IVAN MARCELO GONÇALVES AGRA

Recidiva local de carcinomas epidermóides da boca e orofaringe: estudo de variáveis anatomopatológicas e de marcadores biológicos associados ao prognóstico em pacientes submetidos à cirurgia de resgate

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

Co-orientador: Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto

São Paulo

2007

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese à minha Mãe: a melhor pessoa que eu conheço. O mais valioso ser humano com quem convivo desde sempre. Devo a ela tudo que eu sou, em todos os aspectos. Não teria chegado a esse momento tão importante e significativo de minha vida, se ela não fosse a pessoa corajosa, forte e generosa que sempre foi. Ela continua sendo a minha maior referência, o exemplo a ser seguido.

Estendo minha gratidão ao meu pai, que sempre sonhou por uma vida melhor para seus filhos, diferente da vida difícil que teve. Sem muitas das suas iniciativas, por alguns consideradas intempestivas, eu não teria chegado até esse momento de realização. Graças à sua capacidade de “sonhar alto”, eu entendi que não deveria me contentar com pouco, que deveria tentar ser diferente, que poderia transformar a minha vida.

Aos meus queridos irmãos, com o agradecimento pelo apoio constante, pois sempre tive a certeza de poder contar com vocês a qualquer momento.

Aos meus padrinhos, Antonieta e Eduardo, por tudo que por mim fizeram, principalmente quando eu mais precisava de apoio e cuidados.

À Iluska, pela felicidade de estar novamente ao seu lado e pelo sentimento que nos une.

Ao meu querido amigo João Gonçalves Filho, exemplo de Homem e de Médico, companheiro de todos os momentos. O seu estímulo e cobrança constante foram fundamentais ao desfecho desse trabalho.

Aos amigos e colegas do AC Camargo e da pós-graduação na USP: Éverton Pontes, Antônio Poletto, Samuel Aguiar Jr e Edson Ribeiro; o exemplo de dedicação e perseverança de cada um de vocês me inspirou a seguir o mesmo caminho.

Aos meus amigos: Rogério Ramos, Marcelo Cunha, Neudson Gomes e Tânio Leal, pelo estímulo e amizade fundamentais nessa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski pela orientação nessa tese e por ser o maior responsável pela minha formação como cirurgião de cabeça e pescoço e oncologista. Nossa convivência foi para mim um divisor de águas na vida profissional, aprendi o valor inestimável da pesquisa e do método científico como ferramentas para beneficiar o alvo principal da atuação de qualquer médico: o paciente.

Ao Prof. Dr. André Lopes Carvalho, a quem devo grande parte da minha evolução enquanto pesquisador, ainda iniciante e com muito a aprender. Sem a sua sempre pronta contribuição, tudo seria mais difícil.

Ao Dr. João Gonçalves Filho, pela colaboração fundamental e decisiva em todos os momentos desse estudo.

Ao Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto pela co-orientação nesse estudo. Os méritos que, por ventura, essa tese possa alcançar devem-se em grande parte, à sua competência como patologista e pesquisador.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, pelo apoio incondicional, por ele chancelado, do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo.

Aos membros do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital AC Camargo, especialmente ao Dr. José Magrin e ao Dr. Mauro Ikeda. Serei eternamente grato pelos ensinamentos, o incentivo constante e o tratamento fraternal que me dispensam.

À Sra Sueli Epifânio a quem não tenho palavras para agradecer por tudo que fez por mim durante a residência no AC Camargo, na tese de Mestrado e agora nesta tese de Doutorado. O seu despreendimento e competência foram fundamentais para o desfecho desse estudo.

Ao Dr. Arthur Accioly Rosa, pela indispensável ajuda nos momentos decisivos da redação da tese, contribuindo com o seu conhecimento e sua prestimosidade sem limites, para os detalhes finais desse estudo.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial à Disciplina de Oncologia, pela oportunidade de aprimorar os meus conhecimentos nessa grande instituição.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Metaloproteinases	7
1.2 EGFR (Receptor para o Fator de Crescimento Epidérmico)	10
1.3 VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial)	13
1.4 Fundamentos do Estudo	16
2 OBJETIVOS	18
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	20
3.1 Casuística	21
3.1.1 Dados demográficos	21
3.1.2 Dados relativos ao tumor e ao tratamento prévio	22
3.1.3 Estadiamento dos tumores	24
3.1.4 Dados relativos à cirurgia de resgate	25
3.2 Métodos	26
3.2.1 Seleção dos blocos de parafina	26
3.2.2 Método de Tissue Microarray (TMA)	27
3.2.3 Análise Imunoistoquímica	28
3.3 Análise Estatística	31
4 RESULTADOS	33
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÕES	67
7 REFERÊNCIAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Lâmina do Tissue Microarray (Hematoxilina-eosina)	28
Figura 2	Lâmina do Tissue Microarray (VEGF)	31
Figura 3	Sobrevida global	36
Figura 4	Sobrevida específica por câncer	37
Figura 5	Sobrevida específica por câncer de acordo com a faixa etária	38
Figura 6	Sobrevida específica por câncer de acordo com o tratamento prévio	39
Figura 7	Sobrevida específica por câncer de acordo com o local do tumor	40
Figura 8	Sobrevida específica por câncer de acordo com o estágio clínico da recidiva	41
Figura 9	Sobrevida específica por câncer de acordo com o intervalo livre de doença	42
Figura 10	Fragmento do tissue microarray EGFR positivo (100x)	46
Figura 11	Sobrevida específica por câncer de acordo com a expressão do EGFR	47
Figura 12	Fragmento do tissue microarray MMP-2 positivo (400x)	48
Figura 13	Fragmento do tissue microarray MMP-9 positivo (400x)	48
Figura 14	Sobrevida específica por câncer de acordo com a expressão da MMP-2	49
Figura 15	Sobrevida específica por câncer de acordo com a expressão da MMP-9	50
Figura 16	Fragmento do tissue microarray VEGF positivo (100x)	51
Figura 17	Sobrevida específica por câncer de acordo com a expressão do VEGF	52
Figura 18	Proposta de algoritmo de conduta em pacientes portadores de recidiva local de carcinoma de boca e orofaringe	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	População do estudo	22
Tabela 2	Topografia do tumor em boca e orofaringe	23
Tabela 3	Distribuição do estágio clínico da recidiva e do intervalo livre de doença de acordo com o local do tumor	24
Tabela 4	Dados da cirurgia de resgate	26
Tabela 5	Características dos kits dos anticorpos	30
Tabela 6	Local da nova recidiva	35
Tabela 7	Distribuição da expressão do EGFR, VEGF, MMP-2 e MMP-9 de acordo com o local do tumor	43
Tabela 8	Distribuição da expressão do EGFR, VEGF, MMP-2 e MMP-9 no tumor primário e no tumor recidivado	44
Tabela 9	Expressão do EGFR, VEGF, MMP-2 e MMP-9 de acordo com o intervalo livre de doença	45
Tabela 10	Expressão do EGFR, VEGF, MMP-2 e MMP-9 de acordo com o estágio clínico da recidiva	45
Tabela 11	Análise univariada de sobrevida específica por câncer de acordo com variáveis demográficas, clínicas e expressão do EGFR, VEGF, MMP-2 e MMP-9	53
Tabela 12	Análise Multivariada de sobrevida	54

RESUMO

Agra IMG. *Recidiva local de carcinomas epidermóides da boca e orofaringe: estudo de variáveis anatomopatológicas e de marcadores biológicos associados ao prognóstico em pacientes submetidos à cirurgia de resgate* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 82p.

INTRODUÇÃO: Recidivas locais e loco-regionais são as principais causas de falha do tratamento em pacientes portadores de carcinomas epidermóides de boca e orofaringe. A cirurgia de resgate é geralmente a melhor opção terapêutica para esses pacientes. Esse estudo tem por objetivo avaliar a importância prognóstica da expressão das proteínas EGFR, MMP-2, MMP-9 e VEGF em pacientes com recidiva local submetidos à cirurgia de resgate.

CASUÍSTICA E MÉTODOS: Os prontuários de 111 pacientes portadores de recorrência local de carcinomas epidermóides de boca e orofaringe foram analisados de forma retrospectiva. A localização do tumor primário foi o lábio em 10 casos (9%), a cavidade oral em 68 (61%) e a orofaringe em 33 (30%). O tratamento prévio foi cirurgia em 33 casos (30%), radioterapia associada ou não à quimioterapia baseada em cisplatina em 46 (41%) e cirurgia com radioterapia adjuvante em 32 (29%). A expressão das proteínas EGFR, MMP-2, MMP-9 and VEGF foi avaliada com a técnica do Tissue Microarray.

RESULTADOS: O intervalo livre de doença variou de 0,89 a 140,9 meses, com uma mediana de 6,87 meses. As recidivas foram diagnosticadas em

intervalo de tempo inferior a 1 ano em 69 pacientes (62,2%) e após 1 ano em 42 (37,8%). Os pacientes com intervalo livre de doença inferior a 1 ano apresentaram pior resultado de sobrevida ($p=0,01$). O estágio clínico da recidiva (rEC) foi I ou II em 31 casos (27,9%) e III ou IV em 80 (72,1%). Pacientes com doença em estágio clínico mais avançado (rEC III ou IV) apresentaram piores taxas de sobrevida específica por câncer ($p=0,04$). Hiper-expressão do EGFR foi associada a pior resultado do tratamento. Os casos com EGFR positivo obtiveram sobrevida específica por câncer em 3 anos de 27,2%, enquanto pacientes com EGFR negativo alcançaram 64,3% de sobrevida em 3 anos ($p=0,001$). A expressão das proteínas MMP-2, MMP-9 e VEGF não se mostrou significativa para o prognóstico ($p=0,83$, $p=0,15$ e $p=0,86$, respectivamente). Na análise multivariada, apenas o intervalo livre de doença e a expressão do EGFR foram associadas à maior risco de morte.

CONCLUSÕES: Recidivas locais de carcinomas epidermóides de boca e orofaringe são associadas a mau prognóstico. Intervalo livre de doença superior a 1 ano e ausência de expressão do EGFR foram os principais fatores associados a melhores resultados de sobrevida específica por câncer em pacientes submetidos à cirurgia de resgate.

Descritores: Carcinoma de células escamosas; Receptor do fator de Crescimento Epidérmico; Metaloproteinase 2 da Matriz; Metaloproteinase 9 da Matriz; Fator A de Crescimento do Endotélio Vascular; Recidiva local de neoplasia.

SUMMARY

Agra IMG. *Local recurrence of squamous cell carcinomas of the mouth and oropharynx: A study of anatomic pathology variables and biological markers associated with prognosis in patients submitted to salvage surgery* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 82p.

INTRODUCTION: Local and regional relapses are the main sites of treatment failure in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. In these instances, salvage surgery is the most widely used treatment approach. The aim of this study is to analyze the prognostic effect of the expression of EGFR, MMP-2, MMP-9 and VEGF in patients with recurrent cancer submitted to salvage surgery.

METHODS: The charts of 111 patients with local recurrence of oral or oropharyngeal squamous cell carcinomas were retrospectively analyzed. The tumor sites were: the lip in 11 cases (9%), the oral cavity in 68 (61%) and the oropharynx in 33 (30%). The previous treatment was: Surgery in 33 patients (30%), radiotherapy with or without cisplatin based chemotherapy in 46 (41%) and surgery with adjuvant radiotherapy in 32 (29%). EGFR, MMP-2, MMP-9 and VEGF expressions were analyzed with tissue microarray immunohistochemical technique.

