LAURA MANNARINI

**Fatores prognósticos em pacientes com
carcinoma epidermoide de laringe estágio clínico T3
tratados por cirurgia, radioterapia ou associações terapêuticas**

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

**Programa de Oncologia
Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mannarini, Laura

Fatores prognósticos em pacientes com carcinoma epidermoide de laringe estágio clínico T3 tratados por cirurgia, radioterapia ou associações terapêuticas / Laura Mannarini. -- São Paulo, 2012.

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

Programa de Oncologia.

Orientador: Luiz Paulo Kowalski.

Descritores: 1.Neoplasia de laringe 2.Carcinoma de células escamosas
3.Câncer avançado 4.Prognóstico 5.Biomarcadores 6.Tratamento
7.Seguimento

USP/FM/DBD-282/12

A Grazia, Luciano e Ester

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter proporcionado o aprendizado para fazer pesquisa em toda sua arte. Por ter me abrigado com tanta dedicação e carinho.

À Fundação Antônio Prudente, pela sua reputação e prestígio como Instituição de Ensino e Pesquisa.

Ao Professor Luiz Paulo Kowalski, meu orientador, pela inesgotável paciência, disponibilidade, perseverança e incentivo à pesquisa. Sua presença foi muito importante para meu engrandecimento humano e profissional; suas críticas foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao Professor Roger Chammas, Coordenador do Programa de Oncologia, por ser um grande cientista e pelo seu grande apoio durante minha pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, pelo apoio do Departamento de Anatomia Patológica na execução deste trabalho.

À Dra. Claudia Coutinho Camilo, por ter despertado meu interesse e aumentado meu conhecimento em fazer pesquisa. Pelas críticas e sugestões que foram de grande valor para meu enriquecimento profissional e conclusão deste trabalho.

À Professora Silvia Vanessa Lourenço, pela grande contribuição na interpretação dos dados imunoistoquímicos e intensa dedicação a este

trabalho. Sua grande experiência foi fundamental para enriquecer meu conhecimento na área da Patologia, e para o desenvolvimento desta tese.

À equipe de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital A.C. Camargo, por ter me permitido participar da vida do Departamento; pelo convívio e amizade.

À Dra. Inês N. Nishimoto, pelo auxílio na análise estatística deste trabalho e pelo contínuo incentivo durante esses três anos; agradeço sobretudo pela nossa bela amizade.

À Dra. Sonia Querino, pelo contínuo e incondicional apoio durante minha pós-graduação.

À Dra. Claudinha Barros e à Dra. Elaine Marqueze, pelo apoio na análise estatística e por serem ótimas pesquisadoras.

À Sra. Suely Francisco e toda a equipe da biblioteca, pela dedicação e exaustivo trabalho na biblioteca da Fundação Antônio Prudente.

À equipe do SAME da Fundação Antônio Prudente, em particular ao Dr. Cesar Torres, pela eficiência em disponibilizar os prontuários médicos.

Ao Sr. Carlos Ferreira Nascimento e ao Sr. Severino da Silva Ferreira, pela realização do *Tissue Microarray*.

Ao serviço de biblioteca e documentação da FMUSP, pelo contínuo trabalho e dedicação aos alunos.

À doutora Maria Inês Roland, pela disponibilidade e paciência na revisão do português desta tese.

Ao Departamento de Medicina Preventiva, FMUSP, pela grande disponibilidade e atenção dedicada e, em particular, à minhas amigas Camila, Maria Inês e Lilian, pelo belo companheirismo.

À Paula, Bianca e Ana Maria. Por terem começado comigo essa experiência e terem ficado ao meu lado.

À meu amigo Dr. Marcelo Hajime. Foi de grande importância seu incentivo nos pensamentos positivos. Agradeço por sempre acreditar em mim e me transmitir força para a conclusão desta tese.

Aos meus amigos Elaine e Sérgio, pela nossa linda amizade e o grande carinho sempre demonstrado. Por ter lidado comigo e “minhas malas” mais de uma vez.

À Elen Alves, pelo incentivo em desenvolver atividade de pesquisa laboratorial e pela amizade.

À Carolina, pela amizade e por ser minha “irmã maior” de doutorado.

À Ana Lucia, pela amizade e carinho sempre demonstrado.

À Rita Rodrigues, pela grande disponibilidade, eficiência e amizade.

À Telma, pelos bons conselhos, carinho e amizade.

A quem me ensinou o significado da palavra saudade. Pelo incentivo em trabalhar seriamente, sempre acreditando nos bons resultados. Agradeço por ter sentido você ao meu lado. Ter você como exemplo foi um grande desafio. *E già te l'ho detto, un pezzo di questo dottorato è anche tuo...*

...

Si no puede ser un camino
Si sólo hay un camino,
Si no puede ser el sol, ser una estrella.
No es por el tamaño que va a tener éxito o el fracaso ...
Pero ser el mejor en lo que eres.

...

*Se não puderes ser uma estrada,
Sê apenas uma senda,
Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...
Mas sê o melhor no que quer que sejas.*

Pablo Neruda

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Lista de quadros

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de siglas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia do câncer de laringe	2
1.2 Câncer de laringe em estágio clínico avançado	4
1.2.1 Bases anatômicas, apresentação clínica do câncer de laringe e estadiamento clínico	4
1.2.2 Estádio cT3cN0-3 e opções terapêuticas	10
1.2.3 Tratamento e sobrevida	16
1.3 Marcadores biológicos de prognóstico em câncer de cabeça e pescoço	22
1.3.1 Gene supressor tumoral TP53	23
1.3.2 Receptores tirosina quinase Erb B e vias de transdução de sinal ativadas: via MAPKs e via PI3K-AKT / p53	25
2 OBJETIVOS	31

3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Desenho do estudo	34
3.2 Amostra e caracterização dos pacientes	34
3.2.1 Critérios de inclusão	35
3.2.2 Critérios de exclusão	35
3.2.3 Critérios diagnósticos e estadiamento	36
3.3 Seleção das amostras de material biológico e revisão	36
3.4 Construção do “tissue microarray” (TMA)	37
3.5 Imunoistoquímica	38
3.6 Interpretação das reações imunoistoquímicas	40
3.7 Análise estatística	41
4 RESULTADOS	49
4.1 Características clínico-demográficas dos casos estudados e poder da amostra	50
4.1.1 Características clínico-demográficas e de estilo de vida dos casos estudados e seguimento no estudo	50
4.1.2 Características clínicas de apresentação do tumor e tratamento	53
4.2 Características histopatológicas dos tumores	56
4.3 Persistência, recorrência e segundo tumor primário.	59
4. 4 Imunoistoquímica	60
4.5 Análise da sobrevida	94
4.6 Análise dos fatores estudados na sobrevida livre de doença	109

4.7 Análise multivariada das variáveis clínicas e patológicas	118
4.8 Acometimento do espaço pré-epiglótico como fator diagnóstico de sobrevida de acordo com o tratamento.	121
5 DISCUSSÃO	124
5.1 Reflexões sobre os resultados obtidos e perspectivas futuras.....	142
6 CONCLUSÕES	146
7 ANEXOS	148
8 REFERÊNCIAS	162

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vias de transdução de sinal mediadas por EGFR	30
Figura 2.	Representação esquemática da montagem do TMA	38
Figura 3.	Esquemtização das variáveis analisadas em relação aos desfechos	43
Figura 4a.	Aspectos histopatológicos dos casos de carcinoma epidermoide T3 da laringe: A: bloco tumoral com aspectos de invasão na lâmina própria e próximo a cartilagem calcificada. B: intensa displasia e atipia das células neoplásicas e presença de mitoses (seta); C: carcinoma epidermoide com invasão perivascular; D: êmbolo neoplásico; D: invasão neoplásica perineural; E: invasão neoplásica periglandular	62
Figura 4b.	Expressão imunoistoquímica das proteínas EGFR, Erb B2, Erb B3, Erb B4 em amostras de carcinoma de laringe: A, expressão de membrana positiva de EGFR; B, expressão de membrana/ citoplasmática positiva de EGFR; C,D expressão de membrana positiva de Erb B2; E, expressão de membrana positiva de Erb B3; F, expressão nuclear positiva de Erb B3; G, expressão de membrana positiva de Erb B4; H, expressão citoplasmática positiva de Erb B4	63
Figura 4c.	Expressão imunoistoquímica das proteínas RAS, MEK, ERK em amostras de carcinoma de laringe. A, B expressão nuclear positiva de RAS; C, D expressão citoplasmática positiva de MEK; E, F expressão negativa de ERK	64
Figura 4d.	Expressão imunoistoquímica das proteínas PTEN, mTOR, p53 em amostras de carcinoma de laringe. A, B expressão nuclear de PTEN; C, expressão nuclear de mTOR (displasia grave/carcinoma <i>in situ</i>); D, expressão citoplasmática de mTOR; E, F expressão nuclear de p53	65
Figura 5.	Representação esquemática da via metabólica MAPKs-quinase (RAS-MEK-ERK-MAPK) e da via metabólica P13K-ATK (P13k-AKT-mTOR) e interação da atividade dos dois genes onco-sopresores p53 e PTEN	134
Figura 6.	Expressão positiva de ErbB1 e ErbB3 e ErbB4	135
Figura 7.	Expressão positiva de ErbB1 e hiperexpressão de mTOR (via P13K-AKT)	136
Figura 8.	Expressão positiva de ErbB3 e ErbB4 (homodímeros da	

	família dos receptores Erb B) e hiperexpressão de RAS-MEK (via MAPKs) e mTOR (via P13K-AKT)	138
Figura 9.	Expressão negativa de ErbB2 e ErbB3	140
Figura 10.	Expressão positiva de p53	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição da casuística de acordo com variáveis clínico-demográficas dos pacientes e estilo de vida	52
Tabela 2 -	Distribuição da casuística de acordo com características clínicas de apresentação do tumor	54
Tabela 3 -	Distribuição da casuística de acordo com o tratamento..	56
Tabela 4 -	Distribuição da casuística de acordo com variáveis patológicas do tumor primário e metástases linfonodais	58
Tabela 5 -	Distribuição da casuística de acordo com persistência, recorrência e segundo tumor primário	60
Tabela 6 -	Distribuição da casuística de acordo com expressão dos marcadores	61
Tabela 7a -	Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor de acordo com p53	68
Tabela 7b -	Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do p53	69
Tabela 7c -	Distribuição das expressão marcadores de acordo com p53	70
Tabela 8a -	Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor de acordo com ErbB1	71
Tabela 8b -	Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do ErbB1	72
Tabela 8c -	Distribuição das expressão marcadores de acordo com ErbB1	73
Tabela 9a -	Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor de acordo com ErbB2	74
Tabela 9b	Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do ErbB2	75

Tabela 9c -	Distribuição das expressão marcadores de acordo com ErbB2	76
Tabela 10a -	Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor de acordo com ErbB3	77
Tabela 10b -	Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do ErbB3	78
Tabela 10c -	Distribuição das expressão marcadores de acordo com ErbB3	79
Tabela 11a -	Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor de acordo com ErbB4	80
Tabela 11b-	Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do ErbB4	81
Tabela 11c -	Distribuição das expressão marcadores de acordo com ErbB4	82
Tabela 12a -	Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor, de acordo com MEK	83
Tabela 12b -	Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do MEK	84
Tabela 12c -	Distribuição das expressão marcadores, de acordo com MEK	85
Tabela 13a -	Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor, de acordo com RAS	86
Tabela 13b -	Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do RAS	87
Tabela 13c -	Distribuição das expressão marcadores, de acordo com RAS	88
Tabela 14a -	Distribuição das variáveis clinicas de apresentação do tumor, de acordo com pTEN	89
Tabela 14b -	Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos	

	desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do PTEN	90
Tabela 14c -	Distribuição das expressão marcadores, de acordo com pTEN	91
Tabela 15a -	Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor, de acordo com mTOR	92
Tabela 15b -	Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do mTOR	93
Tabela 16-	Probabilidade de sobrevida global em 5 anos e 10 anos, de acordo com variáveis clínicas de apresentação do tumor e grau histológico	99
Tabela 17 -	Probabilidade de Sobrevida global em 5 anos e 10 anos, de acordo com variável tratamento	101
Tabela 18 -	Probabilidade de Sobrevida global 5 anos e 10 anos, de acordo com variáveis patológicas do tumor	106
Tabela 19 -	Probabilidade de Sobrevida global 5 anos e 10 anos, de acordo com persistência e segundo tumor primário	107
Tabela 20 -	Probabilidade de Sobrevida global em 5 anos e 10 anos, de acordo com a expressão dos marcadores	108
Tabela 21 -	Probabilidade de sobrevida livre de doença 5 anos e 10 anos, de acordo com variáveis de apresentação clínica do tumor e grau histológico	111
Tabela 22 -	Probabilidade de sobrevida livre de doença 5 anos e 10 anos, de acordo com tratamento	112
Tabela 23 -	Probabilidade de sobrevida livre de doença 5 anos e 10 anos, de acordo com variáveis patológicas do tumor ...	116
Tabela 24 -	Probabilidade de sobrevida livre de doença 5 anos e 10 anos, de acordo com persistência e segundo tumor primário	117
Tabela 25 -	Probabilidade de sobrevida livre de doença 5 anos e 10 anos, de acordo com expressão marcadores	118
Tabela 26a -	Análise univariada, estimativa dos Riscos Relativos (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão de COX (variáveis	

	clínicas e terapêuticas)	119
Tabela 26b -	Estimativa dos possíveis fatores prognósticos independentes estimados através do Risco Relativo (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão de COX (variáveis clínicas e terapêuticas)	119
Tabela 27a -	Análise univariada, estimativa dos Riscos Relativos (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão de COX (variáveis clínicas, terapêuticas e patológicas)	120
Tabela 27b -	Estimativa dos possíveis fatores prognósticos independentes estimados através do Risco Relativo (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão de COX (variáveis clínicas, terapêuticas e patológicas)	121
Tabela 28 -	Probabilidade de sobrevida em 5 anos e 10 anos, de acordo com acometimento do espaço pré-epiglótico de acordo com o tratamento	122

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Sobrevida Global, curva de Kaplan Meier	94
Gráfico 2.	Curva kaplan-Meier de sobrevida em acordo com cN	96
Gráfico 3.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com invasão espaço paraglótico	96
Gráfico 4.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com invasão da cartilagem	97
Gráfico 5.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com invasão espaço pré-epiglótico	97
Gráfico 6.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com invasão espaço retrocricoide	98
Gráfico 7.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com tratamento	100
Gráfico 8.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com pN	102
Gráfico 9.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com níveis dos linfonodos positivos	103
Gráfico 10.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com margens cirúrgicas	103
Gráfico 11.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com extravasamento capsular	104
Gráfico 12.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com invasão linfática	104
Gráfico 13.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com persistência	105
Gráfico 14.	Curva de Kaplan-Meier, sobrevida global livre de doença.	109
Gráfico 15.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença em acordo com níveis de linfonodos patológicos positivos...	110
Gráfico 16.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença em acordo com pN	113
Gráfico 17.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença em acordo com níveis de linfonodos patológicos positivos....	114

Gráfico 18.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença em acordo com extravassamento capsular	114
Gráfico 19.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença em acordo com invasão linfática	115
Gráfico 20.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença em acordo com segundo tumor primário	115
Gráfico 21.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com tratamento, pacientes com acometimento do espaço pré-epiglótico	123
Gráfico 22.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com tratamento, pacientes sem acometimento do espaço pré-epiglótico	123

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Anticorpo primário, clones, fornecedor, diluição de uso e recuperação antigênica utilizados para as reações imunoistoquímicas	40
Quadro 2.	Classificação das variáveis demográficas analisadas no presente estudo	44
Quadro 3.	Classificação das variáveis clínicas analisadas no presente estudo	45
Quadro 4.	Classificação das estratégias de tratamento analisadas no presente estudo	46
Quadro 5.	Classificação das variáveis patológicas analisadas no presente estudo	47
Quadro 6.	Classificação de persistência, recorrência e segundo tumor primário*	48
Quadro 7.	Classificação das expressões dos marcadores analisadas no presente estudo	48

LISTA DE ABREVIATURAS

T	Tumor primário (estádio T)
N	Metástase linfonodal (estádio N)
M	Metástases à distância (estádio M)
HAS	Hipertensão arterial
DM	Diabete Melito
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DP	Desvio padrão
ASA	American Society of Anesthesiologists
TC	Tomografia computadorizada
RMN	Resonancia magnética
RT	Radioterapia
RTQT	Radioquimioterapia
TGF-α	Fator transformador de crescimento alfa
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ErbB	Família receptores tirosina quinase
K	Domínio quinase do receptor ErbB
SOS	“son of sevenless”
MEK	Proteína quinase ativada por mitogeno
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extra-celular
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
Akt	Proteína quinase B
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
PTEN	Fosfatase e angiotensina homólogo
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição

LISTA DE SÍMBOLOS

=	igual a
<	menor que
>	maior que
N	número de casos
%	porcentagem
p	valor de significância estatística

LISTA DE SIGLAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
FOSP	Fundação Oncocentro de São Paulo
UICC	Union for International Cancer Control
NCCN	National Comprehensive Cancer Centers Network
EORTC	European Organization Research and Treatment of Cancer
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
AAO-HNS	American Academy of Otolaryngology Head and Neck Surgery
INCA	Instituto Nacional de Câncer
NCI	National Cancer Institute (Estados Unidos da América)
EUA	Estados Unidos da América

RESUMO

Mannarini L. Fatores prognósticos em pacientes com carcinoma epidermoide de laringe estágio clínico T3 tratados por cirurgia, radioterapia ou associações terapêuticas. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A diminuição da sobrevida registrada para pacientes com câncer de laringe nas últimas décadas pode estar relacionada a mudanças nos padrões de tratamento. Na literatura recente, há uma polêmica sobre o tratamento de tumores laríngeos em estágio clínico T3 devido ao emprego disseminado de estratégias de preservação de órgãos (Hoffman, 2006). Embora os critérios de inclusão para o grupo de preservação de órgãos tendam a selecionar tumores de "baixo volume", a escolha de uma determinada estratégia depende também da formação profissional do médico, da experiência e da infraestrutura do hospital e dos desejos dos pacientes. Essa consideração pressupõe uma distribuição homogênea dos pacientes entre os grupos de tratamento. No entanto, deve-se destacar o papel prognóstico das variáveis relacionadas ao tumor, ao paciente e à opção terapêutica na prática clínica.

Objetivo: Avaliar as características clínicas, patológicas e a expressão de biomarcadores ativados pela via do EGFR em uma série de casos em relação à evolução e ao prognóstico. **Metodologia:** No presente estudo, 145 pacientes consecutivos com diagnóstico de carcinomas avançados de laringe cT3N0-3M0 foram analisados retrospectivamente. Foram incluídos casos de carcinoma epidermoide de supraglote, glote, subglote e transglote, tratados em uma única instituição por quatro diferentes estratégias de tratamento (cirurgia exclusiva; cirurgia mais terapia adjuvante; radioterapia exclusiva, e radioquimioterapia). Os dados foram obtidos a partir do Registro de Câncer do Hospital A.C. Camargo, São Paulo (1990-2007). Uma série de variáveis clínicas e patológicas foi avaliada pelo métodos de Kaplan-Meier e de regressão de Cox. Opções de tratamento também foram avaliadas como fator prognóstico. Associações entre características clínico-patológicas do tumor e sobrevida, sobrevida livre de doença e risco de morte, foram investigadas. **Resultados:** Três variáveis clínicas, as variáveis terapêuticas e cinco variáveis patológicas, foram estatisticamente significativas na estimativa de sobrevida específica em 5 anos (CS-5a). A sobrevida foi influenciada negativamente pela invasão do tumor primário do espaço pré-epiglótico (45,5%, $P = 0,003$), pescoço clínico (cN) positivo (37,6%, $P = 0,031$), invasão da área retrocricóide (0,0%, $P = 0,009$), invasão linfática (44,1%, $P = 0,015$), extravasamento capsular (43,1%, $P = 0,003$), pescoço patológico (pN) positivo (42,9%, $P = 0,001$), linfonodos positivos nos níveis cervicais IV-VI (33,3%, $P = 0,008$), margens cirúrgicas positivas (22,2%, $P = 0,001$). O tratamento teve impacto na sobrevida (CS-5a): a taxa foi de 51,6%, quando houve tratamento adjuvante (devido a achado patológico positivo na peça operatória), diminuiu até 41,5% no grupo de radioterapia

exclusiva ($P = 0,039$). Cirurgia exclusiva e radioquimioterapia influenciaram a sobrevida de maneira semelhante (74,0% ; 77,5%). Considerando variáveis clínicas e terapêuticas, resultaram ser fatores prognósticos independentes: invasão do espaço paraglótico (RR multivariado 1,92; IC 1,02-3,61), pescoço clínico (cN) positivo (RR multivariado 2,24; IC 1,11-4,50), invasão do espaço pré-epiglótico (RR multivariado 2,65; IC 1,46-4,81) e tratamento radioterápico exclusivo (RR multivariado 2,88; IC 1,31-6,30); incluindo as variáveis patológicas, resultaram ser fatores prognósticos independentes achados patológicos de extravasamento capsular (RR multivariado 3,09; IC 1,56-6,12) e margens cirúrgicas comprometidas (RR multivariado 3,45; IC 1,11-10,75). A investigação de expressão imunoistoquímica de dez biomarcadores das vias de transdução de sinal ativadas pelo receptor tirosina quinase Erb B (EGFR, Erb B2, Erb B3, Erb B4, RAS, MEK, ERK, mTOR, PTEN, p53) mostrou associação entre expressão imunoistoquímica positiva de ErbB3 e ErbB4 e expressão de biomarcadores da via MAPKs e AKT-PI3K (MEK e mTOR). A positividade desses biomarcadores, ou seja, a desregulação da rede ErbB foi associada à invasão linfática, ponto de partida do acometimento linfonodal que resultou ser fator prognóstico independente entre as variáveis clínicas e patológicas (extravasamento capsular). **Conclusões:** Entre as variáveis clínicas e terapêuticas, resultaram ser fatores prognósticos independentes: invasão do espaço paraglótico, pescoço clínico (cN) positivo, invasão do espaço pré-epiglótico e tratamento radioterápico exclusivo. Quando foram incluídas as variáveis patológicas, resultaram ser fatores prognósticos independentes achados patológicos de extravasamento capsular e margens cirúrgicas comprometidas. A positividade dos biomarcadores estudados (desregulação da rede ErbB), foi associada a invasão linfática.

Descritores: neoplasia de laringe, carcinoma de células escamosas, câncer avançado, prognóstico, biomarcadores, tratamento, seguimento.

SUMMARY

Mannarini L. Prognostic factors in patients with cT3 laryngeal squamous cell carcinoma treated by surgery, radiation or multimodality treatment. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

The decreased survival recorded for patients with laryngeal cancer in the last decades may be related to changes in patterns of management; in literature a recent debate has been dedicated to the management of clinical stage T3 due to the disseminated use of organ preservation strategies (Hoffman, 2006). Although inclusion criteria for organ preservation group tends to select “low volume” tumors, in clinical practice the choice of a determined strategy depends also to medical and hospital experience and infrastructure and on patients’ wishes. This consideration may suppose an homogenous distribution of the patients among the treatment groups, however in clinical practice several clinico-pathological and therapeutic prognostic factors are considered for therapeutic decision. **Objectives:** Evaluate clinical and pathological characteristics and expression of biomarkers activated by the EGFR cascade in a case series and analyse the association with outcomes and prognosis. **Materials and method:** In the present study 145 consecutive patients with diagnosis of laryngeal advanced carcinomas, cT3N0-3M0, were retrospectively analyzed, including cancer of the supraglottis, glottis, subglottis and trans-glottis, treated in a single institution by four different treatment strategies (exclusive surgery, surgery and adjuvant therapy, radiotherapy alone, and radiochemotherapy). Data was obtained from the Cancer Registry, Hospital AC Camargo, São Paulo (1990-2007). A set of clinical and pathological variables were assessed by Kaplan-Meier and Cox regression methods. Treatment option was also assessed as prognostic factor. Associations between clinical-pathological features of the tumor and survival, disease free-survival and risk of death, were investigated. **Results:** Three clinical variables, the therapeutic variable and five pathological variables, were statistically significant in estimating cancer specific survival at 5 years (CS-5y). Survival was negatively influenced by primary tumour spreading as filling of pre-epiglottic space (45.5%, $P = 0.003$), clinical neck (cN) positive (37.6%, $P = 0.031$), invasion of retrocricoid area (0.0%, $P = 0.009$), lymphatic invasion (44.1%, $P = 0.015$), extra-capsular nodal spread (43.1%, $P = 0.003$), pathological neck (pN) positive (42.9%, $P = 0.001$), positive IV-VI levels cervical nodes (33.3%, $P = 0.008$), positive surgical margins (22.2%, $P = 0.001$); treatment impacted on CS-5y, it decreases at 51.6% if adjuvant treatment (positive pathological finding on operative specimen), up to 41.5% in exclusive radiotherapy group ($P = 0.039$); exclusive surgery and radio-chemotherapy influenced survival similarly (74.0%; 77.5%). Among clinical e therapeutic variables, invasion of paraglottic space (HR adjusted 1.92; IC 1.02-3.61), positive clinical neck (cN) (HR adjusted 2,24; IC 1,11-4,50), invasion of pre-epiglottic space (HR

adjusted 2,65; IC 1,46-4,81) and exclusive radiotherapy (RR adjusted 2,88; IC 1,31-6,30) resulted to be independent prognostic factors; including pathological variables, extracapsular node invasion (HR adjusted 3,09; IC 1,56-6,12) and positive resection margins (HR adjusted 3,45; IC 1,11-10,75) were independent prognostic factors. Exploration of immunohistochemical expression of ten biomarkers of the signal transduction pathways activated by tyrosine kinases receptor Erb B (EGFR, Erb B2, Erb B3, Erb B4, RAS, MEK, ERK, mTOR, pTEN, p53) showed association between positive immunohistochemical expression of ErbB3 and ErbB4 and biomarkers of MAPKs and AKT-PI3K pathways (MEK and mTOR); the dysregulation of the Erb B network was associated with lymphatic invasion, starting point for lymph-nodes involvement that resulted to be clinical independent prognostic factors. **Conclusion:** Among clinical and therapeutic variables, the identified independent prognostic factors were: invasion of paraglottic space, clinically positive neck, invasion of pre-epiglottic space and radiotherapy alone. When pathologic variables were included, extracapsular spread and positive surgical margins were identified as independent prognostic factors. Positive results of the studied biomarkers (dysregulation of Erb B network) was associated with lymphatic invasion.

Descriptors: 1-laryngeal neoplasia, 2- squamous cell carcinoma,, 3- advanced cancer, 4-prognosis, 5-biomarkers, 6-treatment, 7-follow-up.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer de laringe

A Sociedade Americana de Câncer estimou a incidência de câncer de laringe para o ano 2012 nos Estados Unidos: os resultados foram baseados na taxa de incidência de 47 estados e no Distrito de Columbia entre 1995 e 2008, como relatado pela Associação Norte-Americana de Registro Central de Câncer (NAACCR), e representando cerca de 95% da população dos EUA. As mortes estimadas foram baseadas em dados de mortalidade dos Estados Unidos (1994-2008) pelo Centro Nacional de Estatísticas de Saúde, Centros de Controle e Prevenção de Doenças. O número de casos novos de câncer de laringe foi estimado em 12.360 (9.840 homens e 2.520 mulheres) e 3.650 mortes (2.880 homens e 770 mulheres) (American Cancer Society, 2012).

O Instituto Nacional de Câncer estimou a incidência de câncer da laringe para o ano 2012 no Brasil: o número de casos novos de câncer de laringe foi estimado em 6.110, sendo 1.740 no Estado de São Paulo (Ministerio da Saúde, Instituto Nacional de Câncer, 2012).

A taxa de incidência está estritamente associada às precárias condições socioeconômicas (baixa escolaridade, poluição ambiental, assistência de saúde de má qualidade etc), e à exposição a fatores de risco

clássicos para câncer de cabeça e pescoço (tabaco e álcool) presentes em mais de 90% dos pacientes (Parkin et al., 2005; Jemal et al., 2008).

Análise do *SEER Cancer Statistics NCI* (2003-2007) estimou que a idade média de diagnóstico para câncer de laringe foi de 65 anos de idade. Poucos casos foram diagnosticados em idade inferior a 20 anos; 0,4% entre 20 e 34 anos; 3,1% entre 35 e 44 anos; 15,7% entre 45 e 54 anos; 28,8% entre 55 e 64 anos; 28,9% entre 65 e 74 anos, 18,2% entre 75 e 84 anos, e 4,9% acima de 85 anos. A taxa de incidência ajustada por idade foi de 3,4 por 100.000 homens e mulheres por ano. Aproximadamente 50% dos casos apresentavam doença localizada; em 20%, havia propagação regional, e em 17%, metástases distantes. Essas taxas foram baseadas em casos diagnosticados no período 2003-2007, em 17 áreas geográficas e coletados pelo *SEER*.

De 2003 a 2007, a idade média de morte por câncer de laringe foi de 68 anos. Poucos casos morreram com menos de 20 anos; 0,1% entre 20 e 34 anos; 1,7% entre 35 e 44 anos; 11,7% entre 45 e 54 anos; 25,2% entre 55 e 64 anos; 28,9% entre 65 e 74 anos; 23,8% entre 75 e 84 anos, e 8,6% com mais de 85 anos. A taxa de mortalidade ajustada por idade foi de 1,2 por 100 mil homens e mulheres por ano. Essas taxas tomaram como base pacientes que morreram no período 2003-2007 nos EUA (*NCI's SEER Cancer Statistics Review, 2003-2007*).

