit (Ventana)"</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo se marcação intensa e difusa em ≥70% das células

ANEXO C

Tabela 32 - Relação da positividade pelo HPV e imunomarcação pelo p16

Nº	Hábitos	Gênero	Idade	Sítio	HPV	p16 tumor dicotômico	p16 margem dicotômico	p16 tumor em cruzes	p16 margem em cruzes
1	TE	F	70	CO	-	-	+	-	2+
2	TE	F	68	CO	-	+	-	2+	-
4	TE	F	39	CO	-	-		-	
5	NTNE	F	70	OF	-	+	+	3+	+
6	NTNE	M	71	HF	-	-	+	-	2+
7	NTNE	F	73	CO	-	-	+	-	2+
9	NTNE	F	70	CO	-	-	-	-	-
10	NTNE	F	81	CO	-	+	+	3+	+
11	NTNE	F	79	CO	-	+	+	3+	+
12	TE	M	53	CO/ OF	-	-	-	-	-
13	NTNE	F	85	CO	-	+	+	3+	2+
14	NTNE	M	56	CO/ OF	-	-	+	-	2+
15	NTNE	F	61	CO	+	+		3+	
16	TE	F	71	CO	-	+	+	3+	3+
18	TE	M	56	CO/ OF	-	-	-	-	-
19	NTNE	M	71	CO	+	+	-	2+	-
20	NTNE	F	79	CO	+	-	-	-	-
22	TE	M	63	CO	-	-	+	-	2+
23	TE	M	51	L	-	-	-	-	-
25	TE	M	80	L	-	+	-	3+	-
26	NTNE	F	40	CO	+				
27	NTNE	F	54	CO	+	-		-	
30	NTNE	F	57	CO	-	+		3+	
31	TE	M	69	CO	-	+	+	3+	+
32	NTNE	M	50	OF	-	+		3+	
33	TE	M	70	L	-	-		-	
34	NTNE	M	73	L	-	-		-	
35	NTNE	F	75	CO	-	-	-	-	-
36	NTNE	F	42	CO	-	-	-	-	-
37	NTNE	F	63	L	-	-		-	
38	TE	M	56	CO	-	+		2+	
39	NTNE	F	80	CO	+	+		3+	
40	NTNE	F	58	CO	-	-		-	
42	NTNE	F	25	CO	-		+		2+
43	NTNE	M	21	OF	+	-		-	
44	NTNE	F	51	CO	-	+	-	3+	-
45	NTNE	F	38	OF	-	+	-	3+	-
46	TE	F	75	CO	-	+	+	+	+
47	TE	M	70	HF	-	-	-	-	-
48	TE	F	59	CO	-		+		+
49	NTNE	F	93	CO	-	+	-	+	-

50	NTNE	F	51	CO	-	-	+	-	+
51	NTNE	M	69	CO	-	-	+	-	+
52	NTNE	F	55	L	+	+	+	3+	3+
53	TE	F	39	CO	-	-	-	-	-
54	NTNE	M	66	L	-	-	-	-	-
55	NTNE	M	63	CO	-	-	-	-	-
56	NTNE	F	58	L	+	-	-	-	-
57	NTNE	F	75	CO/ OF	-	-	-	-	-
58	NTNE	F	66	CO	-	+	+	+	+
59	TE	F	63	L	-	+	-	3+	-
60	NTNE	F	48	OF	-	+	-	3+	-
61	TE	F	79	CO	-	+	+	2+	2+
62	NTNE	F	65	CO	+	+	+	3+	3+
63	NTNE	F	81	CO	+	+	-	2+	-
64	TE	M	41	CO	-	-	-	-	-
65	NTNE	M	36	CO	-	-	-	-	-
66	NTNE	F	49	OF	-	+	-	2+	-
68	NTNE	F	77	CO	+	-	-	-	-
69	NTNE	F	55	CO	+	-	-	-	-
72	NTNE	F	69	CO	-	-	+	-	+
73	TE	M	70	CO	-	-	-	-	-
74	NTNE	F	29	CO/ OF	+	+	-	3+	-
75	NTNE	F	65	CO	-	+	-	2+	-
76	TE	F	70	CO	-	-	-	-	-
77	TE	F	50	CO	-	-	-	-	-
78	NTNE	F	70	CO	-	+	+	2+	2+
79	TE	F	39	CO	-	-	+	-	2+
81	TE	M	66	CO	+	-	+	-	2+
82	NTNE	F	81	CO	-	-	+	-	+
83	TE	F	57	CO	-	-	-	-	-
84	TE	M	51	CO	-	+	-	+	-
85	NTNE	M	28	OF	+	-	-	-	-
86	TE	F	61	CO	+	+	+	2+	+
87	TE	M	42	L	-	-	-	-	-
88	NTNE	M	52	L	-	-	-	-	-
89	TE	M	53	OF	-	-	-	-	-
90	NTNE	F	79	CO	-	+	-	2+	-
91	NTNE	F	80	CO	-	-	-	-	-
92	NTNE	F	66	CO	+	-	-	-	-
93	NTNE	F	83	CO	-	+	+	2+	+
94	NTNE	M	56	CO/ OF	-	-	+	-	+
95	NTNE	F	74	CO	-	-	-	-	-
96	NTNE	M	52	L	+	+	-	+	-
97	NTNE	F	74	CO	-	-	-	-	-
98	NTNE	F	68	OF	+	+	-	3+	-
100	NTNE	F	56	CO/ OF	-	+	+	3+	+

101	NTNE	F	92	OF	+	-	-	-	-
102	NTNE	F	27	CO	-	-	-	-	-
110	NTNE	M	58	L	+	+		3+	

ANEXO D

Tabela 33 - Pacientes NTNE não passíveis de pareamento

Gênero	Idade	Estádio T	Estádio N	Grau de diferenciação e variante	Sítio
F	70	2	2b	Moderadamente	Orofaringe
F	81	4	0	Bem diferenciado	Cavidade Oral
F	79	3	0	Moderadamente	Cavidade Oral
F	85	4	0	Moderadamente	Cavidade Oral
F	79	4	2b	Bem Diferenciado	Cavidade Oral
M	41	1	2b	Pouco Diferenciado	Cavidade Oral
F	75	4	2b	Bem diferenciado	Cavidade Oral
F	80	4	0	Moderadamente	Cavidade Oral
F	25	2	2c	Moderadamente	Cavidade Oral
F	38	1	0	Bem diferenciado	Orofaringe
F	93	4	0	Bem diferenciado	Cavidade Oral
F	75	3	0	Bem Diferenciado – escamoso basalóide	Cavidade Oral e Faringe
F	48	1	0	Bem diferenciado	Orofaringe
F	49	1	0	Moderadamente	Orofaringe
F	55	3	0	Bem diferenciado	Cavidade Oral
F	62	2	1	Moderadamente	Cavidade Oral
F	29	2	1	Pouco diferenciado	Cavidade Oral e Faringe
F	81	2	2b	Moderadamente	Cavidade Oral
M	28	2	2b	Moderadamente	Orofaringe
F	68	2	0	Bem diferenciado - papilífero	Orofaringe
F	56	1	1	Pouco diferenciado	Cavidade Oral e Faringe
F	92	2	0	Bem Diferenciado	Orofaringe
F	27	1	0	Moderadamente	Cavidade Oral
M	58	1	0	Não avaliável - verrucoso	Laringe
F	63	4	2	Pouco Diferenciado	Cavidade Oral
M	64	4	0	Bem diferenciado	Cavidade Oral e Faringe