RESULTS: The disease-free interval ranged from 0.89 to 140.9 months with a median of 6.87 months. The patients were categorized into two groups: Those with recurrence in less than 1 year (69 patients - 62.2%) and those

with recurrence after 1 year (42 - 37.8%). The group with the shorter disease-free interval presented a worse prognosis ($p=0.01$). The clinical stage of recurrence (rCS) was I/II in 31 cases (27.9%) and III/IV in 80 cases (72.1%). Patients with more advanced diseases (rCS III/IV) had worse rates of cancer specific survival (CSS) than patients with rCS I/II ($p=0.04$). An over-expression of EGFR was associated with worse treatment results. Positive EGFR cases had a 3 year CSS of 27.2%, while EGFR negative patients had 64.3% ($p=0.001$). The MMP-2 and MMP-9 over-expression were also associated with a worse prognosis but without statistical significance ($p=0.83$ and $p=0.15$). VEGF expression did not show prognostic significance in this group of patients. In a multivariate analysis only the disease-free interval and over-expression of EGFR were associated with a higher risk of death.

CONCLUSION: Local recurrence in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas usually indicates an unfavorable prognosis. A disease-free interval greater than 1 year and a negative EGFR expression are the main prognostic factors which indicate a better cancer specific survival rate in patients submitted to salvage surgery.

Descriptors: Carcinoma, Squamous Cell; Receptor, Epidermal Growth Factor; Matrix Metalloproteinase 2; Matrix Metalloproteinase 9; Vascular Endothelial Growth Factor; Neoplasm recurrence, local.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional do Câncer estimou em 13470 o número de casos novos de câncer de boca e faringe para o ano de 2006 no Brasil, sendo a oitava neoplasia mais incidente no país, perfazendo 3,0% de todos os casos de neoplasias malignas¹. Em São Paulo foi registrada, na década de 80, uma das maiores incidências mundiais de câncer de boca: 8/100.000 habitantes². O carcinoma de orofaringe tem uma incidência mais baixa em nosso meio quando comparada ao carcinoma da cavidade oral, sendo registrada a maior incidência em capitais da região nordeste: Fortaleza com 1,89/100.000 habitantes e Salvador com 1,81/100.000 habitantes³.

Os principais fatores de risco associados ao câncer de boca são o tabagismo e o etilismo. Essas neoplasias são mais comuns no gênero masculino e apresentam-se mais comumente entre a 5ª e 6ª décadas de vida⁴.

Esses tumores usualmente se apresentam em estádios clínicos avançados. O tratamento mais utilizado para o câncer de boca avançado, quando ressecável, é a cirurgia radical associada à radioterapia, que pode ser associada à quimioterapia para os pacientes de pior prognóstico, no pós-operatório⁵⁻⁶. Para os carcinomas da orofaringe, a tendência atual da literatura é pelo emprego de radioterapia e quimioterapia associados, e, geralmente, concomitantes⁷⁻⁹, para pacientes com doença no estágio clínico III ou IV. A falha do tratamento depende fundamentalmente da terapêutica

previamente empregada e do estadiamento clínico inicial. As taxas de recorrência loco-regional variam de 25 a 48%, e as metástases à distância raramente acontecem de forma isolada¹⁰.

A maioria dos pacientes portadores de carcinomas avançados, de boca e orofaringe, é inicialmente submetida a tratamento prévio com radioterapia exclusiva ou cirurgia associada à radioterapia pós-operatória. Sendo assim, quando ocorre recidiva, a cirurgia de resgate é geralmente a única opção possível de tratamento com intenção curativa¹¹⁻¹², visto que na maioria dos casos não é possível novo curso de radioterapia. Quando tecnicamente factível, a reirradiação é associada a resultados modestos de sobrevida e controle loco-regional¹³⁻¹⁴, além de altas taxas de complicações¹⁵. Quimioterapia sistêmica é geralmente considerada um tratamento paliativo para esses pacientes¹⁶. A terapia fotodinâmica tem sido utilizada como palição, com resultados bons em relação à melhora na qualidade de vida para aqueles pacientes que apresentam resposta completa para o tratamento. Todavia, essa experiência ainda é restrita a poucos centros¹⁷.

Com o intuito de analisar os fatores prognósticos clínicos, associados aos carcinomas de boca e orofaringe recidivados e submetidos à cirurgia de resgate, foi analisada a experiência do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer AC Camargo entre os anos de 1985 e 1999 com esse procedimento terapêutico, sendo esse o objeto de estudo de uma dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo^{11,18}. Foram revistos os prontuários de 246 pacientes portadores de carcinomas de boca (cavidade

oral e lábio) e orofaringe, com diagnóstico histológico comprovado de carcinoma epidermóide (CEC) recidivado, submetidos à cirurgia com intenção curativa. Foram incluídos pacientes com recidivas locais, regionais e loco-regionais. O tipo de recidiva mais freqüente foi a local. Cento e cinquenta e quatro pacientes apresentavam recidivas locais (62,6%), enquanto 59 apresentavam recidivas regionais (24%) e 33 pacientes (13,4%) apresentavam recidivas loco-regionais.

A sobrevida global na amostra de pacientes descrita foi de 32,3% em 5 anos. Pacientes com carcinomas de cavidade oral obtiveram uma sobrevida atuarial em 5 anos de 33,6%, para os portadores de carcinomas da orofaringe a sobrevida foi de 25,6%, enquanto aqueles com carcinomas do lábio apresentaram o melhor resultado de sobrevida em 5 anos (41,5%). Entretanto, essas diferenças não foram significativas após análise estatística. As variáveis estudadas que foram importantes para a definição do prognóstico, em análise multivariada, foram o estadiamento clínico da recidiva (rTNM) e o intervalo livre de doença. Pacientes que se apresentavam com recidivas em estágio clínico inicial (rEC I e II) obtiveram sobrevida a 5 anos de 43,6%, enquanto aqueles com estágio clínico da recidiva mais avançado (rEC III e IV) a sobrevida em 5 anos foi de 29,1%. ($p=0,027$)^{11,18}

O intervalo livre de doença foi outra variável clínica preditiva de prognóstico nessa série. Pacientes com recidivas precoces (< 1 ano) apresentavam pior prognóstico, com sobrevida global em 5 anos de 26,7%, enquanto aqueles com recidivas tardias (> 1 ano) apresentaram sobrevida

de 42,1%. ($p=0.023$) Outras variáveis clínicas avaliadas como o gênero, idade e tipo de recidiva (local, regional ou loco-regional), não influenciaram o prognóstico significativamente^{11,18}.

Cento e trinta e cinco pacientes (55%) apresentaram nova recidiva durante o período de seguimento do estudo. A maioria dos pacientes apresentou segunda recidiva local (68,1% das novas recidivas – 92 casos), metástases à distância isoladamente ocorreram em apenas 8 pacientes (3,3%). Dentre os pacientes que inicialmente apresentavam recidiva local 42,2% desenvolveram nova recorrência local (65 pacientes dentre 154 casos). Ressaltamos que 87,6% desses pacientes apresentavam margens livres no exame anatomopatológico^{11,18}.

A recidiva local dessas neoplasias é associada a decréscimo significativo na qualidade de vida, pois muitas vezes está associada à dor de difícil controle, sangramento e odor fétido. A maioria desses pacientes está incapacitada parcial ou totalmente tanto para a mastigação como para a deglutição. São freqüentes os distúrbios da fala ou mesmo perda dessa função, quando há indicação de uma traqueostomia.

O controle loco-regional dos carcinomas de boca e orofaringe é o principal fator associado à qualidade de vida nesses pacientes, e, como demonstrado nessa série de casos analisados do Hospital AC Camargo, infelizmente a maioria dos pacientes em que ocorreu falha do tratamento, tal evento se deu em decorrência da recidiva loco-regional dessas neoplasias^{11,18}.

Os resultados de sobrevida observados nessa série de pacientes foram pobres: 32,3% de sobrevida global em 5 anos^{11,18}. No entanto, levando-se em consideração que a cirurgia de resgate na maior parte das vezes é a única opção de tratamento com intenção curativa, nós advogamos a indicação desse procedimento para aqueles pacientes com recidivas loco-regionais passíveis de ressecção, desde que apresentem condições clínicas para serem submetidas ao procedimento cirúrgico^{11,18}.

Partindo dessa série de casos analisadas na instituição, decidimos então centrar a nossa atenção no que nos parece ser o maior desafio do tratamento do carcinoma de boca e orofaringe: o controle loco-regional dessas neoplasias. A idéia desse novo estudo parte de uma pergunta ainda não respondida: os resultados do tratamento em relação à sobrevida, compensam a morbidade e os custos associados às cirurgias de resgate para todos os pacientes com tumores ressecáveis, ou apenas para um grupo selecionado de portadores de recidivas locais de CEC de boca e orofaringe? Identificar outros fatores prognósticos que possam ser úteis na definição dos melhores candidatos a esse tipo de procedimento, poderá auxiliar no processo de decisão terapêutica. Informações clínicas disponíveis ao diagnóstico da recidiva foram avaliadas quanto ao seu valor em determinar o prognóstico, assim como marcadores biológicos que podem estar envolvidos - direta ou indiretamente - no processo de invasão dessas neoplasias. Dentre as inúmeras probabilidades de estudo de fatores que possam influir no prognóstico, destaca-se a expressão das metaloproteinases 2 e 9, que são enzimas envolvidas no processo de degradação da membrana basal e

da matriz extracelular. Assim como, a expressão do EGFR (receptor para o fator de crescimento epidérmico), envolvido no processo de controle do ciclo celular; e do VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), proteína ligada ao processo de angiogênese. Esse estudo analisou esses marcadores biológicos, com a hipótese de que a hiperexpressão dessas proteínas poderia estar associada a pior prognóstico.

1.1 METALOPROTEINASES

A capacidade de uma célula tumoral infiltrar os tecidos vizinhos e estruturas vitais é uma das características mais importantes de uma neoplasia maligna. O mecanismo de invasão dos tumores epiteliais aos tecidos adjacentes se inicia pela destruição da membrana basal. Esse evento requer a síntese e ativação de enzimas proteolíticas, envolvidas na degradação de macromoléculas, que compõem a matriz extra-celular, dentre as mais importantes proteínas envolvidas nesse processo estão as metaloproteinases¹⁹.

As metaloproteinases (MMPs) fazem parte de uma família de proteínas com atividade zinco-dependente, que são sintetizadas como enzimas latentes, e posteriormente são ativadas. Mais de vinte e cinco tipos de MMPs já foram identificadas. Essas enzimas são capazes de degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular, bem como outras proteínas importantes para o controle do ciclo celular e para o desenvolvimento de uma neoplasia maligna. Entre essas moléculas, que podem ser degradadas

pelas MMPs, estão os fatores de crescimento, as moléculas de adesão e receptores localizados na membrana da célula¹⁹⁻²².

A atividade da MMP tem regulação a nível de transcrição e atualmente é reconhecido que tal regulação é única para cada tipo celular e, portanto, as neoplasias podem apresentar fenótipos diferentes em relação à expressão e aos mecanismos de ação dessas enzimas¹⁹. As metaloproteinases também podem ser reguladas em sua atividade por fatores de crescimento como o EGF (fator de crescimento epidérmico) e o fator de crescimento derivado do hepatócito, sendo que esse efeito regulatório resulta geralmente em aumento da sua atividade proteolítica²³.

A síntese das MMPs foi originalmente atribuída à própria célula cancerosa, entretanto, estudos mais recentes sugerem que a maior parte da produção dessas enzimas tem origem nas células do estroma como os fibroblastos ou em células inflamatórias que circundam as células neoplásicas, assim como em células endoteliais²⁴⁻²⁷. Os níveis séricos de metaloproteinases 2 e 9 estão elevados em pacientes portadores de carcinomas de cabeça e pescoço, sugerindo que essas enzimas possam ser transportadas até o estroma peritumoral¹⁹.