Observa-se uma tendência de declínio da sobrevida para câncer de laringe nas últimas décadas (Carvalho, 2005). Hoffman (2006) documentou uma diminuição das taxas de sobrevida específica para o carcinoma de

laringe, de 68,1% em 1985 para 64,7% em 2000, por meio de uma análise dos dados referentes ao *SEER Cancer Statistics NCI* (1975-2000). Dentre as várias hipóteses propostas para justificar essa tendência, foi observada uma maior incidência de casos em estágio clínico avançado (de 38,8% em 1985 para 41,2% em 2000) e um grande desenvolvimento e difusão de estratégia de preservação de órgão. Uma análise específica foi dedicada ao carcinoma de laringe estágio clínico T3N0M0 (Hoffman HT, 2006).

1.2 Câncer de laringe em estágio clínico avançado

1.2.1 Bases anatômicas, apresentação clínica do câncer de laringe e estadiamento clínico

A laringe é composta por três regiões anatômicas (Almeida et al., 2005):

1. Laringe supraglótica se estende superiormente, desde epiglote, pregas ariepiglóticas, aritenóides, e falsas pregas vocais inferiormente;
2. Laringe glótica consiste nas pregas vocais verdadeiras (incluindo a comissura anterior) até 5 mm da superfície inferior das pregas vocais verdadeiras inferiormente;
3. Laringe subglótica se estende desde a glote superiormente, até à borda inferior da cartilagem cricóide inferiormente.

O carcinoma de células escamosas da laringe supraglótica é responsável por 35% dos casos de câncer de laringe. Cerca de 25% a 50%

dos pacientes apresentam metástases em linfonodos cervicais, o que é atribuído ao fato de a região supraglótica ser rica em drenagem linfática (INCA, 2001).

Os linfonodos cervicais profundos são chamados de anterolaterais do pescoço e são divididos em seis níveis, de I a VI, sendo que os níveis I, II e V apresentam subdivisão em A e B (Shah et al., 1981; Som et al., 1999).

Em caso de doença na região supraglótica, depois de penetrar no espaço pré-epiglótico e atravessar a membrana tireo-hiodea, a drenagem linfática conflui nos linfonodos jugulares superiores, médios e inferiores (níveis II, III, e IV) (Tomik et al., 2001). A disseminação local do câncer é geralmente em uma direção superior ou lateral. A propagação inferior à comissura anterior é menos comum. O risco de acometimento dos linfonodos depende da extensão do tumor primário (Kowalski et al., 1995).

O câncer de laringe glótica representa quase 65% dos casos de câncer de laringe. Esses tumores tendem a ser bem diferenciados, com crescimento lento e metástases ocorrendo tardiamente. Tendo as cordas verdadeiras drenagem linfática muito limitada, metástases em linfonodos cervicais ocorrem em menos de 10% dos casos (Tomik et al., 2001).

Linfonodos cervicais metastáticos ocorrem geralmente quando o câncer infiltra para além do limite das pregas vocais verdadeiras. A extensão submucosa pode levar ao envolvimento da comissura anterior e da prega vocal contralateral. O câncer pode se estender lateralmente, resultando em destruição da cartilagem, ou na parte superior com a participação das

pregas vocais falsas e das pregas ariepiglóticas (carcinoma transglótico). A extensão subglótica também pode ocorrer (Tomik et al., 2001).

O câncer subglótico ou extensões subglóticas de um câncer glótico estão associados a metástases em linfonodos cervicais. Os vasos linfáticos da laringe subglótica drenam para os linfonodos jugulares médios e inferiores (níveis III e IV) e para os linfonodos pré e paratraqueais; ocasionalmente, para os linfonodos mediastinais. As metástases no nível VII são consideradas metástases em linfonodos não regionais (Kowalski et al., 1998).

A compartimentalização anatômica e embriológica da laringe contribui para explicar a dinâmica de invasão/extensão das lesões neoplásicas. Dessa forma, há uma tendência dos tumores, em sua fase inicial, a permanecer em sua região de origem. Existem algumas barreiras compartimentais para limitar a propagação do tumor (Bayle et al., 2001):

- cone elástico: membrana fibroelástica que limita superiormente a região subglótica, com sua borda superior espessada – os ligamentos vocais;
- membrana quadrangular com seus ligamentos ventriculares;
- tecido conjuntivo ventricular;
- tendão da comissura anterior (Broyle).

O espaço pré-epiglótico é formado superiormente pelo ligamento hioepiglótico, pela membrana tireo-hioidea anteriormente e pela superfície

anterior da epiglote posteriormente. Apresenta um formato de pirâmide invertida e continua lateralmente com a porção superior do espaço paraglótico. Contém gordura e tecido areolar frouxo. Carcinomas podem alcançar esse espaço pelas perfurações da cartilagem epiglote (Bailey et al., 2001).

O espaço paraglótico é formado lateralmente pela superfície interna da cartilagem tireoide, ínfero-medialmente pelo cone elástico, medialmente pelo ventrículo, e súpero-medialmente pela membrana quadrangular. Comunica-se na parte superior com o espaço entre a cartilagem tireoide e o osso hioide; inferiormente, com o espaço entre a cartilagem tireoide e cricoide, e com o espaço pré-epiglótico anteriormente (Bailey et al., 2001).

A invasão do espaço paraglótico favorece também o acometimento do pericôndrio e cartilagens, além do escape para fora dos limites laríngeos, por não oferecer resistência ao crescimento tumoral (Bailey et al., 2001).

A avaliação clínica da mobilidade das pregas vocais é indicativa de invasão profunda do tumor. A fixação da unidade cricoaritenóidea, unidade básica funcional da laringe, sugere a invasão das aritenóides ou do espaço paraglótico (Bailey et al., 2001).

Na unidade funcional de motilidade laríngea são incluídas aritenóide, cartilagem cricoide, nervo laríngeo recorrente, ramo interno do nervo laríngeo superior, musculatura interaritenóidea e musculatura cricoaritenóidea posterior e lateral. Uma fixação da prega vocal (com aritenóide móvel em fonação) não significa acometimento profundo, mas

somente acometimento dos músculos tireoaritenoideos (Stephen et al., 2003).

Uma avaliação da extensão da doença antes do tratamento é objetivo do sistema internacional de estadiamento dos tumores malignos (TNM - Classificação dos Tumores Malignos - AJCC, 2010).

A avaliação do tumor primário laríngeo é baseada na inspeção, laringoscopia indireta, fibrolaringoscopia e/ou laringoscopia direta. As áreas de drenagem linfática no pescoço devem ser examinadas por palpação cuidadosa. O diagnóstico de tumor deve ser confirmado histologicamente, e qualquer outro dado patológico obtido por biópsia pode ser considerado. A avaliação da neoplasia por ressonância magnética ou tomografia computadorizada deve ser feita antes da terapia, para complementar a avaliação clínica (Thabet et al., 1996; Edge et al., 2010).

O estadiamento clínico do câncer de laringe é definido pela classificação TNM, estabelecida pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e *Union for International Cancer Control* (UICC). A classificação é aplicável apenas ao carcinoma. Por isso, deve haver confirmação histopatológica da doença (Edge et al., 2010).

O Sistema TNM para descrever a extensão anatômica da doença tem por base a avaliação de três componentes:

T - a extensão do tumor primário;

N - a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais;

M - a ausência ou presença de metástase a distância.

A adição de números a esses três componentes indica a extensão da doença maligna. Os procedimentos para avaliação das categorias T, N e M são as seguintes:

- Categoria T: obtido por exame físico (laringoscopia) e diagnóstico por imagem;
- Categoria N: exame físico e diagnóstico por imagem;
- Categoria M: exame físico e diagnóstico por imagem.

O agrupamento por estádios de pacientes com carcinoma de laringe é estabelecido por regras de classificação e estadiamento que aparecem na sexta edição do Manual para Estadiamento do Câncer, da AJCC (2002), o qual não difere da última edição (TNM - Classificação dos Tumores Malignos - AJCC, 2010) a respeito da classificação do carcinoma laríngeo em estágio clínico cT3 e dos linfonodos metastáticos cervicais de estágio cN1 até o estágio cN3 (Anexo 1: TNM carcinoma de laringe; fonte: TNM Classificação dos Tumores Malignos - AJCC, 2002).

A classificação patológica (classificação histopatológica pós-cirúrgica), designada pTNM, tem por base as evidências conseguidas antes do tratamento, complementadas ou modificadas pela evidência adicional conseguida por meio de cirurgia e de exame histopatológico. A avaliação histopatológica do tumor primário (pT) exige a ressecção do tumor primário ou biópsia adequada, para avaliar a categoria pT. A avaliação histopatológica dos linfonodos regionais (pN) exige a remoção representativa

de nódulos para comprovar a ausência de metástase em linfonodos regionais (pN0), suficiente para avaliar a categoria pN.

O exame anátomo-patológico evidencia também o estado da margem cirúrgica (livre, exígua, comprometida); a presença ou não de invasão perineural, vascular, linfática; a invasão de cartilagem, e o acometimento extra-laríngeo (Edge et al., 2010).

1.2.2 Estádio cT3cN0-3 e opções terapêuticas

Define-se como câncer de laringe em estágio T3 o carcinoma epidermoide limitado à laringe, com fixação da prega vocal (característica suficiente nos três subsítios anatômicos: subglótico, glótico, supraglótico) e/ou invasão de qualquer uma das seguintes estruturas: espaço paraglótico, e/ou com erosão mínima da cartilagem tireoidea como a córtex interna (câncer supraglótico e glótico), área pós-cricoidea, tecidos pré-epiglóticos (câncer supraglótico).

O *National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practise in Oncology 2010* estabelece as seguintes opções terapêuticas para o câncer de laringe estágio clínico T3 (NCCN Guidelines Head and Neck Cancer, versão 1.2012):

- laringectomia parcial (cirurgia endoscópica ou aberta) com ou sem tratamento adjuvante (radioterapia ou radioquimioterapia);

- laringectomia total com ou sem tratamento adjuvante (radioterapia ou radioquimioterapia);
- radioterapia;
- quimioterapia de indução com avaliação da resposta terapêutica, seguida de radioterapia (se resposta completa) ou radioquimioterapia (se resposta parcial) ou cirurgia (se resposta parcial) com ou sem tratamento adjuvante.

Laringectomias parciais são empregadas em casos selecionados de carcinoma de laringe cT3. Anatomicamente, as dificuldades derivam do acometimento da cartilagem tireoide e dos espaços paraglótico e pré-epiglótico. O objetivo principal do tratamento é a cura do câncer, mas, para respeitar a função da laringe, é necessário conservar pelo menos uma unidade funcional aritenóidea (Stephen et al., 2003). Deve-se considerar a situação específica do tumor: a rapidez da sua evolução, o tipo anatomopatológico, a presença de metástases e eventuais tratamentos anteriores. Outras dificuldades relacionadas ao paciente podem ser encontradas, como idade, baixo *performance status*, situação social, profissional e problemas locais pré-existentes (Guerrier et al., 1979). Essas avaliações podem contraindicar uma cirurgia parcial, resgatando-se a opção de uma laringectomia total ou um tratamento não cirúrgico de preservação de órgão.

Nos casos em que se opta por tratamento cirúrgico do pescoço, o esvaziamento dos linfonodos cervicais é parte importante, e pode envolver

todos os níveis ou somente alguns, dependendo do local do tumor primário e o estágio N.

Nas últimas décadas, o esvaziamento cervical radical originalmente descrito por Crile (Crile et al., 1906) foi modificado de várias maneiras, dando origem a vários tipos de disseções de linfonodos cervicais utilizados atualmente. Essas modificações foram classificadas de acordo com diferentes autores e em diferentes momentos. Em 1991, o Comitê da Academia de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Oncologia publicou um relatório oficial, padronizando as classificações para esses esvaziamentos modificados (Robbins et al., 1991). O Comitê classificou quatro tipos principais de esvaziamentos:

- 1) esvaziamento radical (níveis I-V, com sacrifício da veia jugular interna, músculo esternocleidomastoideo e nervo espinal acessório);
- 2) esvaziamento cervical radical modificado (níveis I-V, com preservação de uma ou mais estruturas supracitadas; havendo preservação das três estruturas, o esvaziamento pode ser definido como funcional) (Bocca et al., 1980);
- 3) esvaziamento cervical radical estendido (a estruturas como carótida, nervo hipoglosso etc, se comprometidas pelo tumor);
- 4) esvaziamento cervical seletivo (em caso de tumor laríngeo, esvaziamento lateral níveis II-IV, esvaziamento posterolateral níveis II-V, esvaziamento anterior nível VI).

O esvaziamento radical é ainda indicado quando há múltiplas metástases clinicamente evidentes de linfonodos cervicais, principalmente

quando os linfonodos do triângulo posterior do pescoço estão envolvidos. As indicações para esvaziamento radical modificado incluem pacientes com metástases clinicamente evidentes, mas sem que o nervo acessório espinal esteja envolvido pelo tumor (Weber et al., 1994).

Existem várias opções para o tratamento de paciente com pescoço estadiado como cN0. O pescoço pode ser observado e tratado apenas se metástases foram detectadas. Esvaziamento cervical seletivo é indicado em carcinoma de laringe com cN0 e selecionados casos cN1. Se, durante dissecação seletiva de um pescoço clinicamente negativo, forem encontradas metástases linfonodais, a dissecação pode ser ampliada para esvaziamento radical modificado, após confirmação histológica de doença metastática (Byers et al., 1988; Medina et al., 1989). A palpação intraoperatória dos linfonodos em pacientes com pescoço clinicamente negativos está associada à alta taxa de falso-positivo (73%) e, em 21% dos casos, o resultado é de falso-negativos. A avaliação por meio de exame histológico extemporâneo por congelação é necessária para confirmar a presença de carcinoma (Rassekh et al., 1995).

A indicação para tireoidectomia ocorre quando há envolvimento da glândula tireoide. A incidência de envolvimento da glândula tireoide no câncer laríngeo varia de 0% a 23% (Sparano et al., 2005; Yuen et al., 1995; Biel et al., 1985; Fagan et al., 1997; Dadas et al., 2001). O câncer laringofaríngeo pode envolver a glândula tireoide, por extensão direta ou indiretamente por via linfática ou estrutura vascular (Sparano et al., 2005; Gilbert et al., 1986). O istmo da glândula tireoide encontra-se normalmente

em frente aos segundo, terceiro e quarto anéis traqueais e está situado abaixo do nível da glote e comissura anterior. Portanto, nos casos de extensão subglótica, a invasão da glândula tireoide acontece diretamente. Os pontos fracos da laringe mais suscetíveis à propagação extralaringea são o ângulo anterior da cartilagem tireoide e a membrana cricotiroideia (Fagan et al., 1994).

A extensão subglótica de tumor laringofaríngeo é uma indicação para hemitireoidectomia ipsilateral profilática (Kim et al., 2007). Portanto, a hemitireoidectomia ipsilateral é amplamente realizada com laringectomia total, para ressecção de metástases clinicamente ocultas de carcinoma laríngeo ao lobo tireoidiano ipsilateral e istmo. Brennan et al. (1991) defendem critérios seletivos, incluindo o envolvimento tumoral da comissura anterior, o espaço subglótico, tumores T3-T4 e câncer de laringe transglótico (Brennan et al, 1991). Sparano et al. (2005) recomendam hemitireoidectomia em pacientes com fixação da prega vocal verdadeira ou extensão subglótica superior a 15 milímetros.

Após avaliação da peça cirúrgica, as condições que impõem radioquimioterapia adjuvante são o comprometimento das margens cirúrgicas, extravasamento capsular dos linfonodos cervicais metastáticos. Radioterapia pós-operatória é indicada se o estadiamento for pT3 (para tumor glótico tratado com cirurgia parcial) ou pT4, pN2 ou pN3, presença de invasão perineural, embolia vascular ou linfática. A adição de cisplatina concomitante à radioterapia pós-operatória melhora a sobrevida em pacientes com um ou mais dos supracitados indicadores de RT adjuvante,

como mostrado pelo trial EORTC (#22931) e RTOG (#9501) (Bernier et al., 2005).

O tratamento não cirúrgico, visando à preservação de órgão, inclui radioterapia exclusiva em casos selecionados de tumores T3 com lesões exofíticas e prega vocal móvel (Suoglu et al., 2007). Não sendo possível esse tratamento, considera-se a radioquimioterapia ou quimioterapia de indução, seguida de radioterapia ou radioquimioterapia concomitante, em paciente com resposta completa ou parcial (Nakayama et al, 2012).

Devido à questionável eficácia da radioterapia na invasão/destruição da cartilagem tireoidea, existe atualmente consenso geral em escolher tratamento cirúrgico para pacientes com invasão total da cartilagem (T4). Para tanto, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) e NCCN têm recomendado a avaliação do acometimento da cartilagem tireoide no algoritmo decisional. No entanto, um superestadiamento clínico (cT4) poderia resultar em perda de possível benefício da preservação de órgãos para muitos pacientes (Li et al., 2011).

O risco elevado de sequelas pela radiação induzida, e toxicidade tardia associada à preservação do órgão com quimioradioterapia, pode levar à reavaliação também da opção cirúrgica (Pfister et al., 2006). A realidade é que muitos pacientes tratados com cirurgia requerem, em última análise, igualmente RT pós-operatória devido à invasão perineural, linfática ou envolvimento linfonodal N2/N3, todos os quais são altamente associados à doença de T3 ou T4. Uma parte significativa deles ainda requer tratamento trimodal, cirurgia com radioquimioterapia pós-operatória, devido à presença

de margens positivas ou extravasamento extracapsular (Langendijk et al., 2008).

1.2.3 Tratamento e sobrevida

Até meados dos anos 1980, a terapia multidisciplinar no câncer avançado de laringe consistia em cirurgia (geralmente laringectomia total) e radioterapia adjuvante (Gillison et al., 1999). Em 1991, foram publicados os resultados de um estudo prospectivo randomizado que incluiu 332 pacientes portadores de câncer de laringe avançado (estadio III e IV). Os casos foram randomizados entre dois braços de tratamento: um grupo foi tratado com dois ciclos de quimioterapia de indução (cisplatina e fluororacil) que, no caso de resposta clínica objetiva à indução, foram seguidos por um terceiro ciclo de radioterapia (6600 até 7600 cGy). O segundo braço foi tratado com cirurgia (laringectomia total) e radioterapia adjuvante. Os pacientes do primeiro braço, com tumores químio-resistentes e/ou com recidiva local, foram submetidos a laringectomia total. Dos casos tratados com químio e radioterapia, 62% tiveram a laringe preservada. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos dados de sobrevida global entre os dois grupos (Department of VA Laryngeal Cancer Study Group, 1991).

Forastiere et al. (2003) publicaram os resultados de um estudo randomizado com 547 pacientes com câncer de laringe localmente avançado, incluindo três grupos de tratamento: quimioterapia de indução

(cisplatina e fluorouracil) seguida por radioterapia; radioterapia concomitante a quimioterapia (cisplatina) e radioterapia isolada. Observaram que houve preservação de laringe em 84% dos pacientes tratados por radioterapia concomitante à quimioterapia. A percentagem foi mais alta em relação aos outros dois grupos [70% dos paciente tratados por radioterapia exclusiva ($p < 0,001$) e 74% dos pacientes tratados por quimioterapia de indução e radioterapia com ($p = 0,005$)]. Esse estudo mostrou que a radioquimioterapia concomitante é a melhor opção terapêutica na preservação do órgão (Forastiere et al., 2003).

Em 2004, o mesmo grupo de pesquisadores da Universidade da Pennsylvania publicou uma adição ao artigo precedente, sublinhando a possibilidade de preservação de órgão também com modalidade cirúrgica, procedimentos que não foram mencionados no artigo anterior (Forastiere et al., 2004).

Alguns protocolos mais recentes também utilizaram quimioterapia de indução para selecionar pacientes. Lefebvre et al. (2009) compararam o tratamento sequencial com o tratamento alternado. Foram incluídos 450 pacientes (câncer de laringe ou hipofaringe, estágio T3-T4), randomizados nos dois braços. A comparação entre essas duas abordagens demonstrou, nos pacientes respondedores à quimioterapia de indução, que o tratamento com radioquimioterapia não compromete o controle da doença e a sobrevida, e permite a preservação da laringe em 40-60% dos pacientes (Lefebvre et al., 2009).

A preservação cirúrgica de órgão foi desenvolvida principalmente nos últimos cinquenta anos. O controle tumoral é obtido pela ressecção de apenas uma parte da laringe, mantendo as funções de respiração (a realização de traqueostomia é temporária, somente como segurança na manutenção da permeabilidade das vias aéreas superiores), fonação e deglutição. O tratamento pode ser realizado por cirurgia aberta (laringectomia parcial vertical, laringectomia horizontal supraglótica, laringectomia supracricoidea) ou por cirurgia endoscópica a laser (Chawla et al., 2009).

As cirurgias parciais da laringe no tratamento do câncer mostraram melhores resultados em relação à qualidade de vida dos pacientes, em relação a tratamento com cirurgia não conservadora e/ou quimiorradioterapia (Weinstein et al., 2001). A qualidade de vida dos pacientes desses dois últimos grupos (laringectomia total *versus* radioquimioterapia) não apresentaram diferenças significativas em termos de bem-estar físico, social, emocional e funcional (Triverdi et al, 2008), ou os resultados foram melhores para o grupo tratado com preservação não cirúrgica de órgão (Boscolo-Rizzo et al., 2008).

Em 1996, um estudo (Vega et al., 1996) avaliou 817 pacientes portadores de carcinomas espinocelulares de laringe supraglótica, dos quais 36,2% eram do estágio clínico avançado. Os pacientes foram tratados com cirurgia conservadora (28,1% dos procedimentos cirúrgicos foram laringectomia supraglóticas alargadas). A taxa de controle loco-regional foi de 82,2% nos estádios III e 66,2% nos estádios IV. A sobrevida em 5 anos

para estágio clínico III foi de 78,3% e de 55,3% para estágio clínico IV. A deglutição pós-operatória foi satisfatória em 97,6% dos pacientes.

Em 2001, Ambrosch et al. (2001) relataram os resultados do tratamento de câncer laríngeo supraglótico com cirurgia endoscópica a laser com resultados parecidos na sobrevida. Dos 50 pacientes com carcinoma supraglótico T3 - estágio III e IV –, o estadiamento T avançado em 41% deles era devido ao comprometimento do espaço pré-epiglótico com fixação das pregas vocais em 18%. A invasão do espaço paraglótico esteve presente em 26% dos casos. O controle local em 5 anos foi de 86% dos pacientes tratados com cirurgia a laser.

Mais estudos enfatizaram também o melhor resultado funcional da laringectomia supraglótica endoscópica a laser com menor tempo de hospitalização e menor morbidade (Peretti et al., 2006).

O sucesso do tratamento com preservação cirúrgica de órgão é a manutenção da funcionalidade laríngea associada a um efetivo controle tumoral. Por essa razão, é necessária uma cuidadosa avaliação da extensão do tumor tridimensionalmente, e não só na extensão superficial. Nos tumores que envolvem a glote, em particular a comissura anterior, pode haver subestadiamento, como mostrado por Barbosa et al. (2005). Nesse estudo, 52 pacientes (câncer glótico ou supraglótico, estágio T1-4) foram avaliados pré-operatoriamente por exame endoscópico e TC (1 mm). Em relação ao estágio obtido pela avaliação da peça operatória, somente 40,4% dos casos apresentaram estadiamento endoscópico pré-operatório correto (40% para T1; 29,4% para T2; 46,4% para T3, e 50% para T4). Em

contrapartida, o estadiamento pré-operatório com TC foi correto na maioria dos casos (75%), em particular para os estádios avançados T3 (73,9%) e T4 (88,2%) (Barbosa et al., 2005).

Costuma-se também focalizar a atenção na mobilidade das pregas vocais e das aritenoides, sendo a unidade cricoaritenóidea a unidade funcional básica do órgão (Tufano et al, 2002).

Somente aderência aos critérios de inclusão permite o controle local da doença (Laccourreye et al., 1997) com boa qualidade de vida (Braz et al., 2005). No Hospital Johns Hopkins, entre dezembro 2000 até março 2006, foram realizadas 24 laringectomias supracricóideas (SCL) (Farrag et al., 2007), e no Hospital M.D. Anderson Câncer Center foram realizados 27 SCL entre 1997 e 2005 (Lewin et al, 2008). A comparação de taxa de controle local e sobrevida entre pacientes tratados com cirurgia parcial em relação à laringectomia total não é geralmente possível, pois uma correta aderência aos critérios de elegibilidade à cirurgia parcial exclui os tumores com pior prognóstico (Nakayama et al., 2008).

Nos anos mais recentes, está sendo abandonado o uso de cirurgia de preservação (cirurgia aberta, endoscópica, robótica) nos Estados Unidos. A habilidade do cirurgião parece ser uma variável prognóstica. Olsen (2009) extrapolou, como corolário dessa tendência, uma menor habilidade cirúrgica por parte de residentes e neoespecialistas na cirurgia conservadora de tumores de cabeça e pescoço (Olsen et al., 2009).

Em 2006, Hoffmann et al. avaliaram 158.426 pacientes [*National Cancer Data Base* (NCDB)] portadores de carcinoma espinocelular de

laringe (qualquer localização) tratados entre 1985 e 2001. Esse estudo retrospectivo mostrou uma piora na sobrevida global. Os dados incluíram principalmente casos diagnosticados em estágio avançado do câncer glótico, estágio inicial e estágio avançado (T3N0M0) do câncer supraglótico. A observação específica sobre o grupo de pacientes com câncer de laringe estágio T3N0M0 (qualquer localização) mostrou uma menor sobrevida em 5 anos no grupo tratado com radioquimioterapia (59,2%) e no grupo tratado com radioterapia isolada (42,7%), comparado com o grupo tratado com cirurgia e radioterapia adjuvante (65,2%) ou sem radioterapia adjuvante (63,3%). Em contraste, um subgrupo de pacientes com tumores estágio T3N0M0, localizados na glote, teve a melhor sobrevida (65,6%) com tratamento cirúrgico e também com radioquimioterapia concomitante. O tratamento cirúrgico incluiu laringectomia total, laringectomia subtotal/parcial e ressecção sem diferenciar os resultados por tipo de cirurgia. De qualquer forma, a sugestão geral que se extrapola é a menor eficácia terapêutica do tratamento não cirúrgico (Hoffman et al., 2006).

O resultado mais insatisfatório do tratamento não cirúrgico e a observação de gastos elevados dessa opção terapêutica sugerem a laringectomia total como opção terapêutica inicial no tratamento do câncer avançado de laringe para pacientes com prognóstico mais comprometido ou com *background* que não favorece tratamento mais demorado, e com exigência de seguimento muito rigoroso.

Em 2007, Chen e Malpern avaliaram 10.590 pacientes do *National-Based Cancer Registry Data*. Desses casos, 7.019 foram incluídos no

estudo. Os pacientes portadores de câncer avançado de laringe (estádios III e IV com qualquer T) foram tratados com laringectomia total ou radioquimioterapia, ou radioterapia isolada. Os pacientes com câncer de laringe estágio III mostraram resultados similares, quando tratados com cirurgia (laringectomia total) ou radioquimioterapia, em contraste com câncer estágio IV, que mostrou maior sobrevida com tratamento cirúrgico. Os autores fizeram ainda observação específica sobre o grupo de pacientes com câncer de laringe T3, os quais, quando submetidos a tratamento de preservação não cirúrgica de órgão (radioquimioterapia ou radioterapia), mostraram aumentado risco de morte, comparados àqueles submetidos a laringectomia total. Nesse artigo, destacaram-se também alguns fatores associados a pior prognóstico: sexo masculino, raça negra e o tipo de seguro saúde, o qual pode não tornar mais rápido o acesso ao tratamento (Chen et al., 2007).

1.3 Marcadores biológicos de prognóstico em câncer de cabeça e pescoço

Dentre as probabilidades de estudo dos fatores que possam influir no prognóstico, o conhecimento de que o câncer é uma doença genética resultante de mutações acumuladas no genoma focaliza também a atenção sobre a biologia celular. Nas duas últimas décadas, houve um crescimento na quantidade de dados genômicos e proteômicos publicados, ampliando as perspectivas de aplicação desse conhecimento na detecção, no diagnóstico e no tratamento. Estes serão, possivelmente, cada vez mais individualizados,

levando-se em conta o perfil molecular individual (Ginsburg et al., 2001; Jain et al., 2002; Barreto et al., 2008). A identificação de assinaturas moleculares, as quais incluem grupos de genes transcritos de RNAm, proteínas, lipídios, carboidratos e metabólitos, permite a correlação entre o estado alterado de expressão de tais marcadores e o comportamento biológico do tumor (Liotta et al., 2000; Petricoin et al. 2002; Negm et al., 2002; Barreto et al., 2005; Ludwig et al., 2005; Nilsson et al., 2009). A disponibilidade e aplicação de novos biomarcadores de predição da resposta terapêutica, bem como o emprego de novas terapias com alvos moleculares, são promissoras (Allison et al., 2008). Os biomarcadores são normalmente divididos em marcadores de prognóstico (predição do curso natural de um câncer individual), marcadores preditivos (predição do possível benefício individual ao tipo de tratamento) ou marcadores de resposta clínica (medida do efeito do tratamento em curto prazo) (Phan et al., 2009).

1.3.1 Gene supressor tumoral TP53

O gene TP53 é um supressor tumoral localizado no cromossomo 17p13. Ele é responsável pela formação de uma proteína de 53 quilodaltons (p53) que, quando ligada ao DNA, induz a transcrição de outro gene regulador, o p21. Este, por sua vez, transcreve uma proteína de 21 quilodaltons (p21) que se une ao complexo da ciclina G1-CDK2, o qual, na ausência dessa proteína, faz a célula transpor o ponto de checagem G1, ou seja, o ponto de início do ciclo celular (Inoue et al., 1995). Portanto, a p53

impede indiretamente, pela proteína p21, que a célula progrida para a fase S e replique seu DNA (Alberts et al., 1997). Além disso, a p53 inibe a expressão de bcl-2 e promove a síntese de Bax, ou seja, contribui para a morte celular programada ou apoptose (James et al., 1999). Quando ocorre a inativação do gene TP53, tem-se maior susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer, pois um dos mecanismos de defesa celular é extinto (Brennan et al., 1995). As mutações do gene TP53 alteram a conformação da proteína p53 e resultam em um complexo protéico de 70 quilodaltons. Essas proteínas p53 mutantes possuem uma meia-vida muito superior às originais, resultando em grandes quantidades dessas proteínas acumuladas no núcleo, e também no citoplasma de células tumorais. Assim, é a forma inativa (mutada) normalmente detectada no exame imunohistoquímicos (Finlay et al., 1988; Gatter et al., 1990).