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
2. Argiris, A., et al., *Head and neck cancer*. Lancet, 2008. **371**(9625): p. 1695-709.
3. Dahlstrom, K.R., et al., *Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study*. Head Neck, 2008. **30**(1): p. 75-84.
4. Gillison, M.L. and K.V. Shah, *Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers*. Curr Opin Oncol, 2001. **13**(3): p. 183-8.
5. Marur, S., et al., *HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic*. Lancet Oncol, 2010.
6. Chaturvedi, A.K., et al., *Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States*. J Clin Oncol, 2008. **26**(4): p. 612-9.
7. Slaughter, D.P., H.W. Southwick, and W. Smejkal, *Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin*. Cancer, 1953. **6**(5): p. 963-8.
8. Califano, J., et al., *Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization*. Cancer Res, 1996. **56**(11): p. 2488-92.
9. Gold, K.A. and E.S. Kim, *Role of molecular markers and gene profiling in head and neck cancers*. Curr Opin Oncol, 2009. **21**(3): p. 206-11.
10. Lingen, M., E.M. Sturgis, and M.S. Kies, *Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers: clinical and biologic characteristics and implications for management*. Curr Opin Oncol, 2001. **13**(3): p. 176-82.
11. Klusmann, J.P., et al., *Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus*. Am J Pathol, 2003. **162**(3): p. 747-53.
12. Pande, P., et al., *Prognostic factors in betel and tobacco related oral cancer*. Oral Oncol, 2002. **38**(5): p. 491-9.
13. Tan, E.H., et al., *Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers*. Am J Clin Oncol, 1997. **20**(2): p. 146-50.
14. Koch, W.M., et al., *Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity*. Laryngoscope, 1999. **109**(10): p. 1544-51.
15. Pytynia, K.B., et al., *Matched-pair analysis of survival of never smokers and ever smokers with squamous cell carcinoma of the head and neck*. J Clin Oncol, 2004. **22**(19): p. 3981-8.

16. Farshadpour, F., et al., *Non-smoking and non-drinking patients with head and neck squamous cell carcinoma: a distinct population*. Oral Dis, 2007. **13**(2): p. 239-43.
17. Wiseman, S.M., et al., *Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers and nondrinkers: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcomes*. Ann Surg Oncol, 2003. **10**(5): p. 551-7.
18. Curado, M.P. and M. Hashibe, *Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer*. Curr Opin Oncol, 2009. **21**(3): p. 194-200.
19. Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin D
GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide, in *IARC CancerBase No. 10* / <http://globocan.iarc.fr>. 2010, International Agency for Research on Cancer.
20. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin. **60**(5): p. 277-300.
21. Curado, M.M., E, *Incidência e Mortalidade dos Cânceres de Cabeça e Pescoço no Brasil*. Rev Bras Cir Cabeça Pescoço, 2006. **35**(3): p. 136-141.
22. Omar Shafey, M.E., Hana Ross, Judith Mackay, *The Tobacco Atlas*. 3rd ed. 2009, Atlanta: American Cancer Society.
23. Iglesias, R., Jha, P, Pinto, M, Silva, VLC, Godinho, J (2007) *Controle do Tabagismo no Brasil*.
24. Hecht, S.S., *Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 733-44.
25. Denissenko, M.F., et al., *Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53*. Science, 1996. **274**(5286): p. 430-2.
26. IARC, W.G., *Tobacco Smoke and Involuntary Smoking*, in ***IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans***. 2002.
27. Gandini, S., et al., *Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis*. Int J Cancer, 2008. **122**(1): p. 155-64.
28. Lubin, J.H., et al., *Total exposure and exposure rate effects for alcohol and smoking and risk of head and neck cancer: a pooled analysis of case-control studies*. Am J Epidemiol, 2009. **170**(8): p. 937-47.
29. Hashibe, M., et al., *Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(2): p. 541-50.
30. Ansary-Moghaddam, A., et al., *The risk of upper aero digestive tract cancer associated with smoking, with and without concurrent alcohol consumption*. Mt Sinai J Med, 2009. **76**(4): p. 392-403.
31. Lacko, M., et al., *Genetic polymorphisms of smoking-related carcinogen detoxifying enzymes and head and neck cancer susceptibility*. Anticancer Res, 2009. **29**(2): p. 753-61.
32. Varela-Lema, L., et al., *Meta-analysis and pooled analysis of GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms and oral and pharyngeal cancers: a HuGE-GSEC review*. Genet Med, 2008. **10**(6): p. 369-84.

33. Lee, Y.C., et al., *Involuntary smoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(8): p. 1974-81.
34. Edwards, R., *Spousal smoking as an indicator of total secondhand smoke exposure*. Nicotine Tob Res, 2009. **11**(6): p. 606-13.
35. Moritsugu, K.P., *The 2006 Report of the Surgeon General: the health consequences of involuntary exposure to tobacco smoke*. Am J Prev Med, 2007. **32**(6): p. 542-3.
36. Guo, R. and J. Ren, *Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace*. Int J Environ Res Public Health. **7**(4): p. 1285-301.
37. Viswanathan, H. and J.A. Wilson, *Alcohol--the neglected risk factor in head and neck cancer*. Clin Otolaryngol Allied Sci, 2004. **29**(4): p. 295-300.
38. Yokoyama, A. and T. Omori, *Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and risk for esophageal and head and neck cancers*. Alcohol, 2005. **35**(3): p. 175-85.
39. Baan, R., et al., *Carcinogenicity of alcoholic beverages*. Lancet Oncol, 2007. **8**(4): p. 292-3.
40. Freedman, N.D., et al., *Alcohol and head and neck cancer risk in a prospective study*. Br J Cancer, 2007. **96**(9): p. 1469-74.
41. Hashibe, M., et al., *Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(10): p. 777-89.
42. Schlecht, N.F., et al., *Interaction between tobacco and alcohol consumption and the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil*. Am J Epidemiol, 1999. **150**(11): p. 1129-37.
43. Purdue, M.P., et al., *Type of alcoholic beverage and risk of head and neck cancer--a pooled analysis within the INHANCE Consortium*. Am J Epidemiol, 2009. **169**(2): p. 132-42.
44. IARC (1988/1998) **Alcohol Drinking**. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans **44**.
45. Allen, N.E., et al., *Moderate alcohol intake and cancer incidence in women*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(5): p. 296-305.
46. Shanta, V., et al., *Epidemiology of cancer of the cervix: global and national perspective*. J Indian Med Assoc, 2000. **98**(2): p. 49-52.
47. zur Hausen, H., *Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account*. Virology, 2009. **384**(2): p. 260-5.
48. Newell, G.R., E.T. Krementz, and J.D. Roberts, *Excess occurrence of cancer of the oral cavity, lung, and bladder following cancer of the cervix*. Cancer, 1975. **36**(6): p. 2155-8.
49. Syrjanen, K.J., et al., *Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions*. Br J Oral Surg, 1983. **21**(2): p. 147-53.

50. Loning, T., et al., *Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA*. J Invest Dermatol, 1985. **84**(5): p. 417-20.
51. de Villiers, E.M., et al., *Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas*. Int J Cancer, 1985. **36**(5): p. 575-8.
52. Hansson, B.G., et al., *Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden*. Acta Otolaryngol, 2005. **125**(12): p. 1337-44.
53. Anaya-Saavedra, G., et al., *High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study*. Arch Med Res, 2008. **39**(2): p. 189-97.
54. Syrjanen, S., *Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer*. J Clin Virol, 2005. **32 Suppl 1**: p. S59-66.
55. Venuti, A., et al., *Presence of HPV in head and neck tumours: high prevalence in tonsillar localization*. J Exp Clin Cancer Res, 2004. **23**(4): p. 561-6.
56. Romanitan, M., et al., *Human papillomavirus frequency in oral and oropharyngeal cancer in Greece*. Anticancer Res, 2008. **28**(4B): p. 2077-80.
57. Ragin, C.C. and E. Taioli, *Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis*. Int J Cancer, 2007. **121**(8): p. 1813-20.
58. Psyrris, A. and D. DiMaio, *Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2008. **5**(1): p. 24-31.
59. Kreimer, A.R., et al., *Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(2): p. 467-75.
60. Shiboski, C.H., B.L. Schmidt, and R.C. Jordan, *Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years*. Cancer, 2005. **103**(9): p. 1843-9.
61. Licitra, L., et al., *Human papillomavirus in HNSCC: a European epidemiologic perspective*. Hematol Oncol Clin North Am, 2008. **22**(6): p. 1143-53, vii-viii.
62. Psyrris, A., P. Gouveris, and J.B. Vermorken, *Human papillomavirus-related head and neck tumors: clinical and research implication*. Curr Opin Oncol, 2009. **21**(3): p. 201-5.
63. D'Souza, G., et al., *Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2007. **356**(19): p. 1944-56.
64. Smith, E.M., et al., *Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers*. Int J Cancer, 2004. **108**(5): p. 766-72.
65. Gillison, M.L., et al., *Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(6): p. 407-20.
66. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
67. Lowy, D.R., R. Kirnbauer, and J.T. Schiller, *Genital human papillomavirus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(7): p. 2436-40.