O envolvimento das MMPs no processo de degradação da matriz extracelular, incluindo a membrana basal, e por conseguinte sua importância no processo de invasão e metástases, está confirmado por vários estudos^{23,27}. No entanto, já foram identificadas outras funções dessas enzimas no processo de desenvolvimento de uma neoplasia. As MMPs promovem a iniciação e crescimento de tumores ativando fatores de

crescimento e permitindo a sua liberação na matriz extracelular^{20,24}. As MMPs podem também inibir a capacidade da célula em reconhecer sinais indutores de apoptose²⁸. As MMPs parecem também desempenhar alguma função regulatória no processo de angiogênese, aparentemente por estarem envolvidas em mecanismos que fazem parte da mobilização e ativação de fatores angiogênicos como o VEGF^{21,29-30}.

MMP-2 e MMP-9 são as metaloproteinases mais comumente expressas em carcinomas de cabeça e pescoço. A MMP-2 é também conhecida como gelatinase A, e usualmente tem sua expressão identificada em fibroblastos (primordialmente), na própria célula tumoral e em macrófagos. A MMP-9, chamada gelatinase B, pode estar expressa na célula neoplásica, mas também em fibroblastos, em células endoteliais e em macrófagos¹⁹.

A implicação da expressão elevada das metaloproteinases no prognóstico dos pacientes portadores de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço é controversa. Há estudos que relacionam a expressão aumentada dessas proteínas com maior risco de metástases linfonodais, o que de forma indireta confere pior prognóstico a esses pacientes³¹. Em outros estudos foi verificado pior prognóstico em pacientes portadores de carcinomas de laringe e da cavidade oral com expressão elevada das metaloproteinases 2 e 9³²⁻³⁵. Por outro lado, a relação direta entre MMP-2 e MMP-9 e prognóstico não foi verificada por outro autor³⁶.

Não se encontrou relato na literatura, de ensaios clínicos publicados, com o uso de inibidores das MMPs em carcinomas de cabeça e pescoço. No entanto, estudos iniciais em outras neoplasias mostraram limitado benefício

desses agentes como terapia biológica, provavelmente devido à limitação imposta pela dose devido a sintomas músculo-esqueléticos (mialgias)³⁷⁻³⁸.

1.2 EGFR (Receptor para o Fator de Crescimento Epidérmico)

Crescimento e diferenciação de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço são regulados por alguns fatores de crescimento e seus receptores de membrana³⁹. O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) apresenta maior expressão nessas neoplasias do que nas células normais da mucosa do trato aerodigestivo superior. O EGFR é uma glicoproteína transmembrana codificada pelo proto-oncogene c-erb-2, localizado no cromossomo 7p12⁴⁰. Os carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, pulmão, colo uterino e pele apresentam probabilidade duas vezes maior que a pele normal de manifestar hiper-expressão do EGFR, indicando que há uma relação do EGFR com a transformação maligna dessas neoplasias⁴¹.

O EGFR é particularmente importante na patogênese de carcinomas de cabeça e pescoço. A expressão aumentada desse receptor e de seus ligantes, fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator alfa de transformação do crescimento (TGF- α), são altamente prevalentes nessas neoplasias. O RNA-mensageiro que codifica esses ligantes está elevado em 92% desses tumores para o EGF e 87% para o TGF- α ⁴².

A relação entre o EGFR e essas neoplasias é evidenciada quando se compara a atividade dessas proteínas em tecidos neoplásicos, com a atividade em células normais da mucosa. O fator de crescimento epidérmico

(EGF) e o seu receptor transmembrana (EGFR) não são associados à significativa contribuição para o processo de crescimento e diferenciação celular em tecidos normais⁴³.

Após ter sido estabelecido o acoplamento do EGFR com seus ligantes naturais mais comuns, o EGF e o TGF- α , ocorre a autoativação da via da tirosino-quinase que em seguida desencadeará uma série de vias sinalizadoras que terão como resultado: inibição da apoptose, ativação da proliferação celular e angiogênese, e aumento no potencial de disseminação metastática da célula neoplásica⁴⁴.

Tumores mais indiferenciados apresentam maior expressão do EGFR que tumores bem diferenciados⁴⁵. A hiper-expressão do EGFR é um evento precoce na carcinogênese de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. A expressão aumentada desse receptor também é verificada em mucosa normal adjacente à neoplasia, o que sugere relação com a condição clínica conhecida como campo de cancerização. Há uma relação direta de aumento da expressão do EGFR em paralelo com alterações histopatológicas da mucosa, desde hiperplasia até carcinoma invasivo, passando por displasia e carcinoma *in situ*⁴⁶.

O EGFR desempenha um papel também na regulação de mecanismos ligados ao estroma tecidual, que têm importância para o desenvolvimento das neoplasias. Suas vias sinalizadoras facilitam o processo de invasão por permitir um ambiente extracelular favorável ao crescimento tumoral. Há evidências de que ocorre incremento da angiogênese por intermédio do EGFR, devido à expressão desses receptores em células endoteliais,

principalmente quando não há expressão significativa do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)⁴⁷.

A expressão elevada do EGFR parece ser diferente entre os tumores das diversas topografias das vias aerodigestivas superiores. Carcinomas de laringe apresentam uma expressão desse receptor considerada baixa quando comparada com a verificada entre os tumores de boca e orofaringe⁴⁸.

A relação entre a expressão elevada de EGFR em carcinomas de cabeça e pescoço, e o prognóstico dos pacientes, foi verificada por muitos autores⁴⁹⁻⁵⁰. Essa relação foi melhor estudada em pacientes tratados com radioterapia. O prognóstico ruim daqueles que apresentam hiperexpressão do EGFR, provavelmente está relacionado com a maior resistência aos efeitos da radioterapia.

O EGFR, devido às suas implicações em múltiplos passos do desenvolvimento dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, tem sido eleito como alvo terapêutico para essas neoplasias. Duas estratégias têm sido desenvolvidas para o tratamento desses tumores. O primeiro alvo é o bloqueio da atividade do EGFR, com a ocupação do mesmo com um anticorpo monoclonal (C225, cetuximab) na superfície da membrana plasmática, resultando em não ativação dos seus ligantes (EGF e TGF- α) e por conseguinte impedindo que seja iniciada a via sinalizadora da tirosino-quinase⁵¹.

O segundo alvo é o domínio intracelular do EGFR que pode ser ocupado por proteínas de baixo peso molecular que competem com a

adenosina trifosfato (ATP), impedindo dessa forma a ativação da via da tirosino-quinase. Exemplos dessas proteínas são o Gefitinib e o Erlotinib⁵¹.

Essas duas classes de inibidores da atividade do EGFR e das suas vias sinalizadoras, não apresentaram significativa atividade citotóxica contra CEC de cabeça e pescoço quando usadas como monoterapia. A associação de quimioterapia sistêmica com o cetuximab para pacientes com CEC recorrente ou metastático também apresentou resultados pouco animadores em relação a resposta terapêutica efetiva e melhora da sobrevida⁵².

A radiação ionizante aumenta a expressão do EGFR das células do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, o bloqueio desse receptor sensibiliza as células para os efeitos da radioterapia, tornando a associação de anticorpos anti-EGFR com essa modalidade terapêutica uma alternativa para o tratamento de CEC de vias aerodigestivas superiores⁵³⁻⁵⁴.

1.3 VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial)

O processo de invasão de uma neoplasia é dependente de um micro ambiente favorável, o acesso do tecido neoplásico a nutrientes e a oxigênio é fundamental para o êxito da infiltração dos tecidos vizinhos e muito facilitado pela formação de neovasos⁵⁵.

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos com origem no endotélio pré-existente, sendo o resultado de um complexo processo com múltiplas etapas, envolvendo a remodelação da matriz extra-celular, a

migração de células endoteliais, diferenciação capilar, anastomose e finalmente o desenvolvimento do lúmen vascular⁵⁵⁻⁵⁶.

Vasculogênese é a neoformação de vasos a partir de precursores embriológicos, localizados no estroma, de origem mesodérmica, tais como angioblastos e hemangioblastos. Angiogênese tumoral é o resultado desses dois eventos, ou seja, apesar da maior parte da neo-vascularização ter origem em vasos pré-existentes, células endoteliais precursoras, presentes no estroma em forma “latente”, podem contribuir para esse processo fundamental ao desenvolvimento das neoplasias⁵⁷⁻⁵⁸.

A parede dos vasos neo-formados é mais frágil que a dos vasos normais, dessa forma há uma facilitação para a invasão dos mesmos pelas células tumorais e, por conseguinte, o desenvolvimento de metástases linfonodais e à distância⁵⁹⁻⁶⁰. Atualmente o conhecimento acerca da angiogênese não se restringe à sua importância para o mecanismo de metástase, mas também para outros aspectos relevantes como o crescimento da neoplasia e o processo de invasão⁵⁵.

A taxa de proliferação das células endoteliais, em estado regular de funcionamento, é relativamente baixa. A regulação da angiogênese em tecidos que sediam uma neoplasia é estimulada por vários fatores, na maioria das vezes produzidos pela própria célula tumoral, que secreta fatores de crescimento como o VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), o fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator de crescimento derivado de hepatócitos⁶¹⁻⁶².

Entre os fatores associados à angiogênese tumoral destaca-se o VEGF. Essa molécula age como indutor de proliferação, diferenciação e migração de células endoteliais, além de aumentar a permeabilidade capilar⁶³⁻⁶⁴. Em decorrência da ação do VEGF também ocorre um incremento na sobrevivência das células endoteliais como resultado da prevenção da apoptose^{58,65}.

O VEGF foi associado a pior prognóstico em um estudo envolvendo apenas pacientes portadores de carcinomas de língua, sendo verificada também uma correlação direta entre alta expressão de VEGF e espessura da lesão, sugerindo um papel dessa proteína no processo de invasão³⁶. Uma meta-análise que avaliou o impacto da expressão por imunohistoquímica do VEGF no prognóstico de portadores de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço confirmou o pior prognóstico para os pacientes que apresentam expressão elevada dessa proteína⁶⁶.

O VEGF como alvo terapêutico tem sido avaliado em pesquisa básica e em ensaios clínicos, para algumas neoplasias, com os primeiros estudos clínicos conduzidos para câncer de cólon⁶⁷ e carcinoma renal⁶⁸. Estudos *in vitro* sugerem o aumento da sensibilidade à radiação das células endoteliais de carcinomas de cabeça e pescoço, quando é usado uma droga anti-VEGF, o bevacizumab⁶⁹⁻⁷⁰. Existem estudos clínicos em andamento testando a eficácia dessa droga associada à radioterapia no tratamento de CEC de cabeça e pescoço⁷¹.

1.4 FUNDAMENTOS DO ESTUDO

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra alvos moleculares definidos e fundamentais aos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das neoplasias malignas é um promissor campo de pesquisa clínica, sendo inclusive uma realidade no tratamento de algumas neoplasias, como as leucemias⁷², o câncer de mama⁷³ e mais recentemente, no tratamento de carcinomas de cabeça e pescoço⁷⁴. Entretanto, a utilização dessas modalidades de tratamento exige o conhecimento do perfil biológico desses tumores. O impacto desses marcadores biológicos como fatores associados ao prognóstico, e por conseguinte, com relevância na definição da terapêutica, não está completamente estabelecido pela literatura. Esse estudo visa a contribuir para o conhecimento do perfil de expressão desses marcadores em carcinomas recidivados de boca e orofaringe.