Mutações e aumento da expressão do gene supressor tumoral TP53 são encontrados em cerca de 40% a 60% dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Apesar disso, há grande divergência quanto ao valor prognóstico. Em alguns estudos sobre carcinomas epidermóides na laringe, a p53 mostrou-se associada a menor sobrevida, sendo que a elevação da p53 está associada à proliferação rápida e maior probabilidade de metástases e recorrências. Outros estudos demonstraram não haver qualquer significado prognóstico (Boyle et al., 1993; Maestro et al., 1992; Spafford et al., 1996).

A análise da p53 tem maior importância quando levado em consideração outro gene supressor tumoral, o bcl-2: a coexpressão p53/bcl-

2 possui um elevado valor prognóstico nos carcinomas da laringe, não observado quando presentes separadamente (Jäckel et al., 2000; Pruneri et al., 1998).

1.3.2 Receptores tirosina quinase Erb B e vias de transdução de sinal ativadas: via MAPKs e via PI3K-AKT / p53

Um dos fatores de crescimento com participação na transformação maligna de células epiteliais escamosas do trato aerodigestivo superior é o fator de crescimento epidérmico (EGF). O EGF estimula a proliferação celular através da interação com o seu receptor (EGFR). O gene do EGFR se localiza no cromossomo 7p12-13, codifica um receptor glicoproteico transmembrana de 170 quilodaltons, o qual tem atividade tirosina quinase intrínseca. O EGFR regula o crescimento celular em uma variedade de tumores de cabeça e pescoço. A alta expressão do gene EGFR é marcador diagnóstico e prognóstico em carcinomas da cabeça e pescoço (Kearsley et al., 1991; Weber et al., 1992; Jonathan et al., 1993). Para a laringe, também foi demonstrado que, na presença de carcinoma, ocorre uma alta expressão de EGFR (Krecicki et al., 1999) e essa hiperexpressão está correlacionada a comportamento tumoral mais agressivo (Maurizi et al., 1992). EGFR pertence à subfamília ErbB dos receptores tirosina quinase, que consiste do EGFR (também chamado ErbB1 ou HER-1), ErbB2 (HER-2 ou Neu), ErbB3 (HER-3) e ErbB4 (HER4). Os receptores são ativados quando o domínio extracelular sofre uma mudança conformacional, que pode ser tanto homo-oligomerização como hetero-oligomerização com outros membros da família;

erbB2 parece funcionar primariamente como parceiro heterodímero para outros membros da família (não sendo atualmente conhecido um ligante próprio do Erb b2 *in vivo*); ErbB3 difere dos outros receptores ErbB por possuir um domínio tirosinaquinase funcionalmente ineficiente (Guy et al., 1994; Klapper et al., 1999; Graus-Porta et al., 1997); mas tanto ErbB3 como ErbB4 podem formar homodímeros (ErbB3:ErbB3; ErbB4:ErbB4) ou heterodímeros com outros membros da família ErbB. A família ErbB é associada a processos de crescimento celular, sobrevivência, quimiotaxia e diferenciação celular (Zhang et al., 1996). A ligação do ligante (EGF, por exemplo) ao receptor ErbB ativa a dimerização deste (homodimerização, se entre dois receptores idênticos; heterodimerização, se entre receptores diferentes da mesma família). Esse evento produz alterações estruturais na porção intracelular do receptor, as quais ativam o domínio tirosina quinase. A ativação da porção intracelular tirosina quinase inicia a via de sinalização intracelular do sinal em cascata, por meio da fosforilação do próprio receptor (autofosforilação), bem como de várias moléculas-alvo a jusante da cascata (Erjola et al., 2006).

Em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, ErbB1 é superexpresso em 80-90% dos tumores, e ErbB2 em menos de 20%. Na literatura, tem havido menos avaliação de ErbB3 e ErbB4 (Ibrahim, 1997). EGFR e ErbB2 são frequentemente ativados, hiperexpressos ou mutados em muitos cânceres comuns, e os antagonistas e/ou inibidores de EGFR e/ou ErbB2 (produzido já como medicamento) apresentam benefícios terapêuticos para pacientes com câncer (Burgess et al., 2008).

A ativação da porção intracelular tirosina quinase inicia a via de sinalização intracelular do sinal através da fosforilação de várias moléculas-alvo a jusante dessa, criando uma cascata de sinais (Erjola et al., 2006). As vias de transdução de sinal ativadas são a Ras-Raf1-Map-Kinase (Alroy et al., 1997, Lewis et al., 1998), a P13K-AKT (Chan et al., 1999; Blume-jensen et al., 2001; Vivanco et AL., 2002) e a Kinase C e Jak/Stat (Yarden et al., 2001).

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (proteínas MAPKs) são ativadas em resposta a uma variedade de sinais externos. Entre as proteínas conhecidas como MAPKs, há a ERK, a proteína quinase regulada por sinal extracelular (Bin Liang et al., 2005). A via poderia ser constitutivamente ativada por EML4-ALK, produto de um gene de fusão EML4-ALK. Quando ativada pelo EGF, o processo de cascata se inicia pela ligação de Grb2 ou Shc (proteína adaptadora) aos receptores fosforilados ErbB. Esse processo implica recrutamento do gene SOS, gene que codifica a proteína ativadora da RAS. RAS é uma G-proteína, ou seja, uma proteína que permite ligação com GTP, a qual conduz à ativação de RAF-1 e, subsequentemente, à fosforilação e ativação de MEK1 e MEK2 (proteína quinase ativada por mitógeno), as quais ativam ERK1 e ERK2, respectivamente. Essa via resulta em proliferação celular e na transcrição aumentada de Bcl-2 e dos membros da família de inibidores de proteínas de apoptose (IAPs), promovendo a sobrevivência celular. A hiperexpressão das proteínas da via MAPK contribui para proliferação tumoral (Henson et al., 2006).

As vias PI3K (fosfoinositida 3-quinase) e Akt (proteína quinase B) são parte de uma importante via de sinalização ativada pela família dos receptores ErbB: o receptor ErbB ativado envia um sinal para a proteína PI3K que, por sua vez, propaga o sinal e determina fosforilação da proteína Akt. A fosforilação de Akt gera p-Akt, uma forma ativada de Akt que promove a sobrevivência e proliferação celular. Demasiada sinalização PI3K/p-Akt pode promover o crescimento do tumor e, em câncer de laringe, já foi associada a radioresistência (Gupta et al., 2002).

Outra proteína envolvida é a PTEN, a qual atua em oposição à via PI3K/Akt, invertendo a atividade de PI3K. Essa proteína homóloga de fosfatase e angiotensina (PTEN), em ser humanos, é codificada pelo gene PTEN, gene supressor de tumor. Mutações desse gene representam um passo para o desenvolvimento de muitos cânceres. A ausência de expressão imunoistoquímica está relacionada a carcinoma epidermoide de baixo grau (Squarize et al., 2002). PTEN expressa atividade proteína fosfatase. Sobreativar PI3K ou p-Akt, ou inativar PTEN, determina um crescimento celular descontrolado e a formação de tumores. Sendo a via PI3K controlada por EGFR, ela é continuamente ativada em tumores nos quais o EGFR é sobreativado (Wick et al., 1999).

Perda de expressão de PTEN foi documentada em carcinoma de glândula salivar, e foi estatisticamente correlacionada a deleção genômica de PTEN (Ettl et al., 2012).

Conexão interessante na sinalização dos genes supressores de tumor foi evidenciada por meio de investigação do genoma humano. Foi

encontrado no *locus* do gene PTEN um elemento de ligação para o gene p53, o qual se mostrou atuar na ativação do gene PTEN. As análises de deleção e mutação mostraram que esse elemento é necessário para a transativação indutível de PTEN por p53. Foi identificado também um elemento de ativação de PTEN capaz de controlar a expressão constitutiva do gene independente do p53. Em contraste com as linhagens de células p53 mutantes, a indução de p53 tipo selvagem em linhagens de células de tumor primário aumentou os níveis de mRNA PTEN (Stambolic et al., 2001).

O gene TP53 promove também regulação negativa da atividade mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamífero) da via P13k-AKT.

A proteína mTOR é um mediador serina/treonina da via de sinalização PI3K/p-Akt/mTor. Fisiologicamente, mTOR é um controlador central de crescimento e proliferação das células, e desempenha um papel crítico na regulação importante das funções celulares, incluindo a proliferação, crescimento, sobrevivência, mobilidade, angiogênese. Autores relataram ativação da via mTOR e superexpressão de mTOR em vários tipos de tumores, incluindo tumores hepatocelulares, carcinoma de próstata e mama. Na literatura, a ativação de p53 é suficiente para inibir a atividade mTOR e regular negativamente os alvos a jusante, incluindo a autofagia e o processo de supressão tumoral (Feng et al., 2005). Superexpressão de mTOR em câncer de mama é associado a um risco de recorrência três vezes maior do que nos pacientes com tumor sem superexpressão de mTOR (Marioni et al., 2011).

Figura 1 – Vias de transdução de sinal mediadas por EGFR

EGF, fator de crescimento epidérmico; EGFR receptor do fator de crescimento epidérmico; K, domínio tirosinaquinase do EGFR; P13K, fosfatidilinositol 3'-cinase; AKT, proteína quinase B; mTOR, proteína alvo da rapamicina em mamífero; Grb2, proteína adaptadora; SOS, Son Of Sevenless; RAS, MEK, proteína quinase ativada por mitógeno; ERK proteína quinase regulada por sinal extra-celular; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; PTEN, proteína homóloga de fosfatase e angiotensina; STAT transdutor de sinal e ativador de transcrição.

Fonte: Janku F, Stewart DJ, Kurzrock R. Targeted therapy in non-small-cell lung cancer--is it becoming a reality? Nat Rev Clin Oncol. 2010 Jul;7(7):401-14. Epub 2010 Jun 15. Review. Erratum in: Nat Rev Clin Oncol. 2011 Jul;8(7):384.

2 OBJETIVOS

- a. Avaliar as características clínicas e patológicas do carcinoma de laringe T3N0-3 em relação à evolução e ao prognóstico;
- b. Associar a expressão de biomarcadores ativados pela via do EGFR (via Map-Kinase e a via P13K-AKT) com características clínicas e patológicas dos tumores.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo de uma série de casos consecutivos de pacientes portadores de carcinoma epidermoide de laringe estágio clínico T3N0-3M0, diagnosticados e tratados no Hospital A.C. Camargo entre janeiro de 1990 a dezembro de 2007, para explorar as características demográficas e clínico-patológicas dos tumores, como potenciais fatores prognósticos.

3.2 Amostra e caracterização dos pacientes

As informações dos casos foram coletadas retrospectivamente (janeiro de 1995 a dezembro de 2007) dos prontuários médicos mantidos pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatística do Hospital A.C. Camargo.

Todos os prontuários foram revistos pelo autor e os dados referentes às variáveis demográficas, clínico-patológicas, imagenológicas e terapêuticas foram coletadas em uma ficha padronizada de registro de dados elaborada especificamente para o presente estudo (Anexo 2).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital A.C. Camargo (Anexo 3) e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) (Anexo 4).

3.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos consecutivamente pacientes não tratados previamente, com biópsia positiva para carcinoma epidermoide de laringe estágio clínico cT3, portadores de qualquer estadiamento linfonodal, sem metástase à distância, submetidos a tratamento com finalidade curativa. O estadiamento se refere ao TNM da UICC, 6^a edição, 2002.

3.2.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo todos os pacientes com as seguintes variáveis:

- Pacientes com descrição clínica da neoplasia insuficiente para confirmar a classificação cT3;
- Pacientes previamente submetidos a radioterapia em cabeça e pescoço;
- Presença de metástase à distância no momento do diagnóstico e estadiamento pré-tratamento;
- Pacientes com outros tumores sincrônicos;
- Pacientes com tumores de laringe irressecáveis;
- Pacientes com comprometimento das condições clínicas gerais, principalmente em relação às doenças metabólicas e

cardiocirculatórias que inviabilizaram tratamento com intuito curativo.

3.2.3 Critérios diagnósticos e estadiamento

Os pacientes incluídos no estudo foram submetidos a exame objetivo otorrinolaringológico completo, microlaringoscopia sob anestesia geral com biópsia ou revisão de lâminas se previamente submetidos a biópsia em outra instituição, RNM ou TC do pescoço para avaliação da extensão local da doença (espaço paraglótico, espaço pre-epiglótico, infiltração de cartilagens ou tecidos moles) e dos linfonodos cervicais. Radiografia e/ou TC tórax foram específicos para pesquisa de metástase e/ou segundos tumores. Foram considerados na análise os exames de imagem realizados ao menos no período de seis semanas anteriores à admissão do paciente.

3.3 Seleção das amostras de material biológico e revisão

Os espécimes de cada caso incluído no estudo foram obtidos dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. Foi resgatado o material de 92 casos (blocos de parafina e lâminas coradas em HE) do total de 145 casos incluídos no estudo. Destes, 74 casos correspondiam ao material obtido da peça cirúrgica e 18 casos eram referentes ao material obtido durante a biópsia diagnóstica. Todas as lâminas coradas em HE foram revisadas por um patologista, para confirmação do diagnóstico e para marcação de uma área representativa da

neoplasia, para inclusão no bloco construído em matriz tecidual (*tissue microarray* – TMA) (Kononen *et al.*, 1998). Os 18 casos referentes a biópsias diagnósticas não apresentaram material suficiente para inclusão no bloco de TMA e foram analisados em lâminas de cortes convencionais.

3.4 Construção do “tissue microarray” (TMA)

Para a confecção do TMA, foi utilizado o aparelho *tissue microarrayer* (Beecher Instruments[®], Silver Spring, EUA). A área identificada no bloco doador foi puncionada no local selecionado com agulha de 1mm e os cilindros obtidos foram transferidos para o bloco receptor (Figura 2). Foram incluídas 74 amostras das neoplasias referentes aos 74 casos que apresentavam material da peça cirúrgica. A partir desse bloco, foram preparados 30 cortes histológicos seriados em lâminas de vidro, por meio de microtomia mecânica na espessura de 4µm, previamente tratadas com película aderente especial. Para controle da representatividade do material, foram confeccionadas lâminas coradas por HE nos níveis 1, 15 e 30.

Figura 2. Representação esquemática da montagem do TMA

Fonte: Technology Insight: identification of biomarkers with tissue microarray technology Jena M Giltnane and David L Rimm Nature Clinical Practice Oncology (2004) 1, 104-111

3.5 Imunoistoquímica

Primeiramente, os anticorpos foram testados e a reação de imunoistoquímica padronizada de acordo com a melhor técnica de diluição, recuperação antigênica e revelação.

As lâminas preparadas foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol por 5 minutos. O tecido foi reidratado em soluções decrescentes de etanol e, a seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos.

A recuperação antigênica é um processo que aumenta a reatividade, e foi realizada por tratamento com calor na presença de citrato de sódio pH 6 ou EDTA/Tris pH 9, utilizando-se panela de pressão ou banho-maria 96 °C, de acordo com a padronização do anticorpo utilizado (Quadro 1). Após a recuperação antigênica, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio em 3 banhos de 5 minutos e, depois, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos.

Em seguida, foi feito o bloqueio de sítios inespecíficos, utilizando-se a solução *Protein Block* (Dako Cytomation) conforme instruções do fabricante,

por 20 minutos. As lâminas foram, então, incubadas com o anticorpo específico em câmara úmida por 2 horas.

Os procedimentos posteriores foram sempre precedidos de três lavagens em PBS pH 7,4 durante 5 minutos cada. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram incubadas com o complexo secundário: solução *Post-Primary* (NovoCastra LABORATORIES LTD, NEWCASTLE UPON TYNE) por 30 minutos e solução *Polymer* (NovoCastra LABORATORIES LTD, NEWCASTLE UPON TYNE) também por 30 minutos. A revelação foi feita, utilizando-se como substrato cromógeno 3,3' – diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos, evidenciando a reação por meio de coloração acastanhada. Os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos e a contracoloração foi feita, utilizando-se a hematoxilina.

Todas as reações foram acompanhadas de um controle positivo, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo testado.

Posteriormente, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanol, diafinizados em 3 banhos de xilol, e montados em resina *permount*.

Todas as reações foram realizadas em duplicata nas lâminas de TMA (para controle da representatividade do material, foram selecionadas lâminas em níveis diferentes e distanciados, por exemplo 4 e 28), e em uma única lâmina de corte convencional para cada caso que não foi incluído no bloco de TMA.

As reações foram analisadas em microscópio óptico. As lâminas foram fotografadas com equipamento fotográfico digital acoplado a microscópio óptico de luz.

Quadro 1. Anticorpo primário, clones, fornecedor, diluição de uso e recuperação antigênica utilizados para as reações imunoistoquímicas

Anticorpo primário	Clone	Fornecedor	Título	Recuperação antigênica
p53	DO-7	Dako	1:7000	Panela de pressão (por 25 minutos), citrato pH 6.0
EGFR	111,6	Lab Vision	1:200	Banho-maria, (por 40 minutos), EDTA/Tris pH 9
c-erbB-2	Policlonal	Dako	1:1000	Panela de pressão, (por 25 minutos), citrato pH 6.0
c-erbB-3/HER3	Policlonal	Neomarkers	1:300	Panela de pressão, (por 25 minutos), citrato pH 6.0
c-erbB-4	Policlonal	Neomarkers	1:100	Panela de pressão, (por 25 minutos), citrato pH 6.0
Phospho ERK-1/ERK-2	E337	EPITOMICS	1:800	Banho-maria, (por 40 minutos), EDTA/Tris pH 9
Phospho MEK 1/2	116F8	Cell Signaling	1:200	Panela de pressão, (por 25 minutos), citrato pH 6.0
PTEN	6H2.1	Cascade	1:200	Panela de pressão, (por 35 minutos), citrato pH 6.0
Phospho m-Tor	49F9	Cell Signaling	1:150	Panela de pressão, (por 25 minutos), citrato pH 6.0
Phospho Ras	E201	EPITOMICS	1:1500	Panela de pressão, (por 25 minutos), EDTA/Tris pH 9

3.6 Interpretação das reações imunoistoquímicas

A interpretação dos resultados do estudo imunoistoquímico foi realizada por um único patologista, empregando-se critério homogêneo para todos os marcadores estudados. Esse critério foi acordado após avaliação crítica de todo o material disponível, com intenção de estratificar os casos em dois únicos grupos – cada caso podia ser positivo ou negativo em relação ao marcador estudado. Devido ao tamanho da amostra, o escore foi

atribuído independentemente da intensidade da reação e localização da coloração (membrana, citoplasma, núcleo).

O tumor foi considerado positivo quando mais de 25% das células tumorais mostravam marcação. O tumor foi considerado negativo quando não se observou coloração ou a coloração estava presente em menos de 25% das células tumorais.

3.7 Análise estatística

As variáveis foram classificadas como demográficas, clínicas, patológicas e de tratamento (Quadro 2-7). A distribuição de frequências foi utilizada para descrever as variáveis categóricas e as medidas de tendência central e de variabilidade para as numéricas ou contínuas. O teste de frequências do qui-quadrado foi utilizado para comparar as variáveis categóricas em relação aos marcadores estudados em tabelas de contingências, e em tabelas 2x2. Quando pelo menos uma frequência esperada foi menor do que 5, foi aplicado o teste exato de Fisher para verificar associações. O tempo de seguimento foi o período entre a data da cirurgia ou início de outro tratamento até a data do óbito e, para os casos censurados foi a data da última informação. Para estimar a sobrevida livre de doença, considerou-se o período livre de recidivas como sendo o tempo decorrido da data da cirurgia ou final de tratamento radioquimioterápico até o diagnóstico de recidiva (local ou à distância). A técnica de Kaplan-Meier foi adotada para estimar as probabilidades de sobrevida global e livre de

doença. A diferença entre as curvas de sobrevida de uma mesma variável foi verificada por meio do teste de *log rank*. O nível de significância de 5% foi considerado em todos os testes estatísticos. O modelo de regressão de COX foi usado para estimar os riscos relativos para óbito (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95%. Para a seleção das variáveis candidatas a possíveis fatores prognósticos, a técnica *stepwise (forward)* foi adotada. A análise univariada foi realizada para as variáveis que, pelo Método de Kaplan-Meier, mostraram significância estatística ou significância marginal (associações com p entre 0,6 e 1). As variáveis que mostraram mais força de associação na análise univariada foram selecionadas para o modelo multivariado. O programa estatístico de computador STATA versão 7.0 foi utilizado para a realização das análises estatísticas (StataCorp, 2001) (Figura 3).

Figura 3. Esquematização das variáveis analisadas em relação aos desfechos

Quadro 2. Classificação das variáveis demográficas analisadas no presente estudo

Variável	Categoria / Medidas
Gênero	Masculino Feminino
Idade	Anos
Raça	Branca Não branca
Tabagismo	Não ou ex-fumante de mais que 5 anos Sim ou ex-fumante de menos que 5 anos
Cigarros	Número por dia
Etilismo	Não ou ex-alcoolista de mais que 5 anos Sim ou ex-alcoolista de menos que 5 anos
História familiar (câncer de cabeça e pescoço)	Não Laringe Cabeça e Pescoço Outros cânceres
Grau de parentesco (familiar com câncer)	Pais Irmãos Outros
Comorbidade	Não HAS DM DPCO Cardiopatia isquêmica Outros
ASA (categorias)	Clase I Classe II Classe III Classe IV Classe V
Seguimento	Vivo sem doença Vivo com doença Morte pós operatória Morte por câncer Morte por outras causas Perdido de seguimento
Tempo de seguimento	Meses Variação Mediana Média (Desvio Padrão)

HAS = Hipertensão arterial; DM = Diabetes Mellito; DPOC = doença pulmonar obstrutiva crônica

Quadro 3. Classificação das variáveis clínicas analisadas no presente estudo

Variável	Categoria / Medidas
Sítio da laringe	Glótico Supraglótico Subglótico Transglótico
cT	T3
cN	N0 N1 N2a N2b N2c N3
Invasão comissura anterior	Não Sim
Fixação emilaringe	Não Sim
Invasão retrocricoidea	Não Sim
Invasão espaço pré-epiglótico	Não Sim
Invasão espaço paraglótico	Não Sim
Invasão focal de cartilagem tireóide	Não Sim
Invasão além da laringe (avaliação clínica)	Não Sim

Quadro 4. Classificação das estratégias de tratamento analisadas no presente estudo

Variável	Categoria
Tratamento	Cirurgia RT RT+QT Cirurgia mais RT ou RT+QT
Tipo cirurgia tumor primário	Laringectomia parcial Laringectomia total Faringolaringectomia
Tipo cirurgia pescoço homolateral	Não Esvaziamento níveis II – IV Esvaziamento níveis II – V Esvaziamento níveis I – V Outros
Tipo cirurgia pescoço contralateral	Não Esvaziamento níveis II – IV Esvaziamento níveis II – V Esvaziamento níveis I – V Outros
Tiroidectomia	Não Istmectomia Lobectomia Total
Esvaziamento do nível VI	Não Unilateral Bilateral

Quadro 5. Classificação das variáveis patológicas analisadas no presente estudo

Variável	Categoria
Estádio pT	pT3 pT4
Tipo histológico CEC	Bem Diferenciado Moderadamente Diferenciado Pouco Diferenciado
Estádio pN	pN0 pN1 pN2a pN2b pN2c pN3
Extravasamento capsular	pN0 RC- pN+ RC- pN+ RC+
Margens	Livre na peça Exígua/livre na margem congelada Comprometida
Invasão além da laringe	Não Sim
Invasão vascular	Não Sim
Invasão perineural	Não Sim
Invasão linfática	Não Sim

RC + = ruptura capsular presente ; RC - = ruptura capsular ausente

Quadro 6. Classificação de persistência, recorrência e segundo tumor primário

Variável	Categoria
Persistência	Não Sim
Recorrência	Não Sim
Segundo tumor primário	Não Sim

Persistência = não teve resposta completa após tratamento de preservação de órgão ou a doença voltou em menos de 6 meses após o tratamento com confirmação da análise patológica. Recorrência = a doença voltou após mais de 6 meses, dentro de três anos, após o tratamento com confirmação da análise patológica (González-García R, 2009). Segundo tumor primário = tumor de tipo histológico diferente ou histológico idêntico, que ocorre em mais de 3 anos após o tratamento do tumor primário, ou é separado do tumor primário por mais de 2 cm de epitélio normal. (Warren S, 1932)

Quadro 7. Classificação das expressões dos marcadores analisadas no presente estudo

Variável	Categoria
p53	Negativo Positivo
Erb b1	Negativo Positivo
Erb b2	Negativo Positivo
Erb b3	Negativo Positivo
Erb b4	Negativo Positivo
Mek	Negativo Positivo
Erk	Negativo Positivo
Ras	Negativo Positivo
pTEN	Negativo Positivo
mTor	Negativo Positivo

Negativo = não se observou coloração ou a coloração estava presente em menos de 25% das células tumorais; positivo = mais de 25% das células tumorais mostravam marcação.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características clínico-demográficas dos casos estudados e poder da amostra

Cento e quarenta e cinco (145) casos diagnosticados como carcinoma epidermoide da laringe em estágio T3 foram incluídos no estudo, com um poder da amostra de 54% (erro $\alpha = 0,05$). Normalmente, é considerado alto um poder acima de 80%. No presente estudo o poder da amostra alcança 82%, aumentando o valor do erro α a 0,2.

Os dados clínico-demográficos dos casos estudados estão demonstrados nas Tabelas 1 a 5.

4.1.1 Características clínico-demográficas e de estilo de vida dos casos estudados, e seguimento no estudo

Dos 145 pacientes, 127 (87,6%) eram do sexo masculino; a idade média foi de 62,1 $\pm$ 10.9 anos (variando de 34 a 87, mediana de 64 anos), 138 (95,2%) eram de raça branca. A maioria dos doentes (130 ou 93.5%) declarou tabagismo e 109 (78,4%) alcoolismo. Cem doentes (100 ou 74.1%) não tinham história familiar de câncer. Dos 35 (25.1%) que relataram histórico positivo, 28 deles relataram a doença em familiar de primeiro grau (6 deles diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço, sendo 3 deles na laringe).

A queixa principal que levou mais frequentemente ao médico foi rouquidão (113 pacientes, 78,5%) e odinofagia (18 pacientes, 12,5%). O intervalo entre a queixa inicial e o atendimento médico foi em média de 7,8+/- 5,8 meses (variando de 1 a 36, mediana de 6 meses).

A maioria dos pacientes apresentava comorbidades (98 declararam doenças como HAS, DM, DPOC, cardiopatia isquêmica, insuficiência hepática e insuficiência renal, entre outras). Após avaliação anestésica documentada em 133 pacientes (avaliação rotineira de pré-operatório, seja para biópsia ou tratamento cirúrgico da neoplasia), 84 pacientes (63,2%) foram classificados em classe ASA II.

No presente estudo, os pacientes foram acompanhados, em média, por 67,4 +/- 58,9 meses (variando de 9 dias a 204 meses, mediana de 56,5 meses). Após a data da última informação (a última atualização das fichas foi em abril 2012), os pacientes acompanhados por menos de 5 anos e dos quais não se obteve informação objetiva de acompanhamento pós-tratamento foram classificados como perdidos quanto ao seguimento (20 pacientes, 13,8%).

Quatro pacientes (2,8%) morreram no pós-operatório; 31 pacientes morreram por câncer (21,4%), 26 (17,9%) morreram por outra causa (que sempre foi relacionada a doenças, como DPOC ou insuficiência hepática, causadas pela exposição crônica aos fatores de riscos clássicos); 9 (6,2%) estavam vivos com doença, e 55 vivos sem doença (37,9%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição da casuística de acordo com variáveis clínico-demográficas dos pacientes e estilo de vida

Variável	Categoria / Medidas	Freq.(%) / Medidas
Gênero	Masculino	127 (87,6)
	Feminio	18 (12,4)
	Informação ausente	0 (0,0)
Idade (anos)	N	145
	Variação	34 – 87
	Media (Desvio Padrão)	62,1 (10,9)
Raça	Branca	138 (95,2)
	Não branca	7 (4,8)
	Informação ausente	0 (0,0)
Tabagismo	Não	9 (6,2)
	Sim	130 (89,7)
	Informação ausente	6 (4,1)
Cigarros (dia)	N	68
	Variação	5 – 80
	Media (Desvio Padrão)	27,4 (16,1)
Etilismo	Não	30 (20,7)
	Sim	109 (75,2)
	Informação ausente	6 (4,1)
História familiar (câncer de cabeça e pescoço)	Não	100 (69)
	Laringe	3 (2)
	Cabeça e Pescoço	3 (2)
	Outros cânceres	29 (20)
	Informação ausente	10 (7)
Grau de parentesco (familiar com câncer)	Pais	15 (10,2)
	Irmãos	13 (9)
	Outros	7 (4,8)
	Informação ausente	110 (76)
Comorbidade	Não	28 (19,3)
	HAS	30 (20,7)
	DM	4 (2,7)
	DPCO	55 (38)
	Cardiopatia isquêmica	4 (2,7)
	Outros	5 (3,4)
	Informação ausente	15 (10,3)
ASA (score)	Clase I	3 (2)
	Classe II	84 (58)
	Classe III	38 (26,2)
	Classe IV	7 (4,8)
	Classe V	1 (0,7)
	Informação ausente	12 (8,3)
Seguimento	Vivo sem doença	55 (37,9)
	Vivo com doença	9 (6,2)
	Morte pós operatória	4 (2,8)
	Morte por cancer	31 (21,4)
	Morte por outras causas	26 (17,9)
	Perdido de vista	20 (13,8)
	Informação ausente	0 (0)
Tempo de seguimento (meses)	N	145
	Variação	9 dias – 204,1
	Mediana	56,5
	Media (Desvio Padrão)	67,4 (58,9)

4.1.2 Características clínicas de apresentação do tumor e tratamento

Todos os tumores primários deste estudo eram da categoria cT3 e o pescoço foi avaliado clinicamente como positivo (metástase linfonodal) em 23 casos (15,9%). O sítio da neoplasia era transglótico em 64 pacientes (44,1%); glótico em 50 (34,5); supraglótico em 29 (20,0%), e subglótico em 2 (1,4%). A fixação da prega vocal estava presente em 134 casos (93,1%) e a comissura anterior estava invadida pela doença em 85 (59,9%).