68. Goodman, A. and D.C. Wilbur, *Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 32-2003. A 37-year-old woman with atypical squamous cells on a Papanicolaou smear.* N Engl J Med, 2003. **349**(16): p. 1555-64.
69. Hafkamp, H.C., J.J. Manni, and E.J. Speel, *Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas.* Acta Otolaryngol, 2004. **124**(4): p. 520-6.
70. Knipe, D.M., Howley, P M., *Fields Virology.* 5th ed. Papillomaviruses, ed. D.R.L. Peter M. Howley. Vol. 2. 2006: Lippincott Williams & Wilkins.
71. Cheng, S., et al., *Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes.* Genes Dev, 1995. **9**(19): p. 2335-49.
72. Scheffner, M., et al., *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53.* Cell, 1990. **63**(6): p. 1129-36.
73. Werness, B.A., A.J. Levine, and P.M. Howley, *Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53.* Science, 1990. **248**(4951): p. 76-9.
74. Dyson, N., et al., *The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product.* Science, 1989. **243**(4893): p. 934-7.
75. Li, Y., et al., *Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb.* Cancer Res, 1994. **54**(23): p. 6078-82.
76. Hoffmann, M., et al., *p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer.* Int J Cancer. **127**(7): p. 1595-602.
77. Fakhry, C. and M.L. Gillison, *Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers.* J Clin Oncol, 2006. **24**(17): p. 2606-11.
78. Swoboda, A. and V. Fabrizi, *Tonsillar carcinoma in a renal graft recipient treated with cyclosporine A.* Clin Nephrol, 1993. **39**(5): p. 272-4.
79. Hemminki, K., C. Dong, and M. Frisch, *Tonsillar and other upper aerodigestive tract cancers among cervical cancer patients and their husbands.* Eur J Cancer Prev, 2000. **9**(6): p. 433-7.
80. Frisch, M. and R.J. Biggar, *Aetiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas.* Lancet, 1999. **354**(9188): p. 1442-3.
81. Frisch, M., R.J. Biggar, and J.J. Goedert, *Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome.* J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(18): p. 1500-10.
82. Goldenberg, D., et al., *Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: An HPV-associated phenomenon.* Head Neck, 2008. **30**(7): p. 898-903.
83. do Sacramento, P.R., et al., *The prevalence of human papillomavirus in the oropharynx in healthy individuals in a Brazilian population.* J Med Virol, 2006. **78**(5): p. 614-8.
84. Cortezzi, S.S., et al., *Analysis of human papillomavirus prevalence and TP53 polymorphism in head and neck squamous cell carcinomas.* Cancer Genet Cytogenet, 2004. **150**(1): p. 44-9.

85. Oliveira, M.C., et al., *High-risk human papillomavirus (HPV) is not associated with p53 and bcl-2 expression in oral squamous cell carcinomas*. *Auris Nasus Larynx*, 2009. **36**(4): p. 450-6.
86. Soares, R.C., et al., *Detection of HPV DNA and immunohistochemical expression of cell cycle proteins in oral carcinoma in a population of Brazilian patients*. *J Appl Oral Sci*, 2008. **16**(5): p. 340-4.
87. de Oliveira, D.E., et al., *Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53 expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma*. *Am J Clin Pathol*, 2006. **126**(2): p. 284-93.
88. Simonato, L.E., et al., *Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival*. *J Oral Pathol Med*, 2008. **37**(10): p. 593-8.
89. Zhao, M., et al., *Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer*. *Int J Cancer*, 2005. **117**(4): p. 605-10.
90. Begum, S., et al., *Detection of human papillomavirus-16 in fine-needle aspirates to determine tumor origin in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(4): p. 1186-91.
91. Worden, F.P., et al., *Chemoselection as a strategy for organ preservation in advanced oropharynx cancer: response and survival positively associated with HPV16 copy number*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(19): p. 3138-46.
92. Chuang, A.Y., et al., *Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma*. *Oral Oncol*, 2008. **44**(10): p. 915-9.
93. Snijders, P.J., D.A. Heideman, and C.J. Meijer, *Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens*. *APMIS*. **118**(6-7): p. 520-8.
94. Smeets, S.J., et al., *A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen*. *Int J Cancer*, 2007. **121**(11): p. 2465-72.
95. Smith, E.M., et al., *Risk factors and survival by HPV-16 E6 and E7 antibody status in human papillomavirus positive head and neck cancer*. *Int J Cancer*. **127**(1): p. 111-7.
96. Nichols, A.C., et al., *HPV-16 infection predicts treatment outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2009. **140**(2): p. 228-34.
97. Mellin, H., et al., *Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer*. *Int J Cancer*, 2002. **102**(2): p. 152-8.
98. Weinberger, P.M., et al., *Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(5): p. 736-47.
99. Licitra, L., et al., *High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(36): p. 5630-6.

100. Ang, K.K., et al., *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer*. N Engl J Med. **363**(1): p. 24-35.
101. Rischin, D., et al., *Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial*. J Clin Oncol. **28**(27): p. 4142-8.
102. Hafkamp, H.C., et al., *A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8*. Int J Cancer, 2003. **107**(3): p. 394-400.
103. Leong ASY, Cooper K, Leong FJWM, *Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology*. 1999, London: Oxford University Press.
104. Gillison, M.L., et al., *Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(9): p. 709-20.
105. Lowy, D.R. and K. Munger, *Prognostic implications of HPV in oropharyngeal cancer*. N Engl J Med. **363**(1): p. 82-4.
106. Peres, J., *HPV-positive oropharyngeal cancer: data may justify new approach*. J Natl Cancer Inst. **102**(19): p. 1456-9.
107. Koutsky, L.A., et al., *A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine*. N Engl J Med, 2002. **347**(21): p. 1645-51.
108. Wu, A., et al., *Innovative DNA vaccine for human papillomavirus (HPV)-associated head and neck cancer*. Gene Ther.
109. Foulkes, W.D., et al., *Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study*. Int J Cancer, 1995. **63**(6): p. 769-73.
110. Garavello, W., et al., *Family history and the risk of oral and pharyngeal cancer*. Int J Cancer, 2008. **122**(8): p. 1827-31.
111. Foulkes, W.D., et al., *Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study*. BMJ, 1996. **313**(7059): p. 716-21.
112. Callegari-Jacques, S.M., et al., *Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population*. Am J Hum Biol, 2003. **15**(6): p. 824-34.
113. Pimenta, J.R., et al., *Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites*. Hum Hered, 2006. **62**(4): p. 190-5.
114. Molina, M.A., et al., *African American and poor patients have a dramatically worse prognosis for head and neck cancer: an examination of 20,915 patients*. Cancer, 2008. **113**(10): p. 2797-806.
115. Settle, K., et al., *Racial survival disparity in head and neck cancer results from low prevalence of human papillomavirus infection in black oropharyngeal cancer patients*. Cancer Prev Res (Phila), 2009. **2**(9): p. 776-81.
116. Chen, L.M., et al., *Matched-pair analysis of race or ethnicity in outcomes of head and neck cancer patients receiving similar multidisciplinary care*. Cancer Prev Res (Phila), 2009. **2**(9): p. 782-91.