A recidiva de um CEC de boca ou de orofaringe muitas vezes se apresenta como um desafio no que diz respeito à melhor conduta terapêutica. A melhor opção de tratamento usualmente é a cirurgia de resgate, entretanto esses procedimentos são associados à elevada morbidade, e muitas vezes a um déficit funcional significativo. Este estudo visa também contribuir para a melhor seleção de pacientes para a realização desses procedimentos de alto custo e de alta morbidade. Parte-se de uma casuística de 111 pacientes submetidos à cirurgias de resgate em uma mesma instituição e com características clínicas semelhantes, todos apresentavam clinicamente apenas recidiva local de carcinoma epidermóide

de boca e orofaringe. Avaliou-se marcadores biológicos que apresentam relação direta com o processo de invasão das neoplasias, seja pela degradação da membrana basal e da matriz extracelular (Metaloproteinases 2 e 9), ou marcadores que interferem direta (VEGF) ou indiretamente (EGFR) com a angiogênese, ou associados à perda do controle do ciclo celular (EGFR).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo são:

1. Analisar fatores prognósticos em pacientes submetidos à cirurgia de resgate para recidivas locais de carcinomas epidermóides de boca e orofaringe;
2. Estudar a expressão das Metaloproteinases 2 e 9, do receptor para o fator de crescimento epidérmico (EGFR), e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) nesses tumores e verificar a associação desses marcadores biológicos com o prognóstico nessa amostra de pacientes.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Os prontuários de 174 pacientes que realizaram cirurgia de resgate para recidiva local isolada de carcinomas epidermóides de boca ou de orofaringe entre os anos de 1990 e 2004, no Hospital A.C. Camargo, foram revistos pelo autor. Foram incluídos apenas pacientes que o exame loco-regional classificava o estágio N como N0 e que não havia evidência de metástases à distância (cTNM). Todos os pacientes foram submetidos a cirurgias com intenção curativa. No entanto, de 63 casos não foi encontrado o bloco de parafina ou ele foi considerado inadequado. Esses casos foram excluídos, resultando em 111 casos para o estudo. O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital AC Camargo.

3.1.1 Dados demográficos

Oitenta e um pacientes eram do sexo masculino (73%) e trinta do sexo feminino (27%). Cento e um pacientes eram da raça branca (90,1%), 8 da raça negra (7,2%) e 2 da raça amarela (1,7%). A idade dos pacientes variou de 31 a 91 anos com mediana de 56 anos (Tabela 1).

3.1.2 Dados relativos ao tumor e ao tratamento prévio

O local do tumor primário foi o lábio em 10 casos (9,0%), a cavidade oral em 68 (61,3%) e a orofaringe em 33 (29,7%). Trinta e três pacientes (29,7%) foram tratados previamente com cirurgia, em 32 (28,8%) a terapêutica prévia consistiu de cirurgia associada à radioterapia adjuvante e em 46 (41,4%) o tratamento foi radioterapia exclusiva ou associada à quimioterapia baseada em cisplatina (Tabela 1).

Tabela 1 – População do estudo

Variável	Categoria	Número de casos (%)
Gênero	Masculino	81 (73,0)
	Feminino	30 (27,0)
Idade	<45	6 (5,4)
	45-60	75(67,6)
	>60	30 (27,0)
Raça	Branca	101 (90,1)
	Negra	8 (7,2)
	Amarela	2 (1,7)
Local do tumor	Lábio	10 (9,0)
	Cavidade oral	68 (61,3)
	Orofaringe	33 (29,7)
Tratamento Prévio	Cirurgia	33(29,7)
	Radioterapia +/- QT	46 (41,4)
	Cirurgia + RxT	32 (28,8)

A topografia mais comumente acometida na cavidade oral foi a língua com 27 casos, na orofaringe a maioria dos pacientes era portadora de tumores da tonsila palatina (Tabela 2).

Tabela 2 – Topografia do tumor em boca e orofaringe

Local do Tumor	Número de casos
Lábio	10
Soalho da boca	14
Língua oral	27
Mucosa Jugal	7
Gengiva inferior	4
Gengiva superior	3
Palato duro	3
Área Retromolar	10
Palato Mole	3
Base da língua	8
Tonsila palatina	22

O intervalo livre de doença, definido como o período entre a data do tratamento inicial e a data do diagnóstico da recidiva, variou de 0,89 a 140,9 meses com mediana de 6,87 meses. Sessenta e nove pacientes (62,2%) apresentaram recidiva antes de 1 ano do tratamento inicial (recidivas precoces), enquanto em 42 as recidivas foram diagnosticadas após 1 ano (tardias) (37,8%) (Tabela 3).

3.1.3 Estadiamento dos tumores

Foi utilizada a versão de 2002 do TNM para a classificação dos tumores por estágio clínico⁷⁵. O estadiamento clínico à apresentação antes do primeiro tratamento foi classificado como inicial (EC I ou II) em 26 casos (23,4%) e avançado (EC III ou IV) em 85 (76,6%). O estadiamento da recidiva manteve a mesma tendência de apresentação em fases avançadas de doença. Oitenta pacientes (72,1%) apresentavam recorrência local em estágio avançado (rEC III ou IV), enquanto 31 (27,9%) apresentavam-nas em estágio clínico inicial (rEC I ou II). A tabela 3 apresenta a distribuição do estágio clínico da recidiva e do intervalo livre de doença de acordo com o local do tumor.

Tabela 3 – Distribuição do estágio clínico da recidiva e do intervalo livre de doença de acordo com o local do tumor

Variável	Categoria	Lábio(%)	Cavidade Oral(%)	Orofaringe(%)
Estádio clínico da recidiva	rEC I/II	3 (30)	19 (27,9)	9 (27,3)
	rEC III/IV	7 (70)	49 (72,1)	24 (72,7)
Intervalo livre de doença	ILD < 1 ano	4 (40)	42 (61,8)	23 (69,7)
	ILD > 1 ano	6 (60)	26 (38,2)	10 (30,3)

3.1.4 Dados relativos à cirurgia de resgate

O tratamento cirúrgico desses pacientes consistiu de ressecção da lesão com margens tridimensionais, incluindo estruturas adjacentes de acordo com a necessidade em cada topografia, sem a realização de esvaziamento cervical em 55 casos (49,5%). Em 56 pacientes (50,5%) a cirurgia consistiu de esvaziamento cervical em monobloco com a ressecção do tumor recidivado. O esvaziamento foi unilateral em 51 casos e bilateral em cinco casos. Em vinte e quatro pacientes (42,9%) havia metástases ocultas diagnosticadas no exame anatomopatológico (pN+). As margens cirúrgicas após a cirurgia de resgate, estavam livres de neoplasia em 79 casos (71,2%), as margens estavam comprometidas ou foram consideradas exíguas em 32 casos (28,8%). Radioterapia adjuvante à cirurgia de resgate foi possível para 30 pacientes (27,0%). Para 7 pacientes foi realizado um segundo curso de radioterapia (6,3%), sendo que a maioria desses não havia recebido dose radical durante o tratamento inicial.

Após a ressecção do tumor recidivado, a reconstrução do defeito da mucosa com retalhos locais foi suficiente para a correção do defeito cirúrgico em 48 pacientes (43,2%), em quarenta e nove pacientes houve necessidade de rotação de um retalho miocutâneo (44,1%), para 1 paciente foi realizado retalho deltopeitoral de Backanjan e em 13 pacientes foi realizado retalho microcirúrgico (11,7%) (Tabela 4).

Tabela 4 – Dados da cirurgia de resgate

Variável	Categoria	Número de casos (%)
Tempo de hospitalização	Até 7 dias	60 (54,1)
	7-14 dias	32 (28,8)
	> 14 dias	19 (17,1)
Tipo de cirurgia	Ressecção local	56 (50,5)
	Cirurgia em monobloco	55 (49,5)
Esvaziamento Cervical	Unilateral	51 (91,1)
	Bilateral	5 (8,9)
Tipo de reconstrução	Retalhos locais	48 (43,2)
	Retalho miocutâneo	49 (44,1)
	Backanjian	1 (0,9)
	Retalho microcirúrgico	13 (11,7)
Complicações cirúrgicas	Não	58 (52,3)
	Infecção de ferida	24 (21,6)
	Fístula orocutânea	22 (19,8)
	Deiscência sutura	10 (9,0)
	Necrose parcial retalho	10 (9,0)
	Necrose total do retalho	3 (2,7)
	Sistêmicas	10 (9,0)
	Óbito no pós-operatório	2 (1,8)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Seleção dos blocos de parafina

Após a identificação dos blocos de parafina e das lâminas do exame anatomopatológico de cada um dos 111 casos, no arquivo do departamento de anatomia patológica do Hospital AC Camargo, todos foram revistos pelo mesmo patologista (Dr Clóvis Antônio Lopes Pinto [CALP], o co-orientador

desse estudo) para delimitação da área mais significativa de cada tumor e confecção das lâminas do “*Tissue Microarray*”.

3.2.2 Método de Tissue Microarray (TMA)

Os 111 tumores, previamente identificados pelo registro anatomopatológico, foram incluídos na construção de um bloco-receptor de parafina de TMA (Beecher Instruments, Silver Spring, MD), a partir de amostras colhidas do bloco-doador original, com agulha de 0,6 mm de diâmetro (TMArrayer punch MP10-0,6mm), após a prévia escolha e marcação circular da área representativa da neoplasia, a partir da lâmina de H.E. (hematoxolína-eosina) original. Os casos foram dispostos, no bloco receptor, em ordem numérica crescente e em duplicata. Realizamos 100 cortes histológicos seriados com 3µm de espessura e fixados em lâminas de vidro, com película adesiva (Microsystems Inc.).

Os cortes nos níveis 1, 10, 20 , 40, 60, 80 e 100 foram corados pela H.E. As lâminas foram examinadas no microscópio óptico por um observador (CALP) para avaliação da representatividade das células neoplásicas.

A Figura 1 demonstra parcialmente a distribuição microscópica dos *cores (fragmentos)* representativos dos tumores, em uma lâmina de H.E. do TMA.

Figura 1 – Lâmina do Tissue Microarray (Hematoxilina-eosina)

3.2.3 Análise Imunoistoquímica

Na análise imunoistoquímica, avaliou-se a expressão das proteínas metaloproteinases 2 e 9, do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

As reações imunoistoquímicas foram realizadas em duplicata nos cortes obtidos do bloco de TMA, totalizando 16 lâminas e 32 cores. A técnica contemplou a utilização do complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO®).

As lâminas foram previamente revestidas por solução de silano diluído em acetona. Os cortes histológicos de 3 micra, obtidos por microtomia

mecânica, foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol e submetidos à recuperação antigênica pelo calor com panela de pressão, utilizando-se tampão citrato 10mM pH 6.0.

Uma vez preparados os cortes, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol. Após esfriamento, por 20 minutos à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em água destilada. A seguir, promoveu-se o bloqueio da peroxidase endógena e imersão em solução salina tamponada com fosfatos (PBS).

Todas as lâminas foram incubadas com anticorpos primários diluídos em título pré-estabelecido, conforme tabela de anticorpos (Tabela 5). Procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário no título pré-estabelecido de 1:200. Os anticorpos foram diluídos em tampão PBS.

As reações são reveladas com solução de Diaminobenzidina (DAB. Sigma®), sensível à luz e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck®). As reações são acompanhadas de controles positivos (ausência do anticorpo primário) e negativos (ausência do anticorpo secundário). A tabela 5 apresenta os anticorpos utilizados e sua diluição. As reações imunoistoquímicas foram realizadas em 2 níveis para cada caso, portanto em quadruplicata para cada anticorpo utilizado.

Tabela 5 – Características dos kits dos anticorpos

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição
MMP-2	Neomarkers	Policlonal	1/200
MMP-9	Neomarkers	Policlonal	1/200
EGFR	Novocastra	EGFR-113	1/200
VEGF	Santa Cruz	C-1	1/200

Para o anticorpo MMP-2 foram utilizadas as lâminas dos níveis 4 e 20, MMP-9 níveis 6 e 7, VEGF níveis 17 e 18 e para EGFR os níveis 26 e 36.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (amplitude de 400x) e a expressão dos antígenos categorizada por um único observador (CALP) acompanhado pelo autor, de acordo com os seguintes critérios:

Grupo I = Negativo ou ausência de expressão;

Grupo II = Fracamente positivo (marcação irregular ou homogênea do fragmento com fraca intensidade da coloração);

Grupo III = Fortemente positivo (marcação regular ou homogênea do fragmento com forte intensidade da coloração).