O espaço pré-epiglótico estava comprometido em 33 (25,6%), o espaço paraglótico em 74 (56,5%) e a cortical interna da cartilagem tireoidea em 48 (35,0%). O comprometimento de sítios adjacente à laringe como base de língua e/ou parede medial do seio piriforme foi documentado em 14 pacientes (10,0%). A área retrocricoide resultou comprometida em 6 casos (4,6%). Esses dados se referem à invasão profunda da laringe e invasão superficial de sítio próximo ao tumor primário (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição da casuística de acordo com características clínicas de apresentação do tumor

Variável	Categoria / Medidas	Freq.(%) / Medidas
Sitio da laringe	Glótico	50 (34,5)
	Supraglótico	29 (20,0)
	Subglótico	2 (1,4)
	Transglótico	64 (44,1)
	Informação ausente	0 (0,0)
cT	T3	145 (100,0)
cN	N0	122 (84,1)
	N1	7 (4,8)
	N2a	5 (3,4)
	N2b	4 (2,8)
	N2c	3 (2,1)
	N3	4 (2,8)
	Informação ausente	0 (0,0)
Invasão comissura anterior	Não	57 (39,4)
	Sim	85 (58,6)
	Informação ausente	3 (2,0)
Fixação emilaringe	Não	10 (6,9)
	Sim	134 (92,4)
	Informação ausente	1 (0,7)
Invasão retrocricoidea	Não	123 (84,9)
	Sim	6 (4,1)
	Informação ausente	16 (11,0)
Invasão espaço pré-epiglótico	Não	96 (66,2)
	Sim	33 (22,7)
	Informação ausente	16 (11,0)
Invasão espaço paraglótico	Não	57 (39,4)
	Sim	74 (51,0)
	Informação ausente	14 (9,6)
Invasão de cartilagem	Não	89 (61,4)
	Sim	48 (33,1)
	Informação ausente	8 (5,5)
Invasão além da laringe (avaliação clínica)	Não	126 (87,0)
	Sim	14 (9,6)
	Informação ausente	5 (3,4)

Características do tratamento dos pacientes incluídos no estudo:

- O tumor primário foi tratado segundo quatro grupos de tratamento: tratamento cirúrgico exclusivo: 60 pacientes (41,4%). Esse tratamento incluiu laringectomia parcial, total ou ampliada à estruturas fora da laringe (base de língua, parede medial do seio piriforme em tumor supraglótico);
- Radioterapia exclusiva em 19 (13,1%);
- Radioquimioterapia em 14 (9,7%);
- Associações terapêuticas em 52 (35,9%) (cirurgia + RT ou RTQT).

Dos 112 pacientes operados, 75 (67%) foram submetidos a laringectomia total, 10 (8,9%) a faringolaringectomia e somente 27 (24,1%) a laringectomia parcial. As laringectomia parciais foram: laringectomia “near total” em 18 pacientes; laringectomia parcial vertical (fronto-lateral ampliada) em 7 pacientes, e laringectomia parcial horizontal (supraglótica) em 2 pacientes.

Tiroidectomia parcial foi executada em 36 pacientes (36,8%), e total em 4 (3,6%); esvaziamento do nível VI em 53 pacientes (47,3%) e esvaziamento cervical em 105 pacientes (93,7%), incluindo 60 casos (53,6%) bilaterais (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição da casuística de acordo com o tratamento

Variável	Categoria	Freq.(%)
Tratamento	Cirurgia	60 (41,4)
	RT	19 (13,1)
	RT+QT	14 (9,7)
	Cirurgia mais RT ou RT+QT	52 (35,9)
	Informação ausente	0 (0,0)
Tipo cirurgia tumor primário	Laringectomia parcial	27 (24,1)
	Laringectomia total	75 (67,0)
	Faringolaringectomia	10 (8,9)
	Informação ausente	0 (0,0)
Tipo cirurgia pescoço homolateral	Não	7 (6,3)
	II – IV	40 (35,7)
	II – V	24 (21,4)
	I – V	38 (33,9)
	Outros	3 (2,7)
	Informação ausente	0 (0,0)
Tipo cirurgia pescoço contralateral	Não	52 (46,4)
	II – IV	35 (31,2)
	II – V	20 (17,9)
	I – V	4 (3,6)
	Outros	1 (0,9)
	Informação ausente	0 (0,0)
Tireoidectomia	Não	70 (62,5)
	Istmectomia	8 (7,1)
	Lobectomia	28 (25,0)
	Total	4 (3,6)
	Informação ausente	2 (1,8)
Esviamento de VI nível	Não	59 (52,7)
	Unilateral	37 (33,0)
	Bilateral	16 (14,3)
	Informação ausente	0 (0,0)

4.2 Características histopatológicas dos tumores

As características histopatológicas foram analisadas nos casos tratados cirurgicamente. Todos os casos analisados foram classificados como carcinoma epidermoide, sendo 84 casos (65,1%) bem diferenciados (Tabela 4).

Após a avaliação da peça operatória, o estágio clínico do tumor primário permaneceu pT3 em 83 pacientes (74,1%), aumentou a pT4 em 29 (25,9%).

As margens cirúrgicas foram consideradas microscopicamente livres de doença em 99 casos (88,4%) e foi evidenciado envolvimento além do sítio laríngeo em 33 casos (29,5%) (base da língua e/ou parede medial do seio piriforme com invasão profunda músculos pré-laringeos, extensão do tumor além da cartilagem tireoidea).

O estágio patológico dos linfonodos cervicais permaneceu N0 em 63 pacientes (60,0%), pN+ foi diagnosticado em 42 pacientes (40%). Dos 42 pacientes pN+, o nível linfonodal mais envolvido foi o nível II em 24 casos (57,1%); nível III em 12 casos (28,4%); nível I em 6 casos (14,2%), e níveis IV-VI em 6 casos (14,2%). Em 6 casos não foram relatados os níveis envolvidos.

O extravasamento capsular estava presente em 31 casos (29,0%), embolização vascular em 7 (6,5%), invasão perineural em 27 (25,5%), invasão linfática em 28 (26,6%) (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição da casuística de acordo com variáveis patológicas do tumor primário e metástases linfonodais

Variável	Categoria	Freq.(%)
Tipo histológico CEC	Bem Diferenciado	84 (75,0)
	Moderadamente Diferenciado	42 (37,5)
	Pouco Diferenciado	3 (2,7)
	Informação ausente	16 (14,3)
Estádio pT	pT3	83 (74,1)
	pT4	29 (25,9)
	Informação ausente	0 (0,0)
Estádio pN	pN0	63 (56,2)
	pN1	1 (0,9)
	pN2a	6 (5,3)
	pN2b	16 (14,3)
	pN2c	16 (14,3)
	pN3	3 (2,7)
	Informação ausente	0 (0,0)
Extravasamento capsular	pN0	63 (56,2)
	pN+ RC-	11 (9,8)
	pN+ RC+	31 (27,8)
	Informação ausente	7 (6,2)
Margens	Livre na peça	99 (88,4)
	Exígua/livre na margen congelada	4 (3,6)
	Comprometida	9 (8,0)
	Informação ausente	0 (0,0)
Invasão além da laringe	Não	79 (70,5)
	Sim	33 (29,5)
	Informação ausente	0 (0,0)
Invasão vascular	Não	100 (89,3)
	Sim	7 (6,2)
	Informação ausente	5 (4,5)
Invasão perineural	Não	79 (70,6)
	Sim	27 (24,1)
	Informação ausente	6 (5,3)
Invasão linfática	Não	77 (68,8)
	Sim	28 (25,0)
	Informação ausente	7 (6,2)

4.3 Persistência, recorrência e segundo tumor primário

Houve persistência do tumor primário em 20 casos (13,8%). Dez casos eram do grupo cirúrgico: a doença voltou (confirmada da análise patológica) em menos de 6 meses após o tratamento (não cumpriu tratamento adjuvante). Doze casos eram do grupo de preservação: não houve resposta completa após tratamento ou a doença voltou (confirmado pela análise patológica) em menos de 6 meses. Em 2 casos (1,4%) houve persistência de linfonodos positivos (metástase). Sete casos (35%) foram submetidos a tratamento de resgate.

Houve descrição de um segundo tumor primário em 26 casos (19,3%). Destes, 10 (38,5%) foram de cabeça e pescoço (hipofaringe, orofaringe e cavidade oral), e 16 (61,5%) de outro local anatômico (pulmão, esôfago, cólon e reto).

Recorrência loco-regional do tumor foi detectada em 16 pacientes (11%) e metástase à distância em 5 (3,5%). Sete pacientes foram submetidos a tratamento de resgate e 9 a tratamento paliativo. Do grupo de preservação de órgão – um total de 60 pacientes –, 10 (16,7%) foram submetidos a laringectomia total (um paciente do grupo de preservação cirúrgica de órgão e 9 pacientes do grupo de preservação de órgão não cirúrgica). O período do tempo livre da doença foi de 24,7 +/-17,8 meses (min, Max 3.5-60.3; mediana 18.3) (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição da casuística de acordo com persistência, recorrência e segundo tumor primário

Variável	Categoria	Freq.(%)
Persistência	Não	123 (84,8)
	Sim (T)	20 (13,8)
	Sim (N)	2 (1,4)
	Informação ausente	0 (0,0)
Segundo tumor primário	Não	109 (75,1)
	Sim	26 (18,0)
	Informação ausente	10 (6,9)
Local do segundo tumor primário	Cabeça e Pescoço	10 (7,0)
	Pulmão	9 (6,2)
	Colon/Reto	6 (4,1)
	Esôfago	1 (0,7)
	Informação ausente	119 (82,0)
Recorrência	Não	124 (85,5)
	Sim (T)	16 (11,0)
	Sim (N)	0 (0,0)
	Sim (M)	5 (3,5)
	Informação ausente	0 (0,0)

4.4 Imunoistoquímica

A análise dos 92 casos submetidos à pesquisa imunoistoquímica dos marcadores relacionados à via do EGFR mostrou hiperexpressão do EGFR em 85 casos (92.5%); Erb b3, em 67 (72.8%); Erb b4, em 75 (81.5%); RAS, em 85 (92.4%); mTOR, em 67 (73.6%), e p53 em 53 (57.6%). Foi evidenciada normoexpressão do Erb b2, em 75 casos (81.5%); Mek, em 67 (74.4%); Erk, em 92 (100%), e pTEN em 73 (79.4%) (Tabela 6), (Figura 4).

Tabela 6 - Distribuição da casuística de acordo com expressão dos marcadores

Variável	Categoria	Freq. (%)
p53	Negativo	39 (42,4)
	Positivo	53 (57,6)
	Informação ausente	0 (0,0)
Erb b1	Negativo	7 (7,5)
	Positivo	85 (92,5)
	Informação ausente	0 (0,0)
Erb b2	Negativo	75 (81,5)
	Positivo	17 (18,5)
	Informação ausente	0 (0,0)
Erb b3	Negativo	25 (27,2)
	Positivo	67 (72,8)
	Informação ausente	0 (0,0)
Erb b4	Negativo	17 (18,5)
	Positivo	75 (81,5)
	Informação ausente	0 (0,0)
Mek	Negativo	67 (72,8)
	Positivo	23 (25,0)
	Informação ausente	2 (2,2)
Erk	Negativo	92 (100,0)
	Positivo	0 (0,0)
	Informação ausente	0 (0,0)
Ras	Negativo	7 (7,6)
	Positivo	85 (92,4)
	Informação ausente	0 (0,0)
pTEN	Negativo	73 (79,4)
	Positivo	19 (20,6)
	Informação ausente	0 (0,0)
mTor	Negativo	24 (26,0)
	Positivo	67 (73,0)
	Informação ausente	1 (1,0)

Figura 4a – Aspectos histopatológicos dos casos de carcinoma epidermóide T3 da laringe: A: bloco tumoral com aspectos de invasão na lâmina própria e próximo a cartilagem calcificada. B: intensa displasia e atipia das células neoplásicas e presença de mitoses (seta); C: carcinoma epidermóide com invasão perivascular; D: êmbolo neoplásico; E: invasão neoplásica perineural; F: invasão neoplásica periglandular

Figura 4b. Expressão imunoistoquímica das proteínas EGFR, Erb B2, Erb B3, Erb B4 em amostras de carcinoma de laringe: A, expressão de membrana positiva de EGFR; B, expressão de membrana/ citoplasmática positiva de EGFR; C,D expressão de membrana positiva de Erb B2; E, expressão de membrana positiva de Erb B3; F, expressão nuclear positiva de Erb B3; G, expressão de membrana positiva de Erb B4; H, expressão citoplasmática positiva de Erb B4

Figura 4c. Expressão imunoistoquímica das proteínas RAS, MEK, ERK em amostras de carcinoma de laringe. A, B expressão nuclear positiva de RAS; C, D expressão citoplasmática positiva de MEK; E, F expressão negativa de ERK

Figura 4d. Expressão imunoistoquímica das proteínas PTEN, mTOR, p53 em amostras de carcinoma de laringe. A, B expressão nuclear de PTEN; C, expressão nuclear de mTOR (displasia grave/carcinoma *in situ*); D, expressão citoplasmática de mTOR; E, F expressão nuclear de p53

Foi investigada a associação entre cada marcador com variáveis de apresentação clínica e características patológicas dos tumores, com expressão de outros marcadores.

A expressão imunoistoquímica positiva do marcador p53 foi estatisticamente associada à invasão do espaço paraglótico ($p=0.002$) e expressão positiva do marcador mTor ($p=0,074$) (Tabelas 7a a 7d). A expressão positiva do marcador Erb b1 foi marginalmente associada à invasão da cartilagem ($p=0.077$) e estatisticamente associada a expressão positiva do marcador mTor ($p=0,013$) (Tabelas 8a a 8d). A expressão negativa do marcador Erb b2 foi estatisticamente associada a estágio clínico pT3 ($p=0.009$) com ausência de invasão além da laringe ($p=0.031$). Pacientes com segundo tumor de sítio além da área de cabeça e pescoço também foram associados a expressão negativa desse marcador ($p=0.055$).

Expressão negativa do marcador Erb b2 foi associada também a expressão negativa do marcador Erb b3 ($p=0,005$) (Tabelas 9a a 9d). Expressão imunoistoquímica positiva do marcador Erb b3 foi estatisticamente associada à invasão da cartilagem ($p=0.015$) e invasão linfática ($p=0.056$). A expressão negativa foi associada a não persistência de tumor ($p=0.018$). Expressão imunoistoquímica positiva de Erb b3 foi estatisticamente associada a expressão positiva dos marcadores Erb b4 ($p<0,001$); Mek ($p=0,001$); Ras ($p=0,015$), e mTor ($p<0,001$) (Tabelas 10a a 10d). A expressão positiva do marcador Erb b4 foi estatisticamente associada à invasão da cartilagem ($p=0.054$) e à invasão linfática ($p=0.056$).

Expressão imunoistoquímica positiva de Erb b4 foi estatisticamente associada a expressão positiva dos marcadores Mek ($p=0,010$), Ras ($p=0,002$) e mTor ($p<0,001$) (Tabelas 11a a 11d). A expressão negativa do marcador MEK foi marginalmente associada a tumor sem invasão da comissura anterior, sem invasão perineural e sem invasão linfática ($p=0.07$). A expressão positiva de MEK foi marginalmente associada a paciente sem diagnóstico de segundo tumor primário ($p=0.09$). A expressão negativa do marcador mTOR foi associada a expressão positiva do marcador mTor ($p=0,001$) (Tabela 12a a 12d). A expressão positiva do marcador RAS foi marginalmente associada à invasão da cartilagem. A expressão positiva do marcador RAS foi associada a expressão positiva do marcador mTor ($p=0.013$) (Tabelas 13a a 13d). A expressão positiva do marcador PTEN foi estatisticamente associada a ausência de invasão linfática ($p=0.057$) (Tabela 14a a 14d). A expressão positiva do marcador mTOR foi associada a tumor com invasão da cartilagem ($p=0.013$) e invasão linfática ($p=0.052$) (Tabelas 15a a 15c). Todos esses dados estão resumidos nas Tabelas 7 a 15.

Tabela 7a - Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor de acordo com p53

Variável	Categoria	Expressão p53		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Sítio da laringe*	Glótico	11 (31,4)	24 (68,6)	NA
	Supraglótico	8 (44,4)	10 (55,6)	
	Subglótico*	1 (100,0)	0 (0,0)	
	Transglótico	19 (50,0)	19 (50,0)	
cN	N0	32 (41,6)	45 (58,4)	0,714
	N+	7 (46,7)	8 (53,3)	
Invasão comissura anterior	Não	14 (38,9)	22 (61,1)	0,601
	Sim	24 (44,4)	30 (55,6)	
Fixação emilaringe	Não	2 (25,0)	6 (75,0)	0,459 *
	Sim	37 (44,0)	47 (56,0)	
Invasão Retrocricoidea	Não	28 (38,4)	45 (61,6)	0,641 *
	Sim	2 (50,0)	2 (50,0)	
Invasão espaço pré-epiglótico	Não	18 (32,7)	37 (67,3)	0,076
	Sim	12 (54,6)	10 (45,4)	
Invasão espaço Paraglottico	Não	22 (57,9)	16 (42,1)	0,002
	Sim	10 (24,4)	37 (75,6)	
Invasão cartilagem	Não	21 (41,2)	30 (58,8)	0,788
	Sim	15 (44,1)	19 (55,9)	
Invasão além da laringe (avaliação clínica)	Não	36 (46,2)	42 (53,8)	0,288*
	Sim	2 (22,2)	7 (77,8)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

* p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 7b - Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do p53

Variável	Categoria	Expressão p53		p-valor
		Negativo Freq. (%)	Positivo Freq. (%)	
Estádio pT	pT3	25 (42,4)	34 (57,6)	0,838
	pT4	9 (45,0)	11 (55,0)	
Estádio pN	pN0	20 (42,6)	27 (57,4)	0,507
	pN+	9 (34,6)	17 (65,4)	
Invasão além da laringe	Não	25 (43,9)	32 (56,1)	0,812
	Sim	9 (40,9)	13 (59,1)	
Invasão vascular	Não	28 (40,6)	41 (59,4)	0,159 *
	Sim	4 (80,0)	1 (20,0)	
Invasão perineural	Não	22 (40,7)	32 (59,3)	0,369
	Sim	10 (52,6)	9 (47,4)	
Invasão linfática	Não	24 (43,6)	31 (56,4)	0,858
	Sim	7 (41,2)	10 (58,8)	
Tipo histológico CEC	Bem Diferenciado	23 (38,3)	37 (61,7)	NA
	Moderada/te Diferenciado	16 (51,6)	15 (48,4)	
	Pouco Diferenciado	0 (0,0)	1 (100,0)	
Persistência	Não	33 (42,3)	45 (57,7)	0,969
	Sim	6 (42,9)	8 (57,1)	
Segundo tumor primário	Não	28 (42,4)	38 (57,6)	0,901
	Sim	9 (40,9)	13 (59,1)	
Sítio do segundo tumor primário	Cabeça e pescoço	4 (44,4)	5 (55,6)	0,999 *
	Outros	5 (38,5)	8 (61,5)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

* p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 7c - Distribuição das expressão marcadores de acordo com p53

Variável	Categoria	Expressão p53		p-valor
		Negativo Freq. (%)	Positivo Freq. (%)	
Erb b1	Negativo	3 (42,9)	4 (57,1)	0,999 *
	Positivo	36 (42,4)	49 (57,6)	
Erb b2	Negativo	32 (42,7)	43 (57,3)	0,911
	Positivo	7 (41,2)	10 (58,8)	
Erb b3	Negativo	13 (52,0)	12 (48,0)	0,255
	Positivo	26 (38,8)	41 (61,2)	
Erb b4	Negativo	10 (58,8)	7 (41,2)	0,129
	Positivo	29 (38,7)	46 (61,3)	
Mek	Negativo	28 (41,8)	39 (58,2)	0,823
	Positivo	9 (39,1)	14 (60,9)	
Ras	Negativo	4 (57,1)	3 (42,9)	0,452 *
	Positivo	35 (41,2)	50 (58,8)	
PTEN	Negativo	29 (39,7)	44 (60,3)	0,311
	Positivo	10 (52,6)	9 (47,4)	
mTor	Negativo	14 (58,3)	10 (41,7)	0,074
	Positivo	25 (37,3)	42 (62,7)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

* p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 8a - Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor de acordo com ErbB1

Variável	Categoria	Expressão Erb b1		p-valor
		Negativo	Positivo Freq. (%)	
Sítio da laringe*	Glótico	2 (5,7)	33 (94,3)	NA
	Supraglótico	2 (11,1)	16 (88,9)	
	Subglótico*	0 (0,0)	1 (100,0)	
	Transglótico	3 (7,7)	36 (92,3)	
cN	N0	7 (9,0)	71 (91,0)	0,593
	N+	0 (0,0)	15 (100,0)	
Invasão comissura anterior	Não	2 (5,6)	34 (94,4)	0,699
	Sim	5 (9,1)	50 (90,9)	
Fixação emilaringe	Não	0 (0,0)	8 (100,0)	0,999
	Sim	7 (8,2)	78 (91,8)	
Invasão Retrocricoidea	Não	6 (8,1)	68 (91,9)	0,999
	Sim	0 (0,0)	4 (100,0)	
Invasão Espaço Pré-epiglótico	Não	4 (7,1)	52 (92,9)	0,999
	Sim	2 (9,1)	20 (90,9)	
Invasão Espaço Paraglottico	Não	2 (5,3)	36 (94,7)	0,678
	Sim	4 (9,5)	38 (90,5)	
Invasão cartilagem	Não	6 (11,5)	46 (88,5)	0,077
	Sim	0 (0,0)	34 (100,0)	
Invasão além da laringe (avaliação clínica)	Não	5 (6,3)	74 (93,7)	0,487
	Sim	1 (11,1)	8 (88,9)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 8b - Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do ErbB1

Variável	Categoria	Expressão Erb b1		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Estádio pT	pT3	5 (8,3)	55 (91,7)	0,999
	pT4	1 (5,0)	19 (95,0)	
Estádio pN	pN0	4 (8,5)	43 (91,5)	0,999
	pN+	2 (7,4)	25 (92,6)	
Invasão além da laringe	Não	5 (8,8)	52 (91,2)	0,667
	Sim	1 (4,4)	22 (95,6)	
Invasão vascular	Não	6 (8,6)	64 (91,4)	0,999
	Sim	0 (0,0)	5 (100,0)	
Invasão perineural	Não	5 (9,1)	50 (90,9)	0,999
	Sim	1 (5,3)	18 (94,7)	
Invasão linfática	Não	6 (10,7)	50 (89,3)	0,325
	Sim	0 (0,0)	17 (100,0)	
Persistência	Não	7 (9,0)	71 (91,0)	0,593
	Sim	0 (0,0)	15 (100,0)	
Segundo tumor primário	Não	6 (9,0)	61 (91,0)	0,676
	Sim	1 (4,6)	21 (95,4)	
Sitio do segundo tumor primário	Cabeça e pescoço	0 (0,0)	9 (100,0)	NA
	Outros	1 (7,7)	12 (92,3)	
Tipo histológico CEC	Bem Diferenciado	7 (11,5)	54 (88,5)	NA
	Moderada/te Diferenciado	0 (0,0)	31 (100,0)	
	Pouco Diferenciado	0 (0,0)	1 (100,0)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 8c - Distribuição das expressão marcadores de acordo com ErbB1

Variável	Categoria	Expressão Erb b1		p-valor
		Negativo	Positivo Freq. (%)	
Erb b2	Negativo	5 (6,7)	70 (93,3)	0,609
	Positivo	2 (11,8)	15 (88,2)	
Erb b3	Negativo	5 (20,0)	20 (80,0)	0,015
	Positivo	2 (3,0)	65 (97,0)	
Erb b4	Negativo	2 (11,8)	15 (88,2)	0,609
	Positivo	5 (6,7)	70 (93,3)	
Mek	Negativo	5 (7,5)	62 (92,5)	0,999
	Positivo	1 (4,4)	22 (96,6)	
Ras	Negativo	3 (42,9)	4 (57,1)	0,008
	Positivo	4 (4,7)	81 (95,3)	
PTEN	Negativo	5 (6,8)	68 (93,2)	0,631
	Positivo	2 (10,5)	17 (89,5)	
mTor	Negativo	5 (20,8)	19 (79,2)	0,013
	Positivo	2 (3,0)	65 (97,0)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

Tabela 9a - Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor de acordo com ErbB2

Variável	Categoria	Expressão Erb b2		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Sítio da laringe*	Glótico	30 (85,7)	5 (14,3)	NA
	Supraglótico	13 (72,2)	5 (27,8)	
	Subglótico*	1 (100,0)	0 (0,0)	
	Transglótico	31 (81,6)	7 (18,4)	
cN	N0	62 (80,5)	15 (19,5)	0,729
	N+	13 (86,7)	2 (13,3)	
Invasão comissura anterior	Não	27 (75,0)	9 (25,0)	0,227 *
	Sim	46 (85,2)	8 (14,8)	
Fixação emilaringe	Não	6 (75,0)	2 (25,0)	0,637
	Sim	69 (82,1)	15 (17,9)	
Invasão Retrocricoidea	Não	59 (80,8)	14 (19,2)	0,999
	Sim	4 (100,0)	0 (0,0)	
Invasão Espaço Pré-epiglótico	Não	46 (83,6)	9 (16,4)	0,526
	Sim	17 (77,3)	5 (22,7)	
Invasão Espaço Paraglótico	Não	32 (84,2)	6 (15,8)	0,665 *
	Sim	33 (80,5)	8 (19,5)	
Invasão cartilagem	Não	43 (84,3)	8 (15,7)	0,561 *
	Sim	27 (79,4)	7 (20,6)	
Invasão além da laringe (avaliação clínica)	Não	65 (83,3)	13 (16,7)	0,357
	Sim	6 (66,7)	3 (33,3)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 9b - Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do ErbB2

Variável	Categoria	Expressão Erb b2		p-valor
		Negativo Freq. (%)	Positivo Freq. (%)	
Estádio pT	pT3	54 (91,5)	5 (8,5)	0,009
	pT4	13 (65,0)	7 (35,0)	
Estádio pN	pN0	40 (85,1)	7 (14,9)	0,744
	pN+	21 (80,8)	5 (19,2)	
Invasão além da laringe	Não	52 (91,2)	5 (8,8)	0,031
	Sim	15 (68,2)	7 (31,8)	
Invasão vascular	Não	60 (87,0)	9 (13,0)	0,527
	Sim	4 (80,0)	1 (20,0)	
Invasão perineural	Não	49 (90,7)	5 (9,3)	0,114
	Sim	14 (73,7)	5 (26,3)	
Invasão linfática	Não	49 (89,1)	6 (10,9)	0,433
	Sim	14 (82,4)	3 (17,6)	
Persistência	Não	62 (79,5)	16 (20,5)	0,454
	Sim	13 (92,9)	1 (7,1)	
Segundo tumor primário	Não	52 (78,8)	14 (21,2)	0,545
	Sim	19 (86,4)	3 (13,6)	
Sitio do segundo tumor primário	Cabeça e pescoço	6 (66,7)	3 (33,3)	0,055
	Outros	13 (100,0)	0 (0,0)	
Tipo histológico CEC	Bem Diferenciado	49 (81,7)	11 (18,3)	NA
	Moderada/te Diferenciado	25 (80,6)	6 (19,4)	
	Pouco Diferenciado	1 (100,0)	0 (0,0)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 9c - Distribuição das expressão marcadores de acordo com ErbB2

Variável	Categoria	Expressão Erb b2		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Erb b3	Negativo	25 (100,0)	0 (0,0)	0,005
	Positivo	50 (74,6)	17 (25,4)	
Erb b4	Negativo	14 (82,4)	3 (17,6)	0,999
	Positivo	61 (81,3)	14 (18,7)	
Mek	Negativo	54 (80,6)	13 (19,4)	0,999
	Positivo	19 (82,6)	4 (17,4)	
Ras	Negativo	5 (71,4)	2 (28,6)	0,609
	Positivo	70 (82,4)	15 (17,6)	
PTEN	Negativo	61 (83,6)	12 (16,4)	0,332
	Positivo	14 (73,7)	5 (26,3)	
mTor	Negativo	20 (83,3)	4 (16,7)	0,999
	Positivo	54 (80,6)	13 (19,4)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

Tabela 10a - Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor de acordo com ErbB3

Variável	Categoria	Expressão Erb b3		p-valor
		Negativo	Positivo Freq. (%)	
Sítio da laringe*	Glótico	10 (28,6)	25 (71,4)	NA
	Supraglótico	3 (16,7)	15 (83,3)	
	Subglótico*	0 (0,0)	1 (100,0)	
	Transglótico	12 (31,6)	26 (68,4)	
cN	N0	20 (26,0)	57 (74,0)	0,541
	N+	5 (33,3)	10 (66,7)	
Invasão comissura anterior	Não	11 (30,6)	25 (69,4)	0,496 *
	Sim	13 (24,1)	41 (75,9)	
Fixação emilaringe	Não	1 (12,5)	7 (87,5)	0,440
	Sim	24 (28,6)	60 (71,4)	
Invasão Retrocricoidea	Não	18 (24,7)	55 (75,3)	0,999
	Sim	1 (25,0)	3 (75,0)	
Invasão espaço pré-epiglótico	Não	14 (25,4)	41 (74,6)	0,802 *
	Sim	5 (22,7)	17 (77,3)	
Invasão espaço Paraglótico	Não	10 (26,3)	28 (73,7)	0,959 *
	Sim	11 (26,8)	30 (73,2)	
Invasão cartilagem	Não	18 (35,3)	33 (64,7)	0,015 *
	Sim	4 (11,8)	30 (88,2)	
Invasão além da laringe (avaliação clínica)	Não	20 (25,6)	58 (74,4)	0,999
	Sim	2 (22,2)	7 (77,8)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 10b - Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do ErbB3