117. Freedman, N.D., et al., *Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study*. Int J Cancer, 2008. **122**(10): p. 2330-6.
118. Boeing, H., et al., *Intake of fruits and vegetables and risk of cancer of the upper aerodigestive tract: the prospective EPIC-study*. Cancer Causes Control, 2006. **17**(7): p. 957-69.
119. Kreimer, A.R., et al., *Diet and body mass, and oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: analysis from the IARC multinational case-control study*. Int J Cancer, 2006. **118**(9): p. 2293-7.
120. Sapkota, A., et al., *Dietary risk factors for squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in central and eastern Europe*. Cancer Causes Control, 2008. **19**(10): p. 1161-70.
121. Peters, E.S., et al., *Dairy products, leanness, and head and neck squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2008. **30**(9): p. 1193-205.
122. Lubin, J.H., et al., *Body mass index, cigarette smoking, and alcohol consumption and cancers of the oral cavity, pharynx, and larynx: modeling odds ratios in pooled case-control data*. Am J Epidemiol. **171**(12): p. 1250-61.
123. Gaudet, M.M., et al., *Body mass index and risk of head and neck cancer in a pooled analysis of case-control studies in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium*. Int J Epidemiol.
124. Nieto, A., et al., *Lifetime body mass index and risk of oral cavity and oropharyngeal cancer by smoking and drinking habits*. Br J Cancer, 2003. **89**(9): p. 1667-71.
125. Franceschi, S., et al., *Leanness as early marker of cancer of the oral cavity and pharynx*. Ann Oncol, 2001. **12**(3): p. 331-6.
126. Guha, N., et al., *Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies*. Am J Epidemiol, 2007. **166**(10): p. 1159-73.
127. Tezal, M., et al., *Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(9): p. 2406-12.
128. Marques, L.A., et al., *Oral health, hygiene practices and oral cancer*. Rev Saude Publica, 2008. **42**(3): p. 471-9.
129. Vaccarezza, G.F., J.L. Antunes, and P. Michaluart-Junior, *Recurrent sores by ill-fitting dentures and intra-oral squamous cell carcinoma in smokers*. J Public Health Dent. **70**(1): p. 52-7.
130. Goldenberg, D., et al., *Habitual risk factors for head and neck cancer*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2004. **131**(6): p. 986-93.
131. Goldenberg, D., A. Golz, and H.Z. Joachims, *The beverage mate: a risk factor for cancer of the head and neck*. Head Neck, 2003. **25**(7): p. 595-601.
132. Chen, Y.J., et al., *Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis*. Cancer Sci, 2008. **99**(8): p. 1507-14.
133. Trivedy, C.R., G. Craig, and S. Warnakulasuriya, *The oral health consequences of chewing areca nut*. Addict Biol, 2002. **7**(1): p. 115-25.

134. Berthiller, J., et al., *Marijuana smoking and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the INHANCE consortium*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. **18**(5): p. 1544-51.
135. Zhang, Z.F., et al., *Marijuana use and increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1999. **8**(12): p. 1071-8.
136. Siemiatycki, J., et al., *Listing occupational carcinogens*. *Environ Health Perspect*, 2004. **112**(15): p. 1447-59.
137. Jayaprakash, V., et al., *Wood dust exposure and the risk of upper aero-digestive and respiratory cancers in males*. *Occup Environ Med*, 2008. **65**(10): p. 647-54.
138. Pintos, J., et al., *Use of wood stoves and risk of cancers of the upper aero-digestive tract: a case-control study*. *Int J Epidemiol*, 1998. **27**(6): p. 936-40.
139. Rennemo, E., U. Zatterstrom, and M. Boysen, *Impact of second primary tumors on survival in head and neck cancer: an analysis of 2,063 cases*. *Laryngoscope*, 2008. **118**(8): p. 1350-6.
140. Khuri, F.R., et al., *The impact of smoking status, disease stage, and index tumor site on second primary tumor incidence and tumor recurrence in the head and neck retinoid chemoprevention trial*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2001. **10**(8): p. 823-9.
141. Ha, P.K. and J.A. Califano, *The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck*. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2003. **14**(5): p. 363-9.
142. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. *Cell*, 1990. **61**(5): p. 759-67.
143. Haddad, R.I. and D.M. Shin, *Recent advances in head and neck cancer*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(11): p. 1143-54.
144. Brennan, J.A., et al., *Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck*. *N Engl J Med*, 1995. **332**(7): p. 429-35.
145. Hittelman, W.N., *Genetic instability in epithelial tissues at risk for cancer*. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. **952**: p. 1-12.
146. Tabor, M.P., et al., *Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(6): p. 1523-32.
147. Braakhuis, B.J., et al., *A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications*. *Cancer Res*, 2003. **63**(8): p. 1727-30.
148. Ohta, M., et al., *The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers*. *Cell*, 1996. **84**(4): p. 587-97.
149. Guerin, L.A., et al., *Decreased fragile histidine triad gene protein expression is associated with worse prognosis in oral squamous carcinoma*. *Arch Pathol Lab Med*, 2006. **130**(2): p. 158-64.
150. Tai, S.K., et al., *Loss of Fhit expression in head and neck squamous cell carcinoma and its potential clinical implication*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(16): p. 5554-7.

151. Zhao, P., N. Hou, and Y. Lu, *Fhit protein is preferentially expressed in the nucleus of monocyte-derived cells and its possible biological significance*. *Histol Histopathol*, 2006. **21**(9): p. 915-23.
152. Sozzi, G., et al., *Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung cancer*. *Cancer Res*, 1997. **57**(11): p. 2121-3.
153. Soma, T., et al., *Nicotine induces the fragile histidine triad methylation in human esophageal squamous epithelial cells*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(5): p. 1023-7.
154. Hassan, M.I., A. Naiyer, and F. Ahmad, *Fragile histidine triad protein: structure, function, and its association with tumorigenesis*. *J Cancer Res Clin Oncol*. **136**(3): p. 333-50.
155. De Flora, S., et al., *Molecular and cytogenetical alterations induced by environmental cigarette smoke in mice heterozygous for Fhit*. *Cancer Res*, 2007. **67**(3): p. 1001-6.
156. Siprashvili, Z., et al., *Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(25): p. 13771-6.
157. Sard, L., et al., *The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(15): p. 8489-92.
158. Wali, A., *FHIT: doubts are clear now*. *ScientificWorldJournal*. **10**: p. 1142-51.
159. Virgilio, L., et al., *FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(18): p. 9770-5.
160. Lee, J.I., et al., *Loss of Fhit expression is a predictor of poor outcome in tongue cancer*. *Cancer Res*, 2001. **61**(3): p. 837-41.
161. Cohen, S., *Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal*. *J Biol Chem*, 1962. **237**: p. 1555-62.
162. Gschwind, A., O.M. Fischer, and A. Ullrich, *The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(5): p. 361-70.
163. Mitsudomi, T. and Y. Yatabe, *Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer*. *FEBS J*. **277**(2): p. 301-8.
164. Lothaire, P., et al., *Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation*. *Head Neck*, 2006. **28**(3): p. 256-69.
165. Howell, G.M. and J.R. Grandis, *Molecular mediators of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma*. *Head Neck*, 2005. **27**(8): p. 710-7.
166. Ford, A.C. and J.R. Grandis, *Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer*. *Head Neck*, 2003. **25**(1): p. 67-73.
167. O-Charoenrat, P., et al., *C-erbB receptors in squamous cell carcinomas of the head and neck: clinical significance and correlation with matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factors*. *Oral Oncol*, 2002. **38**(1): p. 73-80.
168. Walsh, J.E., et al., *Mechanisms of tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma*. *Curr Treat Options Oncol*, 2007. **8**(3): p. 227-38.
169. Cao, Y., *Tumor angiogenesis and therapy*. *Biomed Pharmacother*, 2005. **59 Suppl 2**: p. S340-3.