A expressão dos antígenos foi considerada positiva nos casos de marcação citoplasmática e de membrana para as metaloproteinases 2 e 9 e para o VEGF, sendo considerada apenas a expressão de membrana para o EGFR. A figura 2 demonstra o exame imunoistoquímico em lâmina do tissue microarray.

Figura 2 – Lâmina do Tissue Microarray (VEGF)

3.3 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa estatístico SPSS (versão 10.0)⁷⁶. A análise de sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meier⁷⁷, e a significância entre as diferenças observadas para as categorias

de uma mesma variável foram analisadas pelo teste de Log-Rank. Outras correlações estatísticas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. A sobrevida global foi considerada como o tempo decorrido entre a cirurgia de resgate e o óbito ou a última informação conhecida. O tempo de sobrevida específica por câncer foi definido como o intervalo entre a data da cirurgia de resgate e a última informação objetiva de seguimento ou a morte causada pela doença. O modelo de riscos proporcionais de Cox⁷⁸ foi utilizado para calcular o risco de óbito multifatorial. Significância estatística foi determinada por valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

O tempo de hospitalização após a cirurgia de resgate variou de 1 a 60 dias com média de 10,2 e mediana de 7 dias. Complicações locais da cirurgia ocorreram em 53 pacientes (47,7%), sendo que, infecção da ferida operatória (21,6%) e fístula (19,8%) foram as mais frequentes.

Complicações sistêmicas em decorrência do procedimento cirúrgico ocorreram em 10 pacientes (9,0%), sendo a mais comum broncopneumonia. Dois pacientes morreram após a cirurgia de resgate, ambos em decorrência de complicações sistêmicas (1 caso de broncopneumonia e 1 caso de acidente vascular cerebral), portanto a mortalidade operatória nessa amostra de pacientes foi de 1,8% (Tabela 4).

O seguimento desses pacientes variou de 0,8 a 140,9 meses, com mediana de 11,9 meses. Para 12 pacientes não foi possível obter informações de seguimento (10,8%).

Ao final do tempo de seguimento do estudo, 47 pacientes (42,3%) estavam vivos e sem evidência de doença. Sessenta e quatro pacientes (57,7%) apresentavam nova recidiva da doença, sendo a maioria recidivas locais (43,2%). Metástases à distância ocorreram em apenas 9 pacientes (8,1%). Em 17 casos ocorreu recidiva regional (15,3%). A tabela 6 apresenta a distribuição da nova recidiva de acordo com o sítio de ocorrência.

Tabela 6 – Local da nova recidiva

Local da recidiva	Casos (%)
Não	47 (42,3)
Local	40 (36,0)
Pescoço homolateral	4 (3,6)
Pescoço contra-lateral	5 (4,5)
Distância	4 (3,6)
Local + Regional	5 (4,5)
Local + Distância	1 (0,9)
Regional + Distância	3 (2,7)
Local + Regional + Distância	2 (1,8)

O tempo mediano de sobrevida livre de recidiva foi de 9,6 meses. Entre os 64 pacientes que apresentaram nova recidiva, em vinte e um casos (18,9%) não foi possível nenhum tratamento. Cinco pacientes (4,5%) foram tratados com radioterapia e 12 receberam quimioterapia paliativa (10,8%). Para 26 pacientes (23,4%) foi realizada uma segunda cirurgia de resgate. Dentre os pacientes submetidos a segunda cirurgia de resgate, ao final do tempo de seguimento nenhum estava vivo e sem doença. Dois pacientes estavam vivos com doença em atividade (nova recorrência local) e dezenove pacientes morreram em decorrência do câncer (73,1%). A sobrevida global dessa amostra de pacientes foi de 58,8% em 1 ano, 29,4% em 3 anos e de 23,4% em 5 anos (Figura 3).

Figura 3 – Sobrevida global

A sobrevida específica por câncer para toda a amostra foi de 68,3% em 1 ano, 37,1% em 3 anos e de 31,7% em 5 anos (Figura 4).

Figura 4 – Sobrevida específica por câncer

Os dados apresentados a seguir referem-se à sobrevivida específica por câncer. Não houve diferença estatisticamente significativa nas taxas de sobrevivida de acordo com as variáveis sexo e raça (Tabela 11).

Decidiu-se dividir a amostra pela faixa etária entre pacientes com menos de 45 anos, pacientes entre 45 e 60 anos e pacientes com mais de 60 anos. A sobrevivida em 3 anos foi nula para os pacientes com menos de 45 anos. A sobrevivida atuarial em 3 anos para aqueles entre 45 e 60 anos foi de 45,9%, já os pacientes com idade superior a 60 anos obtiveram taxa de sobrevivida em 3 anos de 20,7%. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,02$) (Tabela 11) (Figura 5).

Figura 5 – Sobrevida específica por câncer de acordo com a faixa etária.

O tipo de tratamento inicialmente realizado não apresentou impacto significativo no prognóstico. Pacientes previamente submetidos à cirurgia isolada apresentaram o melhor resultado de sobrevida específica por câncer, 49,8% em 3 anos. Quando o tratamento prévio foi radioterapia exclusiva, a sobrevida em 3 anos foi de 28,2%. Pacientes tratados previamente com ambas modalidades terapêuticas obtiveram sobrevida específica de 28,9% em 3 anos ($p=0,12$) (Tabela 11) (Figura 6).

Figura 6 – Sobrevida específica por câncer de acordo com o tratamento prévio

O local do tumor primário também não teve impacto no prognóstico desses pacientes. A sobrevida específica por câncer tendeu a ser pior para os portadores de carcinomas de orofaringe, 30,1% em 3 anos, quando comparado a 40,2% observada para os portadores de carcinomas da cavidade oral e 37,5% para os com carcinomas do lábio. Essa diferença não se mostrou estatisticamente significativa ($p=0,84$) (Tabela 11) (Figura 7).

Figura 7 – Sobrevida específica por câncer de acordo com o local do tumor.

As margens de ressecção cirúrgica estavam livres em mais de 70% dos pacientes, esse grupo apresentou melhor resultado de sobrevida (38,7% estavam vivos em 3 anos). Os pacientes que apresentavam margens cirúrgicas exíguas ou comprometidas tiveram pior prognóstico, 26,5% de sobrevida em 3 anos. Porém, essa diferença não alcançou significância estatística ($p=0,79$) (Tabela 11).

O estágio clínico da recidiva (rEC) foi uma das variáveis clínicas significativas para o prognóstico, em análise univariada, para esse grupo de pacientes. Os portadores de recidivas em estádios iniciais (rEC I e II)

obtiveram sobrevida específica por câncer em 3 anos de 42,3%. Pacientes que apresentavam doença em estágio mais avançado (rEC III e IV) alcançaram sobrevida em 3 anos de 31,2%. ($p=0,04$) (Tabela 11) (Figura 8).

Figura 8 – Sobrevida específica por câncer de acordo com o estágio clínico da recidiva

O intervalo livre de doença foi um fator decisivo para o resultado obtido com a cirurgia de resgate. As recidivas ocorridas, após 1 ano do tratamento inicial, foram associadas a maiores taxas de sobrevida (51,2% dos pacientes incluídos nesse subgrupo estavam vivos ao final de 3 anos de seguimento). As recidivas precoces foram associadas a pior prognóstico, com sobrevida específica em 3 anos de 29,6% ($p=0,01$) (Tabela 11) (Figura 9).

Figura 9 - Sobrevida específica por câncer de acordo com o intervalo livre de doença

Para análise de sobrevida específica por câncer, os marcadores biológicos estudados foram agrupados, no que diz respeito à sua expressão no Tissue Microarray (TMA), em positivo (fraco ou forte) e negativo quando não houve qualquer expressão.

Não houve diferença na expressão dos marcadores, em relação à topografia do tumor primário, para as proteínas MMP-2, MMP-9 e VEGF. No entanto, houve um maior número de casos positivos para EGFR em carcinomas de cavidade oral quando comparados aos carcinomas do lábio e da orofaringe, e essa diferença alcançou significância estatística ($p=0,03$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Distribuição da expressão do EGFR, VEGF, MMP-2 e MMP-9 de acordo com o local do tumor

Variável	Categoria	Lábio	Cavidade Oral	Orofaringe	<i>p</i>
EGFR	Negativo	5(50)	10(15,4)	9(29)	0,03
	Positivo	5(50)	55(84,6)	22(71,0)	
MMP-2	Negativo	1(10)	16(23,9)	3(9,7)	0,18
	Positivo	9(90)	51(76,1)	28(90,3)	
MMP-9	Negativo	0	11(16,7)	5(16,1)	0,38
	Positivo	10(100)	55(83,3)	26(83,9)	
VEGF	Negativo	2(20)	13(19,4)	7(21,2)	0,98
	Positivo	8(80)	54(80,6)	26(78,8)	

Para trinta e dois casos, houve a disponibilidade dos blocos de parafina do tumor primário e do tumor recidivado, sendo que em 1 caso para o EGFR e em 1 caso para a MMP-9 não havia material adequado para a confecção do Tissue Microarray. Observou-se que houve uma tendência de maior expressão desses marcadores na recidiva que nos tumores primários, verificada pela discordância de percentual de hiperexpressão dos marcadores entre os tumores primários e os tumores recidivados. A diferença de expressão no tumor primário e no tumor recidivado de um mesmo paciente pode ser exemplificada pela distribuição do EGFR: Dezesete, entre os trinta e um tumores primários (54,8%), eram positivos para EGFR, enquanto 27 entre os 31 tumores recidivados apresentaram hiperexpressão desse receptor (87,1%) (Tabela 8).

Tabela 8 – Distribuição da expressão do EGFR, VEGF, MMP-2 e MMP-9 no tumor primário e no tumor recidivado.

Marcador	Categoria	Primário	Recidiva
EGFR	Negativo	14	4
	Positivo	17	27
MMP-2	Negativo	13	11
	Positivo	19	21
MMP-9	Negativo	10	3
	Positivo	21	28
VEGF	Negativo	14	8
	Positivo	18	24

Avaliou-se também a correlação entre a expressão desses marcadores biológicos com as variáveis clínicas que se mostraram significativas em análise univariada, estágio clínico da recidiva e intervalo livre de doença. Em relação a essas variáveis clínicas, houve uma tendência de maior expressão dos marcadores nas categorias de pior prognóstico: estágio clínico da recidiva III e IV e recidivas precoces; no entanto, a associação não alcançou significância estatística em nenhuma dessas variáveis (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9 – Expressão do EGFR, VEGF, MMP-2 e MMP-9 de acordo com o intervalo livre de doença

Marcador	Categoria	ILD< 1ano (%)	ILD> 1ano (%)	p
EGFR	Negativo	13 (11,4)	11 (28,2)	0,29
	Positivo	54 (80,6)	28 (71,8)	
MMP-2	Negativo	14 (20,9)	6 (14,6)	0,41
	Positivo	53 (79,1)	35 (85,4)	
MMP-9	Negativo	9 (13,2)	7 (17,9)	0,51
	Positivo	59 (86,8)	32 (35,2)	
VEGF	Negativo	16 (23,2)	6 (14,6)	0,27
	Positivo	53 (76,8)	35 (85,4)	

Tabela 10 – Expressão do EGFR, VEGF, MMP-2 e MMP-9 de acordo com o estágio clínico da recidiva

Marcador	Categoria	rEC I/II (%)	rEC III/IV (%)	p
EGFR	Negativo	9 (31,0)	15 (19,5)	0,20
	Positivo	20 (69,0)	62 (80,5)	
MMP-2	Negativo	4 (13,8)	16 (20,3)	0,44
	Positivo	25 (86,2)	63 (79,7)	
MMP-9	Negativo	5 (16,7)	11 (14,3)	0,75
	Positivo	25 (83,3)	66 (85,7)	
VEGF	Negativo	9 (30,0)	13 (16,3)	0,10
	Positivo	21 (70,0)	67 (83,8)	

A expressão por imunohistoquímica do EGFR não foi aferida em 5 casos (4,5%) devido a dificuldades técnicas no TMA. Não houve expressão do marcador em 24 casos (21,6%), em 82 casos (73,9%) houve expressão do EGFR na membrana. (Tabela 7). A figura 10 demonstra um fragmento do tissue microarray do EGFR quando positivo com um aumento de 100 vezes.