Variável	Categoria	Expressão Erb b3		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq.	(%)	
Estádio pT	pT3 pT4	15 (25,4) 4 (20,0)	44 (74,6) 16 (80,0)	0,767 *
Estádio pN	pN0 pN+	11 (23,4) 7 (26,9)	36 (76,6) 19 (73,1)	0,738
Invasão além da laringe	Não Sim	14 (24,6) 5 (22,7)	43 (75,4) 17 (77,3)	0,864
Invasão vascular	Não Sim	17 (24,6) 1 (20,0)	52 (75,4) 4 (80,0)	0,999 *
Invasão perineural	Não Sim	14 (25,9) 3 (15,8)	40 (74,1) 16 (84,2)	0,531 *
Invasão linfática	Não Sim	16 (29,1) 1 (5,9)	39 (70,9) 16 (94,1)	0,056 *
Persistência	Não Sim	17 (21,8) 8 (57,1)	61 (78,2) 6 (42,9)	0,018 *
Segundo tumor primário	Não Sim	17 (25,8) 7 (31,8)	49 (74,2) 15 (68,2)	0,580
Tipo histológico CEC	Bem Diferenciado Moderada/te Diferenciado Pouco Diferenciado	18 (30,0) 7 (22,6) 0 (0,0)	42 (70,0) 24 (77,4) 1 (100,0)	NA
Sítio do segundo tumor primário	Cabeça e pescoço Outros	3 (33,3) 4 (30,8)	6 (66,7) 9 (69,2)	0,999 *

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

*p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 10c - Distribuição das expressão marcadores de acordo com ErbB3

Variável	Categoria	Expressão Erb b3		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Erb b4	Negativo	11 (64,7)	6 (35,3)	< 0,001
	Positivo	14 (18,7)	61 (81,3)	
Mek	Negativo	23 (34,3)	44 (65,7)	0,001
	Positivo	0 (0,0)	23 (100,0)	
Ras	Negativo	5 (71,4)	2 (28,6)	0,015 *
	Positivo	20 (23,5)	65 (76,5)	
PTEN	Negativo	19 (26,0)	54 (74,0)	0,628
	Positivo	6 (31,6)	13 (68,4)	
mTor	Negativo	17 (70,8)	7 (29,2)	< 0,001
	Positivo	7 (10,4)	60 (89,6)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

*p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

Tabela 11a - Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor de acordo com ErbB4

Variável	Categoria	Expressão Erb b4		p-valor
		Negativo	Positivo Freq. (%)	
Sítio da laringe*	Glótico	4 (11,4)	31 (88,6)	NA
	Supraglótico	3 (16,7)	15 (83,3)	
	Subglótico*	0 (0,0)	1 (100,0)	
	Transglótico	10 (26,3)	28 (73,7)	
cN	N0	13 (16,9)	64 (83,1)	0,466
	N+	4 (26,7)	11 (73,3)	
Invasão comissura anterior	Não	8 (22,2)	28 (77,8)	0,368 *
	Sim	8 (14,8)	46 (85,2)	
Fixação PV	Não	0 (0,0)	8 (100,0)	0,343
	Sim	17 (20,2)	67 (79,8)	
Invasão Retrocricoidea	Não	14 (19,2)	59 (80,8)	0,999
	Sim	1 (25,0)	3 (75,0)	
Invasão Espaço Pré-epiglótico	Não	12 (21,8)	43 (78,2)	0,534
	Sim	3 (13,6)	19 (86,4)	
Invasão Espaço Paraglottico	Não	9 (23,7)	29 (76,3)	0,465 *
	Sim	7 (17,1)	34 (82,9)	
Invasão cartilagem	Não	13 (25,5)	38 (74,5)	0,054 *
	Sim	3 (8,8)	31 (91,2)	
Invasão além da laringe (avaliação clínica)	Não	13 (16,7)	65 (83,3)	0,357
	Sim	3 (33,3)	6 (66,7)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 11b - Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do ErbB4

Variável	Categoria	Expressão Erb b4		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Estádio pT	pT3	10 (17,0)	49 (83,0)	0,999
	pT4	3 (15,0)	17 (85,0)	
Estádio pN	pN0	11 (23,4)	36 (76,6)	0,093*
	pN+	2 (7,7)	24 (92,3)	
Invasão além da laringe	Não	9 (15,8)	48 (84,2)	0,748
	Sim	4 (18,2)	18 (81,8)	
Invasão vascular	Não	11 (15,9)	58 (84,1)	0,999
	Sim	1 (20,0)	4 (80,0)	
Invasão perineural	Não	9 (16,7)	45 (83,3)	0,717
	Sim	2 (10,5)	17 (89,5)	
Invasão linfática	Não	11 (20,0)	44 (80,0)	0,056
	Sim	0 (0,0)	17 (100,0)	
Persistência	Não	12 (15,4)	66 (84,6)	0,126
	Sim	5 (35,7)	9 (64,3)	
Segundo tumor primário	Não	13 (19,7)	53 (80,3)	0,999
	Sim	4 (18,2)	18 (81,8)	
Sítio do segundo tumor primário	Cabeça e pescoço	1 (11,1)	8 (88,9)	0,616
	Outros	3 (23,1)	10 (76,9)	
Tipo histológico CEC	Bem Diferenciado	11 (18,3)	49 (81,7)	NA
	Moderada/te Diferenciado	6 (19,4)	25 (80,6)	
	Pouco Diferenciado	0 (0,0)	1 (100,0)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 11c - Distribuição das expressão marcadores de acordo com ErbB4

Variável	Categoria	Expressão Erb b4		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Mek	Negativo	15 (22,4)	52 (77,6)	0,010 *
	Positivo	0 (0,0)	23 (100,0)	
Ras	Negativo	5 (71,4)	2 (28,6)	0,002*
	Positivo	12 (14,1)	73 (85,9)	
PTEN	Negativo	13 (17,8)	60 (82,2)	0,746 *
	Positivo	4 (21,0)	15 (79,0)	
Mtor	Negativo	13 (54,2)	11 (45,8)	<0,001*
	Positivo	4 (6,0)	63 (94,0)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

*p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

Tabela 12a - Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor, de acordo com MEK

Variável	Categoria	Expressão MEK		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Sítio da laringe*	Glótico	23 (65,7)	12 (34,3)	NA
	Supraglótico	15 (83,3)	3 (16,7)	
	Subglótico*	1 (100,0)	0 (0,0)	
	Transglótico	28 (77,8)	8 (22,2)	
cN	N0	56 (74,7)	19 (25,3)	0,999 *
	N+	11 (73,3)	4 (26,7)	
Invasão comissura anterior	Não	30 (83,3)	6 (16,7)	0,093
	Sim	35 (67,3)	17 (32,7)	
Fixação emilaringe	Não	5 (62,5)	3 (37,5)	0,416 *
	Sim	62 (75,6)	20 (24,4)	
Invasão Retrocricoidea	Não	52 (72,2)	20 (27,8)	0,999 *
	Sim	2 (66,7)	1 (33,3)	
Invasão Espaço Pre-epiglotico	Não	39 (72,2)	15 (27,8)	0,945
	Sim	15 (71,4)	6 (28,6)	
Invasão Espaço Paraglotico	Não	28 (77,8)	8 (22,2)	0,351
	Sim	28 (68,3)	13 (31,7)	
Invasão cartilagem	Não	35 (71,4)	14 (28,6)	0,609
	Sim	26 (76,5)	8 (23,5)	
Invasão além da laringe (avaliação clínica)	Não	54 (71,0)	22 (29,0)	0,433 *
	Sim	8 (88,9)	1 (11,1)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

* p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 12b - Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do MEK

Variável	Categoria	Expressão MEK		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Estádio pT	pT3	42 (73,7)	15 (26,3)	0,460
	pT4	13 (65,0)	7 (35,0)	
Estádio pN	pN0	33 (73,3)	12 (26,7)	0,711
	pN+	18 (69,2)	8 (30,8)	
Invasão além da laringe	Não	40 (72,7)	15 (27,3)	0,690
	Sim	15 (68,2)	7 (31,8)	
Invasão vascular	Não	47 (70,2)	20 (29,8)	0,999 *
	Sim	4 (80,0)	1 (20,0)	
Invasão perineural	Não	41 (75,9)	13 (24,1)	0,070
	Sim	9 (52,9)	8 (47,1)	
Invasão linfática	Não	40 (75,5)	13 (24,5)	0,078
	Sim	9 (52,9)	8 (47,1)	
Persistência	Não	55 (72,4)	21 (27,6)	0,505 *
	Sim	12 (85,7)	2 (14,3)	
Segundo tumor primário	Não	52 (81,2)	12 (18,8)	0,092
	Sim	14 (63,6)	8 (36,4)	
Sítio do segundo tumor primário	Cabeça e pescoço	6 (66,7)	3 (33,3)	0,999 *
	Outros	8 (61,5)	5 (38,5)	
Tipo histológico CEC	Bem Diferenciado	42 (71,2)	17 (28,8)	NA
	Moderada/te Diferenciado	24 (80,0)	6 (20,0)	
	Pouco Diferenciado	1(100,0)	0 (0,0)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

* p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 12c - Distribuição das expressão marcadores, de acordo com MEK

Variável	Categoria	Expressão MEK		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Ras	Negativo	6 (100,0)	0 (0,0)	0,332 *
	Positivo	61 (72,6)	23 (27,4)	
PTEN	Negativo	52 (73,2)	19 (26,8)	0,771 *
	Positivo	15 (79,0)	4 (21,0)	
mTor	Negativo	22 (100,0)	0 (0,0)	0,001
	Positivo	44 (65,7)	23 (34,3)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

* p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

Tabela 13a - Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor, de acordo com RAS

Variável	Categoria	Expressão RAS		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Sítio da laringe*	Glótico	1 (2,9)	34 (97,1)	NA
	Supraglótico	2 (11,1)	16 (88,9)	
	Subglótico*	0 (0,0)	1 (100,0)	
	Transglótico	4 (10,5)	34 (89,5)	
cN	N0	6 (7,8)	71 (92,2)	0,999
	N+	1 (6,7)	14 (93,3)	
Invasão comissura anterior	Não	3 (8,3)	33 (91,7)	0,680
	Sim	3 (5,6)	51 (94,4)	
Fixação emilaringe	Não	0 (0,0)	8 (100,0)	0,999
	Sim	7 (8,3)	77 (91,7)	
Invasão Retrocricoidea	Não	5 (6,8)	68 (93,2)	0,999
	Sim	0 (0,0)	4 (100,0)	
Invasão espaço pré-epiglótico	Não	4 (7,3)	51 (92,7)	0,999
	Sim	1 (4,6)	21 (95,4)	
Invasão espaço Paraglótico	Não	3 (7,9)	35 (92,1)	0,667
	Sim	2 (4,9)	39 (95,1)	
Invasão cartilagem	Não	6 (11,8)	45 (88,2)	0,077
	Sim	0 (0,0)	34 (100,0)	
Invasão além da laringe (avaliação clínica)	Não	5 (6,4)	73 (93,6)	0,491
	Sim	1 (11,1)	8 (88,9)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 13b - Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do RAS

Variável	Categoria	Expressão RAS		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Estádio pT	pT3	3 (5,1)	56 (94,9)	0,999
	pT4	1 (5,0)	19 (95,0)	
Estádio pN	pN0	3 (6,4)	44 (93,6)	0,999
	pN+	1 (3,8)	25 (96,2)	
Invasão além da laringe	Não	3 (5,3)	54 (94,7)	0,999
	Sim	1 (4,6)	21 (95,4)	
Invasão vascular	Não	4 (5,8)	65 (94,2)	0,999
	Sim	0 (0,0)	5 (100,0)	
Invasão perineural	Não	3 (5,6)	51 (94,4)	0,999
	Sim	1 (5,3)	19 (94,7)	
Invasão linfática	Não	4 (7,3)	51 (92,7)	0,566
	Sim	0 (0,0)	17 (100,0)	
Persistência	Não	5 (6,4)	73 (93,6)	0,288
	Sim	2 (14,3)	12 (85,7)	
Segundo tumor primário	Não	6 (9,1)	60 (90,9)	0,675
	Sim	1 (4,6)	21 (95,4)	
Sítio do segundo tumor primário	Cabeça e pescoço	1 (11,1)	8 (88,9)	NA
	Outros	0 (0,0)	13 (100,0)	
Tipo histológico CEC	Bem Diferenciado	7 (11,7)	53 (88,3)	NA
	Moderada/te Diferenciado	0 (0,0)	31 (100,0)	
	Pouco Diferenciado	0 (0,0)	1 (100,0)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 13c - Distribuição das expressão marcadores, de acordo com RAS

Variável	Categoria	Expressão RAS		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
PTEN	Negativo	6 (8,2)	67 (91,8)	0,999
	Positivo	1 (5,3)	18 (94,7)	
mTor	Negativo	5 (20,8)	19 (79,2)	0,013
	Positivo	2 (3,0)	65 (97,0)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

Tabela 14a - Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor, de acordo com PTEN

Variável	Categoria	Expressão PTEN		p-valor
		Negativo	Positivo Freq. (%)	
Sítio da laringe*	Glótico	27 (77,1)	8 (22,9)	NA
	Supraglótico	15 (83,3)	3 (6,7)	
	Subglótico*	1 (100,0)	0 (0,0)	
	Transglótico	30 (79,0)	8 (21,0)	
cN	N0	61 (79,2)	16 (20,8)	0,999
	N+	12 (80,0)	3 (20,0)	
Invasão comissura anterior	Não	29 (80,6)	7 (19,4)	0,912 *
	Sim	44 (81,5)	10 (18,5)	
Fixação emilaringe	Não	6 (75,0)	2 (25,0)	0,667
	Sim	67 (79,8)	17 (20,2)	
Invasão Retrocricoidea	Não	58 (79,5)	15 (20,5)	0,581
	Sim	4 (100,0)	0 (0,0)	
Invasão espaço pré-epiglótico	Não	46 (83,6)	9 (16,4)	0,342
	Sim	16 (72,7)	6 (27,3)	
Invasão espaço Paraglottico	Não	32 (84,2)	6 (15,8)	0,485 *
	Sim	32 (78,0)	9 (22,0)	
Invasão cartilagem	Não	41 (80,4)	10 (19,6)	0,912 *
	Sim	27 (79,4)	7 (20,6)	
Invasão além da laringe (avaliação clínica)	Não	64 (82,0)	14 (18,0)	0,084
	Sim	5 (55,6)	4 (44,4)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 14b - Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do PTEN

Variável	Categoria	Expressão PTEN		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Estádio pT	pT3	47 (79,7)	12 (20,3)	0,166
	pT4	19 (95,0)	1 (5,0)	
Estádio pN	pN0	39 (83,0)	8 (17,0)	0,999
	pN+	21 (80,8)	5 (19,2)	
Invasão além da laringe	Não	45 (79,0)	12 (21,0)	0,098
	Sim	21 (95,4)	1 (4,6)	
Invasão vascular	Não	58 (84,1)	11 (15,9)	0,999
	Sim	4 (80,0)	1 (20,0)	
Invasão perineural	Não	45 (83,3)	9 (16,7)	0,999
	Sim	16 (84,2)	3 (15,8)	
Invasão linfática	Não	43 (78,2)	12 (21,8)	0,057
	Sim	17 (100,0)	0 (0,0)	
Persistência	Não	63 (80,8)	15 (19,2)	0,477
	Sim	10 (71,4)	4 (28,6)	
Segundo tumor primário	Não	51 (77,3)	15 (22,7)	0,771
	Sim	18 (81,8)	4 (18,2)	
Sitio do segundo tumor primário	Cabeça e pescoço	9 (100,0)	0 (0,0)	0,115
	Outros	9 (69,2)	4 (30,8)	
Tipo histológico CEC	Bem Diferenciado	49 (81,7)	11 (18,3)	NA
	Moderada/te Diferenciado	23 (74,2)	8 (25,8)	
	Pouco Diferenciado	1 (100,0)	0 (0,0)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 14c - Distribuição das expressão marcadores, de acordo com PTEN

Variável	Categoria	Expressão PTEN		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
mTor	Negativo	21 (87,5)	3 (12,5)	0,239 *
	Positivo	51 (76,1)	16 (23,9)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

Tabela 15a - Distribuição das variáveis clínicas de apresentação do tumor, de acordo com mTOR

Variável	Categoria	Expressão MTOR		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Sítio da laringe*	Glótico	5 (14,7)	29 (85,3)	NA
	Supraglótico	5 (27,8)	13 (72,2)	
	Subglótico*	0 (0,0)	1 (100,0)	
	Transglótico	14 (36,8)	24 (63,2)	
cN	N0	21 (27,3)	56 (72,7)	0,753
	N+	3 (21,4)	11 (78,6)	
Invasão comissura anterior	Não	10 (28,6)	25 (71,4)	0,784 *
	Sim	14 (25,9)	40 (74,1)	
Fixação emilaringe	Não	2 (25,0)	6 (75,0)	0,999
	Sim	22 (26,5)	61 (73,5)	
Invasão Retrocricoidea	Não	17 (23,6)	55 (76,4)	0,999
	Sim	1 (25,0)	3 (75,0)	
Invasão espaço pré-epiglótico	Não	13 (24,1)	41 (75,9)	0,900 *
	Sim	5 (22,7)	17 (77,3)	
Invasão espaço Paraglótico	Não	12 (31,6)	26 (68,4)	0,242 *
	Sim	8 (20,0)	32 (80,0)	
Invasão cartilagem	Não	18 (36,0)	32 (64,0)	0,013 *
	Sim	4 (11,8)	30 (88,2)	
Invasão além da laringe (avaliação clínica)	Não	20 (25,6)	58 (74,4)	0,999
	Sim	2 (25,0)	6 (75,0)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

NA= não avaliável estatisticamente

Tabela 15b - Distribuição das variáveis patológicas do tumor e dos desfechos persistência e segundo tumor, de acordo com expressão do mTOR

Variável	Categoria	Expressão MTOR		p-valor
		Negativo	Positivo	
		Freq. (%)		
Estádio pT	pT3	16 (27,6)	42 (72,4)	0,503 *
	pT4	4 (20,0)	16 (80,0)	
Estádio pN	pN0	15 (31,9)	32 (68,1)	0,145 *
	pN+	4 (16,0)	21 (84,0)	
Invasão além da laringe	Não	15 (26,3)	42 (73,7)	0,822 *
	Sim	5 (23,8)	16 (76,2)	
Invasão vascular	Não	18 (26,5)	50 (73,5)	0,610
	Sim	2 (40,0)	3 (60,0)	
Invasão perineural	Não	16 (30,2)	37 (69,8)	0,222 *
	Sim	3 (15,8)	16 (84,2)	
Invasão linfática	Não	18 (32,7)	37 (67,3)	0,052
	Sim	1 (6,2)	15 (93,8)	
Persistência	Não	19 (24,7)	58 (75,3)	0,510
	Sim	5 (35,7)	9 (64,3)	
Segundo tumor primário	Não	16 (24,6)	49 (75,4)	0,508 *
	Sim	7 (31,8)	15 (68,2)	
Sítio do segundo tumor primário	Cabeça e pescoço	3 (33,3)	6 (66,7)	0,999
	Outros	4 (30,8)	9 (69,2)	
Tipo histológico CEC	Bem Diferenciado	15 (25,0)	45 (75,0)	NA
	Moderada/te Diferenciado	9 (30,0)	21 (70,0)	
	Pouco Diferenciado	0 (0,0)	1 (100,0)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

NA= não avaliável estatisticamente

4.5 Análise da sobrevida

A sobrevida global nos casos analisados foi de 62.2% em 5 anos e 52,2% em 10 anos (Gráfico 1).

Gráfico 1. Sobrevida Global, curva de Kaplan Meier

De acordo com as características clínicas do tumor, a sobrevida foi maior em casos de tumor glótico (65,8% em 5 anos e 62% em 10 anos, $p=0,350$), carcinoma epidermoide de grau histológico bem diferenciado (63,8% em 5 anos e 52% em 10 anos, $p=0,404$), diagnosticados dentro de 6 meses após a queixa principal (63,6% em 5 anos e 50,3% em 10 anos, $p=0,919$), com pescoço clinicamente negativo (66,6% em 5 anos e 54,7% em 10 anos, $p=0,031$, Gráfico 2). Houve menor sobrevida em casos de

câncer com invasão do espaço paraglótico (57,6% em 5 anos e 45,9% em 10 anos, $p=0.065$, Gráfico 3) e acometimento da mobilidade laríngea (61,2% em 5 anos e 51,0% em 10 anos, $p=0,202$). Invasão da comissura anterior deixou praticamente inalterado o valor de sobrevida (63,4% em 5 anos e 53% em 10 anos, $p=0,696$) enquanto invasão da cortical interna reduziu a percentagem (52,5% em 5 anos e 41,2% em 10 anos, $p=0.061$, Gráfico 4). Os casos de tumor supraglótico ou transglótico com acometimento de sítios além da laringe, como base de língua ou parede medial do seio piriforme foram associados a melhor prognóstico (68,8% em 5 anos e 68,8% em 10 anos, $p=0,207$). Invasão do espaço pré-epiglótico foi associada a pior sobrevida (45,8% em 5 anos e 30,2% em 10 anos, $p=0.003$, Gráfico 5), e também invasão retrocricóideia sem sobreviventes em 5 anos ($p=0.009$, Gráfico 6), (Tabela 16).

Gráfico 2. Curva kaplan-Meier de sobrevida em acordo com cN

Gráfico 3. Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com invasão espaço paraglotico

Gráfico 4. Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com invasão da cartilagem

Gráfico 5. Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com invasão espaço pré-epiglótico

Gráfico 6. Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com invasão espaço retrocricoide

Tabela 16- Probabilidade de sobrevida global em 5 anos e 10 anos, de acordo com variáveis clínicas de apresentação do tumor e grau histológico

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Sítio da laringe*	Glótico	65,8	62,0	0,350*
	Supraglótico	60,8	37,6	
	Subglótico*	50,0	-	
	Transglótico	60,4	53,0	
Tipo histológico CEC	Bem Diferenciado	63,8	52,0	0,404
	Moderadamente Diferenciado	62,6	54,7	
	Pouco Diferenciado	0,0	-	
Tempo queixa (meses)	≤ 6	63,6	50,3	0,919
	> 6	60,4	55,5	
cN	N0	66,6	54,7	0,031
	N+	37,6	37,6	
Invasão comissura anterior	Não	60,1	49,0	0,696
	Sim	63,4	53,1	
Fixação emilaringe	Não	80,0	70,0	0,202
	Sim	61,2	51,0	
Invasão retro-cricoidea	Não	67,1	56,1	0,009
	Sim	0,0	-	
Invasão espaço pré-epiglótico	Não	71,2	63,1	0,003
	Sim	45,8	30,2	
Invasão Espaço Paraglótico	Não	70,7	62,2	0,065
	Sim	57,6	45,9	
Invasão cartilagem	Não	68,3	59,8	0,061
	Sim	52,5	41,2	
Invasão além da laringe (avaliação clínica)	Não	61,7	51,2	0,207
	Sim	68,8	68,8	

p-valor obtido pelo teste de logrank

* p-valor excluindo sítio subglótico

De acordo com variáveis de tratamento (Gráfico 7), a sobrevida global foi maior no grupo RT+QT (77,5% em 5 anos e 58,2% em 10 anos), no grupo de tratamento cirúrgico (74% em 5 anos e 63,6% em 10 anos) ($p=0.003$) e, principalmente, em casos laringectomia total ampliada (80% em 5 anos e 67,7% em 10 anos). Em casos com esvaziamento seletivo do pescoço homolateral, a sobrevida foi de 79,8% em 5 anos e 72,3% em 10 anos. Nos casos com tratamento bilateral do pescoço, a sobrevida foi de 75% em 5 anos e 71,2% em 10 anos. Em pacientes submetidos a tireoidectomia total a sobrevida foi 71,4% em 5 anos e 71,4% em 10 anos, sem esvaziamento do nível VI foi 70,0% em 5 anos e 56,6% em 10 anos(Tabela 17).

Gráfico 7. Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com tratamento

Tabela 17 - Probabilidade de Sobrevida global em 5 anos e 10 anos, de acordo com variável tratamento

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Tratamento	Cirurgia	74,0	63,6	0,003
	RT	41,5	31,1	
	RT+QT	77,5	58,2	
	Associações terapêuticas	51,6	45,9	
Tipo cirurgia do tumor primário	LP	70,3	58,1	0,459
	LT	58,7	52,4	
	FLT	80,0	67,7	
Tipo esvaziamento cervical homolateral	Não	57,1	57,1	0,109
	II – IV	79,8	72,3	
	II – V	61,6	43,2	
	I – V	49,0	45,2	
	Outros	33,3	-	
Tipo esvaziamento cervical contralateral	Não	61,7	48,5	0,262
	II – IV	75,0	71,2	
	II – V	46,2	46,2	
	I – V	66,7	22,2	
	outros	-	-	
Tiroidectomia	Não	65,1	54,1	0,798
	Istmectomia	45,0	45,0	
	Lobectomia	66,1	61,4	
	Total	71,4	71,4	
Esv VI nível	Nao	70,0	56,6	0,185
	Unilateral	63,0	59,6	
	Bilateral	41,5	41,5	

p-valor obtido pelo teste de logrank

De acordo com variáveis patológicas da peça operatória, a sobrevida foi menor no casos de estadiamento patológico T4 (61,4% em 5 anos e 56,8% em 10 anos), pescoço positivo (42,9% em 5 anos e 36,3% em 10 anos, $p=0.001$, Gráfico 8), especificamente quando existiam linfonodos metastáticos nos níveis IV, V ou VI (33,3% em 5 anos e 33,3% em 10 anos, $p=0.008$, gráfico 9), margens comprometidas (22,2% em 5 anos e 22,2% em 10 anos, $p=0.01$, Gráfico 10), extravasamento capsular (43,1% em 5 anos e

34,0% em 10 anos, $p=0.03$, Gráfico 11), invasão além da laringe (base de língua, parede medial seio piriforme, músculos pré-laringeos, acometimento tumoral além da cartilagem tireoidea) (56,9% em 5 anos e 52,7% em 10 anos), invasão perineural (54,4% em 5 anos e 45,4% em 10 anos), invasão linfática (44,1% em 5 anos e 39,7% em 10 anos, $p=0.015$, Gráfico 12), e invasão vascular (57,1% em 5 anos e 57,1% em 10 anos) (Tabela 18).

Em casos de persistência de doença após tratamento, a sobrevida foi reduzida (19,9% em 5 anos e 13,3% em 10 anos, $p<0.001$, Gráfico 13). Segundo tumor primário não influenciou na estimativa de sobrevida em 5 anos. Em 10 anos, nesse grupo, a sobrevida foi de 49,5%. Quando o segundo tumor foi de um local fora da cabeça e pescoço, a taxa de sobrevida global foi de 39,8% (Tabela 19).

Gráfico 8. Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com pN

Gráfico 9. Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com níveis dos linfonodos positivos

Gráfico 10. Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com margens cirúrgicas

Gráfico 11. Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com extravasamento capsular

Gráfico 12. Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com invasão linfática

Gráfico 13. Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com persistência

Tabela 18 - Probabilidade de Sobrevida global 5 anos e 10 anos, de acordo com variáveis patológicas do tumor

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Estádio pT	pT3	64,2	54,8	0,864
	pT4	61,4	56,8	
Estádio pN	pN0	78,4	67,8	0,001
	pN+	42,9	36,3	
Nível dos linfonodos positivos	0	76,4	69,6	0,008
	Nível I	-	-	
	Nível II	40,5	35,1	
	Nível III	55,6	18,5	
	Nível IV-VI	33,3	33,3	
Margens	Livre na peça	68,0	58,5	0,001
	Exígua/livre congelada	50,0	50,0	
	Comprometida	22,2	22,2	
Extravasamento capsular	pN0	79,8	69,0	0,003
	pN+ RC –	53,3	53,3	
	pN+ RC +	43,3	34,0	
Invasão além da laringe	Não	66,4	56,6	0,402
	Sim	56,9	52,7	
Invasão vascular	Não	65,8	56,2	0,943
	Sim	57,1	57,1	
Invasão perineural	Não	68,2	59,4	0,313
	Sim	54,4	45,4	
Invasão linfática	Não	71,4	61,1	0,015
	Sim	44,1	39,7	

p-valor obtido pelo teste de log rank

Tabela 19 - Probabilidade de Sobrevida global 5 anos e 10 anos, de acordo com persistência e segundo tumor primário

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Persistência	Não	69,7	59,1	< 0,001
	Sim	19,9	13,3	
Segundo tumor primário	Não	64,4	56,2	0,799
	Sim	68,2	49,5	
Sítio do segundo tumor primário	Cabeça e pescoço	80,0	60,0	0,244
	Outros	59,7	39,8	

De acordo com a expressão dos marcadores, a sobrevida foi menor no grupo dos pacientes com tumor negativo para expressão das proteínas p53 (56,8% em 5 anos e 50,9% em 10 anos, $p=0,499$), Erb b1 (57,1% em 5 anos e 57,1% em 10 anos, $p=0,849$), Erb b2 (61,5% em 5 anos e 53,7% em 10 anos, $p=0,280$), Erb b3 (48,3% em 5 anos e 41,4% em 10 anos, $p=0,122$), Erb b4 (65,7% em 5 anos e 46,9% em 10 anos, $p=0,505$), RAS (57,1% em 5 anos e 57,1% em 10 anos, $p=0,819$) e mTOR (57,4% em 5 anos e 45,9% em 10 anos, $p=0,350$).