170. Teknos, T.N., et al., *Tumor angiogenesis as a predictive marker for organ preservation in patients with advanced laryngeal carcinoma*. Laryngoscope, 2002. **112**(5): p. 844-51.
171. Kim, S.H., et al., *Correlations of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression*. J Surg Oncol, 2006. **93**(4): p. 330-7.
172. Boonkitticharoen, V., et al., *Vascular endothelial growth factor a and proliferation marker in prediction of lymph node metastasis in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2008. **134**(12): p. 1305-11.
173. Gerdes, J., et al., *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*. Int J Cancer, 1983. **31**(1): p. 13-20.
174. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. J Cell Physiol, 2000. **182**(3): p. 311-22.
175. Torres-Rendon, A., et al., *Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas*. Br J Cancer, 2009. **100**(7): p. 1128-34.
176. Ritta, M., et al., *Cell cycle and viral and immunologic profiles of head and neck squamous cell carcinoma as predictable variables of tumor progression*. Head Neck, 2009. **31**(3): p. 318-27.
177. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. 2002, New York: Garland Science.
178. Haber, D. and E. Harlow, *Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age*. Nat Genet, 1997. **16**(4): p. 320-2.
179. Hollstein, M., et al., *p53 mutations in human cancers*. Science, 1991. **253**(5015): p. 49-53.
180. Lane, D.P. and L.V. Crawford, *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells*. Nature, 1979. **278**(5701): p. 261-3.
181. Strano, S., et al., *Mutant p53 proteins: between loss and gain of function*. Head Neck, 2007. **29**(5): p. 488-96.
182. Gasco, M. and T. Crook, *The p53 network in head and neck cancer*. Oral Oncol, 2003. **39**(3): p. 222-31.
183. Foulkes, W.D., *p53--master and commander*. N Engl J Med, 2007. **357**(25): p. 2539-41.
184. Van Dyke, T., *p53 and tumor suppression*. N Engl J Med, 2007. **356**(1): p. 79-81.
185. Greenblatt, M.S., et al., *Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis*. Cancer Res, 1994. **54**(18): p. 4855-78.
186. Taylor, D., et al., *Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations*. Hum Pathol, 1999. **30**(10): p. 1221-5.
187. Poeta, M.L., et al., *TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med, 2007. **357**(25): p. 2552-61.
188. Soussi, T. and C. Beroud, *Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 233-40.

189. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. *Nature*, 1993. **366**(6456): p. 704-7.
190. Rocco, J.W. and D. Sidransky, *p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression*. *Exp Cell Res*, 2001. **264**(1): p. 42-55.
191. Ai, L., et al., *The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases*. *Mod Pathol*, 2003. **16**(9): p. 944-50.
192. Vairaktaris, E., et al., *Loss of tumour suppressor p16 expression in initial stages of oral oncogenesis*. *Anticancer Res*, 2007. **27**(2): p. 979-84.
193. Kraunz, K.S., et al., *Duration but not intensity of alcohol and tobacco exposure predicts p16INK4A homozygous deletion in head and neck squamous cell carcinoma*. *Cancer Res*, 2006. **66**(8): p. 4512-5.
194. Geisler, S.A., et al., *p16 and p53 Protein expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(11): p. 3445-53.
195. Weinberger, P.M., et al., *Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(17): p. 5684-91.
196. Lewis, J.S., Jr., et al., *p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status*. *Am J Surg Pathol*. **34**(8): p. 1088-96.
197. Durazzo, M.D., et al., *Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: increasing incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastases*. *Clinics (Sao Paulo)*, 2005. **60**(4): p. 293-8.
198. Kowalski, L.P., et al., *Lateness of diagnosis of oral and oropharyngeal carcinoma: factors related to the tumour, the patient and health professionals*. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 1994. **30B**(3): p. 167-73.
199. Brouha, X., et al., *Role of alcohol and smoking in diagnostic delay of head and neck cancer patients*. *Acta Otolaryngol*, 2005. **125**(5): p. 552-6.
200. Siegelmann-Danieli, N., et al., *Oral tongue cancer in patients less than 45 years old: institutional experience and comparison with older patients*. *J Clin Oncol*, 1998. **16**(2): p. 745-53.
201. Agudelo, D., et al., *Laryngeal carcinoma in patients without a history of tobacco and alcohol use*. *Head Neck*, 1997. **19**(3): p. 200-4.
202. Harris, S.L., et al., *Never-smokers, never-drinkers: unique clinical subgroup of young patients with head and neck squamous cell cancers*. *Head Neck*. **32**(4): p. 499-503.
203. Farshadpour, F., et al., *Head and neck squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients with multiple tumors: etiologic significance of p53 and Ki-67 in non-tumorous epithelium*. *J Oral Pathol Med*, 2008. **37**(9): p. 549-54.
204. Wey, P.D., M.J. Lotz, and L.J. Triedman, *Oral cancer in women nonusers of tobacco and alcohol*. *Cancer*, 1987. **60**(7): p. 1644-50.

205. Brennan, J.A., et al., *Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med, 1995. **332**(11): p. 712-7.
206. Lingen, M.W., et al., *Overexpression of p53 in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients with no known risk factors is not associated with mutations in exons 5-9*. Head Neck, 2000. **22**(4): p. 328-35.
207. Fleming, I., *AJCC Cancer Staging Manual*. 5th ed. 1997, Philadelphia: Lippincott - Raven.
208. Greene, F., Page, DL, Fleming, ID, Fritz, AG, Balch, AM, Haller, DG, Marrow, M, *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. 2002, Chicago: Springer.
209. Weidner, N., D.H. Moore, 2nd, and R. Vartanian, *Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin"-reactive MIB1 antibody*. Hum Pathol, 1994. **25**(4): p. 337-42.
210. Matos, L.L., et al., *Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis*. Clinics (Sao Paulo), 2006. **61**(5): p. 417-24.
211. Strauss, S., et al., *Single-tube real-time nested polymerase chain reaction for detecting human papillomavirus DNA*. Diagn Mol Pathol, 2000. **9**(3): p. 151-7.
212. Kay, P., K. Meehan, and A.L. Williamson, *The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA*. J Virol Methods, 2002. **105**(1): p. 159-70.
213. CALLEGARI-JACQUES, S., *Bioestatística Principios e Aplicações*. 2003, Porto Alegre: Artmed.
214. Carvalho MS, Andreozzi VL, Codeço CL, Barbosa MTS, Shimakura SE, *Análise de Sobrevida. Teoria e Aplicações na Saúde*. 2005, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.
215. Boing, A.F., et al., *How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk?* J Epidemiol Community Health.
216. Bergamasco, V., Marta, GN, Kowalski, LP, Carvalho, AL, *Epidemiological profile of the head and neck cancer in the State of São Paulo*. Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço, 2008. **37**(1): p. 15-19.
217. Carvalho, A.L., et al., *Trends of oral and oropharyngeal cancer survival over five decades in 3267 patients treated in a single institution*. Oral Oncol, 2004. **40**(1): p. 71-6.
218. Hashibe, M., et al., *Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(4): p. 696-703.
219. Rosenblatt, K.A., et al., *Marijuana use and risk of oral squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 4049-54.

220. Olshan, A.F., et al., *GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000. **9**(2): p. 185-91.
221. Cui, Y., et al., *Polymorphism of Xeroderma Pigmentosum group G and the risk of lung cancer and squamous cell carcinomas of the oropharynx, larynx and esophagus*. *Int J Cancer*, 2006. **118**(3): p. 714-20.
222. Zhang, Z., et al., *Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(5): p. 1188-93.
223. Hayes, R.B., et al., *Tobacco and alcohol use and oral cancer in Puerto Rico*. *Cancer Causes Control*, 1999. **10**(1): p. 27-33.
224. Franceschi, S., et al., *Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy*. *Cancer Res*, 1990. **50**(20): p. 6502-7.
225. Baron, A.E., et al., *A comparison of the joint effects of alcohol and smoking on the risk of cancer across sites in the upper aerodigestive tract*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1993. **2**(6): p. 519-23.
226. Levi, F., et al., *Food groups and risk of oral and pharyngeal cancer*. *Int J Cancer*, 1998. **77**(5): p. 705-9.
227. Elahi, A., et al., *The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(7): p. 1229-34.
228. Herrero, R., et al., *Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(23): p. 1772-83.
229. Wang, D., et al., *Alcohol dehydrogenase 3 and risk of squamous cell carcinomas of the head and neck*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(3): p. 626-32.
230. Benhamou, S., et al., *DNA repair gene XRCC2 and XRCC3 polymorphisms and susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract*. *Int J Cancer*, 2004. **112**(5): p. 901-4.
231. Freedman, N.D., et al., *The association of menstrual and reproductive factors with upper gastrointestinal tract cancers in the NIH-AARP cohort*. *Cancer*. **116**(6): p. 1572-81.
232. Hill, K.G., et al., *Family influences on the risk of daily smoking initiation*. *J Adolesc Health*, 2005. **37**(3): p. 202-10.
233. Mansour, O.I., C.H. Snyderman, and F. D'Amico, *Association between tobacco use and metastatic neck disease*. *Laryngoscope*, 2003. **113**(1): p. 161-6.
234. Taylor CR, Shi S, Barr NJ, *Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls, and Standardization*, in *Diagnostic Immunohistochemistry*, D. Dabbs, Editor. 2010, Saunders, Elsevier: Philadelphia. p. 1-41.
235. Hawes D, Shi S, Dabbs DJ, Taylor CR, Cote RJ, *Immunohistochemistry*, in *Modern Surgical Pathology*, N. Weidner, Editor. 2009, Saunders - Elsevier: Philadelphia. p. 48-70.