Figura 10 – Fragmento do tissue microarray EGFR positivo (100x)

O EGFR apareceu como um forte indicador de mau prognóstico, quando apresentou expressão nesses tumores. Pacientes que, no exame imunohistoquímico, os tumores expressaram esse receptor de membrana para o fator de crescimento epidérmico obtiveram sobrevida específica em 3

anos de 27,2%. Quando o EGFR não apresentava expressão alguma (negativo), a sobrevida em 3 anos foi de 64,3%. Essa diferença foi estatisticamente significativa em análise univariada ($p=0,001$) (Tabela 11) (Figura 11).

Figura 11 – Sobrevida específica por câncer de acordo com a expressão do EGFR.

A metaloproteinase 2 apresentou expressão elevada na maioria dos tumores. A expressão da MMP-2 foi positiva em 88 pacientes (79,3%) e negativa em 20 casos (18,0%). Em apenas 3 casos (2,7%) não houve material adequado para avaliar a expressão dessa proteína. Em relação à expressão da metaloproteinase 9 o padrão foi semelhante ao da MMP-2, em

apenas 16 casos foi negativa (Tabela 7). As Figuras 12 e 13 apresentam fragmentos do tissue microarray com MMP-2 e MMP-9 positivos, respectivamente, com aumento de 400 vezes.

Figura 12 – Fragmento do tissue microarray MMP-2 positivo (400x).

Figura 13 – Fragmento do tissue microarray MMP-9 positivo (400x).

As metaloproteinases 2 e 9 quando expressas nesses tumores foram associadas a taxas de sobrevida menores que as observadas nos casos negativos. No entanto, para ambas as proteínas essa diferença não alcançou significância estatística ($p=0,83$ e $p=0,15$, respectivamente) (Tabela 11) (Figuras 14 e 15).

Figura 14 – Sobrevida específica por câncer de acordo com a expressão da MMP-2

Figura 15 – Sobrevida específica por câncer de acordo com a expressão da MMP-9

O TMA para o VEGF demonstrou que a maioria dos tumores dessa amostra de pacientes expressou essa proteína. Oitenta e oito pacientes expressaram o VEGF (79,3%), em apenas 1 caso não foi possível avaliar esse marcador por TMA, por deficiência no material coletado (Tabela 7). A figura 16 demonstra um fragmento do tissue microarray positivo para o VEGF com um aumento de 100 vezes.

Figura 16 – Fragmento do tissue microarray VEGF positivo (100x)

O VEGF não se mostrou como marcador associado a diferenças no resultado do tratamento. As taxas de sobrevida foram praticamente semelhantes entre os dois grupos (negativo e positivo) nessa amostra de pacientes (Tabela 11) (Figura 17).

Figura 17 – Sobrevida específica por câncer de acordo com a expressão do VEGF

A tabela 11 apresenta os resultados da análise estatística univariada para as principais variáveis clínicas, e em relação à expressão dos marcadores biológicos estudados, levando em consideração a sobrevida específica por câncer em 3 anos.

Tabela 11 – Análise univariada de sobrevida específica por câncer de acordo com variáveis demográficas, clínicas e expressão do EGFR, VEGF, MMP-2 e MMP-9

Variável	Categoria	n	Sobrevida em 3 anos (%)	p
Gênero	Masculino	81	37,5	0,75
	Feminino	30	35,4	
Idade	<45 anos	6	0	0,02
	45-60 anos	75	45,9	
	> 60 anos	30	20,7	
Local do Tumor	Lábio	10	37,5	0,84
	Cavidade Oral	68	40,2	
	Orofaringe	33	30,1	
Estádio Clínico da recidiva	rEC I/II	31	42,3	0,04
	rEC III/IV	80	31,2	
Intervalo livre de doença	< 1 ano	69	29,6	0,01
	> 1 ano	42	51,2	
Margens cirúrgicas	Livres	79	38,7	0,79
	Positivas/exíguas	32	26,5	
EGFR	Negativo	24	64,3	0,001
	Positivo	82	27,2	
MMP-2	Negativo	20	47,2	0,83
	Positivo	68	33,2	
MMP-9	Negativo	16	66,3	0,15
	Positivo	91	32,3	
VEGF	Negativo	22	37,6	0,86
	Positivo	88	35,8	

Em análise multivariada apenas o intervalo livre de doença e a expressão de EGFR foram associadas a maior risco de óbito. Pacientes com intervalo livre de doença superior a 1 ano e que não expressaram EGFR apresentaram melhor prognóstico. A Tabela 12 apresenta essas variáveis e o risco relativo (hazard ratio) a elas associado.

Tabela 12 – Análise Multivariada de sobrevida

Variável	Categoria	Risco relativo	Intervalo de Confiança
EGFR	Negativo	1,0	Referência
	Positivo Fraco	3,97	1,52-10,36
	Positivo Forte	4,20	1,56-11,28
Intervalo livre de doença	> 1 ano	1,0	Referência
	< 1 ano	1,97	1,05-3,69

Foram analisadas as taxas de sobrevida para os pacientes considerados de melhor e de pior prognóstico, de acordo com o resultado obtido pela análise multivariada. Para os pacientes que apresentaram recidivas tardias (ILD > 1ano) e EGFR negativo, considerados de melhor prognóstico e que compunham um grupo de 11 pacientes, a sobrevida global em 3 anos foi de 65,5% e a sobrevida específica por câncer foi de 80%. Para

os pacientes com recidivas precoces (ILD < 1 ano) e EGFR positivo, (pior prognóstico), foram 54 pacientes, a sobrevida global em 3 anos foi de 16,4% e a sobrevida específica por câncer foi de 20,7%. Se for considerado ainda o estágio clínico da recidiva, variável significativa em análise univariada, e forem agrupados então os pacientes com os piores fatores prognósticos (ILD < 1ano, rEC III ou IV e EGFR positivo), compondo um grupo de 41 pacientes, será encontrada uma taxa de sobrevida global em 3 anos de 14,4% e taxa de sobrevida específica por câncer de 19,5%. Nesse último grupo de pacientes, apenas 3 estavam vivos e sem doença ao final do seguimento.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os portadores de carcinomas recidivados da boca ou da orofaringe constituem-se em um desafio para a equipe médica que realiza seu seguimento clínico. Quando ocorre recidiva local ou loco-regional dessas neoplasias, muitas vezes o diagnóstico é difícil. A fibrose, decorrente do tratamento inicial, dificulta, em muitos casos, o diagnóstico precoce de uma recidiva. Os exames clínico e endoscópico geralmente são menos acurados, em decorrência de alterações clínicas como a dor crônica, ou de limitações anatômicas para o exame, como por exemplo o trismo. A definição da ressecabilidade em muitos casos não é possível com base apenas em dados clínicos e radiológicos. A melhor conduta terapêutica para esses pacientes, tem sido considerada a cirurgia de resgate, a despeito dos resultados modestos de sobrevida^{11,18}.

O tratamento prévio não apresentou impacto sobre o prognóstico nessa série de pacientes. Apesar do melhor resultado de sobrevida para aqueles submetidos à cirurgia isoladamente (49,8% de sobrevida específica por câncer em 3 anos), essa diferença não se mostrou significativa. Este estudo sugere que, mesmo para pacientes submetidos a tratamento prévio com cirurgia e radioterapia adjuvante, a cirurgia de resgate pode ser oferecida como alternativa terapêutica. Para alguns autores,⁷⁹⁻⁸⁰ não há indicação de qualquer tratamento de resgate para esses pacientes, pois já foram utilizadas previamente as melhores estratégias terapêuticas. Evidentemente,

essa parece ser uma estratégia equivocada já que um grupo selecionado de pacientes pode realmente beneficiar-se do tratamento cirúrgico¹¹.

O intervalo livre de doença, variável que em estudo prévio mostrou-se significativa para definição dos resultados de sobrevida^{11,18}, na maioria dos casos foi inferior a 1 ano. Em muitos pacientes submetidos à radioterapia, na verdade esse intervalo foi nulo, isto é, houve persistência de doença devido à falta de resposta ao tratamento.

Para os pacientes com recidivas precoces ou persistência da doença, outros estudos⁸¹⁻⁸² demonstraram que as chances de sobrevida e mesmo controle loco-regional são menores em comparação aos pacientes que alcançam períodos de sobrevida livre de doença mais prolongados. Para essa casuística, o intervalo livre de doença também foi confirmado como variável decisiva para o resultado do tratamento, sendo que os pacientes com recidivas em intervalo inferior a 1 ano do tratamento inicial apresentaram pior prognóstico. No entanto, a cirurgia de resgate é considerada, por alguns autores, a única modalidade terapêutica com intenção curativa que pode ser oferecida para a maioria desses pacientes¹¹⁻¹².

O desafio imposto ao cirurgião de cabeça e pescoço, ao radioterapeuta e ao oncologista clínico é decidir para quais pacientes deve ser oferecida a cirurgia de resgate, quando se leva em consideração que o prognóstico desses pacientes é reservado⁸³, a morbidade da cirurgia de resgate é elevada^{12,84} e os custos envolvidos nesses procedimentos podem ser maiores que os de outras alternativas de tratamento¹².

Apesar dos problemas já apontados anteriormente, a cirurgia de resgate oferece aos pacientes elegíveis (aqueles com tumores ressecáveis e que se apresentem em condições clínicas favoráveis - Karnofsky Performance Status [KPS] >70) uma maior chance de controle loco regional e sobrevida que as outras alternativas terapêuticas¹¹⁻¹².

A escolha entre cirurgia de resgate ou tratamento paliativo pode ser tomada com base nas variáveis clínicas que reconhecidamente têm impacto no prognóstico: estágio clínico da recidiva (rEC) e intervalo livre de doença (ILD). Pacientes com doença em estágio clínico inicial (rEC I e II) e recidivas com ILD superior a um ano são considerados de melhor prognóstico e há poucas objeções à indicação de uma cirurgia de resgate. Entretanto, para aqueles com ILD inferior a um ano e recidivas com estágio avançado (rEC III e IV), apesar da cirurgia de resgate ser a única possibilidade atual de tratamento com intenção curativa, a sua indicação permanece controversa⁸⁵. Uma vez que os indicadores prognósticos clínicos e anatomopatológicos não são suficientes para aprimorar o processo de decisão clínica; é necessário investigar novos elementos para fundamentar essa decisão. O estudo de marcadores biológicos, nesta tese de doutoramento, visa a contribuir para a definição da melhor terapêutica a ser empregada para esse grupo de pacientes.

A expressão do receptor para o fator de crescimento epidérmico (EGFR) foi associada ao prognóstico nessa amostra. Pacientes que não expressavam EGFR apresentaram melhor resultado após a cirurgia de resgate, com sobrevida específica por câncer de 64,3% em 3 anos,

enquanto aqueles que expressaram essa proteína alcançaram sobrevida em 3 anos de apenas 27,2%. A expressão elevada do EGFR foi associada ao aumento de até 4,2 vezes no risco de óbito em análise multivariada.

Ang et al.⁵⁰ avaliaram a influência da expressão imunoistoquímica do EGFR em pacientes portadores de carcinomas de cabeça e pescoço tratados com radioterapia como parte de um estudo fase III conduzido pelo RTOG (Radiation Therapy Oncology Group). Foram avaliados 155 pacientes portadores de tumores de cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe. A expressão elevada do EGFR teve relação direta com o resultado do tratamento, sendo associada a pior resultado de sobrevida global e sobrevida livre de doença, além de pior resultado em controle loco-regional. Em análise multivariada a expressão elevada desse receptor foi um fator independente significativo para o prognóstico.

Chen et al.⁴⁹ estudaram a expressão do EGFR e sua relação com o prognóstico, em uma amostra de 59 pacientes portadores de CEC de cavidade oral tratados com cirurgia associada à radioterapia para casos considerados com maior risco de recidiva. Hiper-expressão do EGFR foi associado a piores resultados de sobrevida global em análise univariada e multivariada. Nesse estudo também foi verificada uma relação direta entre hiper-expressão de EGFR e parâmetros clínicos como estádios T e N e presença de extravazamento capsular da metástase linfonodal. Demiral et al. também demonstraram associação entre a expressão do EGFR com pior prognóstico para pacientes portadores de CEC de laringe⁸⁶.

O pior prognóstico dos pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço, com elevada expressão de EGFR, pode ter relação com resistência ao tratamento com radioterapia. Com base nessa hipótese, foi conduzido um estudo fase III, comparando radioterapia (RT) exclusiva e RT associada a um anticorpo anti-EGFR, o cetuximab, para portadores de CEC de orofaringe, laringe ou hipofaringe em estádios clínicos III ou IV⁷⁴. Foram recrutados para o estudo 213 pacientes no braço controle (radioterapia exclusiva) e 211 pacientes para o braço que associava cetuximab à radioterapia. O perfil de expressão por imunohistoquímica do EGFR foi semelhante nos dois grupos. Houve melhor controle loco-regional, melhor sobrevida livre de progressão de doença e melhor sobrevida global para pacientes do braço do estudo sob investigação: associação de radioterapia com cetuximab. Esse estudo vem ratificar a importância do EGFR no prognóstico de pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço, além de demonstrar a eficácia da estratégia utilizada para tratamento de um grupo específico de pacientes que teria pior prognóstico, se fosse tratado apenas com a modalidade terapêutica escolhida nesse ensaio clínico – radioterapia exclusiva⁷⁴.

A análise da expressão do EGFR, por meio de exame imunohistoquímico, no espécime da biópsia da recidiva, pode ser útil para a definição terapêutica de pacientes portadores de CEC recidivado localmente de boca e orofaringe. Este parece ser o primeiro estudo que avalia o impacto desse marcador no prognóstico nesse grupo específico de pacientes. Os outros estudos a que tivemos acesso não estudaram pacientes portadores

de tumores recidivados. Confirmamos o mau prognóstico desses pacientes como verificado nos estudos com pacientes sem tratamento prévio. O exame imunoistoquímico para avaliar a expressão do EGFR pode ser útil para selecionar pacientes candidatos à cirurgia de resgate. Aqueles que não expressam essa proteína podem alcançar melhores resultados de sobrevida, já os que hiperexpressam o EGFR apresentam pior prognóstico e são piores candidatos para esses procedimentos.

Nessa amostra de pacientes a expressão das metaloproteinases 2 e 9 estava presente na maioria dos tumores e houve uma relação da sua hiperexpressão com os resultados do tratamento. Pacientes com tumores, que expressaram essas proteínas, obtiveram resultados piores de sobrevida. Entretanto, para ambas as enzimas essa diferença não alcançou significância estatística.

Kim et al.³⁶ avaliaram 38 pacientes com carcinomas de língua de forma retrospectiva e verificaram que a hiperexpressão das Metaloproteinases 2 e 9 ocorreu na maioria dos seus pacientes, mas não houve correlação com os dados de sobrevida e controle loco-regional. Katayama et al.³¹, igualmente não verificaram associação da hiperexpressão da MMP-2 por imunoistoquímica e o prognóstico de 53 pacientes portadores de carcinomas de cavidade oral. Nessa mesma série, pacientes com elevada expressão de MMP-9 obtiveram piores resultados de sobrevida específica por câncer quando comparados com aqueles sem qualquer expressão. Yorioka et al.³⁵ encontraram uma correlação entre atividade enzimática elevada das MMPs-2 e 9 e a sobrevida livre de doença em carcinomas de boca.

Ruokolainen et al.⁸⁷ estudaram o nível sérico da MMP-9 em 67 pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço e verificaram que pacientes com elevados níveis séricos dessa proteína apresentaram sobrevida específica por câncer inferior (40% em 5 anos) aos pacientes com baixos níveis séricos (69% em 5 anos), essa diferença apresentou diferença estatisticamente significativa.

Alguns ensaios clínicos foram publicados com a utilização de inibidores das MMPs para o tratamento de neoplasias malignas, no entanto apresentaram resultados pouco promissores. Levin et al.⁸⁸, conduziram um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e controlado para avaliar o impacto de um inibidor das MMPs (marimastat) no tratamento do glioblastoma multiforme. Os autores não verificaram qualquer benefício na duração do tempo de sobrevida, nem na qualidade de vida entre os dois grupos. Um estudo fase II, avaliando a eficácia dessa mesma droga em melanoma cutâneo, verificou apenas atividade modesta desse inibidor das MMPs contra essa neoplasia maligna⁸⁹.

A hiperexpressão do VEGF é verificada na maioria dos estudos que analisam essa proteína em carcinoma de cabeça e pescoço⁶⁶. Kyzas et al.⁹⁰, avaliaram a expressão do VEGF em 36 pacientes portadores de carcinomas de boca e de laringe. Verificaram que essa proteína, quando hiperexpressa, era associada a maior risco de óbito em análise multivariada, sendo a única variável independente para a definição do prognóstico.

Foi publicada, recentemente, uma meta-análise⁶⁶ de estudos que relacionam o VEGF com carcinomas de vias aerodigestivas superiores.

Confirmou-se a relação da expressão elevada desse fator de crescimento, por meio de exame imunoistoquímico, com os resultados de sobrevida desses pacientes, sendo a hiperexpressão do VEGF associada a pior prognóstico.

Neste estudo, não houve diferenças significativas nos resultados de sobrevida específica por câncer entre pacientes que expressaram ou que não expressaram VEGF. Essa proteína tem uma associação clara, nos estudos publicados, com o estágio N⁶⁶. Neste estudo só foram incluídos pacientes com tumores em estágio clínico N0, além disso, a literatura apresenta a associação do VEGF com o prognóstico de pacientes não submetidos a tratamento previamente, enquanto nessa amostra estão incluídos apenas pacientes com tumores recidivados e submetidos a tratamento de resgate com intenção curativa.

Em um estudo realizado no Hospital do Câncer AC Camargo⁹¹ com pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço sem tratamento prévio, que está incluído na meta-análise de Kyzas et al.⁶⁶, foi confirmada a relação desse marcador com o prognóstico. Na maioria dos casos dessa amostra havia metástases para linfonodos cervicais no momento do diagnóstico. Esses dados de estudo anterior, com pacientes não tratados previamente, e que foram avaliados em nossa instituição, quando comparados com os dados negativos desse estudo, podem sugerir que o VEGF é um marcador mais importante para definição do prognóstico no tumor primário, principalmente para aqueles com metástases cervicais.

Entre os 32 pacientes onde foi possível avaliar a expressão dos marcadores no tumor primário e na recidiva, houve uma tendência de maior percentual de expressão elevada dessas proteínas na recidiva que nos tumores primários, ou seja, o tumor primário pode não expressar determinado marcador e o tumor recidivado expressá-lo. Essa diferença de expressão foi mais significativa na avaliação do EGFR. O estudo desse marcador na biópsia dos tumores recidivados pode ser significativo para a definição da conduta terapêutica, visto que a expressão do mesmo pode sofrer alterações como demonstrado nessa amostra de pacientes, sugerindo que clones resistentes ao tratamento inicial podem ser os responsáveis pela recidiva. Com base nos resultados desse estudo, sugere-se que o exame imunoistoquímico para detecção da expressão do EGFR seja feito no espécime da biópsia do tumor recidivado, para que seja utilizado como auxiliar na definição da melhor conduta terapêutica para esses pacientes, com o intuito de selecionar os melhores candidatos para o melhor tratamento com intenção curativa – a cirurgia de resgate.

A pergunta que suscitou essa tese de doutoramento foi: Os resultados do tratamento em relação à sobrevida, compensam a morbidade e os custos associados às cirurgias de resgate para todos os pacientes com tumores ressecáveis, ou apenas para um grupo selecionado de portadores de recidivas locais de CEC de boca e orofaringe?

Este estudo nos oferece algumas ferramentas importantes para decidir a conduta frente a esses pacientes e responder a essa pergunta. Os resultados deste estudo sugerem que os pacientes portadores de recidivas

locais de carcinomas de boca e orofaringe podem ser estratificados entre pacientes de melhor e pior prognóstico com base em informações clínicas simples e disponíveis ao diagnóstico (estádio clínico da recidiva e intervalo livre de doença) que associadas ao exame imunoistoquímico do EGFR, podem ser muito úteis na definição da melhor conduta terapêutica. Sendo assim, sugerimos o seguinte algoritmo (Figura 18) para pacientes portadores de recidiva local de carcinomas epidermóides ressecáveis de boca e orofaringe:

Legenda: ILD, intervalo livre de doença; rEC, estágio clínico da recidiva

Figura 18 - Proposta de algoritmo de conduta em pacientes portadores de recidiva local de carcinoma de boca e orofaringe.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. O intervalo livre de doença foi a variável clínica mais importante nesta amostra de pacientes para definição do risco de recorrência e óbito. Pacientes que apresentaram recidivas precoces, antes de 1 ano do tratamento inicial, tiveram pior prognóstico;
2. O EGFR, quando avaliado por imunoistoquímica, demonstrou neste estudo, ser um marcador de prognóstico para pacientes com doença recidivada submetidos à cirurgia de resgate. A expressão elevada dessa proteína foi associada a maior risco de óbito;
3. As metaloproteinases 2 e 9 apresentam taxa elevada de hiperexpressão em carcinomas de boca e orofaringe recidivados localmente. Os pacientes que não apresentam expressão dessas proteínas tendem a alcançar melhor resultado de sobrevida, porém as diferenças nas taxas de sobrevida não alcançaram significância estatística;
4. O VEGF apresentou-se hiperexpresso em 80% dos pacientes dessa amostra e não houve diferença significativa nos resultados de sobrevida entre os que expressaram essa proteína e aqueles com ausência de expressão desse marcador.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. *Incidência de câncer no Brasil: estimativa 2006*. Rio de Janeiro: INCA; 2005.
2. Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, Fava AS, Torloni H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case control study. *Int J Cancer* 1989;43:992-1000.
3. Curado MP, Martins E. Incidência e mortalidade dos cânceres de cabeça e pescoço no Brasil. *Rev Bras Cir Cabeça e Pescoço* 2006;35:136-41.
4. Pintos J, Franco EL, Oliveira BV, Kowalski LP, Curado MP, Dewar R. Mate, coffee, and tea consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in southern Brazil. *Epidemiology* 1994;5:583-90.
5. Bernier J, Dometge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lafebvre JL, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M, Cognetti F, Bourhis J, Kirkpatrick A, van Glabbeke M; European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 22931. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 2004;350:1945-52.
6. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M, Machtay M, Ensley JF, Chao KS, Schultz CJ, Lee N, Fu KK; Radiation Therapy Oncology Group 9501 / Intergroup. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2004;350:1937-44.