A positividade para o marcador MEK resultou em maior sobrevida em 61,4% dos casos em 5 anos e 47,9% em 10 anos ($p=0,291$). Nos casos positivos para o marcador PTEN, a sobrevida foi maior em 55,2% em 5 anos e 55,2% em 10 anos, $p=0,693$ (Tabela 20).

Tabela 20 - Probabilidade de Sobrevida global em 5 anos e 10 anos, de acordo com a expressão dos marcadores

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
p53	Negativo	58,6	50,9	0,499
	Positivo	69,5	59,3	
Erb b1	Negativo	57,1	57,1	0,849
	Positivo	65,2	55,2	
Erb b2	Negativo	61,5	53,7	0,280
	Positivo	80,5	65,9	
Erb b3	Negativo	48,3	41,4	0,122
	Positivo	70,8	60,9	
Erb b4	Negativo	65,7	46,9	0,505
	Positivo	65,2	57,9	
Mek	Negativo	67,0	58,7	0,291
	Positivo	61,4	47,9	
Ras	Negativo	57,1	57,1	0,819
	Positivo	65,6	55,3	
PTEN	Negativo	67,4	56,5	0,693
	Positivo	55,2	55,2	
mTor	Negativo	57,4	45,9	0,350
	Positivo	68,9	60,5	

p-valor obtido pelo teste de logrank

4.6 Análise dos fatores estudados na sobrevida livre de doença

A sobrevida global livre de doença nos casos estudados foi de 82% em 5 anos e 80,6% em 10 anos (Gráfico 14).

Gráfico 14. Curva de Kaplan-Meier, sobrevida global livre de doença

A sobrevida livre da doença foi menor em câncer transglótico (77,4% em 5 anos e 77,4% em 10 anos, $p=0,626$), com grau histológico pouco diferenciado (50% em 5 anos e 0% em 10 anos, $p=0,349$), diagnosticado após 6 meses da aparição da queixa principal (81,1% em 5 anos e 77,4% em 10 anos, $p=0,826$) e com pescoço positivo (65,9% em 5 anos e 65,9% em 10 anos, $p=0,007$, Gráfico 15). As características clínicas de apresentação do tumor que indicaram associação a menor sobrevida livre de

doença foram: invasão de sítio próximo à laringe, como base de língua e parede medial do seio piriforme (78,3% em 5 anos e 78,3% em 10 anos, $p=0,798$) e invasão retrocricóidea (58,4% em 5 anos e 0% em 10 anos, $p=0,124$) (Tabela 21).

Gráfico 15. Curva Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença em acordo com níveis de linfonodos patológicos positivos

Tabela 21 - Probabilidade de sobrevida livre de doença 5 anos e 10 anos, de acordo com variáveis de apresentação clínica do tumor e grau histológico

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Livre de Doença (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Sítio da laringe*	Glótico	87,5	83,5	0,626*
	Supraglótico	85,6	85,6	
	Subglótico*	50,0	-	
	Transglótico	77,4	77,4	
Tipo histológico CEC	Bem Diferenciado	83,6	83,6	0,349
	Moderadamente Diferenciado	86,8	81,8	
	Pouco Diferenciado	50,0	-	
Tempo queixa (meses)	≤ 6	81,3	81,3	0,826
	> 6	81,1	77,4	
cN	N0	84,7	83,1	0,007
	N+	65,9	65,9	
Invasão comissura anterior	Não	79,5	79,5	0,634
	Sim	83,0	80,8	
Fixação PV	Não	90,0	90,0	0,463
	Sim	81,0	79,5	
Invasão retrocricoidea	Não	81,1	79,6	0,124
	Sim	58,4	-	
Invasão Espaço Pré-epiglótico	Não	79,0	77,2	0,550
	Sim	82,2	82,2	
Invasão Espaço Paraglótico	Não	75,4	72,2	0,181
	Sim	83,6	83,6	
Invasão cartilagem	Não	79,7	79,7	0,918
	Sim	83,1	78,7	
Invasão além da laringe	Não	81,9	80,3	0,798
	Sim	78,3	78,3	

p-valor obtido pelo teste de logrank

* p-valor excluindo sítio subglótico

A sobrevida livre da doença foi menor no grupo de tratamento RT+QT (65,4% em 5 anos e 65,4% em 10 anos, $p=0,141$). Entre os dois grupos de tratamento cirúrgico, as variáveis relacionadas a menor sobrevida livre de doença foram laringectomia parcial (81,3% em 5 anos e 81,3% em 10 anos,

p=0,872), esvaziamento níveis I-V (homolateral, 72,3% em 5 anos e 72,3% em 10 anos, p=0,113; controlateral, 50% em 5 anos e 50% em 10 anos, p=0,591) (Tabela 22).

Tabela 22 - Probabilidade de sobrevida livre de doença 5 anos e 10 anos, de acordo com tratamento

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Livre de Doença (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Tratamento	Cirurgia	89,3	89,3	0,141
	RT	74,7	74,7	
	RT+QT	65,4	65,4	
	Associações terapêutica	81,1	76,3	
Tipo cirurgia do tumor primário	LP	81,3	81,3	0,872
	LT	86,4	83,6	
	FLT	90,0	90,0	
Tipo esvaziamento cervical homolateral	Não	100,0	100,0	0,113
	II – IV	91,8	91,8	
	II – V	87,7	80,7	
	I – V	72,3	72,3	
	Outros	100,0	-	
Tipo esvaziamento cervical contralateral	Não	83,4	83,4	0,591
	II – IV	90,5	90,5	
	II – V	75,0	75,0	
	I – V	50,0	50,0	
	Outros	-	-	
Tiroidectomia	Não	83,6	83,6	0,934
	Istmectomia	83,3	83,3	
	Lobectomia	88,5	82,1	
	Total	100,0	100,0	
Esv VI nível	Nao	82,6	82,6	0,872
	Monolateral	87,1	87,1	
	Bilateral	92,9	66,3	

p-valor obtido pelo teste de logrank

Entre as variáveis patológicas do tumor, a sobrevida livre da doença foi menor no grupo pT4 (79,1% em 5 anos e 73% em 10 anos, p=0,167), pN+ (68,4% em 5 anos e 62,7% em 10 anos, p<0.001, Gráfico 16), nível III

envolvido (40,9% em 5 anos e 40,9% em 10 anos, $p < 0.001$, Gráfico 17), margens comprometidas (42,9% em 5 anos e 42,9% em 10 anos, $p = 0,179$), extravasamento capsular (66,3% em 5 anos e 58,9% em 10 anos, $p < 0.001$, gráfico 18), invasão além da laringe (76,9% em 5 anos e 71% em 10 anos, $p = 0,021$). Entre os indicadores de invasão microscópica, também invasão perineural (77,7% em 5 anos e 77,7% em 10 anos, $p = 0,246$) e linfática (73% em 5 anos e 73% em 10 anos, $p = 0,021$, Gráfico 19) foram associados (Tabela 23). Pacientes sem segundo tumor primário mostraram maior período de sobrevida livre de doença (94,3% em 5 anos e 94,3% em 10 anos, $p = 0,09$; reduzindo-se a 89,5% se o sítio do segundo tumor era fora da área de cabeça e pescoço, Gráfico 20) (Tabela 24).

Gráfico 16. Curva Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença em acordo com pN

Gráfico 17. Curva Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença em acordo com níveis de linfonodos patológicos positivos

Gráfico 18. Curva Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença em acordo com extravassamento capsular

Gráfico 19. Curva Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença em acordo com invasão linfática

Gráfico 20. Curva Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença em acordo com segundo tumor primário

Tabela 23 - Probabilidade de sobrevida livre de doença 5 anos e 10 anos, de acordo com variáveis patológicas do tumor

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Livre de Doença (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Estádio pT	pT3	87,8	87,8	0,167
	pT4	79,1	73,0	
Estádio pN	pN0	94,0	94,0	< 0,001
	pN+	68,4	62,7	
Nível dos linfonodos positivos	0	97,8	97,8	< 0,001
	Nível I	-	-	
	Nível II	82,6	71,6	
	Nível III	40,9	40,9	
	Nível IV-Vi	66,7	66,7	
Margens	Livre na peça	86,7	84,9	0,179
	Exígua/livre congelada	100,0	100,0	
	Comprometida	42,9	42,9	
Extravasamento capsular	pN0	94,0	94,0	< 0,001
	pN+ RC –	80,0	80,0	
	pN+ RC +	66,3	58,9	
Invasão além da laringe	Não	88,9	88,9	0,078
	Sim	76,9	71,0	
Invasão vascular	Não	84,0	82,1	0,278
	Sim	100,0	100,0	
Invasão perineural	Não	87,3	85,1	0,246
	Sim	77,7	77,7	
Invasão linfática	Não	88,6	88,6	0,021
	Sim	73,0	73,0	

p-valor obtido pelo teste de logrank

Tabela 24 - Probabilidade de sobrevida livre de doença 5 anos e 10 anos, de acordo com persistência e segundo tumor primário

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Livre de Doença (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Persistência	Não	82,6	81,2	0,441
	Sim	69,4	69,4	
Segundo tumor primário	Não	82,2	80,4	0,091
	Sim	94,3	94,3	
Sítio do segundo tumor primário	Cabeça e pescoço	100,0	100,0	0,317
	Outros	89,5	89,5	

De acordo com a expressão dos marcadores, a sobrevida livre da doença foi menor em pacientes com tumor negativo por p53 (89% em 5 anos e 83% em 10 anos, $p=0,792$), Erb b3 (87,9% em 5 anos e 87,9% em 10 anos, $p=0,929$), Erb b4 (86,7% em 5 anos e 86,7% em 10 anos, $p=0,694$), PTEN (88,6% em 5 anos e 86,1% em 10 anos, $p=0,639$), mTOR (85,3% em 5 anos e 85,3% em 10 anos, $p=0,954$) e tumor positivo por Erb b1 (88,6% em 5 anos e 86,3% em 10 anos, $p=0,359$), Erb b2 (85,9% em 5 anos e 77,3% em 10 anos, $p=0,359$), MEK (81,4% em 5 anos e 81,4% em 10 anos, $p=0,147$), RAS (88,8% em 5 anos e 86,4% em 10 anos, $p=0,428$) (Tabela 25).

Tabela 25 - Probabilidade de sobrevida livre de doença 5 anos e 10 anos, de acordo com expressão marcadores

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Livre de Doença (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
p53	Negativo	89,0	83,0	0,792
	Positivo	89,3	89,3	
Erb b1	Negativo	100,0	100,0	0,359
	Positivo	88,6	86,3	
Erb b2	Negativo	90,8	90,8	0,359
	Positivo	85,9	77,3	
Erb b3	Negativo	87,9	87,9	0,929
	Positivo	89,8	87,1	
Erb b4	Negativo	86,7	86,7	0,694
	Positivo	89,7	87,2	
Mek	Negativo	92,1	89,1	0,147
	Positivo	81,4	81,4	
Ras	Negativo	100,0	100,0	0,428
	Positivo	88,8	86,4	
PTEN	Negativo	88,6	86,1	0,639
	Positivo	93,9	93,9	
mTor	Negativo	85,3	85,3	0,954
	Positivo	91,9	89,1	

p-valor obtido pelo teste de logrank

4.7 Análise multivariada das variáveis clínicas e patológicas

A análise de regressão de COX (técnica *stepwise*) foi utilizada para avaliar as associações entre variáveis que, pelo Método de Kaplan-Meier, mostraram significância estatística ou significância marginal (p entre 0,6 e 1). Considerando exclusivamente características de apresentação clínica do tumor e tratamento, entraram no modelo cinco variáveis clínicas e a variável terapêutica (Tabela 26a). Três variáveis clínicas e a variável terapêutica

mostraram mais força de associação na análise univariada e foram selecionadas para o modelo multivariado como possíveis fatores prognósticos independentes (Tabela 26b).

Tabela 26a - Análise univariada, estimativa dos Riscos Relativos (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão de COX (variáveis clínicas e terapêuticas)

Variável	Categoria	N	RR (95%IC) Bruto
Invasão cartilagem	Não	89	1,00 ref.
	Sim	48	1,64 (0,97 – 2,76)
Invasão Retocricoide	Não	123	1,00 ref.
	Sim	6	3,22 (1,26 – 8,21)

Tabela 26b - Estimativa dos possíveis fatores prognósticos independentes estimados através do Risco Relativo (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão de COX (variáveis clínicas e terapêuticas)

Variável	Categoria	N	RR (95%IC) Bruto	RR (95%IC) Multivariado
Invasão espaço paraglotico	Não	57	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
	Sim	74	1,70 (0,96 – 3,02)	1,92 (1,02 – 3,61)
Pescoço clínico	cN0	122	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
	cN+	23	1,94 (1,05 – 3,59)	2,14 (1,11 – 4,50)
Invasão espaço pre-epiglotico	Não	99	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
	Sim	33	2,25 (1,29 – 3,93)	2,65 (1,46 – 4,81)
Tratamento	Cirurgia	60	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
	RT	19	3,63 (1,75 – 7,54)	2,88 (1,31 – 6,30)
	RT+QT	14	1,16 (0,43 – 3,13)	1,46 (0,48– 4,42)
	Cirurgia + adjuvante	52	1,83 (1,00 – 3,33)	1,34 (0,69– 2,62)

Considerando características de apresentação clínica, tratamento e achados patológicos (informações ocultas para 33 casos que não foram submetidos a cirurgia), entraram no modelo cinco variáveis clínicas, a variável terapêutica e cinco variáveis patológicas (Tabela 27a). Duas variáveis patológicas mostraram mais força de associação na análise univariada e foram selecionadas para o modelo multivariado como possíveis fatores prognósticos independentes (Tabela 27b).

Tabela 27a - Análise univariada, estimativa dos Riscos Relativos (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão de COX (variáveis clínicas, terapêuticas e patológicas)

variável	Categoria	N	RR Bruto	(95%IC)
cN	N0	122	1,00	ref.
	N+	23	1,94	(1,05 – 3,59)
Invasão espaço paraglótico	Não	57	1,00	ref.
	Sim	74	1,70	(0,96 – 3,02)
Invasão cartilagem	Não	89	1,00	ref.
	Sim	48	1,64	(0,97 – 2,76)
Invasão espaço pré-epiglótico	Não	99	1,00	ref.
	Sim	33	2,25	(1,29 – 3,93)
Invasão retocricóide	Não	123	1,00	ref.
	Sim	6	3,22	(1,26 – 8,21)
Tratamento	Cirurgia	60	1,00	ref.
	RT	19	3,63	(1,75 – 7,54)
	RT+QT	14	1,16	(0,43 – 3,13)
	Associações terapêutica	52	1,83	(1,00 – 3,33)
Invasão linfática	Não	77	1,00	ref.
	Sim	28	2,17	(1,15 – 4,10)
Estádio pN	pN0	63	1,00	ref.
	pN+	42	2,89	(1,55 – 5,41)
Nível dos linfonodos positivos (pN)	0	51	1,00	ref.
	Nível I	1	-	
	Nível II	23	2,77	(1,31 – 5,81)
	Nível III	6	2,68	(0,76 – 9,43)
	Nível IV-VI	6	3,66	(1,20 – 4,17)

Tabela 27b - Estimativa dos possíveis fatores prognósticos independentes estimados através do Risco Relativo (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão de COX (variáveis clínicas, terapêuticas e patológicas)

Variável	Categoria	N	RR (95%IC) Bruto	RR (95%IC) Multivariado
Margens comprometidas	Não Sim	103 9	1,00 (ref.) 4,32 (1,89 – 9,88)	1,00 (ref.) 3,45 (1,11 – 10,75)
Extravasamento capsular	pN0 pN+ RC – pN+ RC +	63 11 31	1,00 (ref.) 2,17 (1,15 – 4,10) 3,09 (1,57-6,10)	1,00 (ref.) 1,63 (0,51 – 5,25) 3,09 (1,56– 6,12)

4.8 Acometimento do espaço pré-epiglótico como fator prognóstico de sobrevida de acordo com o tratamento

A avaliação do espaço pré-epiglótico esteve presente em 129 pacientes (dado não disponível em 16 casos): 96 (74,4%) pacientes mostraram acometimento, 33 (25,6%) pacientes não mostraram acometimento. Dentre as variáveis clínicas identificadas como fatores prognósticos para o presente estudo, o acometimento desse espaço laríngeo profundo mostrou o maior risco de óbito [RR bruto de 2,25 com IC:1,29 – 3,93; RR multivariado de 2,65 com IC:1,46 – 4,81].

Estratificando-se cada grupo por tratamento, o grupo sem acometimento do espaço pré-epiglótico, teve diferença estatisticamente significativa de acordo com as quatro opções terapêuticas ($p < 0,001$): cirurgia e radioquimioterapia foram associadas a maior sobrevida. No grupo com acometimento do espaço pré-epiglótico, as estratégias de preservação de

órgão não cirúrgicas mostraram melhor sobrevida, mas sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,78$), (Gráfico 21-22) (Tabela 28).

Tabela 28 - Probabilidade de sobrevida em 5 anos e 10 anos, de acordo com acometimento do espaço pré-epiglótico de acordo com o tratamento

Acometimento espaço pré-epiglótico	Categoria	Probabilidade de Sobrevida (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Ausente	Cirurgia	84,7	69,0	<0,001
	RT	39,5	12,6	
	RT+QT	78,0	36,4	
	Associações terapêuticas	62,6	41,2	
Presente	Cirurgia	45,4	16,7	0,78
	RT	55,6	10,0	
	RT+QT	50,0	0,0	
	Associações terapêuticas	43,7	18,3

Gráfico 21. Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com tratamento, pacientes com acometimento do espaço pré-epiglótico

Gráfico 22. Curva Kaplan-Meier de sobrevida em acordo com tratamento, pacientes sem acometimento do espaço pré-epiglótico

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O estudo foi realizado por meio de avaliação de características clínico-demográficas e patológicas referentes a uma série de casos: pacientes portadores de carcinoma epidermoide da laringe, estágio clínico avançado T3,N0-3,M0.

A sobrevida específica para o carcinoma de laringe está diminuindo nas últimas décadas. Contemporaneamente, estão sendo desenvolvidas estratégias de preservação de órgão, cirúrgicas e não cirúrgicas, e uma das questões mais controversas na literatura é sobre a decisão de tratamento para lesões primárias cT3 (Hoffmann, 2006). O estudo investigou os fatores prognósticos de sobrevida, sobrevida livre de doença e risco de óbito para 145 tumores cT3 com quaisquer valores de N, incluindo câncer da supraglote, glote, subglote e transglote, tratados em uma única instituição por quatro opções terapêuticas.

As características demográficas resultaram compatíveis com os dados da literatura sobre perfil de câncer laríngeo. Os fatores de risco clássicos (tabagismo e etilismo) foram presentes em mais de 90% da amostra (Parkin et al., 2005; Jemal et al., 2008).

Na literatura, o prognóstico mostra ser estritamente relacionado às características do tumor primário, como tamanho ou volume tumoral. Na presente casuística, o tumor primário mostra estadiamento clínico (T3) homogêneo, tentando evidenciar como as características de invasão tumoral

(dependendo do sítio laríngeo), acometimento linfonodal e opção terapêutica influenciam a sobrevida.

Os critérios TNM na classificação do tumor laríngeo, na categoria T3 são heterogêneo (fixação da hemilaringe, invasão do espaço pré-epiglótico, invasão do espaço paraglótico, invasão da região pós-cricoide, invasão da córtex interna da cartilagem tireoide). Cada critério tem um diferente valor prognóstico e diferente significância terapêutica. Um tumor supraglótico com invasão do espaço pré-epiglótico pode ser tratado com uma laringectomia supraglótica na maioria das vezes. Um tumor com unidade de aritenóide fixa, que contraindica cirurgia parcial, poderá ser tratado com preservação de órgão ou laringectomia total. Ambos são tumores T3, com diferenças marcantes na indicação do tratamento e com prognósticos também distintos (Peters, 1994; Hoffmann, 2006).

As vias de disseminação podem ser classificadas como anterior (penetração da cartilagem tireoide), posterior (destruição da cartilagem aritenóide, alargamento do espaço tireoaritenóideo), inferior (penetração do *conus elasticus*) e superior (base da língua, membrana tireoidea). A precisão de avaliação dessas estruturas, durante o pré-operatório, pode influenciar o tipo de tratamento e, conseqüentemente, o prognóstico (Blitz, 2008; Chen, 2011). Os espaços laríngeos profundos, paraglótico e pré-epiglótico, são separados por um septo fibroso, e o acometimento tumoral deles é associado a risco aumentado de metastase linfonodal (Joo, 2012). A significância prognóstica é explicada pela riqueza de drenagem linfática (Dursun et al., 1997).

No presente estudo, tumores classificados como supraglóticos mostraram um comportamento mais agressivo em relação aos tumores glóticos, mas sem significância estatística (sobrevida de 60,8% em 5 anos, cerca de 2% menos da sobrevida global). Se destacada a variável “invasão do espaço paraglótico”, compatível com carcinoma glótico e supraglótico, a sobrevida foi de 57,6% com $p=0,061$; se destacada “invasão do espaço pré-epiglótico”, achado compatível com tumor supraglótico, a sobrevida de cinco anos foi de 45,8%, com valor de $p < 0.003$. Na literatura, ressecção "em bloc" da região supraglótica com o espaço pré-epiglótico parece reduzir o impacto desse fator prognóstico negativo (Suogluet al., 2007). Também, se destacada a variável “invasão da área retrocricoide”, compatível com carcinoma supraglótico, a sobrevida foi fortemente reduzida, com $p < 0.009$ (0,0% em cinco anos). De acordo com o volume da lesão e com a infiltração de regiões caracterizadas por rica drenagem linfática, a alta taxa de metástase linfonodal influi na sobrevida.

A presença de metástases cervicais é um dos principais fatores associados a pior prognóstico, comparada aos pacientes pN0, principalmente se existir extravasamento linfonodal (Oosterkamp, 2006). Na ausência de metástases linfáticas clinicamente detectáveis, o tratamento profilático das cadeias linfáticas cervicais é preconizado em pacientes com tumores T3 e T4 submetidos a tratamento cirúrgico, devido à alta incidência de metástases ocultas nesse grupo de pacientes, chegando a ocorrer em 55% dos casos no nível III de drenagem linfática cervical (Shah et al., 1990). Nossos dados mostraram quase 40% dos pacientes com achado de N+

patológico e mais dos 50% dos casos em nível II. A sobrevida foi de 42,9% em 5 anos, com $p=0.008$. A sobrevida com extravasamento capsular foi de 43,1% em 5 anos, parecida com o valor anterior. O valor caiu para 33,3% somente em subgrupo de casos com linfonodos patológicos em níveis IV-VI.

No entanto, depois de ter avaliados os resultados deste estudo, as características de invasão tumoral que mostraram um comportamento mais agressivo em termos de sobrevida e risco de morte devem ser consideradas, sobretudo, quando o tratamento de preservação de órgão e a sobrevida livre de doença estiverem em discussão (Shiao et al., 2011). Em análise retrospectiva de 147 pacientes com câncer de laringe cT3 com avaliação de sobrevida global, sobrevida livre da doença, sobrevida livre da laringectomia, e taxa de preservação da função, Vilaseca et al. (2010) concluíram que o envolvimento do espaço pré-epiglótico é o melhor fator preditivo de preservação de órgão com cirurgia transoral a laser (Vilaseca et al., 2010). Esse dado corrobora o resultado da casuística do presente estudo, que estima esse fator prognóstico com risco de óbito aumentado mais de 2 vezes. Infelizmente, o fator supracitado se aplica somente a um subgrupo de tumores.

A variável “infiltração focal da cartilagem” foi marginalmente significativa no cálculo da sobrevivência (52,5% em 5 anos com $p=0.06$) e com um risco de óbito marginalmente aumentado de 1,64 (IC 0,96-3,02). A invasão da cartilagem tireoidiana ocorreu principalmente na glote, geralmente em áreas de deficiência de pericôndrio, como na comissura anterior no ligamento de Broyle. Farias et al. (2004) evidenciaram como

pacientes com tumores T4 N0 M0, com invasão tumoral de cartilagem de laringe, sem destruição, tiveram comportamento prognóstico semelhante aos pacientes com tumores T3 N0 M0.

Fixação da prega vocal que se aplica a todos os sítios, poderia representar indicador clínico de prognósticos para todos os tumores de laringe cT3. A casuística do presente estudo não determinou resultados significativos.

Os resultados deste estudo concordam com estudo de Vilansec et al. (2011), no qual a presença de prega vocal fixa e presença de infiltração focal de cartilagem tireoidea foram ambos fatores independentes de proteção para recidiva local e, ao mesmo tempo, de risco para preservação de função na análise multivariada. Essa falta de consenso nos resultados sublinha, portanto, a necessidade de maiores investigações para estabelecer a real contribuição dessa característica de invasão tumoral no prognóstico. Uma reflexão sobre o tema leva a considerar a acurácia com a qual é julgada a erosão da cartilagem como a invasão dos espaços profundos laríngeos. Não é sempre fácil, na rotina pré-operatória convencional, tal como endoscopia de VADS e TC/RNM estabelecer a exata definição da invasão tumoral profunda. Mais objetiva poderia ser a avaliação de uma característica como fixação da prega vocal, mas há que ser considerada também a controvérsia sobre a definição de acometimento da mobilidade laríngea (Shiao et al., 2011). O comprometimento das pregas vocais pode estar relacionado tanto ao efeito de massa de um tumor volumoso exofítico sem invasão do espaço paraglótico como à infiltração profunda do músculo tireoaritenoideo. No

entanto, a quantidade necessária de espaço paraglótico envolvido para resultar na fixação da prega vocal não é definida (Vilanseca et al., 2011). A importância da mobilidade das aritenoides tem sido enfatizada na literatura como melhor preditor de invasão paraglótica e tem sido considerada critério fundamental para selecionar pacientes para cirurgia conservadora (Olsen et al., 2009). Na presente análise retrospectiva, não foi possível discriminar com absoluta certeza as diferentes características de fixação laríngea e, portanto, essa peculiaridade não poderia ser indicativa de escolha correta do tratamento.

Em relação ao tratamento, os pacientes foram direcionados a uma das quatro opções terapêuticas (RT, RTQT, cirurgia, cirurgia com tratamento adjuvante) após avaliação médica multidisciplinar, de acordo com os critérios NCCN, e também com as exigências peculiares de cada caso. A casuística variou de 1990 até 2007, devendo-se considerar a mudança de equipe médica ao longo dos anos e as novas tendências terapêuticas surgindo em nível mundial. Isso pode ter levado a critérios heterogêneos na escolha do tratamento.

Cirurgia e RTQT mostraram uma curva de sobrevida parecida, respectivamente 74,0% e 77,5% em cinco anos. A análise em tumores sem acometimento do espaço pré-epiglótico, confirmou cirurgia exclusiva e radioquimioterapia como melhores opções terapêuticas (84,7% e 78,0% em 5 anos). Focando atenção sobre o grupo de pacientes com invasão do espaço pré-epiglótico, não houve diferença estatisticamente significativa em sobrevida quando se estratificou a análise pelas quatro opções terapêuticas

($p=0,78$), mas a tendência sugere o tratamento de preservação de órgão não cirúrgica, RT e RTQT, como melhor controle da doença.

Características patológicas da peça que indicassem terapia adjuvante reduziram a sobrevida em cinco anos (51,6%), mas em casos tratados por radioterapia exclusiva houve taxa de sobrevida ainda mais baixa, 41,5% em cinco anos. Esse dado é explicável por tratamento incompleto/inadequado da doença, sendo a radioterapia exclusiva opção terapêutica elegível em selecionadas lesões de T3, normalmente não “volumosas” (são classificadas como “volumosas” lesões exofíticas e/ou infiltrativas, envolvendo completamente uma prega vocal verdadeira ou mais de um terço anterior de ambas as pregas).

Em estudo com 170 casos cT3 tratados com RT ou RTQT (Al-Mamgani et al., 2012), a adição de QT melhorou significativamente a sobrevida, embora os pacientes tratados com RT exclusiva terem tido bom controle local da doença. No grupo de lesões volumosas, a percentagem de pacientes não submetidos a laringectomia total foi de 5,6% *versus* 40,4% no grupo de lesões não volumosas.

O grupo de associações terapêuticas mostra verdadeiramente menor sobrevida por um conceito semelhante. A presença de achados patológicos que indicam a necessidade de tratamento bi ou trimodal são sinônimos de resultado não oncológicamente satisfatórios por parte do tratamento cirúrgico. A necessidade de terapia adjuvante é responsável pela deterioração de sobrevida neste subgrupo de pacientes. Os ensaios clínicos demonstram que radioterapia mais quimioterapia adjuvante são mais

eficazes do que radioterapia exclusiva em termos de controle loco-regional e sobrevida livre de doença (Rades et al., 2011; Nakayama et al., 2012). Envolvimento microscópico de margens de ressecção e propagação extracapsular do tumor em linfonodos do pescoço são os fatores de pior prognóstico e os pacientes parecem se beneficiar de forma mais significativa a partir da adição de quimioterapia à radioterapia (Nakayama et al., 2012). Estádio patológico avançado, infiltração perineural, embolias vasculares e linfáticas são indicadores de tratamento radioterápico adjuvante e, na literatura, parecem se beneficiar também em termos de sobrevivência com adição de quimioterapia, embora menos do que o grupo com margens comprometidas e/ou estravamento capsular (Bernier et al., 2005; Berneir et al., 2006). Na presente casuística, foram associados a menor sobrevida, mostrando-se fatores prognósticos independentes extravasamento capsular (risco de óbito 3 vezes maior se comparado a pescoço patológico negativo) e margens cirúrgicas comprometidas (risco de óbito de quase 4 vezes maior do que margens livres).