236. Chan, P.K., et al., *Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA*. J Clin Pathol, 2001. **54**(5): p. 401-3.
237. Reed, A.L., et al., *High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 1996. **56**(16): p. 3630-3.
238. O'Regan, E.M., et al., *p16(INK4A) genetic and epigenetic profiles differ in relation to age and site in head and neck squamous cell carcinomas*. Hum Pathol, 2008. **39**(3): p. 452-8.
239. Singhi, A.D. and W.H. Westra, *Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience*. Cancer. **116**(9): p. 2166-73.
240. Klingenberg, B., et al., *p16 INK4A overexpression is frequently detected in tumour-free tonsil tissue without association with HPV*. Histopathology. **56**(7): p. 957-67.
241. Golebiowski, F., R. Kowara, and T. Pawelczyk, *Distribution of Fhit protein in rat tissues and its intracellular localization*. Mol Cell Biochem, 2001. **226**(1-2): p. 49-55.
242. Golebiowski, F., et al., *Ubc9-induced inhibition of diadenosine triphosphate hydrolase activity of the putative tumor suppressor protein Fhit*. Arch Biochem Biophys, 2004. **428**(2): p. 160-4.
243. Kitamura, A., et al., *Reduced Fhit expression occurs in the early stage of esophageal tumorigenesis: no correlation with p53 expression and apoptosis*. Oncology, 2001. **61**(3): p. 205-11.
244. van Heerden, W.F., et al., *Immunohistochemical evaluation of Fhit protein expression in oral squamous cell carcinomas*. J Oral Pathol Med, 1999. **28**(10): p. 433-7.
245. Ritchie, J.M., et al., *Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx*. Int J Cancer, 2003. **104**(3): p. 336-44.
246. Lassen, P., et al., *Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck*. J Clin Oncol, 2009. **27**(12): p. 1992-8.
247. Chen, M.K., et al., *Glutathione S-transferase P1 and alpha gene variants; role in susceptibility and tumor size development of oral cancer*. Head Neck. **32**(8): p. 1079-87.
248. Fischer, C.A., et al., *Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality?* Int J Cancer. **126**(5): p. 1256-62.
249. Kumar, B., et al., *EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(19): p. 3128-37.
250. Laco, J., et al., *High-risk human papillomavirus infection and p16INK4a protein expression in laryngeal lesions*. Pathol Res Pract, 2008. **204**(8): p. 545-52.
251. Hafkamp, H.C., et al., *Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas*. Int J Cancer, 2008. **122**(12): p. 2656-64.

252. Smith, E.M., et al., *P16INK4a expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer*. Oral Oncol, 2008. **44**(2): p. 133-42.
253. Konig, F., et al., *Relation between human papillomavirus positivity and p16 expression in head and neck carcinomas--a tissue microarray study*. Anticancer Res, 2007. **27**(1A): p. 283-8.
254. Kim, S.H., et al., *HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation*. Int J Cancer, 2007. **120**(7): p. 1418-25.
255. Suzuki, H., H. Sugimura, and K. Hashimoto, *p16INK4A in oral squamous cell carcinomas--a correlation with biological behaviors: immunohistochemical and FISH analysis*. J Oral Maxillofac Surg, 2006. **64**(11): p. 1617-23.
256. Lau, H.Y., et al., *Prognostic significance of p16 in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with concurrent cisplatin and radiotherapy*. Head Neck.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

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 25.11.08, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **0511/07** intitulado: **"Busca de marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço"**, aprovado por esta Comissão em 01.08.07, contempla o sub-projeto intitulado **"Análise clínica e molecular de pacientes não tabagistas e não etilistas com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço"**, que será **tese de doutorado** da aluna **Raquel Ajub Moysés**.

Pesquisador Responsável: **DR PEDRO MICHALUART JR.**

CAPPesq, 25 de novembro de 2008.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

APÊNDICE 2

FORMULÁRIO DE CADASTRO DOS PACIENTES

!!Dados de Identificação

Q1- Nº de identificação:

Q2- Nome do Paciente:

Q3- Número do prontuário no hospital:

Q4- Hospital:

Q5- Paciente: ☐ Internado ☐ Ambulatorial

Q6- Diagnóstico principal: ☐ Controlado ☐ Câncer

Q7- CID-10(código):

Q8- CID-10(Descrição da doença):

Q9- Entrevistador:

!!Informações Gerais

Q10- Data da Entrevista: dd/mm/aaaa

Q11- Início da entrevista: hh:mm

Q12- Coleta de Sangue: ☐ Sim ☐ Não

Q13- Data: dd/mm/aaaa

Q14- Sexo: ☐ Feminino ☐ Masculino

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

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

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

Q15- Endereço:

Q16- Bairro:

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

Q20- Cep: 00000-000

Q21- Telefone: (DDD)- 0000-0000

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

Q22- Data de Nascimento: dd/mm/aaaa

Q23- Qual é a sua idade?

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

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

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

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

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

Q30- Se "Sim", então qual tratamento?

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

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

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

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

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

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

Q42(onde nasceu) - País :

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

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

!!História de Câncer no Entrevistado e na Família

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

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

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

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

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

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

Vivo/Morto : Vivo: V Morto: M

Tumor : Sim: S Não: N IGN: I

Tabagismo : Sim: S Não: N IGN: I

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

OB8: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (tipo de familiar, vivo/morto, idade atual ou da morte, tipo do tumor, idade no diagnóstico ou tabagista). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T1_L3C2- Tabela1 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de história familiar, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de Vivo/Morto.

!!História de Tabagismo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Hábitos de Bebida

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

☐ Sim, ainda bebe ☐ Nunca ☐ Só no passado

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

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

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

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

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

OBS: Destilados: uísque, conhaque, cachaca e valco.

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

Bebida: Vinho: 01 Cerveja: 02 Destilados: 03

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

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

Por: Dia: 01 Semana: 02 Mês: 03

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

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

APÊNDICE 3

FORMULÁRIO DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS: CABEÇA E PESCOÇO

Q0 - Nº de identificação: Nome do Paciente:

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

PRIMEIRA CONSULTA

QUEIXA E DURAÇÃO

Q201- Nome da Mãe:

Q1 -Peso habitual antes da doença: (KG)

Q2 -Altura: (cm)

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

Q7 -IMC:

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

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

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

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

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

Q18 -Dor: ☐ Sim ☐ Não Q19 - (dias)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LOCALIZAÇÃO DA LESÃO CID-10

Q46 - ☐ C00 - Neoplasia maligna do lábio

Q47 - ☐ C00.0 - Lábio superior externo

Q48 - ☐ C00.1 - Lábio inferior externo

Q49 - ☐ C00.2 - Lábio externo, não especificado

Q50 - ☐ C00.3 - Lábio superior, face interna

Q51 - ☐ C00.4 - Lábio inferior, face interna

Q52 - ☐ C00.5 - Lábio, sem especificação, face interna

Q53 - ☐ C00.6 - Comissura labial

Q54 - ☐ C00.8 - Lesão invasiva do lábio

Q55 - ☐ C00.9 - Lábio, não especificado

Q56 - ☐ C01 - Neoplasia maligna de base de língua

Q57 - ☐ C02 - Neoplasia maligna de outras partes e partes não especificadas de língua