7. Denis F, Goraud P, Bardet E, Alfonsi M, Sire C, Germain T, Bergerot P, Rhein B, Tortochaux J, Calais G. Final results of the 94-01 French Head and Neck Oncology and Radiotherapy Group randomized trial comparing radiotherapy alone with concomitant radiochemotherapy in advanced-stage oropharynx carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22:69-76.
8. Boyle J, Patel S, Shah JP. Management of oral and oropharyngeal cancers. *Oral Dis* 2003;9:109-11.
9. Kowalski LP, Bagietto R, Lara JR, Santos RL, Silva JF, Magrin J. Prognostic significance of the distribution of neck node metastasis from oral carcinoma. *Head Neck* 2000;22:207-14.
10. Carvalho AL, Magrin J, Kowalski LP. Sites of recurrence in oral and oropharyngeal cancers according to the treatment approach. *Oral Dis* 2003;9:112-18.
11. Agra IM, Carvalho AL, Kowalski LP, de Campos OD, Martins EP, Magrin J, Kowalski LP. Prognostic factors in salvage surgery for recurrent oral and oropharyngeal cancer. *Head Neck* 2006;28:107-13.
12. Goodwin WJ Jr. Salvage surgery for patients with recurrent squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: When do the ends justify the means. *Laryngoscope* 2000;110(Suppl 93):1-18.
13. Levendag PC, Meeuwis CA, Visser AG. Re-irradiation of recurrent head and neck cancers: external and/or interstitial radiation therapy. *Radiother Oncol* 1992;23:6-15.
14. Kasperts N, Slotman B, Leemans CR, Langendijk JA. A review of re-irradiation for recurrent and second primary head and neck cancer. *Oral Oncol* 2005;41:225-43.

15. Wang CC. To irradiate or not to irradiate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;25:953-59.
16. Colevar AD. Chemotherapy options for patients with metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2006;24:2644-652.
17. D`Cruz AK, Robinson MH, Biel MA. mTHPC-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: a multicenter study of 128 patients. *Head Neck* 2004;26:232-40.
18. Agra IMG. *Fatores prognósticos em carcinomas epidermóides recorrentes de boca e orofaringe submetidos à cirurgia de resgate*. [Dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2003.
19. Rosenthal EL, Matrysian LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck* 2006;28:639-48.
20. Mueller MM, Fusenig NE. Tumor stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation* 2002;70:486-97.
21. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000;10:415-33.
22. Patel BP, Shah PM, Rowal UM, Desai AA, Shah SV, Rawal RM, Patel PS. Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2005;90:81-8.

23. Rosenthal EL, Johnson TM, Allen ED, Apel IJ, Punturieri A, Weiss SJ. Role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in epidermal growth factor – and reather factor: stimulated invasion of carcinoma cells. *Cancer Res* 1998;58:5221-30.
24. Lyn CC, Matrysian LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 2002;70:561-73.
25. Rosenthal EL, Talbert M, Carrol W, Carroll W, Magnuson JS, Peters GE. Expression of proteolytic enzymes in head and neck cancer-associated fibroblasts. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:943-47.
26. Shekhar MP, Werdell J, Santner SJ, Pauley RJ, Tait L. Breast stroma a dominant regulatory in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. *Cancer Res* 2001;61:1320-326.
27. Sabeh F, Ota I, Halmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M, Lopez-Otin C, Shapiro S, Inada M, Krane S, Allen E, Chung D, Weiss SJ. Tummor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol* 2004;167:769-81.
28. Fingleton B, Vargo-gogola T, Crawford HC, Matrisian LM. Matrilysin (MMP-7) expression selects for cell with reduced sensitivity to apoptosis. *Neoplasia* 2001;3:459-68.
29. Egeblad M, Werb Z. New function for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161-74.

30. DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L, Padarathsingh M. Proteases, extracellular matrix and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol* 2004;164:1131-39.
31. Katayama A, Bondoh N, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Nonaka S, Harabuchi Y. Expression of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastasis and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004;10:634-40.
32. Christopoulos TA, Papageorgakopoulou N, Theocharis DA, Aletras AJ, Tsiganos CP, Papadas TA, Mastronikolis NS, Goumas P, Vynios DH. Diagnostic and classifications value of metalloproteinases in squamous human laryngeal carcinoma. *Int J Oncol* 2004;25:481-85.
33. Bagussewicz M, Stryjecka-Zimmer M, Szymansky M, Rechberger T, Golabek W. Activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 in advanced laryngeal cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;128:132-36.
34. Yoshizaki T, Maurycena Y, Sato H, Furukawa M. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2001;95:44-50.
35. Yorioka CW, Coletta RD, Nishimoto IN, Kowalski LP, Graner E. Matrix metalloproteinases-2 and -9 activities correlate with disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Oncol* 2002;20:189-94.

36. Kim SH, Cho NH, Kim K, Lee JS, Koo BS, Kim JH, Chang JH, Choi EC. Correlations of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *J Surg Oncol* 2006;93:253-4.
37. Latreille J, Batist G, Laberge F, Champagne P, Croteau D, Falardeau P, Levinton C, Hariton C, Evans WK, Dupont E. Phase I/II trial of the safety and efficacy of AE-941 (Neovastat) in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2003;4:231-36.
38. Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW. Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomized trial. *Br J Cancer* 2002;86:1864-870.
39. Putti TC, Hsu HC, Chan ATC, Chan AT, Lai GM, Tse G, Lee YS, Whang-Peng J, Millward M, Lin L, Lin X, Lee CS. Expression of epidermal growth factor receptor in head and neck cancers correlates with clinical progression: a multicentre immunohistochemical study in the Asia-Pacific region. *Histopathology* 2002;41:144-51.
40. Davies RL, Grosse VA, Kucherlapati R, Bothwell M. Genetic analysis of epidermal growth factor action: assignment of human epidermal growth factor receptor gene to chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci* 1980;77:4188-192.
41. Rikimaru K, Tadokoro K, Yamamoto T, Enomoto S, Tsuchida N. Gene amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 1992;14:8-13.

42. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993;53:3579-84.
43. Arteaga C. Targeting HER1/EGFR: a molecular approach to cancer therapy. *Semin Oncol* 2003;30(Suppl 7):3-14.
44. Roskoski R Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:I-II.
45. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:2666-72.
46. Grandis JR, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1996;78:1284-92.
47. Sini P, Wyder L, Schnell C, O'Reilly T, Littlewood A, Brandt R, Hynes NE, Wood J. The antitumor and antiangiogenic activity of vascular endothelial growth factor receptor inhibition is potentiated by ErbB1 blockade. *Clin Cancer Res* 2005;11:4521-32.
48. Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuuring E, Litvinov SV, Hermans J, Van Krieken JH. Differences in expression of oncogenes and tumor suppression genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res* 1998;18:4793-800.
49. Chen IH, Chang JT, Liao CT, Wang HM, Hsieh LL, Cheng AJ. Prognostic significance of EGFR and Her-2 in oral cavity cancer in betel quid prevalent area cancer prognosis. *Br J Cancer* 2003;89:681-86.

50. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:7350-56.
51. Zimmermann M, Zouhair A, Azria D, Ozsahin M. The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications. *Radiat Oncol* 2006;1:11.
52. Rabben D, Bianco C, Milas L, Ang KK. Targeted therapies and radiation for the treatment of head and neck cancer: are we making progress? *Semin Radiat Oncol* 2004;14:139-52.
53. Liang K, Ang KK, Milas L, Hunter N, Fan Z. The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:246-54.
54. Bonner JA, Maihle NJ, Folven BR, Christianson TJ, Spain K. The interaction of epidermal growth factor and radiation in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines with vastly different radiosensitivities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29:243-47.
55. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
56. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
57. Ellis LM, Liu W, Fan F, Reinmuth N, Shaheen RM, Jung YD, Ahmad S. Role of angiogenesis inhibitors in cancer treatment. *Oncology* 2001;15:39-46.

58. Reinmuth N, Parikh AA, Ahmad SA, Liu W, Stoeltzing O, Fan F, Takeda A, Akagi M, Ellis LM. Biology of angiogenesis in tumors of the gastrointestinal tract. *Microsc Res Tech* 2003;60:199-207.
59. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339:58-61.
60. Folkman J. Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Rev* 1990;9:171-74.
61. Weidner N. Intratumoral microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995;147:9-19.
62. Polverini PJ, Leibovich SJ. Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor associated macrophages. *Lab Invest* 1984;51:635-42.
63. Ferrara N, Davis-Smith T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrin Rev* 1997;18:4-25.
64. Breslin JW, Pappas PJ, Cerveira JJ, Hobson RW, Duran WN. VEGF increases endothelial permeability by separate signaling pathways involving ERK-1/2 and nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H92-H100.
65. Gupta K, Kshirsagar S, Li W, Ramakrishnan S, Gupta P, Law PY, Hebbel RP. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp Cell Res* 1999;247:495-504.

66. 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.
67. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.
68. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003;349:427-34.
69. Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, Seetharam S, Koons A, Hari DM, Kufe DW, Weichselbaum RR. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res* 1999;59:3374-8.
70. Lee CG, Heijn M, di Tomaso E, Griffon-Etienne G, Ancukiewicz M, Koike C, Park KR, Ferrara N, Jain RK, Suit HD, Boucher Y. Anti-vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res* 2000;60:5565-70.
71. Chen HX. Expanding the clinical development of bevacizumab. *Oncologist* 2004;9(Suppl 1):27-35.

72. Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. Beyond Herceptin and Gleevec. *Curr Opin Chem Biol* 2003;7:490-95.
73. Piccart-Gebhart MJ. Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-overexpressing breast cancer: What we know and what we still need to learn. *Eur J Cancer* 2006;42:1715-9.
74. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK. Radiotherapy plus cetuximab for squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006;354:567-78.
75. Sobin LH, Wittekind CH. *TNM classificação de tumores malignos*. 6^a ed. Trad de A L A Eisenberg. Rio de Janeiro: INCA, 2004. Lábio e cavidade oral, faringe; p.24-37.
76. [SPSS]. Statistical package for social science, statistical data analysis for windows. Chicago; SPSS; 2000.
77. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric simulation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-81.
78. Cox DR. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc Br* 1972;34:187-220.
79. de Visscher AVM, Manni JJ. Routine long term follow-up in patients treated with curative intent for squamous cell carcinoma of the larynx, pharynx and oral cavity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:934-39.

80. Boysen M, Nutvig K, Winther FO, Tausjö J. Value of routine follow-up in patients treated for squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Otolaryngol* 1985;14:211-14.
81. Llewelin J, Mitchel R. Survival of patients who needed salvage surgery for recurrence after radiotherapy for oral carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1997;35:424-28.
82. Stell PM. Time to recurrence of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 1991;13:277-81.
83. Wong LY, Wei WI, Lam LK, Yuen AP. Salvage of recurrent head and neck squamous cell carcinoma after primary curative surgery. *Head Neck* 2003;25:953-9.
84. Agra IM, Carvalho AL, Pontes E, Campos OD, Ulbrich FS, Magrin J, Kowalski LP. Postoperative complications after *en bloc* salvage surgery for head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:1317-321.
85. Koo BS, Lim YC, Lee JS, Choi EC. Recurrence and salvage treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol* 2006;42:789-94.
86. Demiral AN, Sarioglu S, Birlik B, Sen M, Kinay M. Prognostic significance of EGF receptor expression in early glottic cancer. *Auris Nasus Larynx* 2004;31:417-24.
87. Ruokolainen H, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma is a prognostic factor. *Int J Cancer* 2005;116:422-27.

88. Levin VA, Phuphanich S, Yung WK, Forsyth PA, Maestro RD, Perry JR, Fuller GN, Baillet M. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of marimastat in glioblastoma multiforme patients following surgery and irradiation. *J Neurooncol* 2006;78:295-302.
89. Quirt I, Bodurth A, Lohmann R, Rusthoven J, Belanger K, Young V, Wainman N, Stewar W, Eisenhauer E. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Phase II study of marimastat (BB-2516) in malignant melanoma: a clinical and tumor biopsy study of the National Cancer Institute of Canada clinical trials group. *Invest New Drugs* 2002;20:431-37.
90. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131:624-30.
91. Cunha IW, Soares FA. Expressão do VEGF em carcinomas de cabeça e pescoço e sua relação com o prognóstico. Casuística fez parte da metaanálise da referência 63. Comunicação pessoal. Dados não publicados.