Muitas perguntas sobre a otimização de tratamentos adjuvantes ainda permanecem sem resposta, especialmente a respeito da integração de novos medicamentos que visem também ao aspecto biológico do tumor, e tratem cada paciente de acordo com a assinatura biológica da própria doença. O presente estudo entrou nessa área, tentando identificar alterações na expressão proteica de vias de transdução de sinal mediadas pela família ErbB para indentificar as alterações envolvidas em características patológicas de invasão tumoral de importante significado

prognóstico. Nenhum marcador foi individualmente impactante na curva de sobrevida. Esse resultado é compatível com o conceito de “cascata de sinalização”, segundo o qual não é uma única proteína responsável pela agressividade biológica do tumor, mas um conjunto delas. Foram encontrados valores de p estatisticamente significativos nas associações entre expressão dos marcadores e variáveis patológicas de invasão tumoral. Em literatura uma maior expressão do marcador ErbB implica na ativação aumentada da via MAPKs e I13P-AKT. A expressão do marcador p53 (p53 mutado) é sinônimo de falha na inibição de mTOR e falha na ativação do gene oncosupressor PTEN, o que se traduz também em descontrole das vias ativadas pelo ErbB. Tais descontroles produzem proliferação celular aumentada e síntese proteica aumentada.

A seguir, representação esquemática das supracitadas associações contextualizando os marcadores na dinâmica da própria via metabólica (Figura 5).

Figura 5. Representação esquemática da via metabólica MAPKs-quinase (RAS-MEK-ERK-MAPK) e da via metabólica P13K-ATK (P13k-AKT-mTOR) e interação da atividade dos dois genes onco-supressores p53 e PTEN

A expressão positiva de homodímeros da família dos receptores ErbB (ErbB1 com ErbB3, $p=0,015$; Erb3 com ErbB4, $p<0,001$) foi associada a características patológicas de invasão tumoral como invasão linfática e invasão da cartilagem tireoidea (Figura 6).

Figura 6. Expressão positiva de ErbB1 e ErbB3 e ErbB4

Na literatura, estudos *in vitro* documentam associação entre a via de transdução de sinal mediada pela família ErbB e invasão linfática, dado compatível com a presente casuística (Shuyi et al., 2011). Sendo a permeação vascular linfática o ponto de partida para a metastatização linfonodal, entende-se seu peso no prognóstico. Esse resultado é coerente na literatura há mais de vinte anos, e em tumores de diferentes áreas, como cabeça e pescoço (Toi et al., 1989; Masakazu et al., 1991; Shuyi et al., 2011).

Em relação à invasão da cartilagem, estudos pré-clínicos e clínicos sugerem um papel potencial do EGFR na diferenciação dos osteoclastos e patogênese da metástase óssea em câncer (Swanson et al., 2012; Mundy et

al., 2002). Na literatura, inibidores do domínio tirosina quinase do EGFR inibem a invasão osteolítica induzida por tumor em metástase óssea. Houve supressão da ativação dos osteoclastos nos locais de metastáse óssea e supressão de produção de fatores osteolíticos em células tumorais (Furugaki, 2011).

Expressão positiva de ErbB1 e mTOR (pp=0,013) foi também associada a características patológicas de invasão tumoral como invasão da cartilagem e invasão linfática (Figura 7).

Figura 7. Expressão positiva de ErbB1 e hiperexpressão de mTOR (via P13K-AKT)

A via p13K também é associada às propriedades invasivas do tumor para cartilagem (Laragione et al., 2010) e vasos linfáticos (Petel V et al., 2010). Petel et al. (2010) mostraram que a inibição do mTOR com rapamicina e rapalog RAD001 diminui linfangiogênese no tumor primário e impede a disseminação de células cancerosas de cabeça e pescoço para os linfonodos cervicais.

No presente estudo, expressão positiva de ErbB3 e ErbB4 foi associada a expressão positiva de RAS ($p=0,015$; $p=0,010$), MEK ($p=0,001$; $p=0,010$) e mTOR ($p<0,001$; $p<0,001$). A aumentada expressão de proteínas da via MAPKs e da proteína a jusante a via P13K-AKT foi ainda associada a invasão da cartilagem tireoide, invasão linfática e invasão perineural (Figura 8).

Figura 8. Expressão positiva de ErbB3 e ErbB4 (homodímeros da família dos receptores Erb B) e hiperexpressão de RAS-MEK (via MAPKs) e mTOR (via P13K-AKT)

Veit et al. (2004) estudaram células de carcinoma de pâncreas, as quais exibem uma tendência pronunciada para invadir nervos intra e extrapancreáticos, mesmo nas fases iniciais da doença. A inibição da cascata Ras-Raf-MEK-ERK por expressão estável do H-Ras (N17) ou por adição do inibidor do MEK (1PD98059), assim como a inibição da via P13K, impediram a migração induzida pelo fator neurotrófico derivado da linha de células gliais (GDNF) e a invasão de linhas celulares de carcinoma pancreático (PANC-1). Esse resultado demonstrou que a migração de células pancreáticas e invasão tumoral, e, possivelmente, perineural, em

resposta a GDNF é criticamente controlada por ativação da Ras-Raf-MEK-ERK e da via P13K.

Na literatura, a inibição combinada das duas vias é uma eficaz estratégia anti-tumoral, sendo nomeadamente mTOR e MEK as proteínas-alvo de inibidores específicos (Yu, 2008; Ho, 2012).

Na presente casuística, ERK resultou ser negativo em todos os casos. O significado prognóstico da expressão desse marcador é muito controverso na literatura, dependendo do tecido anatômico analisado (Milde-Langosch, 2005). Se expressão negativa fosse interpretada como correto funcionamento fásico da proteína (Colucci-D'Amato, 2003), o alvo da proteína MEK seria a proteína anti-apoptótica MCL-1, ativada também pelo mTOR (Ho, 2012), o qual, como visto na nossa amostra, resulta em proliferação, invasão e metástase.

A expressão negativa de ErbB2 e ErbB3 ($p=0,015$) foi associada a tumores limitados a sítio laríngeo e que não apresentaram persistência após tratamento (Figura 9).

Figura 9. Expressão negativa de ErbB2 e ErbB3

O heterodímero ErbB2/ 3 desempenha um papel crítico na progressão do câncer da mama e no desenvolvimento de resistência do sistema endócrino.

A expressão dos receptores ErbB2 e ErbB3 foi investigada em modelo experimental de carcinogênese oral induzida quimicamente em ratos normais e diabéticos (tipo I). Parece que o diabetes aumenta a expressão de erbB2 e ErbB3 em algumas fases da oncogênese oral, possivelmente resultando na promoção da proliferação celular e inibição de apoptose (Vairaktaris et al., 2008). Normoexpressão dos receptores indica ainda controle no começo da via de transdução de sinal.

Expressão positiva da p53 foi associada a tumores com invasão laríngea profunda. A inativação de TP53 por mutações (expressão imunoistoquímica) é um evento crucial na carcinogênese molecular e está estreitamente relacionada à exposição a fatores de risco. O gene mutado deixa de inativar mTOR (associado a características patológicas de invasão tumoral como invasão da cartilagem e invasão linfática) e compromete uma via de ativação de PTEN que controla a inibição da P13k (associado a invasão linfática) (Figura 10).

Figura 10. Expressão positiva de p53

Uma análise comparativa revelou que a resistência adquirida aos inibidores do EGFR estava associado de forma consistente com a perda do TP53 (Huang, 2011).

5.1 Reflexões sobre os resultados obtidos e perspectivas futuras

O presente estudo descreveu o perfil de uma amostra de câncer de laringe estágio clínico T3N0-3M0 tratada por uma única instituição com quatro opções terapêuticas. O tamanho da amostra total (N=145) mostrou um poder estatístico baixo (54%, erro $\alpha = 0,05$), constituindo uma limitação do estudo para encontrar fatores prognósticos. No entanto, esta casuística é mais uniforme do que estudos que englobam tumores avançados, ou tumores candidatos a uma ou outra estratégia de tratamento.

Considerando a amostra total, fatores prognósticos clínicos que mais influenciaram as taxas de sobrevida e o risco de óbito foram características de invasão tumoral profunda e acometimento dos linfonodos cervicais (que mostrou também ser associado com diminuição das taxas de sobrevida livre de doença).

No subgrupo de pacientes tratados por cirurgia, fatores prognósticos patológicos que mais influenciaram a sobrevida, sobrevida livre de doença e risco de óbito, foram a presença de linfonodos patológicos positivos com extravasamento capsular e a presença de margens de ressecção cirúrgica comprometidas. Invasão linfática também associou-se a uma diminuição nas taxas de sobrevida, sobrevida livre de doença e um aumentado risco de óbito. Essa variável não apresentou suficiente força de associação para

constituir fator prognóstico independente, mas sua significância para a prática clínica reside na sua associação com a disseminação linfonodal.

É importante comentar que os dois subgrupos que se delinearam no presente estudo (grupo cirúrgico, N=112 e grupo com material biológico resgatado, N=92) apresentaram características demográficas, clínicas e terapêuticas semelhantes à amostra total ($p>0.05$), não constituindo viés de seleção. A avaliação de expressão de biomarcadores da via de transdução de sinal ativada pelo receptores ErbB, mostrou associação estatisticamente significativa entre dois receptores ErbB (ErbB3 e ErbB4), uma proteína da via MPAKs (MEK) e uma proteína da via PI3K-AKT (mTOR). Não foi identificado um marcador ou uma associação de marcadores que influenciassem significativamente a sobrevida e sobrevida livre de doença, mas foi identificada uma associação entre os supracitados marcadores e uma variável patológica (invasão linfática) de significado prognóstico.

A perspectivas futuras deste estudo serão possíveis, aumentando-se o tamanho da amostra e, eventualmente, associando-se a casuísticas de outras instituições criando um estudo multicêntrico.

Seria importante identificar variáveis de prognóstico independente (clínica) comuns a mais subsítios laríngeos (como invasão focal da cartilagem) e com uma casuística maior, poder estratificar nos quatro grupos terapêuticos para sugerir a opção melhor para abordagem terapêutica do carcinoma cT3 com aquela característica de invasão. O passo sucessivo seria identificar marcadores biológicos preditivos para essa característica de

invasão tumoral (por exemplo molécula envolvida em atividade condroclástica). Isso poderia sugerir com antedecência o perfil biológico da neoplasia e influenciar a decisão terapêutica.

Com o presente estudo, a opção de preservação de órgão com radioquimioterapia mostrou resultado semelhante em termos de sobrevida quando comparado a cirurgia exclusiva. Não foi discriminado se a quimioterapia foi sequencial ou concomitante à radioterapia, e não foi mostrada a taxa de interrupção de tratamento. Com casuística maior, seria interessante focar somente neste aspecto e comparar radioquimioterapia concomitante (tratamento padrão nas lesões avançadas) *versus* radioterapia exclusiva *versus* cirurgia parcial aberta *versus* cirurgia parcial endoscópica. Essa comparação poderia identificar a melhor opção de preservação de órgão em termos de sobrevida e sobrevida livre de doença.

A presente análise tem uma limitada aplicabilidade na prática clínica. Isso sugere, e pode ser proposto para conhecimento sobre o tema, a possibilidade de focar atenção sobre lesões que acometem a região supraglótica e câncer com perfil imunoistoquímico para desregulação da via de sinalização ativada pelo *erb B*. Esses tipos de perfil deveriam ser tratados já se pensando em um acometimento linfonodal altamente provável e, portanto, a opção terapêutica escolhida devendo levar em conta o tratamento do pescoço.

Uma sugestão para o futuro seria um estudo prospectivo que avaliasse carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço com perfil imunoistoquímico de vias de transdução de sinal ativadas pelo receptor tirosina quinase *ErbB*

desreguladas. Pacientes tratados cirurgicamente com achados patológicos que não indicassem tratamento adjuvante com RTQT, mas somente com RT (como em presença de invasão linfática exclusiva, sem margens cirúrgicas comprometidas e/ou extravasamento capsular), poderiam ser alocados aleatoriamente para RT exclusiva *versus* RT com tratamento sistêmico (quimioterapia ou terapia alvo), para avaliar controle local e regional da doença e sobrevida. Se confirmado o poder preditivo, a avaliação imunoistoquímica do Erb B e das vias ativadas poderiam direcionar na escolha de tratamento adjuvante e terapia alvo.

7 CONCLUSÕES

Entre as variáveis clínicas e terapêuticas, resultaram ser fatores prognósticos independentes invasão do espaço paraglótico (RR multivariado 1,92; IC 1,02-3,61), pescoço clínico (cN) positivo (RR multivariado 2,24; IC 1,11-4,50), invasão do espaço pré-epiglótico (RR multivariado 2,65; IC 1,46-4,81) e tratamento radioterápico exclusivo (RR multivariado 2,88; IC 1,31-6,30). Incluindo as variáveis patológicas, resultaram ser fatores prognósticos independentes achados patológicos de extravasamento capsular (RR multivariado 3,09; IC 1,56-6,12) e margens cirúrgicas comprometidas (RR multivariado 3,45; IC 1,11-10,75).

Houve associação entre expressão imunoistoquímica positiva de ErbB3 e ErbB4 e expressão de biomarcadores da via MAPKs e AKT-PI3K (MEK e mTOR). A positividade desses biomarcadores, ou seja, a desregulação da rede ErbB, foi associada a característica de invasão linfática, ponto de partida do acometimento linfonodal que resultou fator prognóstico independente entre as variáveis clínicas e patológicas, quando com extravasamento capsular.

7 Anexos

Anexo 1 - Classificação TNM, carcinoma de laringe

Categoria T, Tumor primário	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência do tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
Supraglote	
T1	Tumor limitado a uma sub-localização anatômica da supraglote, com mobilidade normal da prega vocal
T2	Tumor invade a mucosa de mais do que uma sublocalização anatômica adjacente da supraglote ou a glote ou região externa à supraglote (p. ex., a mucosa da base da língua, a valécula, a parede medial do seio piriforme), sem fixação da laringe
T3	Tumor limitado à laringe, com fixação da prega vocal e/ou invasão de qualquer uma das seguintes estruturas: área pós-cricoide, tecidos pré-epiglóticos, espaço paraglótico, e/ou com erosão mínima da cartilagem da tireoide (p.ex. córtex interna).
T4a	Tumor que invade toda a cartilagem tireoide e/ou estende-se aos tecidos além da laringe, p. ex., traqueia, partes moles do pescoço, incluindo músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), alça muscular, tireoide e esôfago
T4b	Tumor que invade o espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacentes à artéria carótida

Glote	
T1	Tumor limitado à(s) prega (s) vocal(is) (podem envolver a comissura anterior ou posterior), com mobilidade normal da(s) corda(s)
T1a	T1a = Tumor limitado a uma prega vocal
T1b	T1b = Tumor que envolve ambas as pregas vocais
T2	Tumor que se estende à supraglote e/ou subglote, e/ou com mobilidade diminuída da prega vocal
T3	Tumor limitado à laringe, com fixação da prega vocal e/ou que invade o espaço paraglótico, e/ou com erosão mínima da cartilagem tireoide (p.ex. córtex interno)
T4a	Tumor que invade completamente a cartilagem tireoide, ou estende-se aos tecidos além da laringe, p.ex., traqueia , partes moles do pescoço,incluindo músculos os profundos/ extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), alça muscular, tireoide e esôfago
T4b	Tumor que invade o espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacentes à artéria carótida
Subglote	
T1	Tumor limitado à subglote.
T2	Tumor que se estende à(s) corda(s) vocal(is), com mobilidade normal ou reduzida
T3	Tumor limitado à laringe, com fixação da corda vocal
T4a	Tumor que invade a cartilagem cricoide ou tireoide e/ou estende-se a outros tecidos além da laringe, p.ex., traqueia , partes moles do pescoço, incluindo músculos profundos /extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso,palatoglosso e estiloglosso), alça muscular e tireoide e esôfago
T4b	Tumor que invade o espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacente à artéria carótida

Categoria N, Linfonodos Regionais Cervicais	
Nx	linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	metástase em um único linfonodo ipsilateral, até 3 cm em sua maior dimensão
N2	metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm até 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N2a	metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm até 6 cm em sua maior dimensão
N2b	metástases em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N2c	metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N3	metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão

Categoria M, Metástase à Distância	
Mx	a presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	ausência de metástase à distância
M1	metástase à distância

Estádio Clínico e Grupos Prognósticos			
Estádio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
IVB	T4b	Qualquer N	M0
	Qualquer T	N3	M0
IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

Anexo 2 – Ficha de levantamento de dados

**FATORES PROGNÓSTICOS EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LARINGE
ESTADIO CLÍNICO T3 TRATADOS POR CIRURGIA, RADIOTERAPIA OU
ASSOCIAÇÕES TERAPÊUTICAS.**

1- ID: _____

2- Paciente: _____

3- RGH: _____

4-[☐] **Sexo:** masculino (0) feminino (1)

5-[☐] **Idade na época do tratamento**

6-[☐] **Raça:** Branca (1) Negra (2) Amarela (3) Outra (4)

7-[☐] **Queixas:** Rouquidão (1) Dispneia (2) Tosse/pigarro (3) Disfagia (4) Odinofagia (5)

Emagrecimento (6) Disfagia (8) Outros

8-[☐] meses **Tempo de história**

9-[☐] **Tabagismo:** NÃO (0) SIM (1)

[☐] cig/dia

10-[☐] **Etilismo:** NÃO (0) SIM (1)

[☐] lit/dia

11-[☐] **História familiar de CA:** Não (0) Laringe (1) Cabeça e Pescoço (2) Outro câncer (3)

Ignorado (4)

12-[☐] **Familiares com câncer:** Não (0) Pais (1) Irmãos (2) Outros (3)

13-[☐] **Peso** [☐] **Altura** [☐] **Índice de massa corpórea:**

14-[☐] mg/dL **Hemoglobina pre-operatória:**

15-[☐] mg/dL **Albumina pre-operatória:**

16-[☐] **Comorbidades:** HAS (1) DM (2) DPCO (3) Cardiopatia isquêmica (4)

[☐] **Adult Comorbidity Evaluation – 27 (ACE – 27) Test** – *ficha anexo*

17-[☐] **ASA:** I (1), II (2), III (3), IV (4), V (5)

- 18-[/ /] dia/mes/ano Traqueostomia prévia: NÃO (0) SIM (1)
- 19-[] **Estadiamento clínico T3, sítio** : Glótico (1), Supraglótico (2), Subglótico (3)
- 20-[] **Invasão da comisura anterior**: NÃO (0) SIM (1)
- 21-[] **Invasão supra-glótica**: Ventrículo laringeo (1), Banda ventricular (2), Epiglote (3), Aritenoide (4), Outra (5)
- 22-[] **Invasão sub-glótica**: NÃO (0) SIM (1)
- [] cm
- 23-[] **Fixação de pelo menos uma das pregas vocais**: NÃO (0) SIM (1)
- 24-[] **Invasão da área retrocricoidea**: NÃO (0) SIM (1)
- 25-[] **Invasão dos espaços pré-epiglótico**: NÃO (0) SIM (1)
- 26-[] **Invasão dos espaços paraglótico**: NÃO (0) SIM (1)
- 27-[] **Invasão menor de cartilagem**: NÃO (0) Mínima (1) Maior (2)
- 28-[] **Estadiamento clínico N**: 0 (0), N1 (1), N2a (2), N2b (3), N2c (4), N3 (5)
- 29-[/ /] dia/mes/ano Data do tratamento inicial:
- 30-[] **Tipo de tratamento inicial**: Cirurgia (1), RxT (2), Qt + RxT (3), Cirurgia + RxT (4), Outors (5)
- 31-[] **Tipo de cirurgia**: Cirurgia endoscópica à laser (1), laringectomia parcial vertical (2), laringectomia horizontal supra-glótica (3), laringectomia supra-cricoide (4), Laringectomia total (5), Outra (6)
- 32-[] **Tipo de esvaziamento ipsilateral**: Não (0), II-IV (1), II-V (2), I-V (3), Outro (4)
- 33-[] **Tipo de esvaziamento contralateral**: NÃO (0), II-IV (1), II-V (2), I-V (3), Outro (4)
- 34-[] **Esvaziamento do nível VI**: NÃO (0) SIM (1)
- 35-[] **Tireoidectomia**: NÃO (0), istmectomia (1), lobectomia (2), total (3), Outro (4)
- 36-[] **Complicações pós-operatória**: NÃO (0), infecção do sítio cirúrgico (1), fístula (2), Aspiração (3), Pneumonia (4), Sangramento (5), morte pós-operatória (6), outras (7)
- 37-[] **Transfusão intra-operatória**: NÃO (0) SIM (1)
- 38-[] dias **Tempo de UTI**: NÃO (0) SIM (1)
- 39-[] dias **Tempo de internação**:
- 40-[] dias **Número de dias com SNG**:
- 41-[] **Estadiamento patológico N**: N0 (0), N1 (1), N2a (2), N2b (3), N2c (4), N3 (5)

42-[] **Números de linfonodos positivos ipsilaterais:**

43-[] **Níveis dos linfonodos positivos ipsilaterais:** I (1), II (2), III (3), IV (4), V (5), VI (6), não especificado (7),

44-[] **Números de linfonodos positivos contralaterais**

45-[] **Níveis dos linfonodos positivos contralaterais:** I (1), II (2), III (3), IV (4), V (5), VI (6), não especificado (7),

46-[] **Extravasamento extracapsular:** NÃO (0) SIM (1)

47-[] **Margens:** Livre na peça (1), livre na margem congelada (2), comprometidas (3), não relatada (4)

48-[] **Invasão vascular:** NÃO (0) SIM (1)

49-[] **Invasão perineural:** NÃO (0) SIM (1)

50-[] **Invasão linfática:** NÃO (0) SIM (1)

51- **Análise Imuno-histoquímica: Avaliação de Expressão dos marcadores**

Negativo (0), Positivo (1)

[] p53

[] EGFR

[] ErbB2

[] ErbB3

[] Erb B4

[] Mek 1/2

[] Erk1/2

[] mTOR

[] RAS

[] pTEN

52-[] **Radioterapia:** Externa pós-operatória (1), Exclusiva (2), Radioquimioterapia (3)

53-[/ /] dia/mes/ano **Data do início da RXT:**NÃO (0) SIM (1)

54-[/ /] dia/mes/ano **Data do término da RXT:**NÃO (0) SIM (1)

55-[]-Gy **Dose total no tu primário:**

56-[]-Gy **Dose total nos campos cervicais:**

57-[] **Irradiação da área da traqueostomia:** NÃO (0) SIM (1)

58-[] **Aparelho da RXT:** NÃO irradiado (0), CO (1), acelerador linear (2)

- 59-[] **Complicações da RXT:** NÃO (0), dermatite (1), mucosite (2), condronecrose (3), outras (4)
- 60-[] **Interrupção da RXT por complicação:** NÃO (0) SIM (1)
[/ /] dia/mes/ano
- 61-[] **Quimioterapia:** NÃO (0), indução (1), concomitante a RxT (2)
[/ /] dia/mes/ano
- 62-[] **Drogas quimioterápicas utilizadas:** Cisplatina (1), carboplatina (2), docetaxel (3), paclitaxel (4), fluorouracil (5), cetuximab (6), outras (7)
- 63- Números de ciclos quimioterápicos realizados:
- 64-[] **Complicações relacionadas à quimioterapia:** NÃO (0), dermatite (1), mucosite (2), neutropenia (3), outras (4)
- 65-[] **Interrupção da quimioterapia:** NÃO (0) SIM (1)
[/ /] dia/mes/ano
- 66-[] **Necessário suporte nutricional durante o tratamento:** NÃO (0) SIM (1)
- 67-[] **Persistência:** NÃO (0), local (1), cervical (2), local+cervical (3)
[/ /] dia/mes/ano
- 68-[] **Tratamento da persistência:** NÃO (0), RxT (1), Qt (2), Cirurgia (3), RHD (4)
- 69-[] **Recorrência:** NÃO (0), local (1), cervical (2), local+cervical (3), distância (4)
[/ /] dia/mes/ano
- 70-[] **Tratamento da recorrência:** NÃO (0), RxT (1), Qt (2), Cirurgia (3), RHD (4)
- 71-[] **Segundo primário:** NÃO (0) SIM (1)
[/ /] dia/mes/ano
- 72-[] **CID do segundo primário:**
- 73-[] **Tratamento do segundo primário:** NÃO (0), RxT (1), Qt (2), Cirurgia (3), RHD (4)
- 74-[] **Data da última informação:** NÃO (0) SIM (1)
[/ /] dia/mes/ano
- 75-[] **Status nesta data:** Vivo sem doença (0), Vivo sem doença (1), Morte pós-op (2), Morte por CA (3), Morte por outras causas (4), Perdido de vista (5).

Anexo 3 – Parecer Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital A.C.Camargo

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 19 de Abril de 2010.

Ao
Dr. Luiz Paulo Kowalski

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1394/10
“Fatores prognósticos em pacientes com carcinoma epidermóide de laringe estágio clínico T3 tratados por cirurgia, radioterapia ou associações terapêuticas”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 13/04/2010, aprovaram a realização do projeto em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Ciência do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO**Projeto:** 1394/10**Título:** "Fatores prognósticos em pacientes com carcinoma epidermóide de laringe estágio clínico T3 tratados por cirurgia, radioterapia ou associações terapêuticas".**Pesquisador Responsável:** Dr. Luiz Paulo Kowalski. (Departamental)**Co-Pesquisadores:** Dr. Fernando Augusto Soares e Laura Mannarini.**Patrocinador:** N/A**Comentários gerais:**

O câncer de laringe é uma das neoplasias mais comuns das vias aéreas superiores. Na Fundação Oncocentro do estado de São Paulo entre Janeiro de 2000 a setembro de 2009 foram registrados 6.370 casos novos de tumores de laringe, destes, 3.995 (62,7%) foram diagnosticados em estádios clínicos III e IV, o que por si só justifica a relevância científica do projeto apresentado.

Justificativa do estudo:

Há poucos estudos que avaliam fatores preditivos e prognósticos de resposta terapêutica em grandes séries de pacientes com tumores T3 de laringe. Este estudo se propõe a avaliar a expressão de biomarcadores quanto à possibilidade de predição de resposta terapêutica quando tratados por radioterapia ou quimioradioterapia. Os mesmos marcadores serão avaliados quanto seu potencial de predição do prognóstico em pacientes tratados por radioterapia, quimioradioterapia, cirurgia, ou cirurgia e radioterapia pós-operatória.

Objetivos do estudo:

Análise retrospectiva de fatores prognósticos e preditivos de resposta terapêutica em pacientes portadores de carcinoma espinocelular de laringe cT3N0-3M0 admitidos para tratamento no período de janeiro de 1995 a dezembro de 2007.

Adequação do título: adequado.**Adequação da revisão de literatura:** adequada.**Adequação dos objetivos frente à literatura:** adequado.**Desenho e metodologia do projeto (grupos experimentais, procedimentos, indicadores de resultado, tipo de estudo, fase da pesquisa):**

Através do Registro Hospitalar de Câncer (RHC), se estima a necessidade de avaliar 900 prontuários para a seleção de cerca de 300 casos elegíveis, que serão revistos pelo pesquisador. Os dados relativos a variáveis demográficas, clínico-patológicas e terapêuticas serão coletados através da Ficha de Registro de Dados (Anexo 1 do projeto).

CrITÉRIOS de inclusão:

Pacientes previamente não tratados, com biópsia positiva para carcinoma epidermóide de laringe estágio clínico cT3, portadores de qualquer estadiamento linfonodal sem metástase à distância, submetidos a tratamento com finalidade curativa. O estadiamento se refere ao TNM da UICC 6ª edição de 2002.

CrITÉRIOS de exclusão:

Pacientes previamente submetidos a radioterapia em cabeça e pescoço; presença de metástase à distância; tumores sincrônicos; tumores de laringe irresssecáveis; comprometimento das condições clínicas gerais, principalmente, em relação às doenças metabólicas e cardiocirculatórias que inviabilizaram tratamento com intuito curativo.

CrITÉRIOS diagnósticos e estadiamento:

Os pacientes incluídos no estudo devem ter sido submetidos a exame objetivo otorrinolaringológico completo, microlaringoscopia sob anestesia geral com biópsia ou revisão de

lâminas, RMN ou TC do pescoço para avaliar a extensão local (espaço paraglótico, espaço tiroepiglótico, infiltração da cartilagem ou tecidos moles, junção cricocaritenoidea) e os linfonodos cervicais e radiografia e/ou TC tórax para pesquisa de metástase e/ou segundos tumores. As imagens devem ter sido efetuadas preferencialmente nas últimas 6 semanas anteriores a admissão do paciente. Após a identificação dos blocos de parafina e das lâminas do exame anatomo-patológico de cada paciente incluído no estudo (arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo), todos os casos serão revistos pelo mesmo patologista (FAZ) para delimitação da área mais significativa de cada tumor e confecção de lâminas do "Tissue Microarray". Então, será realizada análise imuno-histoquímica, avaliando-se a expressão das proteínas metaloproteinases 2 e 9 (MPS), do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), do receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), do fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF-1) e das proteínas reguladas pelo mesmo fator (CAIX e GLU-1), do receptor de interleucina 4 (IL4R), do receptor de tirosina quinase tipo 2 (NTRK2), do proto-oncogene Met (MET) e do fator de crescimento transformante (TGF α). As reações serão acompanhadas de controles positivos e negativos.

Análise estatística:

Este é um estudo retrospectivo. Para armazenamento dos dados e análise estatística será utilizado o programa estatístico SPSS 15.0 for Windows. Para verificar as associações entre as variáveis categóricas o teste do qui-quadrado será utilizado em tabelas de contingência e quando pelo menos uma frequência esperada for menor do que 5 em tabelas 2X2 o teste exato de Fisher será adotado. Para cálculo da sobrevida atuarial livre de doença e global serão utilizados o método de Kaplan Meier. Para comparação entre as curvas de sobrevida entre as diferentes categorias de uma mesma variável será utilizado o teste Log-Rank. O modelo de riscos proporcionais de Cox será usado para estimar os fatores prognósticos independentes. O nível de significância de 5% será considerado para os testes estatísticos.