Q58 - ☐ C02.0 - Face dorsal da língua

Q59 - ☐ C02.1 - Borda da língua

Q60 - ☐ C02.2 - Face ventral da língua

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

Q105 - ☐ C11.9 - Nasofaringe, não especificada

Q106 - ☐ C12 - Neoplasia maligna do seio piriforme

Q107 - ☐ C13 - Neoplasia maligna da hipofaringe

Q108 - ☐ C13.0 - Região pós-crióides

Q109 - ☐ C13.1 - Pregas arilepiglóticas, face hipofaríngea

Q110 - ☐ C13.2 - Parede posterior da hipofaringe

Q111 - ☐ C13.8 - Lesão invasiva da orofaringe

Q112 - ☐ C13.9 - Hipofaringe, não especificada

Q113 - ☐ C14 - Neoplasia maligna de outras localidades e de localidades mal definidas do lábio cavidade oral e faringe

Q114 - ☐ C14.0 - Faringe, não especificada

Q115 - ☐ C14.1 - Laringofaringe, descrita como tal

Q116 - ☐ C14.2 - Anel de Webber

Q117 - ☐ C14.8 - Lesão invasiva do lábio, cavidade oral e faringe

Q118 - ☐ C30 - Neoplasia maligna da cavidade nasal e do ouvido médio

Q119 - ☐ C30.0 - Cavidade nasal

Q120 - ☐ C30.1 - Ouvido médio

Q121 - ☐ C31 - Neoplasia maligna dos seios da face

Q122 - ☐ C31.0 - Seio maxilar

Q123 - ☐ C31.1 - Seio etmoidal

Q124 - ☐ C31.2 - Seio frontal

Q125 - ☐ C31.3 - Seio esfenoidal

Q126 - ☐ C31.8 - Lesão invasiva dos seios da face

Q127 - ☐ C31.9 - Seio da face, não especificado

Q128 - ☐ C32 - Neoplasia maligna da laringe

Q129 - ☐ C32.0 - Glote

Q130 - ☐ C32.1 - Região supraglótica

Q131 - ☐ C32.2 - Região subglótica

Q132 - ☐ C32.3 - Cartilagens da laringe

Q133 - ☐ C32.8 - Lesão invasiva da laringe

Q134 - ☐ C32.9 - Laringe não especificada

Q135 - ☐ C77.0 - Neoplasia maligna secundária e não especificada dos gânglios linfáticos

Q136 - ☐ C44.9 - Neoplasia maligna da pele

TAMANHO DO TUMOR

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

LINFONÓDOS COM PROMETIDOS CLINICAMENTE

Q140 - E1 NIVEL I D: ☐ Sim ☐ Não

Q143 - E2 NIVEL II D: ☐ Sim ☐ Não

Q146 - E3 NIVEL III D: ☐ Sim ☐ Não

Q141 - Nº de Linfonodos:

Q144 - Nº de Linfonodos:

Q147 - Nº de Linfonodos:

Q142 - Maior Linfonodo: cm

Q145 - Maior Linfonodo: cm

Q148 - Maior Linfonodo: cm

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

METÁSTASES À DISTÂNCIA

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

TUM Clínica: Q188- T: Q189- N: Q190- M:

INFORMAÇÕES TERAPÊUTICAS

Q191- Cirurgia realizada:	☐ Sim ☐ Não	Q192- Data:	<input type="text"/> dd/mm/aaaa	
Q193- Notas: <input type="text"/>				
Q194- Radioterapia:	☐ Sim ☐ Não	Q195- Data início:	<input type="text"/> dd/mm/aaaa	Q196- Data término: <input type="text"/>
Q197- Tipo de Radioterapia:	<input type="text"/>			
Q198- Dose:	<input type="text"/> cGy			
Q199- Quimioterapia:	☐ Sim ☐ Não			

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

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

OB 8: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (drugs, dose, nº dias, dados, data início ou data fim). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T1_L3C2 - Tabela1 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de quimioterapia, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de dose.

Q200- Tipo de Quimioterapia (especificar):

APÊNDICE 4

FORMULÁRIO ANATOMO PATOLÓGICO- CABEÇA E PESCOÇO

OBS: Ao utilizar o banco de dados eletrônico deste formulário, deve-se verificar que há um código formado pela letra "Q" seguido de um número, antes do código de cada questão. Como para um mesmo paciente pode haver mais de um anátomo patológico, esse código inicial com a letra "Q" indica o número do formulário de anátomo patológico inserido no sistema. Suponha o exemplo Q1_Q2: "Q2" indica o segundo formulário de anátomo patológico e "Q1" a primeira questão deste formulário.

Q0 - Nº de identificação: Nome do Paciente:

---Protocolo Anátomo Patológico- Cabeça e Pescoço

1) TIPO DE MATERIAL

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

Q1 - ☐ Biópsia ☐ Peça Cirúrgica - Q2 - data do exame:

2) EXAME MACROSCÓPICO

Tamanho do Tumor - dimensão máxima em centímetros

(Informe diâmetros e espessura tomada a partir da superfície mucosa normal)

Q3 - cm X Q4 - cm X Q5 - cm Q6 - ☐ Não-avaliável

Q7 - Crescimento:

☐ Exofítico ☐ Endofítico ☐ Não-avaliável

Q8 - Área de comprometimento do tumor

3) EXAME MICROSCÓPICO

Tipo Histológico - Carcinoma Glândular

Q9 - Carcinoma espinhal (CEC): ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Informado

Q10 - Variante Morfológica:

☐ Verrucoso ☐ Adenocarcinoma
☐ Linfoplasmático ☐ Escamoso Glândular ☐ Escamoso Endofítico ☐ Fusocelular (Sarcomatosa)
☐ Não-avaliável ☐ Outro

Q11 -

Q11 - Grau de diferenciação:

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

Para a linfoplasia (o componente linfático predomina, com invasão local da lâmina própria)

☐ Microinvasão ☐ Lâmina Própria ☐ Plano Muscular ☐ Cartilagem ☐ Outras Estruturas

Q12 - Profundidade de Invasão do tumor:

☐ Não-avaliável

Infiltração Vascular

Q13 - Sangüínea:

☐ Ausente ☐ Presente ☐ Não-avaliável

Q14 - Linfática:

☐ Ausente ☐ Presente ☐ Não-avaliável

Q15 - Invasão Perineural:

☐ Ausente ☐ Presente ☐ Não-avaliável

Q16 - Infiltração Infratonsilária ou peritonsilária:

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

Q17 - Margens Cirúrgicas:

☐ Com distúrbio de alto grau (especificar o local): Q18
☐ Envolvida por tumor ou invasão (especificar o local): Q19
☐ Com carcinoma in situ (especificar o local): Q20
☐ Não-avaliável Q21
☐ Livre de tumor