Riscos e benefícios aos sujeitos: N/A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Os pesquisadores solicitam dispensa do Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE) em função do caráter retrospectivo do projeto de pesquisa.

Duração total da pesquisa: início previsto para 01/05/2010, duração prevista 48 meses.

Explicitação das responsabilidades: de acordo.

Explicitação dos critérios para suspender ou encerrar a pesquisa: não se aplica.

Local de pesquisa:

- Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia;
- Departamento de Anatomia Patológica.

Fonte financeira: Será utilizada verba do CEPID para os materiais do Departamento de Anatomia Patológica, quanto aos custos relativos a insumos de escritório, estes serão de responsabilidade do pesquisador.

Análise da Comissão de Pesquisa: Aprovado.

Comentários finais:

O projeto de pesquisa proposto é extremamente pertinente na realidade de pesquisa na qual se insere. Portanto decidimos pela aprovação final do mesmo.

Parecer Final:

Projeto aprovado.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Hospital A. C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 16 de Novembro de 2011.

**Ao
Dr. Luiz Paulo Kowalski**

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1394/10

“Fatores prognósticos em pacientes com carcinoma epidermóide de laringe estágio clínico T3 tratados por cirurgia, radioterapia ou associações terapêuticas”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 08/11/2011, tomaram conhecimento do seguinte documento:

- Relatório de acompanhamento do estudo em referência, datado de 19/04/2011.

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 4 – Parecer Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq – Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

DE :

FAX :

11 MAR 2009 17:54 Pág. 1

APROVAÇÃO

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 08.06.10, **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº 125/10 intitulado: **"FATORES PROGNÓSTICOS EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LARINGE ESTÁDIO CLÍNICO T3 TRATADOS POR CIRURGIA, RADIOTERAPIA OU ASSOCIAÇÕES TERAPÊUTICAS."**, apresentado pelo Departamento de Radiologia.

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

Pesquisador (a) Responsável: Luiz Paulo Kowalski

Pesquisador (a) Executante: Laura Mannarini

CEP-FMUSP 08 de junho de 2010

Prof. Dr. Roger Chammas
 Prof. Dr. Roger Chammas
 Coordenador de Pós-Graduação
 Área de Oncologia
 FMUSP

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
 Coordenador
 Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 6º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 8442 Fax: 011 3069 8492 e-mail: cep.fmusp@fmed.usp.br

8 REFERÊNCIAS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Câncer. *Biologia Molecular da Célula*. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p.1255-94.

Allison M. Is personalized medicine finally arriving. *Nat Biotechnol*. 2008; 26:509-17.

Al-Mamgani A, Tans L, van Rooij P, Levendag PC. A single-institutional experience of 15 years of treating t3 laryngeal cancer with primary radiotherapy, with or without chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;83(3):1000-6.

Almeida N. *Tratamento cirúrgico das neoplasias de laringe*. Disponível em: http://www.forl.org.br/pdf/seminarios/seminario_48.pdf

Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interaction. *FEBS Lett*. 1997;410:83-6.

Ambrosch P, Rodel R, Kron M, Steiner W. Die Transorale lasermikrochirurgie des Larynxkarzinoms. Eine retrospektive Analyse von 657 Patientenverläufen. *Der Onkologe*. 2001;5:505-2.

American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2012. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2012.

Bailey BJ (Ed.). Head & Neck Surgery – Otolaryngology. 3rd. ed. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven, 2001.

Barbosa MM, Araújo VJ Jr, Boasquevisque E, Carvalho R, Romano S, Lima RA, Dias FL, Salviano SK. Anterior vocal commissure invasion in laryngeal carcinoma diagnosis. *Laryngoscope*. 2005;115(4):724-30.

Barreto BD. *Identificação de assinatura moleculares preditores de resposta à quimio e radioterapia combinada em tumores localmente avançados de laringe e hipofaringe*. [Mestrado] São Paulo: Fundação Antonio Prudente, 2005.

_____. *Validação de classificadores moleculares preditores de resposta à quimioterapia combinada com radioterapia em carcinoma epidermoide de laringe e hipofaringe localmente avançado*. [Mestrado] São Paulo: Fundação Antonio Prudente, 2009.

Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A, Ozsahin EM, Jacobs JR, Jassem J, Ang KK, Lefèbvre JL. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck*. 2005;27(10):843-50.

- Bernier J, Vermorken JB, Koch WM. Adjuvant therapy in patients with resected poor-risk head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(17):2629-35.
- Biel MA, Maisel RH. Indications for performing hemithyroidectomy for tumors requiring total laryngectomy. *Am J Surg*. 1985;150:435-9.
- Blitz AM, Aygun N. Radiologic evaluation of larynx cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 2008;41(4):697-713, vi. Review.
- Blume-jensen P, Hunter T. Oncogenetic kinase signaling. *Nature*. 2001; 411:355-65.
- Bocca E, Functional Neck Dissection. *Arch Otolaryngol*. 1980;106:524-7.
- Boyle JO, Hakim J, Koch W, Van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, Correo R, Eby YJ, Ruppert JM, Sidransky D. The incidence of p53 mutations increases with tumor progression of head and neck cancer. *Cancer Res*. 1993;53:4477-81.
- Boscolo-Rizzo P, Maronato F, Marchiori C, Gava A, Da Mosto MC. Long-term quality of life after total laryngectomy and postoperative radiotherapy versus concurrent chemoradiotherapy for laryngeal preservation. *Laryngoscope*. 2008;118(2):300-6.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. *Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-1999*. Brasília, DF: Instituto Nacional do Câncer, 2002.
- Braz DSA, Ribas MM, Dedivitis RA, Nishimoto IN, Barros AP. Quality of Life and Depression in Patients undergoing Total and Partial Laryngectomy. *Clinics*. 2005;60:135-42.
- Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D. Association between cigarette smoking and Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 procedure a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol*. 1988;8:531-5.
- Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New Engl J Med*. 1995;332: 712-7.
- Brennan MA, Meyers AD, Jafek BW. The intraoperative management of the thyroid gland during laryngectomy. *Laryngoscope*. 1991;101:929-34.
- Burgess AW. EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors*. 2008;26(5):263-74.
- Byers R. Rationale for Elective Modified Neck Dissection. *Head and Neck Surgery*. 1988;160-7.
- Bayley BJ, Gerald HB, Johnson JT, Robert JK, Karen CH, Harold PC, Tardy M Eugene (Ed). *Head & Neck Surgery – Otolaryngology*. 3rd Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer*. 2005;114(5):806-16..

Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:965-1014. *Gens, Chromosome and Cancer*. 2009;48:441-454.

Chawla S, Carney AS. Organ preservation surgery for laryngeal cancer, Review. *Head & Neck Oncology*. 2009;1:12.

Chen AY, Halpern M. Factors predictive of survival in advanced laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;133(12):1270-6.

Chen SA, Muller S, Chen AY, Hudgins PA, Shin DM, Khuri F, Saba NF, Beitler JJ. Patterns of extralaryngeal spread of laryngeal cancer: thyroid cartilage penetration occurs in a minority of patients with extralaryngeal spread of laryngeal squamous cell cancers. *Cancer*. 2011;117(22):5047-51.

Crile G. Excision of Cancer of the Head and Neck. *J Am Med Assoc*. 1906;47:1780-86.

Colucci-D'Amato L, Perrone-Capano C, di Porzio U. Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *Bioessays*. 2003 Nov;25(11):1085-95.

Dadas B, Uslu B, Cakir B, Ozdogan HC, Calis AB, Turgut S. Traoperative management of the thyroid gland in laryngeal cancer surgery. *J Otolaryngol*. 2001;30:179–83.

Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer: the Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *N Engl J Med*. 1991;324(24):1685-90.

Dursun G, Keser R, Aktürk T, Akiner MN, Demireller A, Sak SD The significance of pre-epiglottic space invasion in supraglottic laryngeal carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1997;254 Suppl 1:S110-2.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC (Eds). *Larynx*. AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010. p 57-62.

Erjala K, Sundvall M, Junttila TT, Zhang N, Savisalo M, Mali P, Kulmala J, Pulkkinen J, Grenman R, Elenius K. Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growthfactor or receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinibin head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 2006;12(13):4103-11.

Ettl T, Baader K, Stiegler C, Müller M, Agaimy A, Zenk J, Kühnel T, Gosau M,

Zeitler K, Schwarz S, Brockhoff G. Loss of PTEN is associated with elevated EGFR and HER2 expression and worse prognosis in salivary gland cancer. *Br J Cancer*. 2012;106(4):719-26.

Fagan JJ, Kaye PV. Management of the thyroid gland with laryngectomy for cT3 glottic carcinomas. *Clin Otolaryngol*. 1997;22:7-12.

Fagan JJ, Tolley NS. Clinicopathological correlation of T3 glottic carcinomas. *Clin Otolaryngol*. 1994;19:532-6.

Farias TP, Dias LF, de Sá GM, Lima RA, Freitas de Oliveira AL, Sampaio ABN. Prognostic value of cartilage invasion in laryngeal cancer. *Rev Col Bras Cir*. 2004;31(2): 95-101.

Farrag TY, Koch WM, Cummings CW, Goldenberg D, Abou-Jaoude PM, Califano JA, Flint PW, Webster K, Tufano RP. Supracricoid laryngectomy outcomes: the Johns Hopkins experience. *Laryngoscope*. 2007;117:129-32.

Forastiere AA, Goepfert H, Maor M; et al. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(22):2091-8. A correction has been published: *N Engl J Med*. 2004;350(10):1049.

Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(23):8204-9.

Furugaki K, Moriya Y, Iwai T, Yorozu K, Yanagisawa M, Kondoh K, Fujimoto-Ohuchi K, Mori K. Erlotinib inhibits osteolytic bone invasion of human non-small-cell lung cancer cell line NCI-H292. *Clin Exp Metastasis*. 2011;28(7):649-59.

Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of the p53 oncogene in primary lung cancer. *The Lancet*. 1990;335:675-9.

Gilbert RW, Cullen RJ, van Nostrand AW, Bryce BP, Harwood AR. Prognostic significance of thyroid gland involvement in laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1986;112:856-9.

Gillison ML, Forastiere AA. Larynx preservation in head and neck cancers: a discussion of the National Comprehensive Cancer Network Practice Guidelines. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1999;13(4):699-718.

Giltneane JM, Rimm DL. Technology Insight: identification of biomarkers with tissue microarray technology *Nature Clinical Practice Oncology*. 2004;1:104-111.

Ginzburg GS, McCarthy JJ. Personalized medicine: revolutionizing drug discovery and patient care. *Trends Biotechnol*. 2001;19:491-6.

- González-García R, Naval-Gías L, Román-Romero L, Sastre-Pérez J, Rodríguez-Campo FJ. Local recurrences and second primary tumors from squamous cell carcinoma of the oral cavity: a retrospective analytic study of 500 patients. *Head Neck*. 2009 Sep;31(9):1168-80.
- Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J*. 1997;16:1647-55.
- Guerrier Y. Difficult indications for partial laryngectomy. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 1979;41(5):262-72.
- Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, Feldman MD, Goldsmith JD, Mick R, Machtay M, Rosenthal DI, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, Bernhard EJ, Weber RS, Muschel RJ. Local Recurrence in Head and Neck Cancer, Relationship to Radiation Resistance and Signal Transduction. *Clin Cancer Res*. 2002;8:885.
- Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL. III. Insect cell-expressed p180 erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci US A*. 1994;91:8132-6.
- Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor signal transduction pathways: Implications for cancer therapy. *Cell Sig*. 2006;18(12):2089-97.
- Ho AL, Musi E, Ambrosini G, Nair JS, Deraje Vasudeva S, de Stanchina E, Schwartz GK. Impact of Combined mTOR and MEK Inhibition in Uveal Melanoma Is Driven by Tumor Genotype. *PLoS One*. 2012;7(7):e40439.
- Hoffmann HT, Porter M, Karnell LH, Cooper JS, Weber RS, Langer CJ, Ang KK, Gay G, Stewart A, Robinon RA. Laryngeal Cancer in the United States: Changes in Demographics, Patterns of Care and Survival. *Laryngoscope* 2006. 116;(Suppl 111):1-13.
- Huang S, Benavente S, Armstrong EA, Li C, Wheeler DL, Harari PM. p53 modulates acquired resistance to EGFR inhibitors and radiation. *Cancer Res*. 2011 Nov 15;71(22):7071-9. Epub 2011 Nov 8.
- Ibrahim SO, Vasstrand EN, Liavaag PG, Johannessen AC, Lillehaug JR. Expression of c-erbB proto-oncogene family members in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res*. 1997;17(6D):4539-46.
- Instituto Nacional de Cancer (INCA) /Ministerio da Saude (MS). Carcinoma epidermoide da Cabeça e Pescoço, Conduta do INCA/MS; *Rev Bras Cancerol*. 2001, 47(4): 361-76.
- Inoue DP, Amar A, Cervantes O. Marcadores tumorais no cancer da laringe (tumor markers in larynx cancer). *Rev Bras Cir Cabeça e Pescoço*. 2005;34(1):7-14.

Jäckel MC, Sellmann L, Dorudian MA, Youssef S, Füzesi L. Prognostic significance of p53/bcl-2 coexpression in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2000;110:1339-45.

Jain KK, Personalized medicine. *Current Opinion Mol Ther*. 2002;4:548-58.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos K, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, Harris AL. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res*. 2001;7:3399–3403.

James, L.A. Comparative genomic hybridization as a tool in tumour cytogenetics. *J Pathol*. 1999;187:385-95.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(2):71-96.

Jonathan C, Irish JC, Berstein A. Oncogenes in head and neck cancer. *Laryngoscope*. 1993;103:42-52.

Joo YH, Park JO, Cho KJ, Kim MS. Relationship between paraglottic space invasion and cervical lymph node metastasis in patients undergoing supracricoid partial laryngectomy. *Head Neck*. 2012 Aug;34(8):1119-22.

Kearsley JH, Leonard JH, Walsh MD, Wright GR. A comparison of epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erb B-2 oncogene expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Pathology*. 1991;23:189-94.

Kim JW, Han GS, Byun SS, Lee DY, Cho BH, Kim YM. Management of thyroid gland invasion in laryngopharyngeal cancer. *Auris Nasus Larynx*. 2008;35(2):209-12.

Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, et al. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stromaderived growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:4995-5000.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat med*. 1998;4(7):844-7

Kowalski LP, Franco EL, de Andrade Sobrinho J. Factors influencing regional lymph node metastasis from laryngeal carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995;104(6):442-7.

Kowalski LP, Medina JE. Nodal metastases: predictive factors. *Otolaryngol Clin North Am*. 1998;31(4):621-37.

Krecicki T, Jelen M, Zalesska-Krecicka M, Rak J, Szkudlarek T, Jelen-Krzeszewska J. Epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in laryngeal epithelial lesions. *Oral Oncol*. 1999;35:180-6.

- Kunkel M, Reichert TE, Benz P, Lehr HA, Jeong JH, Wieand S, Bartenstein P, Wagner W, Whiteside TL. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2003;15;97(4):1015-24.
- Kyzas PA, Cunha IW, Ioannidis JPA. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:1434-440.
- Laccourreye O, Brasnu D, Laccourreye H, Piquet JJ. Cricohyoidoepiglottopexy for Glottic Carcinoma with Fixation or Impaired Motion of the True Vocal Cord: 5-year Oncologic Results with 112 Patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1997;106:364–9.
- Langendijk JA, Doornaert P, Verdonck-de Leeuw IM, Leemans CR, Aaronson NK, Slotman BJ. Impact of late treatment-related toxicity on quality of life among patients with head and neck cancer treated with radiotherapy. *J Clin Oncol*. 2008;26:3770–6.
- Laragione T, Gulko PS. mTOR Regulates the Invasive Properties of Synovial Fibroblasts in Rheumatoid Arthritis. *Molecular Medicine*. 2010;16(9-10):352-8.
- Lefebvre JL, Rolland F, Tessler M, Bardet E, Leemans CR, Geoffrois L, Hupperets P, Barzan L, de Raucourt D, Chevalier D, Licitra L, Lunghi F, Stupp R, Lacombe D, Bogaerts J, Horiot JC, Bernier J, Vermorken JB. EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group; EORTC Radiation Oncology Group. Phase 3 randomized trial on larynx preservation comparing sequential vs alternating chemotherapy and radiotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(3):142-52.
- Lewin JS, Hutcheson KA, Barringer DA, May AH, Roberts DB, Holsinger FC, Diaz Jr EM. Functional analysis of swallowing outcomes after supracricoid partial laryngectomy. *Head Neck*. 2008;30:559–66.
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*. 1998;74:49-139.
- Li B, Bobinski M, Gandour-Edwards R, Farwell DG, Chen AM. Overstaging of cartilage invasion by multidetector CT scan for laryngeal cancer and its potential effect on the use of organ preservation with chemoradiation. *The British Journal of Radiology*. 2011;84:64–9.
- Liang B, Wang S, Zhu XG, Yu YX, Cui ZR, Yu IZ. Increased expression of mitogen-activated protein kinase and its upstream regulating signal in human gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):623-8.
- Liotta L, Petricone E. Molecular profiling of human cancer. *Nat Rev Genet*. 2000;1:48-56.
- Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, Wycoff CC, Pastorek J, Ratcliffe PJ, Stratford IJ, West CM. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res*. 2001;61(17):6394-9.

Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:845-56.

Maestro R, Dolcetti R, Gasporotto D, Doglioni C, Pelucchi S, Barzan L, Grandi E, Boiocchi M. High frequency of p53 gene alterations associated with protein overexpression in human squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncogene*. 1992;7:1159-63.

Marioni G, Staffieri A, Giacomelli L, Lionello M, Guzzardo V, Busnardo A, Blandamura S. Mammalian target of rapamycin expression and laryngeal squamous cell carcinoma prognosis: novel preliminary evidence. *Histopathology*. 2011;58(7):1148-56.

Masakazu Toi, Akihiko Osaki, Hirofumi Yamada, Tetsuya Toge. Epidermal growth factor receptor expression as a prognostic indicator in breast cancer. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*. 1991;27:977-80.

Maurizi M, Scambia G, Panici BP, Ferrandina G, Almadori G, Paludetti G, De Vincenzo R, Distefano M, Brinchi D, Cadoni G, Manusco S. EGF receptor expression in primary laryngeal cancer: correlation with clinicopathological features and prognostic significance. *Int J Cancer*. 1992;52:862-6.

Medina JE. Supraomohyoid Neck Dissection: Rationale, Indications, and Surgical Technique. *Head and Neck*. 1989;111-22.

Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, Grund D, Hemminger G, Müller V, Löning T. Expression and prognostic relevance of activated extracellular regulated kinases (ERK1/2) in breast cancer. *B J Cancer*. 2005 Jun 20;92(12):2206-15.

Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Misawa K, Araki K, Misawa Y, Ueda Y. Prognostic value of glucose transporter 1 expression in patients with hypopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res*. 2002;22(6B):3489-94.

Gomes da Silva JA. *Incidência de Câncer no Brasil*. Estimativa 2012.. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Câncer, 2011.

Million RR, Mendenhall WM, Parsons JT. Comparison of radiation therapy and surgery in the management of T1-T2 vocal cord carcinoma. *Laryngeal Cancer*. 1994; 9(1):303-7.

Mundy GR. Metastasis: metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(8):584-93

Nakayama M, Laccourreye O, Holsinger FC, Okamoto M, Hayakawa K. Functional organ preservation for laryngeal cancer: past, present and future. *Jpn J Clin Oncol*. 2012;42(3):155-60.

Nakayama M, Okamoto M, Miyamoto S, Takeda M, Yokobori S, Masaki T, Seino Y. Supracricoid laryngectomy with cricothyroidoepiglottomy or cricothyroido-pexy: experience on 32 patients. *Auris Nasus Larynx*. 2008;35:77-82.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guideline in oncology, Head and Neck cancer. Version 1.2012. Disponível em:
http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf

National Cancer Institute, SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) available at website:
http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/results_merged/sect_12_larynx.pdf
<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/laryn.html#incidence-mortality>

Negm RS, Verma M, Srivastava S. The promise of biomarkers in cancer screening and detection. *Trends Mol Med*. 2002;8:288-93.

Nilsson R, Björkegren J, Tegner J. On reliable discovery of molecular signatures. *BMC Bioinformatics*. 2009;29:10-38.
Olsen KD. Reexamining the treatment of advanced laryngeal cancer. *Head Neck*. 2009;32(1):1-7.

Oosterkamp S, de Jong JM, Van den Ende PL, Manni JJ, Dehing-Oberije C, Kremer B. Predictive value of lymph node metastases and extracapsular extension for the risk of distant metastases in laryngeal carcinoma. *Laryngoscope*. 2006;116(11):2067-70.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74-108.

Pastorekova S, Parkkila S, Zavada J. Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance. *Adv Clin Chem*. 2006;42:167-216. Review.

Patel V, Marsh CA, Dorsam RT, Mikelis CM, Masedunskas A, Amornphimoltham P, Nathan CA, Singh B, Weigert R, Molinolo AA, Gutkind JS. Decreased lymphangiogenesis and lymph node metastasis by mTOR inhibition in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2011;71(22):7103-12. Epub 2011 Oct 5. Erratum in: *Cancer Res*. 2012;72(3):826.

Peretti G, Piazza C, Cattaneo A, De Benedetto L, Martin E, Nicolai P. Comparison of functional outcomes after endoscopic versus open-neck supraglottic laryngectomies. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006;115:827-32.

Petricon EF, Zoon KC, Kohn EC, Barrett JC, Liotta LA. Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1:683-95.

Peters L. The problems with the present staging and classification of laryngeal cancer. *Laryngeal Cancer*. 1994;7(1):241-3.

Pfister DG, Laurie SA, Weinstein GS, Mendenhall WM, Adelstein DJ, Ang KK, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:3693-704.

Phan JH, Moffitt RA, Stokes TH, Liu J, Young AN, Nie S, Wang MD. Convergence of biomarkers, bioinformatics and nanotechnology for individualized cancer treatment. *Trends Biotechnol*. 2009;27:350-8.

- Potter C, Harris AL. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle*. 2004;3(2):164-7. Review.
- Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Ronchetti D, Cesana BM, Ottaviani A, Neri A, Buffa R. Clinical relevance of p53 and bcl-2 over-expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1998;79:263-8.
- Putti TC, Hsu HCX, Chan ATC, Chan AT, Lai GM, Tse G, Lee YS, Whang-Peng J, Milward M, Lin L, Lin X, Lee CS. Expression of epidermal growth factor receptor in head and neck cancer correlates with clinical progression: a multicentre immunohistochemical study in the Asia-Pacific region. *Histopathology*. 2002; 41:144-51.
- Rades D, Schroeder U, Bajrovic A, Schild SE. Radiochemotherapy versus surgery plus radio(chemo)therapy for stage T3/T4 larynx and hypopharynx cancer - results of a matched-pair analysis. *Eur J Cancer*. 2011;47(18):2729-34.
- Rassekh CH, Johnson JT, Myers EN. Accuracy of intraoperative staging of the NO neck in squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 1995;105(12 Pt 1):1334-6.
- Robbins KT, Medina JE, Wolfe GT, Levine PA, Sessions RB, Pruet CW. Standardizing neck dissection terminology. Official report of the Academy's Committee for Head and Neck Surgery and Oncology. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1991 Jun;117(6):601-5.
- Rosental EL, Matrysian LM. Matrix metalloproteinase in head and neck cancer. *Head and Neck*. 2006;28:639-48.
- Secades P, Rodrigo JP, Hermsen M, Alvarez C, Suarez C, Chiara MD. Increase in Gene Dosage is a mechanism of HIF-1alpha. Constitutive Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Genes, Chromosome and Cancer*. 2009;48:441-54.
- Shah JP. Patterns of cervical lymph node metastasis from squamous carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg*. 1990;160(4):405-9.
- Shah JP, Strong E, Spiro RH, Vikram B. Surgical grand rounds. Neck dissection: current status and future possibilities. *Clin Bull*. 1981;11(1):25-33.
- Shiao JY, Wang CC. Organ preservation for T3 glottic cancer with vocal fold fixation. *Head Neck*. 2011;33(5):759; author reply 760-1. Doi: 10.1002/hed.21680.
- Shuyi Y, Feng W, Jing T, Hongzhang H, Haiyan W, Pingping M, Liwu Z, Zwahlen RA, Hongyu Y. Human beta-defensin-3 (hBD-3) upregulated by LPS via epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways to enhance lymphatic invasion of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112(5):616-25.
- Som PM, Curtin HD, Mancuso AA. An imaging-based classification for the cervical nodes designed as an adjunct to recent clinically based nodal classifications. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999;125:388-96.

Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996;122:627-32.

Sparano A, Chernock R, Laccourreye O, Weinstein G, Feldman M. Predictors of Thyroid gland invasion in glottic squamous cell carcinoma. *Laryngoscope.* 2005;115:1247–50.

Squarize CH, Castilho RM, Santos Pinto D Jr. Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(7):379-84.

Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, Benchimol S, Mak TW. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell.* 2001;8(2):317-25).
StataCorp. *Stata Statistical Software:Release 7.0.* College Station, TX: Stata Corporation, 2001.

Stephen YL, Laccourreye O, Gregory S. Weinstein
Supracricoid partial laryngectomy with cricohyoidpiglottopexy Operative Techniques. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* 2003;14(1):34-9.

Suoglu Y, Guven M, Kiyak E, Enoz M. Significance of pre-epiglottic space invasion in supracricoid partial laryngectomy with cricohyoidopexy. *J Laryngol Otol.* 2008;122(6):623-7.

Swanson CD, Akama-Garren EH, Stein EA, Petralia JD, Ruiz PJ, Edalati A, Lindstrom TM, Robinson WH. Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase ameliorates collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 2012;188(7):3513-21.

Thabet HM, Sessions DG, Gado MH, et al. Comparison of clinical evaluation and computed tomographic diagnostic accuracy for tumors of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope.* 1996;106(5 Pt 1):589-94.

Thiry A, Dogné JM, Masereel B, Supuran CT. Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(11):566-73.

Toi M, Hamada Y, Nakamura T, Mukaida H, Suehiro S, Wada T, Toge T, Niimoto M, Hattori T. Immunocytochemical and biochemical analysis of epidermal growth factor receptor expression in human breast cancer tissues: relationship to estrogen receptor and lymphatic invasion. *Int J Cancer.* 1989;43(2):220-5.

Tomik J, Składzien J, Modrzejewski M. Evaluation of cervical lymph node metastasis of 1400 patients with cancer of the larynx. *Auris Nasus Larynx.* 2001;28(3):233-40.

TNM. *Classificação dos Tumores Malignos – AJCC.* 6. Ed. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/tratamento/tnm/index.asp> . Edição original em Inglês: TNM Classification of Malignant Tumours – 6 th ed. Edited by L.H. Sobin and Ch. Wittekind. John Wiley & Sons, INC., Publication – 2002 ISBN 0-471-22288-7.

Edge SB, Compton CC. *American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual.* 7th ed. New York: Springer, 2010.

- Trivedi NP, Swaminathan DK, Thankappan K, Chatni S, Kuriakose MA, Iyer S. Comparison of quality of life in advanced laryngeal cancer patients after concurrent chemoradiotherapy vs total laryngectomy. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;139(5):702-7.
- Tufano RP. Organ preservation surgery for laryngeal cancer. *Otolaryngol Clin N Am*. 2002;35:1067-80.
- Vairaktaris E, Goutzanis L, Vassiliou S, Spyridonidou S, Nkenke E, Papageorgiou G, Strantzias P, Lazaris A, Yapijakis C, Patsouris E. Enhancement of erbB2 and erbB3 expression during oral oncogenesis in diabetic rats. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008;134(3):337-44. Epub 2007 Aug 18.
- Veit C, Genze F, Menke A, Hoeffert S, Gress TM, Gierschik P, Giehl K. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase is required for glial cell line-derived neurotrophic factor-induced migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res*. 2004;64(15):5291-300.
- Vega SF, Scola B, Vega MF, Martinez T, Scola E. [Conservative surgery for supraglottic carcinoma. Surgical technique. Oncologic and functional results. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 1996;16(4):363-70.
- Vilaseca I, Bernal-Sprekelsen M, Luis Blanch J. Transoral laser microsurgery for T3 laryngeal tumors: Prognostic factors. *Head Neck*. 2010;32(7):929-38.
- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Genet*. 2002; 2:489-501.
- Warren S, Gates O. Multiple primary malignant tumors. A survey of the literature and statistical study. *Am J Cancer* 1932;16:1358-1414.
- Weber PC. The Impact of Bilateral Neck Dissection on Pattern of Recurrence and Survival in Supraglottic Carcinoma. *Arch Otolaryn Head and Neck Surg*. 1994;120:703-6.
- Weber RS, Pathak S, Frankenthaler R, Gallick GE, Sacks PG. Effect of epidermal growth factor (EGF) on a newly established head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992;10: 529-35.
- Weinstein GS, EL-Sawy MM, Ruiz C, Dooley P, Chalian A, El-Sayed MM, Goldberg A. Laryngeal preservation with supracricoid partial laryngectomy results in improved quality of life when compared with total laryngectomy. *Laryngoscope*. 2001;111:191-9.
- Wick W, Furnari F B, Naumann U, Cavenee W K, Weller M. PTEN gene transfer in human malignant glioma: sensitization to irradiation and CD95L-induced apoptosis. *Oncogene*. 1999;18: 3936-43.
- Yarden Y, Sliwkowski M. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:127-37.

Yu K, Toral-Barza L, Shi C, Zhang WG, Zask A. Response and determinants of cancer cell susceptibility to PI3K inhibitors: combined targeting of PI3K and Mek1 as an effective anticancer strategy. *Cancer Biol Ther*. 2008; 7:307–315.

Yuen AP, Wei WI, Lam KH, Ho CM. Thyroidectomy during laryngectomy for advanced laryngeal carcinoma: whole organ section study with long-term functional evaluation. *Clin Otolaryngol*. 1995;20:145–9.

Zhang, K. Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. *J Biol Chem*. 1996;271:3884-90.