Q18 - Lesões em órgãos adjacentes

Linhas de

NIVEL I

Q22-Nº dissecado

Q23-Nº dissecado

Q24-Nº dissecado

Q25-Nº dissecado

Q26-Nº dissecado

Q27-Nº dissecado

Q28-Nº dissecado

Q29-Nº dissecado

Q30-Nº dissecado

Q31-Nº dissecado

Q32-Nº dissecado

Q33-Nº dissecado

Q34-Nº dissecado

Q35-Nº dissecado

Q36-Nº dissecado

Q37-Nº dissecado

Q38-Nº dissecado

Q39-Nº dissecado

Q40-Nº dissecado

Q41-Nº dissecado

Q42-Nº dissecado

Q43-Nº dissecado

Q44-Nº dissecado

Q45-Nº dissecado

Q46-Nº dissecado

Q47-Nº dissecado

Q48-Nº dissecado

Q49-Nº dissecado

Q50-Nº dissecado

Q51-Nº dissecado

Q52-Nº dissecado

Q53-Nº dissecado

Q54-Nº dissecado

Q55-Nº dissecado

Q56-Nº dissecado

Q57-Nº dissecado

Q58-Nº dissecado

Q59-Nº dissecado

Q60-Nº dissecado

Q61-Nº dissecado

Q62-Nº dissecado

Q63-Nº dissecado

Q64-Nº dissecado

Q65-Nº dissecado

Q66-Nº dissecado

Q67-Nº dissecado

Q68-Nº dissecado

Q69-Nº dissecado

Q70-Nº dissecado

Q71-Nº dissecado

Q72-Nº dissecado

Q73-Nº dissecado

Q74-Nº dissecado

Q75-Nº dissecado

Q76-Nº dissecado

Q77-Nº dissecado

Q78-Nº dissecado

Q79-Nº dissecado

Q80-Nº dissecado

Q81-Nº dissecado

Q82-Nº dissecado

Q83-Nº dissecado

Q84-Nº dissecado

Q85-Nº dissecado

Q86-Nº dissecado

Q87-Nº dissecado

Q88-Nº dissecado

Q89-Nº dissecado

Q90-Nº dissecado

Q91-Nº dissecado

Q92-Nº dissecado

Q93-Nº dissecado

Q94-Nº dissecado

Q95-Nº dissecado

Q96-Nº dissecado

Q97-Nº dissecado

Q98-Nº dissecado

Q99-Nº dissecado

Q100-Nº dissecado

Q101-Nº dissecado

Q102-Nº dissecado

Q103-Nº dissecado

Q104-Nº dissecado

Q105-Nº dissecado

Q106-Nº dissecado

Q107-Nº dissecado

Q108-Nº dissecado

Q109-Nº dissecado

Q110-Nº dissecado

Q111-Nº dissecado

Q112-Nº dissecado

Q113-Nº dissecado

Q114-Nº dissecado

Q115-Nº dissecado

Q116-Nº dissecado

Q117-Nº dissecado

Q118-Nº dissecado

Q119-Nº dissecado

Q120-Nº dissecado

Q121-Nº dissecado

Q122-Nº dissecado

Q123-Nº dissecado

Q124-Nº dissecado

Q125-Nº dissecado

Q126-Nº dissecado

Q127-Nº dissecado

Q128-Nº dissecado

Q129-Nº dissecado

Q130-Nº dissecado

Q131-Nº dissecado

Q132-Nº dissecado

Q133-Nº dissecado

Q134-Nº dissecado

Q135-Nº dissecado

Q136-Nº dissecado

Q137-Nº dissecado

Q138-Nº dissecado

Q139-Nº dissecado

Q140-Nº dissecado

Q141-Nº dissecado

Q142-Nº dissecado

Q143-Nº dissecado

Q144-Nº dissecado

Q145-Nº dissecado

Q146-Nº dissecado

Q147-Nº dissecado

Q148-Nº dissecado

Q149-Nº dissecado

Q150-Nº dissecado

Q151-Nº dissecado

Q152-Nº dissecado

Q153-Nº dissecado

Q154-Nº dissecado

Q155-Nº dissecado

Q156-Nº dissecado

Q157-Nº dissecado

Q158-Nº dissecado

Q159-Nº dissecado

Q160-Nº dissecado

Q161-Nº dissecado

Q162-Nº dissecado

Q163-Nº dissecado

Q164-Nº dissecado

Q165-Nº dissecado

Q166-Nº dissecado

Q167-Nº dissecado

Q168-Nº dissecado

Q169-Nº dissecado

Q170-Nº dissecado

Q171-Nº dissecado

Q172-Nº dissecado

Q173-Nº dissecado

Q174-Nº dissecado

Q175-Nº dissecado

Q176-Nº dissecado

Q177-Nº dissecado

Q178-Nº dissecado

Q179-Nº dissecado

Q180-Nº dissecado

Q181-Nº dissecado

Q182-Nº dissecado

Q183-Nº dissecado

Q184-Nº dissecado

Q185-Nº dissecado

Q186-Nº dissecado

Q187-Nº dissecado

Q188-Nº dissecado

Q189-Nº dissecado

Q190-Nº dissecado

Q191-Nº dissecado

Q192-Nº dissecado

Q193-Nº dissecado

Q194-Nº dissecado

Q195-Nº dissecado

Q196-Nº dissecado

Q197-Nº dissecado

Q198-Nº dissecado

Q199-Nº dissecado

Q200-Nº dissecado

Q201-Nº dissecado

Q202-Nº dissecado

Q203-Nº dissecado

Q204-Nº dissecado

Q205-Nº dissecado

Q206-Nº dissecado

Q207-Nº dissecado

Q208-Nº dissecado

Q209-Nº dissecado

Q210-Nº dissecado

Q211-Nº dissecado

Q212-Nº dissecado

Q213-Nº dissecado

Q214-Nº dissecado

Q215-Nº dissecado

Q216-Nº dissecado

Q217-Nº dissecado

Q218-Nº dissecado

Q219-Nº dissecado

Q220-Nº dissecado

Q221-Nº dissecado

Q222-Nº dissecado

Q223-Nº dissecado

Q224-Nº dissecado

Q225-Nº dissecado

Q226-Nº dissecado

Q227-Nº dissecado

Q228-Nº dissecado

Q229-Nº dissecado

Q230-Nº dissecado

Q231-Nº dissecado

Q232-Nº dissecado</

APÊNDICE 5

FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO: CABEÇA E PESCOÇO

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

Q0 - Nº de identificação: Nome do Paciente:

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

II. Acompanhamento de Cabeça e Pescoço

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

Q3- ☐ Recidiva loco-regional ou residual

Q4- ☐ Metástase à distância

Q5- ☐ 2º Tumor primário

Q6- ☐ Óbito

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

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

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

Comentários referente aos campos mencionados acima:

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

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

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

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

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

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

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

A) RECIDIVA B - Recidiva loco-regional ou residual

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

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

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

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

Q21- Nível: Q22- ☐ Direto ☐ Esquerdo

Q23- Nível: Q24- ☐ Direto ☐ Esquerdo

Q25- Nível: Q26- ☐ Direto ☐ Esquerdo

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

Q27- Notas:

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

Q30-Notas:

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

Q34-Se sim, tipo de Radioterapia:

Q35-Se sim, Dose:

Q36-Quimioterapia: ☐ Sim ☐ Não

	C1 Drogas	C2 Dose	C3 Ciclos	C4 Data Início	C5 Data Término
T1					
L1					
L2					
L3					
L4					
L5					
L6					
L7					
L8					
L9	T1_LnC1	T1_LnC2	T1_LnC3	T1_LnC4	T1_LnC5

QB8: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (drogas,dose,nºde ciclos,dados, data início ou data fim). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T1_L3C2 - Tabela1 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de quimioterapia da rede, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de dose.

Q37 -Tipo de Quimioterapia (especificar):

C) METÁSTASES À DISTÂNCIA

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

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

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

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

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

D) TRATAMENTO REALIZADO PARA A METÁSTASES À DISTÂNCIA

Q50-Notas:

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

Q53-Notas:

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

Q57-Se sim, tipo de

Radioterapia:

Q58-Se sim, Dose:

Q59-Quimioterapia: ☐ Sim ☐ Não

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

OB 8: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (drogas,dose,nº dias,dados, data início ou data fim). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T2_L3C2 - Tabela2 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de quimioterapia de metástase, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de dose.

Q60-Tipo de Quimioterapia (especificar):

E) SEGUNDA LEÃO - 2º Tumor primário

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

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

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

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

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

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

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

F) TRATAMENTO DA SEGUNDA LEÃO - 2º Tumor primário

Q76-Notas:

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

Q79-Notas:

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

Q83-Se sim, tipo de Radioterapia:

Q84-Se sim, Dose:

Q85-Quimioterapia: ☐ Sim ☐ Não

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

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

Q86-Tipo de
Quimioterapia
(especificar):

G) INFORMAÇÕES SOBRE O ÓBITO

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

Q88-Data Óbito: dd/mm/aaaa

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

Q90-Se por outra causa,
Informe qual: