

MARCO ANTONIO CORTELAZZO

**Associação de marcadores de proliferação e de apoptose
com a resposta à radioterapia e sua importância prognóstica
em carcinoma epidermóide de palato mole**

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

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cortelazzo, Marco Antonio

Associação de marcadores de proliferação e de apoptose com a resposta à radioterapia e sua importância prognóstica em carcinoma epidermóide de palato mole / Marco Antonio Cortelazzo. -- São Paulo, 2007.

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

Departamento de Radiologia.

Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Luiz Paulo Kowalski.

Descritores: 1.Carcinoma de células escamosas 2.Palato mole 3.Radioterapia
4.Resultado de tratamento 5.Marcadores biológicos de tumor 6.Prognóstico

USP/FM/SBD-032/07

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Bruno Cortelazzo (*in memoriam*)

e

à minha mãe Izolina Andreuccetti Cortelazzo,

os quais me orgulho e muito amo,

agradeço desde a herança implícita de exons e introns, mas, principalmente, à herança comportamental transmitida em caráter “mendeliano educacional”, referentes ao caráter, ética, moral e formação espiritual, os quais me conferem um melhor prognóstico - com $p < 0,001$ - em relação ao comportamento de uma grande e lamentável porção dos nossos políticos, os quais não herdaram tais genes ou sofreram severas mutações no sistema de reparo, infelizmente, com forte tendência à perpetuação da espécie!!!

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes envolvidos nesta pesquisa que, no anonimato, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pacientes, da região de Erechim-RS, que perdoem a minha ausência, mas que possam ser recompensados com os conhecimentos adquiridos.

Ao Prof. Dr Luiz Paulo Kowalski, cujas palavras não traduzirão a amplitude da minha gratidão e admiração, pela paciência e compreensão frente às minhas dificuldades, mas, principalmente, por ser um modelo pessoal, profissional e científico.

Ao Prof Dr Fernando Augusto Soares, do qual me orgulho de tê-lo como professor desde a minha formação à época da graduação, pelas incansáveis orientações sem qualquer obrigação legal para tal, mas sempre disponível e acolhedor, além da incansável revisão histológica e imunoistoquímica.

Ao Dr. Humberto Torloni, exemplo de dedicação, disponibilidade, humildade, além das revisões histológicas.

À Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani, pela compreensão, orientações e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Rogers Chamas pela humildade e disponibilidade.

À Profa. Dra. Helena Regina Cômodo Segreto pela disponibilidade, orientações e sugestões.

Ao Prof. Dr André Lopes Carvalho, pela disponibilidade e realização das análises estatísticas.

Ao Dr. Clóvis Antonio Lopes Pinto pelas revisões e orientações imunoistoquímicas.

À (mestre!) Elizangela Nivardo Dias, pelo carinho e amizade, além do profissionalismo.

Ao Dr. Clóvis Clock pela amizade e revisão das lâminas de imunoistoquímica.

Ao Dr. Paulo Prata (in memoriam), Dra Scylla Duarte Prata e todos os médicos, funcionários e pacientes do Hospital do Câncer de Barretos - Fundação Pio XII, pela confiança, apoio, incentivo e iniciação dos meus conhecimentos na área da oncologia.

Aos Drs. Antonio Victor Martins Priante, Everton Pontes, Ivan Agra, Jefferson Luiz Gross e João Gonçalves Filho, pela grata amizade, orientações e momentos de descontração.

À Prof. Dra. Maria Aparecida Koike pela sensibilidade e apoio

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, pelas palavras de apoio e estímulo.

Ao Dr. Mauro Kasuo Ikeda, pela sensibilidade e espírito de integração.

Ao Dr. José Magrin, pela admiração e acolhida

À Sra. Hirde Contesini, pela meticulosidade, paciência e exemplo de como cuidar dos prontuários.

A todos os funcionários, residentes, ex-residentes e médicos do Hospital do Câncer A. C. Camargo, principalmente dos departamentos de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, de Anatomia Patológica e do Centro de Estudos, pela ótima acolhida e oportunidade de conhecimentos.

Ao Luis Otílio de Lima e todos os funcionários do SAME do HCACC, pela dedicação e atendimento.

À Suely Francisco, Francyne Pólen Gomes de Lima, Janaína Beltrame, Maria Adriana Martins Bassols, e Rosinéia Aguiar Carneiro, da biblioteca do HCACC, pelos incansáveis auxílios nas pesquisas bibliográficas e pela excelência no atendimento.

Aos funcionários da biblioteca da FMUSP, particularmente, Marinalva de Souza Aragão, pela prestatividade no atendimento.

À Benedita Aparecida de Moura, Gilmara Santos da Silva, Raimunda Nonata Pereira e Rita Lopes Cardoso pela paciência, prontidão e agendamentos.

Ao Josué Moreira de Souza, pela prontidão e disponibilidade.

À Prof. Emilia Fantinel, pelo auxílio na revisão ortográfica.

À Alexandra Cardozo Longo, pela atenção e delicadeza.

Ao Aparecido Gomes da Silva, Carlos Ferreira Nascimento, José Ivanildo Neves, Marcelo Augusto Sibucks, Severino da Silva Ferreira e Suely Nonogaki, pela competência e disponibilidade em suas atividades.

Aos médicos, funcionários e amigos de Erechim, pelo apoio e suporte aos meus pacientes na minha ausência.

Ao Dr. Roberto Gomes, Dr. Hiram Silveira Luca e Jorge Assad Abujanra pelo apoio, incentivo, confiança e amizade.

A todos do CELAFISCS (Centro de Estudos do Laboratório de Aptidão Física de São Caetano do Sul), na pessoa do Dr Victor Keiran Matsudo, com o qual aprendi os primeiros passos no mundo da pesquisa e da ciência.

A todos da saudosa FMRP-USP, onde tudo começou na área médica.

A todos do Hospital de Cotia, em especial ao Dr. Paulo Bafile, pela sabedoria e compreensão.

À Profa. Maria Camila Bedin, pela amizade, prontidão e competência na revisão final da tese.

Aos meus alunos, pela energia que me passam, espero que possam se beneficiar com os meus conhecimentos adquiridos.

Ao meu irmão Carlos Alberto Cortelazzo, pelos imprescindíveis auxílios no banco de dados e na área de informática e à sua esposa Iolanda Bueno de Camargo Cortelazzo, pelo incentivo.

À minha irmã Patrícia Rita Cortelazzo e ao meu irmão Angelo Luiz Cortelazzo, pelo estímulo e apoio.

Aos meus amigos, pela compreensão da minha ausência.

A todos aqueles não mencionados, as minhas desculpas por não ter percebido a sua importância. Sintam-se espiritualmente recompensados pois, tudo feito por amor tem sua recompensa intrinsecamente implícita, ainda que, humanamente, às vezes, não reconhecida.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Quadros

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO	11
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3.1 Publicações	14
3.2 Breve revisão sobre os marcadores tumorais utilizados	25
4. MÉTODOS.....	34
4.1 Critérios de elegibilidade	35
4.2 Métodos propedêuticos	36
4.3 Exame loco-regional.....	36
4.4 Ficha de coleta de dados	38
4.5 Estádio clínico	39
4.6 Análise histopatológica.....	42
4.7 Método de tissue microarray (TMA)	43
4.8 Análise imunoistoquímica.....	44
4.9 Tratamento.....	51
4.10 Falência do tratamento.....	51
4.11 Segundo tumor primário.....	52
4.12 Seguimento	52
4.13 Critérios de avaliação dos resultados.....	53
4.14 Análise estatística	54
4.15 Considerações éticas	56

5. RESULTADOS.....	57
5.1 Dados demográficos	58
5.2 Dados clínicos	59
5.3 Dados anatomopatológicos	62
5.4 Dados imunoistoquímicos	63
5.5 Terapêutica	64
5.6 Seguimento	66
5.6.1 Falência do tratamento	66
5.6.2 Tratamento das falências do tratamento inicial	68
5.6.2 Segundo tumor primário	70
5.6.3 Situação ao final do seguimento.....	71
5.7 Análises das correlações entre as variáveis estudadas.....	72
5.7.1 Análise da correlação entre os marcadores tumorais e as variáveis demográficas, clínicas e grau histológico	72
5.8 Análise de Sobrevida Atuarial	77
5.8.1 Análise Univariadas	77
5.8.2 Análises multivariadas	86
6. DISCUSSÃO.....	88
6.1 Análise da correlação entre a expressão de p53, Ki-67, Bcl-2 e Bax e as variáveis demográficas, clínicas e grau de diferenciação histológica	89
6.2 Análise da sobrevida atuarial	92
6.2.1 Análise da sobrevida referente aos fatores demográficos, clínicos e histológicos	94
6.3 Análise da Falência do tratamento.....	100
6.4 Análise da sobrevida referente aos fatores imunoistoquímicos.	102
6.4.1 Análise da sobrevida referente à expressão imunoistoquímica de p53	103
6.4.2 Análise da sobrevida referente à expressão imunoistoquímica de Ki-67	104
6.4.3 Análise da sobrevida referente à expressão imunoistoquímica de Bcl-2.....	104
6.4.4 Análise da sobrevida referente à expressão imunoistoquímica de Bax.....	105
6.5 Considerações finais.....	106
7. CONCLUSÕES.....	108
8. REFERÊNCIAS	110

LISTA DE ABREVIATURAS

CALP	Dr Clóvis Antonio Lopes Pinto
cir	cirurgia
CK	Dr Clóvis Clock
Dr.	Doutor, médico
et al.	e outros
fig	figura
FAS	prof. Dr. Fernando Augusto Soares
HT	Dr Humberto Torloni
prof.	professor
vs	versus

LISTA DE SIGLAS

EC	Estádio Clínico
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
G	Grau de diferenciação histológica
Gy	gray
HCACC	Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer Antonio Cândido Camargo
HR	Hazard Ratio
IC	Intervalo de Confiança
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L	Local
MS	Ministério da Saúde
M	Metástase
n	número de casos
N	Categoria N (linfonodo)
Nc	Linfonodo contra lateral
Ni	Linfonodo ipsilateral
p	valor estatístico de p
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
SEC	Sobrevida Específica por Câncer
SG	Sobrevida Global
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
T	Categoria T (tamanho do tumor)
UICC	União Internacional Contra o Câncer
TMA	Tissue microarray

LISTA DE SÍMBOLOS

$<$	menor que
\leq	menor ou igual a
$>$	maior que
\geq	maior ou igual que
$=$	igual a
$/$	por
$\%$	porcentagem

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Escores: Modificado de Allred et al. (1998).....	48
FIGURA 2 - Exemplos de escores negativos e positivos segundo a expressão ou não dos marcadores p53, Ki-67, Bcl-2 e Bax. ..	50
FIGURA 3 - Gráfico da sobrevida específica por câncer dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole submetidos a tratamento com radioterapia.	77
FIGURA 4 - Gráfico da Sobrevida Global dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole submetidos a tratamento com radioterapia.	78
FIGURA 5 - SEC segundo p53	82
FIGURA 6 - SG segundo p53	82
FIGURA 7 - SEC segundo Ki-67	83
FIGURA 8 - SG segundo Ki-67.....	83
FIGURA 9 - SEC segundo Bcl-2	84
FIGURA 10 - SG segundo Bcl-2.....	84
FIGURA 11 - SEC segundo Bax	85
FIGURA 12 - SG segundo Bax.....	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Distribuição dos dados demográficos	58
TABELA 2 - Distribuição das variáveis clínicas	60
TABELA 3 - Distribuição dos casos de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole de acordo com a associação entre as categorias T,N e estágio clínico (EC) pela classificação tnm da uicc 2002 (sobin e wittekind, 2002).....	61
TABELA 4 - Distribuição dos casos quanto aos dados histológicos	62
TABELA 5 - Distribuição dos casos quanto aos escores imunoistoquímicos	63
TABELA 6 - Distribuição dos casos quanto aos dados imunoistoquímicos considerados como negativos ou positivos	64
TABELA 7 - Distribuição dos casos de acordo com os campos de irradiação e dose recebida.....	65
TABELA 8 - Distribuição dos casos de acordo com a presença, ou ausência de tumor após o tratamento.....	66
TABELA 9 – Distribuição dos casos de acordo com a presença de tumor após o tratamento.....	67
TABELA 10 - Distribuição dos casos de acordo com o tempo para diagnóstico de persistência ou recorrência da doença	68
TABELA 11 - Distribuição dos casos com persistência e recorrência tumoral segundo o tratamento de resgate ou de suporte	69
TABELA 12 - Distribuição dos casos de acordo com o diagnóstico de segunda neoplasia primária	70
TABELA 13 - Distribuição dos casos de acordo com status	71
TABELA 14 - Parâmetros demográficos, clínicos e patológicos segundo a expressão de p53	73
TABELA 15 - Parâmetros demográficos, clínicos e patológicos segundo a expressão de Ki-67	74

TABELA 16 - Parâmetros demográficos, clínicos e patológicos segundo a expressão de Bcl-2	75
TABELA 17 - Parâmetros demográficos, clínicos e patológicos segundo a expressão de Bax	76
TABELA 18 - Sobrevida específica por câncer e sobrevida global quanto às variáveis demográficas.....	79
TABELA 19 - Sobrevida específica por câncer e sobrevida global quanto às variáveis clínicas, e histológicas	81
TABELA 20 - Sobrevida específica por câncer e sobrevida global em casos de carcinoma epidermóide de palato mole, segundo a expressão imunoistoquímica de p53.....	82
TABELA 21 - Sobrevida específica por câncer e sobrevida global em casos de carcinoma epidermóide de palato mole, segundo a expressão imunoistoquímica de ki-67	83
TABELA 22 - Sobrevida específica por câncer e sobrevida global em casos de carcinoma epidermóide de palato mole, segundo a expressão imunoistoquímica de Bcl-2.....	84
TABELA 23 - Sobrevida específica por câncer e sobrevida global em casos de carcinoma epidermóide de palato mole, segundo a expressão imunoistoquímica de Bax	85
TABELA 24 - Modelo multivariado de risco de óbito por câncer	86
TABELA 25 - Modelo multivariado de risco de óbito.....	87

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Estádio Clínico	41
QUADRO 2 - Anticorpos utilizados e sua diluição	45

RESUMO

Cortelazzo MA. *Associação de marcadores de proliferação e de apoptose com a resposta à radioterapia e sua importância prognóstica em carcinoma epidermóide de palato mole [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 134p.

Carcinoma epidermóide de palato mole é relativamente raro, representando em torno de 15% das neoplasias da orofaringe, onde predominam os tumores de base de língua e tonsila palatina. Não há consenso sobre a melhor forma de tratamento para estes tumores, pois apesar de todos os avanços e associações terapêuticas, as taxas de sobrevida têm se alterado pouco nas últimas décadas. Mesmo com os avanços da cirurgia reparadora, minimizando as seqüelas da cirurgia oncológica, a radioterapia exclusiva e/ou associada à quimioterapia é a forma de tratamento mais utilizada em muitos serviços, principalmente para os tumores em estágio clínico avançado. Entretanto, muitos pacientes não apresentam resposta a tal terapêutica. Desse modo, selecionar um grupo de pacientes com maiores possibilidades de resposta à irradiação poderia orientar a melhor indicação terapêutica para cada caso. Sendo assim, os objetivos desse trabalho são avaliar as características demográficas, clínicas, histológicas e a expressão imunoistoquímica das proteínas p53, Ki-67, Bcl-2 e Bax como fatores preditivos de resposta ao tratamento e de sobrevida, em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole submetidos à radioterapia com finalidade curativa. Foram selecionados, retrospectivamente, 73 prontuários de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole admitidos para tratamento no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A. C. Camargo, em São Paulo, no período de janeiro de 1970 a dezembro de 2000 que foram submetidos à radioterapia com finalidade curativa e que apresentavam tecido biopsiado, previamente ao tratamento, viável para a confecção e análise da expressão imunoistoquímica dos marcadores em questão, em lâminas de tissue microarray. As variáveis idade, sexo, raça, tabagismo, alcoolismo, grau histológico (G), categoria T e N e estágio clínico (EC) foram correlacionadas com a expressão imunoistoquímica destes marcadores. A idade média dos pacientes foi de 60 anos, com predomínio de pacientes do sexo masculino (83,6%), raça branca (80,8%), tabagistas (86,3%), alcoolistas (76,7%), G1+2 (69,9%) e em EC avançado da doença (72,6%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão dos marcadores em questão e as variáveis estudadas. As análises univariadas de sobrevida em 5 anos evidenciaram que a sobrevida específica por câncer (SEC) foi de 27,1%, sendo significativamente melhor para os pacientes portadores de tumores em categoria T e N iniciais e em estágios clínicos iniciais. A sobrevida global (SG) foi de 24,9% sendo significativamente melhor nos pacientes portadores de tumores em estágios clínicos iniciais. Em relação à imunorreatividade dos marcadores estudados, não observamos diferenças estatisticamente significativas quanto à sobrevida específica por câncer e global. A análise multivariada da SEC em

5 anos evidenciou que EC avançado, grau histológico G3 e imunexpressão de p53 foram variáveis independentes, associadas a pior prognóstico ($p < 0,100$). Para a sobrevida global, somente EC avançado foi identificado como variável independente associada a pior prognóstico. Conclusão: pacientes com tumores em estádios clínicos iniciais e/ou G1+2 e/ou que não expressam p53 têm melhor prognóstico.

SUMMARY

Proliferation and apoptosis markers in association with radiotherapy response and their prognostic importance in squamous cell carcinoma of soft palate [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 134p.

Squamous cell carcinoma of the soft palate is rare and represents about 15% of the oropharynx cancer, where there is prevalence of tumors of the base of tongue and palatine tonsil. There is no consensus about the best form of treatment for these tumors because, despite all advances and therapeutic associations, there has not been major changes in overall survival in the last decades. In spite of the advances of reconstructive surgery, which has reduced the sequelae of oncologic surgery, radiotherapy alone or in association with chemotherapy are the most used treatments, especially for tumors in advanced clinical stage, mostly because of the sequelae of surgical treatment. However, many patients have a poor response to this therapeutic. This way, selecting a group of patients with more possibilities of response to irradiation could be used in the selection of the best therapeutic for each case. Because of this, the objective of this paper is to evaluate demographic, clinical and histological characteristics and the immunoistochemical expression of p53, ki-67, Bcl-2 and Bax proteins as predictive factors of response to treatment and survival in patients with squamous cell carcinoma of soft palate submitted to radiotherapy with curative intent. We selected, retrospectively, 73 clinical charts of patients with squamous cell carcinoma of soft palate admitted for treatment in the Department of Head and Neck and Otorrinolarynxology Surgery of A. C. Camargo Hospital, in São Paulo, from 1970 to 2000, submitted to radiotherapy with curative intent and who had tissue biopsy – before treatment – which had a viable paraffin block analyze the immunoistochemical expression of the studied markers, in plates of tissue microarray. Variables as age, sex, race, smoking, alcoholism, histological degree, T and N categories and clinical stage were correlated with the immunoistochemistry expression of these markers. Mean age was 60 years, mostly patients were males (83.6%), white (80.8%), smokers (86.3%), alcoholics (76.7%), the histologic degree was G1 and G2 (69.9%) and most were diagnosed in advanced clinical stages (72.6%). There was no statistically meaningful difference between the expression of the studied markers and the studied variables. Univaried analysis of survival in 5 years showed that cancer specific survival was 27.1%, which was significantly better for those patients with tumors in early T and N categories and initial clinical stages. Overall survival was 24.9%, significantly better for patients with tumors in initial clinical stages. About the immuno-reactivity of the studied markers, we did not find statistically significant differences for overall survival cancer and specific survival. Multivaried analysis of cancer specific survival in 5 years showed that advanced clinical stage, histological degree 3 and p53+ were independent variables, associated with a worst prognosis ($p < 0.100$). For overall survival, only advanced clinical stage was an independent prognostic variable. Conclusion: patients with tumors in advanced clinical stages and/or histological degree 1 + 2 and/or that do not express p53 have a better prognosis.

1. INTRODUÇÃO

Com exceção dos tumores de pele, a maioria dos tumores de cabeça e pescoço ocorre nas vias aerodigestivas superiores, principalmente na boca, faringe e laringe (Krolls, Hoffman, 1976; Silverberg et al., 1990; Boring, 1994). Mais de 90% desses tumores são carcinomas epidermóides (Silverberg et al., 1990; Boring, 1994). A maior ou menor incidência de um determinado tumor em um determinado sítio ou subsítio anatômico da cabeça e pescoço pode variar em função da região geográfica analisada, havendo diferenças marcantes quando se comparam países desenvolvidos com países em desenvolvimento (Jemal et al., 2003; Carvalho et al., 2004b).

As taxas de incidência e de mortalidade mundiais por câncer da cavidade oral e faringe para o ano 2003 ocuparam, respectivamente, a 9ª e a 11ª posições em ordem de frequência (Jemal et al., 2003). Segundo dados do Ministério da Saúde (Brasil (MS-INCA), 2006), estima-se que ocorreram cerca de 13.470 casos novos de câncer da cavidade oral no Brasil em 2006, correspondendo à 8ª causa mais frequente em ambos os sexos, sendo 10.060 (6ª causa) em homens e 3.410 (8ª causa) em mulheres. Quanto à mortalidade, os dados referem-se ao período de 1995 a 1999 e corresponderam à 9ª causa de óbito por câncer para ambos os sexos, sendo a 6ª no sexo masculino e a 8ª no sexo feminino. A mesma fonte não diferencia estatisticamente estimativas de incidência e mortalidade para câncer de orofaringe.

O câncer de orofaringe ocorre com maior frequência no sexo masculino e acima de 60 anos (Spitz, 1994). Alguns estudos epidemiológicos demonstram que os maiores fatores de risco são o consumo de tabaco e de bebidas alcoólicas (Elwood et al., 1984; Franco et al., 1989; Maier et al., 1992; Muir, Weiland, 1995; Schlecht et al., 1999; Schlecht et al., 2001).

O carcinoma epidermóide de palato mole representa cerca de 15% das neoplasias da orofaringe, onde predominam os tumores da base de língua e tonsila palatina e, mais raramente, os tumores da parede posterior da faringe, com menos de 5% dos casos. Incide, em média, três vezes mais frequentemente nos homens em relação às mulheres, predominando na faixa etária entre os 55 e os 70 anos (New, Hallberg, 1941; Martin, 1942; Ratzner et al., 1970; Evan, Shah, 1981; Barnes, Johnson, 1986; Weber et al., 1988). Estas proporções variam em função de algumas regiões geográficas como, por exemplo, na Índia onde Rao et al. (1998) referem 7,4 homens para cada mulher. A maioria dos carcinomas epidermóides de palato mole são bem e/ou moderadamente diferenciados (Martin, 1942; Barnes, Johnson, 1986; Fee et al., 1979; Erkal et al., 2001).

Clinicamente, observamos relatos de metástases para os linfonodos cervicais à primeira consulta, em cerca de 14 a 54% dos casos, sendo a maioria para os linfonodos jugulares altos - atingindo 20% de metástases bilaterais no início da doença - chegando a 40% de disseminação contralateral em casos mais avançados. Metástases a distância ocorrem em

até cerca de 10% dos casos (Fletcher, Lindberg, 1966; Lindberg, 1972; Russ et al., 1977; Chung et al., 1979; Fee et al., 1979; Garret, Beale, 1984; Barnes, Johnson, 1986; Amdur et al., 1987; Calais et al., 1988; Esche et al., 1988; Keus et al., 1988; Weber et al., 1988; Horton et al., 1989; Tandon et al., 1992; Mak-Kregar et al., 1994; Medini et al., 1997; Erkal et al., 2001).

A terapêutica do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço tem evoluído muito nas últimas décadas. Para os tumores em estádios clínicos iniciais, a cirurgia e a radioterapia têm resultados semelhantes, sendo a radioterapia a opção de muitos serviços, principalmente, quando a cirurgia pode comprometer a funcionalidade da fala e/ou da deglutição (Wagner et al., 1998; Osborne, Brown, 2004; Selek et al., 2004; Le Scodan et al., 2005). Apesar dos avanços na cirurgia reconstrutora e do emprego de implantes e de próteses possibilitando melhor qualidade na reabilitação funcional (Cordeiro, Santamaria, 2000; Kildal et al., 2001; Sakuraba et al., 2003; Brown et al., 2006; Mariani et al., 2006), a cirurgia não é considerada a primeira opção terapêutica em muitas instituições - principalmente nos tumores em estádios avançados - devido aos custos do tratamento (Nijdam et al., 2004; Nijdam et al., 2005) e aos efeitos funcionais da cirurgia serem mais severos em relação à radioterapia, ainda que a radioterapia também possa promover seqüelas significativas, já que, tumores avançados, após radioterapia, podem resultar em perdas teciduais importantes, além de efeitos colaterais como xerostomia, radionecrose, trismo entre outros (De Crevoisier et al., 1998; Erkal et al., 2001; Luukka et al., 2003; Levendag et al., 2004). Além disso, o desenvolvimento de novas técnicas como a

radioterapia hiperfracionada e, de novos equipamentos que vão desde a utilização da tomografia computadorizada e/ou da ressonância nuclear magnética e/ou do PET scan, assim como a associação de programas de informática com a possibilidade de planejamento do tratamento em três dimensões e com o desenvolvimento da radioterapia conformacional, da radiocirurgia estereotáxica e da terapia de intensidade modulada, seja através de fótons ou de prótons, possibilita a utilização da irradiação atingindo o tumor de maneira mais concentrada e intensa, com o menor efeito colateral possível aos tecidos sãos vizinhos (Fallai et al., 2006; Bourhis et al., 2006; Budach et al., 2006). Os avanços da quimioterapia, principalmente nos tumores avançados - seja como neoadjuvante ou como adjuvante à radioterapia - tornam esta associação de tratamento a primeira opção para muitos autores. Entretanto, também a quimioterapia tem diversos efeitos colaterais e limitantes, como, por exemplo, exacerbação da mucosite, da queda do estado geral, leucopenia, predisposição à infecções entre outros. (Lefevre et al., 1996; Carvalho et al., 2000; Pignon et al., 2000; Al-Sarraf, 2002; Adelstein et al., 2003; Cohen et al., 2004; Gibson, Forastiere, 2004; Herchenhorn, Dias, 2004; Moyer et al., 2004; Argiris, 2005; Rinehart et al., 2005; Seiwert, Cohen, 2005; Bonner et al., 2006; Budach et al., 2006).

Os escassos estudos referentes ao palato mole são retrospectivos e, geralmente, o analisam em conjunto com outros sítios da orofaringe e, às vezes, da cavidade oral ou da cabeça e pescoço como um todo e, evidenciam a experiência de cada instituição frente a um determinado tipo de tratamento, sem evidências clínicas e estatisticamente significativas de

que uma determinada forma de tratamento seja melhor do que a outra, ou que determinada variável seja um fator prognóstico significativo de sobrevida impossibilitando, assim, a padronização das condutas terapêuticas (Martin, 1942; Ratzer et al., 1970; Evans, Shah, 1981; Rao et al., 1998; Erkal et al., 2001).

Em nossa dissertação de mestrado apresentada em outubro de 2003, estudamos, retrospectivamente, 151 prontuários consecutivos de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole tratados no *Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A. C. Camargo*, entre janeiro de 1970 a dezembro de 1996. Foram realizadas análises univariada e multivariada da sobrevida específica por câncer e sobrevida global, quanto às variáveis demográficas, clínicas, terapêuticas e quanto ao período de admissão do paciente no hospital. A análise multivariada da sobrevida evidenciou que, quanto à sobrevida específica por câncer, as variáveis estágio clínico e tratamento foram significativamente associadas ao prognóstico dos pacientes tratados. O risco de morte por câncer foi 3,1 vezes maior para os casos com carcinoma epidermóide de palato mole em estágio clínico avançado, quando comparados com os casos em estágio clínico inicial. Quanto ao tratamento, observamos um risco 2,1 vezes maior de morrer de câncer quando o paciente foi tratado com radioterapia exclusiva, em relação aos pacientes submetidos ao tratamento baseado em cirurgia (cirurgia isolada, ou cirurgia associada à radioterapia pós-operatória).

Pacientes que apresentam resposta completa à radioterapia, de um modo geral, apresentam menos alterações funcionais que os pacientes operados. Dessa forma, selecionar um grupo de pacientes com maiores possibilidades de resposta à irradiação poderia modificar significativamente a indicação terapêutica.

A variável mais significativa para se predizer a expectativa de sobrevida de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECCP) tem sido o estágio clínico do tumor ao diagnóstico. Tamanho do tumor, presença de metástase cervical, margens positivas após a excisão cirúrgica e invasão perineural têm sido considerados indicadores confiáveis de pobres resultados terapêuticos em pacientes portadores de CECCP. Porém, a presença de invasão extracapsular em linfonodos cervicais metastáticos permanece como o maior fator prognóstico para a recorrência local e metástases à distância e, conseqüentemente, para a sobrevida (Ildstad et al., 1989; Kowalski et al., 1991; Tylor, Olofsson, 1992; Brasilino de Carvalho, 1998; Fagan et al., 1998; Weber et al., 1988; Siczka et al., 2001; Shikama et al., 2003; Shingaki et al., 2003; Rahima et al., 2004; Kademani et al., 2005; Kowalski et al., 2005). Além disso, relatos como baixos níveis de hemoglobina influenciando na resposta ao tratamento com radioterapia podem nos auxiliar na escolha terapêutica e/ou na melhora das condições clínicas pré e durante a radioterapia (Molls et al., 1998; Stadler et al., 1998; Oblak et al., 2003; Macdonald, Hurman, 2004; Carlson et al., 2006). Embora estes parâmetros forneçam os melhores critérios possíveis para se decidir sobre a melhor forma de tratamento, eles são limitados em discernir futuros comportamentos

agressivos de CECCP e necessitam que o paciente seja submetido a esvaziamento cervical para se conhecer o seu estadiamento linfonodal.

Dessa forma, as diferentes respostas ao tratamento para casos clínicos e com diagnósticos histológicos semelhantes, além das seqüelas inerentes a cada tipo de tratamento e a necessidade de se identificar os pacientes de risco para recidiva local, metástase cervical à distância, antes de qualquer tratamento, são fundamentais. Nesse sentido, a busca por marcadores moleculares capazes de prever a resposta a um determinado tratamento, é imperativa, já que, até hoje, todos os estudos relacionando os fatores demográficos, clínicos e histopatológicos, ainda que possam se correlacionar com a resposta à radiação ou com qualquer forma de associação de tratamento, com ganhos no controle local e na sobrevida livre de doença, apesar de todos os avanços acima citados, não foram suficientes para orientar a escolha do tratamento a fim de melhorar a sobrevida dos pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço, a qual permanece praticamente inalterada nos últimos 30 anos e, também, não explicam por que alguns casos, mesmo em estádios clínicos avançados, têm ótimas respostas ao tratamento e sobrevida relativamente alta e, por outro lado, alguns pacientes com tumores em estádios clínicos iniciais e recebendo a mesma forma de tratamento apresentam recidivas, metástases e um péssimo prognóstico (Ratzer et al., 1970; Evans, Shah, 1981; Garret, Beale, 1984; Calais et al., 1988; Weber et al., 1988; Ildstad et al., 1989; Boring et al., 1994; Rao et al., 1998; Lefevre et al., 1996; Pignon et al. 2000; Al-Sarraf, 2002; Adelstein et al., 2003; Carvalho et al., 2003; Carvalho et al., 2004a;

Cohen et al., 2004; Gibson, Forastiere, 2004; Herchenhorn, Dias, 2004; Moyer et al., 2004; Argiris, 2005; Carvalho et al., 2005; Rinehart et al., 2005; Seiwert, Cohen, 2005; Thomas et al., 2005; Bonner et al., 2006; Fallai et al., 2006; Budach et al., 2006).

Não encontramos na literatura trabalhos específicos relacionando fatores preditores biológicos de resposta à radioterapia em carcinoma epidermóide de palato mole.

Torna-se, portanto, imperiosa a busca por novos fatores biológicos que possam nos auxiliar a responder as questões descritas acima. Nesse sentido, diversos estudos têm sido realizados na busca da identificação de uma impressão digital genética, hoje facilitada através dos “*arrays*”, assim como através da busca de novos parâmetros biológicos com potencial preditivo; entre eles, a expressão de oncogenes, genes supressores de tumores, genes de controle do ciclo celular, genes de apoptose, genes relacionados à angiogênese e fatores de crescimento, entre outros (Wilson et al., 1995; Awwad et al., 1996; Gallo et al., 1996; Raybaud-Diogenè et al., 1997; Gallo et al., 1999; Xie et al., 1999 (a); Xie et al., 1999 (b); Dijkema et al., 2000; Grabenbauer et al., 2000; Obata et al., 2000; Raybaud et al., 2000; Lavertu et al., 2001; Corvo et al., 2001; Couture et al., 2002; Xie et al., 2002; Grabenbauer et al., 2003; Yamazaki et al., 2003; Ataman et al., 2004; Pich et al., 2004; Koch, Sidransky, 2004; Thomas et al., 2005; entre outros).

Baseados na literatura e na tentativa de encontrar algum marcador que pudesse ser utilizado na prática diária com exames e análises

relativamente simples e não muito custosos decidimos estudar o papel de alguns marcadores relacionados com a apoptose e com a proliferação celular, entre eles: p53, Bcl-2, Bax e Ki-67 (Miyashita et al., 1994; Gallo et al., 1996; Jordan et al., 1996; Raybaud-Diogenè et al., 1997; Gallo et al., 1999; Smith et al., 1999; Xie et al., 1999; Dijkema et al., 2000; Raybaud et al., 2000; Grabenbauer et al., 2000; Couture et al., 2001; Lavertu et al., 2001; Yamazaki et al., 2003; Koch, Sidransky, 2004).

Considerando-se a falta de relatos na literatura sobre o reconhecimento de fatores prognósticos que poderiam auxiliar na escolha de métodos terapêuticos específicos para o tratamento dos tumores localizados no palato mole e devido aos nossos resultados evidenciarem pior prognóstico nos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole submetidos à radioterapia exclusiva em relação aos submetidos a tratamento baseado em cirurgia, decidimos estudar esta nossa casuística, na tentativa de identificar os fatores preditivos de resposta à radioterapia, avaliando um conjunto de informações demográficas, clínicas, histológicas e alguns marcadores de resposta à irradiação que possam ser aplicados na prática clínica.

2. OBJETIVO

Os objetivos desse trabalho são avaliar as características demográficas, clínicas, histológicas e a expressão imunoistoquímica das proteínas p53, Ki-67, Bcl-2 e Bax como fatores preditivos de resposta ao tratamento e de sobrevida, em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole submetidos à radioterapia com finalidade curativa.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Publicações

Até a presente data, não encontramos nenhum trabalho publicado abordando especificamente os marcadores p53, ki 67, Bcl-2 e Bax, em relação a pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole submetidos à radioterapia exclusiva. A maioria das publicações inclui, nas suas casuísticas, tumores da cavidade oral e/ou orofaringe e/ou laringe, submetidos a diversos tipos de associação de tratamento empregando cirurgia e/ou radioterapia e/ou quimioterapia. Sendo assim, a nossa revisão baseou-se em trabalhos que estudaram casos de carcinoma epidermóide em que, na casuística, constavam pacientes com tumores exclusivos, ou um número expressivo de casos, do sítio da orofaringe, submetidos à radioterapia exclusiva e que foram analisados com, pelo menos, um dos marcadores estudados em nosso trabalho.

Awwad et al. (1996) avaliaram 79 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (40 laringe, 22 orofaringe, 14 cavidade oral e 3 hipofaringe) submetidos à radioterapia (99% receberam entre 50-63Gy). A maioria, 48 (61%) dos pacientes, apresentava tumores em estágio clínico inicial e 31 (39%), em estágio clínico avançado, sendo 77% destes referentes à orofaringe. A expressão nuclear de p53 foi investigada por imunohistoquímica. Quarenta e dois tumores (53%) foram p53+, sendo 53%

de laringe; 64% de orofaringe e 43% de cavidade oral. Todos os tumores que apresentavam invasão vascular e/ou linfática eram p53+. A proporção de p53+ foi alta em tumores com grau histológico pouco diferenciado, em relação aos bem ou moderadamente diferenciados, mas não houve correlação com a sobrevida global ou sobrevida livre de doença em 5 anos. Não houve diferença significativa entre pacientes p53+ e p53-, tanto na sobrevida global (59% vs 65%), como na sobrevida livre de doença (57% vs 51%). A análise multivariada evidenciou que o estágio clínico do tumor (EC) foi o fator prognóstico mais significativo com relação à sobrevida global em 5 anos (87%) para os casos com tumores em EC iniciais vs 14% para EC avançados. As diferenças também foram significativas para a sobrevida livre de doença. Houve uma significativa correlação entre imunohistoquímica e história de tabaco, sem reflexo na sobrevida. Os dados demonstraram que a superexpressão de p53, detectada por coloração de imunohistoquímica nos pacientes portadores de CECCP submetidos à radioterapia, não foi preditiva quanto à sobrevida livre de doença. A análise multivariada evidenciou que somente estágio clínico foi fator prognóstico significativo na sobrevida. Houve uma associação significativa entre p53 e tabagismo, mas sem correlação com a sobrevida.

Gallo et al. (1996) analisaram a relevância prognóstica da expressão de bcl-2 na sobrevida livre de doença e na sobrevida global em 5 anos, em 71 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECCP), sendo: 50 (70,4%) de laringe, 12 (16,9%) de cavidade oral e 9 (12,7%) de orofaringe, tratados com radioterapia. A expressão de Bcl-2 foi

detectada em 21% dos casos estudados. Uma sugestiva associação entre exposição ao tabaco e Bcl-2 positivo (>30%) foi observada, mas sem correlação estatisticamente significativa. Esta associação foi significativa ($p = 0,03$) nos pacientes que tiveram falência do tratamento com radioterapia primária. Também foi observada uma alta taxa de Bcl2+ em biópsias pós-radioterapia de pacientes que tiveram recidiva em relação aos pacientes previamente irradiados. A análise univariada evidenciou que pacientes que tinham tumores que expressavam a proteína Bcl2 tiveram pior sobrevida global e uma tendência à pior sobrevida livre de doença em 5 anos após radioterapia. A análise multivariada evidenciou que, tanto para a sobrevida livre de doença, como para a sobrevida global, em 5 anos após radioterapia, a expressão de Bcl2 foi o principal indicador de mau prognóstico.

Raybauld-Diogène et al. (1997) estudaram 101 pacientes, sendo 36 com CEC de cavidade oral, laringe e hipofaringe e 65 de orofaringe, onde 63 receberam radioterapia externa e 37 receberam, também, um “boost” de braquiterapia (geralmente tumores T3 e T4) e 1 recebeu somente braquiterapia. Os marcadores p53, Ki-67, c-erb-B-2, GST π , HSP-27 foram analisados. O “cutoff” utilizado foi: p53 positivos > 10% e Ki-67 positivo quando > 20% de células coradas. A expressão de cada marcador foi correlacionada com controle local e sobrevida usando curvas de Kaplan-Meier. Análise multivariada, segundo regressão de Cox, foi feita incluindo todas as variáveis clínicas e imunohistoquímicas e evidenciou que p53, ki-67 e estágio T foram variáveis independentes. Expressão de p53 ($p53 > 10\%$) e baixo Ki-67 ($Ki-67 < 20\%$) permitiram identificar os pacientes que não

responderam à radioterapia. Pacientes com tumores p53 > 10% mostraram RR 3,78 maior de não estarem controlados pela radioterapia comparados com pacientes com tumores p53 < 10 (negativos). Para tumores com Ki-67 > 20% o RR foi de 0,25, comparado com tumores com Ki-67 < 20%. Quando a expressão de p53 e a proliferação celular (Ki67) foram consideradas simultaneamente, no modelo de Cox, a associação com resistência à RT foi altamente significativa. O RR para resistência com um marcador (p53 > 10% ou Ki67 < 20%) foi de 3,8 e quando p53 > 20% e Ki-67 < 20%, o RR foi de 14,87. Estádio T inicial (T1-2) vs Estádio T avançado (T3-4) mostrou RR 2,05 maior de recidiva local para os casos com tumores em estágio clínico avançado. Portanto, este estudo evidenciou que a expressão de p53, Ki-67 e estágio T surgiram como preditores independentes do controle local e da sobrevida dos pacientes tratados com RT. A superexpressão de p53 e a baixa proliferação celular podem ser usadas para predizer a resposta do câncer ao tratamento com radioterapia.

Gallo et al., (1999) investigaram a significância prognóstica da mutação do gene TP53 (exons 5-9) e a expressão da proteína Bcl-2 e p53 em 85 pacientes portadores de carcinoma epidermóide primários de cabeça e pescoço tratados com RT curativa. Foram estudados 85 casos. Detectaram a proteína Bcl2 em 20/85 (23,5%) e mutação da p53 em 38/85 (44,7%) dos casos estudados. Foi observada forte associação entre exposição ao tabaco e expressão de Bcl2 ($p = 0,003$) e p53 ($p = 0,049$) e a maioria dos cânceres Bcl2+ (70%) também apresentava mutação do gene TP53 ($p = 0,01$). A análise univariada evidenciou que escores Bcl2 > 30%

tiveram pior prognóstico, tanto na sobrevida livre de doença ($p = 0,034$), quanto na sobrevida global ($p = 0,06$). Não houve diferença significativa, tanto quanto à recidiva local, como na sobrevida global, em relação ao TP53 mutado ou não. Quando ambos marcadores estão alterados, Bcl2 > 30% e p53 mutado, novamente são altamente preditivos de pior prognóstico, tanto na sobrevida livre de doença, quanto na sobrevida global. A análise multivariada evidencia que fumar menos que 40 maços cigarro/ano e Bcl2 > 30% associado a p53+ mantiveram-se como variáveis independentes em relação à sobrevida livre de doença em 5 anos e Bcl2 > 30% associado a p53+ manteve-se como variável independente significativa de pior prognóstico, também na sobrevida global em 5 anos (Gallo et al. (1996) e Friedman et al. (1997) também tiveram resultados semelhantes).

Obata et al. (2000)* estudaram 38 pacientes portadores de CEC de orofaringe, sendo 30 tratados com radioterapia com intenção curativa, 4 com tratamento paliativo, 3 com cirurgia e 1 não realizou tratamento. O escore usado para IHQ: positivo se p53 foi > 10% de coloração nuclear castanho escuro. Teste exato de Fisher foi usado para analisar a associação entre expressão de p53 e os parâmetros clínicos: sexo, idade (<65 vs ≥ 65), Estágio T inicial (T1 e T2) vs T avançado (T3 e T4), N0 vs N 1-3, EC inicial (I e II) vs EC avançado (III e IV), grau histológico, uso de tabaco (Brinkman Index < 600 vs ≥ 600), consumo de álcool (Sake Index < 60 vs ≥ 60). Os

* Brinkman Index = número de cigarros consumidos/dia X tempo de consumo de tabaco, em anos.

Sake Index = (consumo de álcool/dia, em gramas) / 28g X tempo de consumo, em anos.

autores examinaram a frequência de p53 mutado em 38 pacientes portadores de CEC de orofaringe usando técnica de seqüenciamento gênico (ensaio funcional com leveduras “yeast”) comparando com a técnica de coloração por imunistoquímica (IHQ). O acúmulo da proteína p53 mutada foi detectado em 17 (45%) dos 38 casos através de IHQ e em 23 (61%) pela técnica de ensaio funcional “yeast”. Além dos 17 casos detectados por IHQ, a técnica de ensaio funcional “yeast” detectou mais 6 casos mutados. A seqüência do cDNA analisado revelou que mutações não detectadas por IHQ consistiam de 3 “frameshift”, 1 “non-sense” e 2 “missense”. IHQ normalmente não detecta mutações de p53 “frameshift” e “nonsense” (Wynford-Thomas et al., 1992 e Melhem et al., 1995; Sjögren et al., 1996; Logullo et al., 2000). Estes resultados mostram que a técnica de seqüenciamento gênico foi mais sensível na detecção das mutações 23/38 (61%), do que imunistoquímica 17/38 (45%). Devido a essa diferença, os autores realizaram as análises dos dados considerando os resultados das análises feitas com o seqüenciamento gênico e não os resultados da imunistoquímica. Mutação do p53 não foi associada com idade, sexo, estágio do tumor, ou grau de diferenciação histológica e consumo pesado de tabaco, mas teve correlação significativamente positiva para consumo intenso de álcool, sugerindo que a exposição prolongada ao álcool é mais associada à mutação do p53 do que o consumo de tabaco, em pacientes portadores de CEC de orofaringe. A sensibilidade à radioterapia foi examinada comparando-se o tamanho do tumor por ressonância nuclear magnética antes e após completar 45Gy de irradiação, em 18 casos

estadiados como tumores T2. Os resultados mostraram que tumores com p53 selvagem diminuíram significativamente em tamanho, quando comparados com aqueles com p53 mutado. Nos 33 pacientes tratados com intenção curativa, a sobrevida global após o tratamento completo foi melhor nos pacientes com p53 selvagem em relação aos pacientes com p53 mutado. Os autores concluem que a mutação do TP53 está associada com resistência à radioterapia e com decréscimo da sobrevida em CEC de orofaringe e que análises utilizando seqüenciamento gênico são mais fidedignas em relação às análises por imunistoquímica.

Raybaud et al. (2000) relatam que fatores prognósticos e radiorresistência em carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe (CECOO) são limitados. Nesse estudo, foi analisado o conteúdo do DNA nuclear como preditor de radiorresistência em pacientes portadores de CECOO. Radiorresistência tem sido definida como o aparecimento de recorrência local, ou quando há persistência do tumor após a radioterapia. Análise da ploidia do DNA foi feita por citometria estática sobre células suspensas coradas obtidas de material embebido em formol e fixado em parafina e corado com Feulgen. A ploidia do DNA foi correlacionada com a taxa de proliferação celular (Ki-67) e com o acúmulo de proteína p53, obtidas por imunistoquímica. O seguimento dos pacientes variou de 8 a 62 meses. A recorrência local (radiorresistência) foi observada em 17 de 56 pacientes (30,4%). Dos 56 tumores analisados, 28 (50%) eram DNA não-diplóides. Destes, 14(50%) eram radiorresistentes (recidivaram), comparados com apenas 3/28 (10,7%) de recidiva dos tumores diplóides. Vinte e três (41%)

de 56 mostraram p53 > 10% e 38 (67,9%) apresentaram baixa taxa de proliferação (Ki-67 < 20%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre DNA ploidia e sexo, sitio, grau histológico, ou estágio T. Houve diferença significativa entre ploidia e expressão de p53 ($p = 0,05$), mas não entre ploidia e expressão de Ki-67. A taxa de controle local foi de 79% para T1-2 vs 51% para T3-4. Uma comparável taxa de controle local foi observada para os sítios da orofaringe [27/39 (69,2%)] e da cavidade oral [12/17 (70,5%)]. Sexo, grau histológico, duração do tratamento, “boost” com braquiterapia e dose total não tiveram influência no controle local. Acúmulo da proteína p53 (p53 > 10%) foi preditivo de pobre controle local (47% vs 81%, $p = 0,01$). Em pacientes com Ki-67 > 20% o controle local foi de 89% comparado com 58% quando Ki-67 < 20%. A influência da ploidia foi correlacionada com p53 e Ki-67. Entre os 33 casos de p53 < 10% (negativos, portanto), nenhum de 20 casos, que eram os diplóides, tiveram recorrência ou progressão da doença, enquanto 6 de 13 não diplóides tiveram. Esta diferença mostrou-se significativa estatisticamente. Em contraste, entre os 23 casos de p53 > 10% (positivos), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os casos diplóides e não diplóides. Quando Ki-67 < 20%, ploidia teve um bom valor preditivo correspondendo a altas taxas de recorrência. Usando-se o método de Kaplan-Meier, a taxa de falência local, em 3 anos, foi de 52,5% para pacientes com tumores não diplóides e apenas de 12,5% para pacientes com tumores diplóides com Ki-67 < 20%. Ploidia, entretanto, não foi estatisticamente significante em prever a resposta à radioterapia em

pacientes com Ki-67 > 20%. A análise multivariada evidenciou que os tumores não diplóides (RR = 4.3), p53+ (RR = 3,5) e Ki-67 < 20% (RR = 6.6) aparecem como fatores prognósticos independentes para o controle local, com pior prognóstico.

Couture et al. (2002) avaliaram retrospectivamente 304 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, subdivididos em laringe (90), orofaringe (104), cavidade oral (77), nasofaringe (12), hipofaringe (21). Todos foram submetidos à radioterapia, sendo 81% submetidos à radioterapia externa e 19% receberam radioterapia externa e um “boost” com braquiterapia e os tumores foram avaliados por imunistoquímica quanto aos níveis de expressão de p53 e Ki-67. As análises univariadas evidenciaram que pacientes do sexo feminino, não fumantes, não consumidores de álcool, com tumores menores (T1 e T2) e ausência de linfonodos tiveram melhor sobrevida global. Sítio comprometido (laringe em relação à orofaringe), tamanho do tumor (T1 e T2) e expressão de p53 com escore < 10 foram associados a melhores taxas de controle local. Pacientes com p53 superexpresso (p53 > 10%) e baixa taxa de proliferação celular (Ki-67 < 20%) tiveram taxa de controle local de apenas 45%, comparada com taxas de 67% para os outros valores, sendo esta diferença significativa. Esta associação foi ainda mais forte nos pacientes com lesões T1 e T2 (45% vs 77%). Na análise multivariada, quanto ao controle local para todos pacientes, as variáveis tamanho do tumor, sítio comprometido e expressão de p53 permaneceram como fatores preditivos independentes. O risco ajustado de recidiva local para tumores que

superexpressavam p53 ($p53 \geq 10\%$) foi de 1,5 comparado com tumores que não superexpressavam p53. É notável que o risco de recidiva local foi 1,9 vezes maior para tumores com a combinação de p53 superexpresso ($p53 \geq 10\%$) e baixa taxa de proliferação ($Ki-67 < 20\%$). Quanto à sobrevida global para todos os pacientes, as variáveis sexo feminino, tamanho do tumor (T1 e T2) e ausência de linfonodo comprometido permaneceram associadas com melhor sobrevida global. Houve uma tendência desfavorável quando p53 estava superexpresso, mas isto não foi estatisticamente significativo. Portanto, imunoexpressão de p53 foi fator preditivo independente para recidiva local em pacientes com CECCP tratados com radioterapia. A combinação entre p53 e Ki-67 pode ajudar a selecionar melhor os pacientes quanto à indicação de radioterapia, principalmente naqueles com tumores em estádios iniciais e com marcadores desfavoráveis ($p53 > 10\%$ e $Ki-67 < 20\%$), já que não responderam bem ao tratamento com radioterapia, nesta série.

Ataman et al. (2004) estudaram 309 pacientes que haviam sido randomizados em dois braços, onde 184 pacientes foram submetidos à radioterapia contínua hiperfracionada (54Gy em 36 frações realizadas em 12 dias) e 125 pacientes foram submetidos à radioterapia convencional (66Gy em 33 frações realizadas em 6,5 semanas). Idade, sexo, estado de saúde, T, N, histologia, sítios comprometidos [42 (13,6%) cavidade oral, 82 (26,5%) orofaringe, 34 (11,0%) hipofaringe e 138 (44,7%) laringe], recidiva local, locorregional e à distância associando-se a padrão de proliferação e diversos marcadores biológicos (p53, Ki-67, Bcl-2, CD31, ciclina D1) foram

avaliados. Os resultados evidenciaram que o primeiro sinal de falência do tratamento ocorreu em 99 (32,0%) pacientes como recorrência local, 41 (13,3%) como recorrência linfonodal, com ou sem falência local e 20 pacientes (6,5%) tiveram recorrência à distância (fora da área do campo de irradiação), como primeira manifestação de falência do tratamento. Linfonodo positivo no momento do diagnóstico diminuía o tempo de falência linfonodal, como era esperado. Estádios T mais avançados foram associados com um curto tempo para aparecimento de recorrência local e de metástases à distância (M). Ki-67 > 20% foi associado com diminuição do risco de falência à distância, sem significativo efeito na falência local e locorregional. Bcl-2 positivo (> 5%) foi associado com diminuição do risco de recidiva local, ou regional, portanto, foi um marcador prognóstico favorável. Não houve diferença quanto aos tipos de tratamento para os marcadores p53, Ki-67 e Bcl-2. Somente pacientes com alto score de CD31 tiveram melhores respostas quando submetidos à radioterapia hiperfracionada, mas este não é o foco desta tese.

Diversos outros trabalhos, relativos aos marcadores em questão, foram publicados, mas o tratamento empregado não consiste de radioterapia exclusiva, impossibilitando, assim, a comparação dos dados (Xie et al., 1999 (a); Xie et al., 1999 (b); Dijikema et al., 2000; Grabenbauer et al., 2000; Lavertu et al., 2001; Grabenbauer et al., 2003; entre outros).

3.2 Breve revisão sobre os marcadores tumorais utilizados

O gene TP53 é localizado no cromossomo 17p13 (braço curto do cromossomo 17). Trata-se de um supressor tumoral responsável pela codificação de uma fosfoproteína nuclear com peso de 53 quiloDáltons (p53), a qual, na sua forma selvagem, ou normal, tem uma meia-vida muito curta, em torno de 20 minutos, não se acumulando em níveis detectáveis à imunistoquímica. Já a proteína mutada tem meia-vida em torno de 6 a 8 horas, acumulando-se e sendo detectada através dos métodos de imunistoquímica. A mutação do gene TP53 está associada ao processo de carcinogênese (Nagai et al., 1998) e diversos estudos evidenciam que a expressão da proteína p53 está aumentada em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço com relatos que vão de 34% a próximo de 100% (Gusterson et al., 1991; Kropveld et al., 1999).

O gene TP53 está envolvido no controle do ciclo celular através da regulação da transcrição gênica, da síntese e reparo de danos do DNA e/ou da apoptose (morte celular programada). A proteína p53 induz uma parada do ciclo celular na fase G1, denominada primeiro ponto de checagem, ou “Gap 1”, permitindo que o DNA danificado seja reparado antes da duplicação celular, impedindo que o erro seja perpetuado. Provavelmente, na falha ou na impossibilidade desse mecanismo de proteção celular, a célula ative outros mecanismos protetores, como a indução da morte celular programada (apoptose) impedindo, novamente, que a célula se multiplique e perpetue a

alteração genética. Portanto, altas concentrações de p53 nuclear são mobilizadas na defesa celular, determinando uma ação anti-proliferativa, através do impedimento da complementação do ciclo celular e/ou ativando outros genes que codificam proteínas necessárias ao reparo do DNA alterado, e/ou conduzindo a célula para a morte celular programada (apoptose). Devido a esses mecanismos de proteção do genoma, o gene TP53 é conhecido como o “guardião do genoma” (Lane, 1992; Levine et al., 1991; Nylander et al., 2000).

A perda da função supressora do gene TP53 pode, portanto, permitir a proliferação celular. Diferentes métodos têm sido utilizados para estudar a cinética celular em lesões proliferativas: métodos não imunoistoquímicos (IHQ) e métodos imunoistoquímicos. Dentre os não IHQ temos: contagem de mitoses; marcação pela timidina tritiada seguida de radioautorradiografia; incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) seguida de imunocitoquímica anti-BrdU; marcação das regiões organizadoras de nucléolo pela prata (AgNOR); análise por citometria de fluxo. Dentre os métodos imunoistoquímicos, os marcadores mais utilizados são o Ki-67 e o PCNA (Girod et al., 1998; Sittel et al., 1999). As vantagens dos métodos imunoistoquímicos estão, fundamentalmente, no fato deles poderem ser utilizados em material embebido em parafina.

Neste estudo, optamos por utilizar o marcador Ki-67/MIB-1 por ser um marcador que tem maior consistência biológica em relação ao PCNA, como veremos a seguir, além de ser de fácil realização e de custo relativamente baixo.

Gerdes et al. (1983) descreveram a preparação de um anticorpo monoclonal de camundongo dirigido a um antígeno presente em células em proliferação, que eles denominaram de Ki-67. Esse anticorpo foi obtido em estudos que tinham como objetivo a produção de anticorpos monoclonais para antígenos nucleares específicos das células de Reed-Sternberg, através da imunização de camundongos com extrato nuclear da linhagem celular L428. O anticorpo chamado Ki-67, além de reagir com nucléolos das células de Reed-Sternberg, também reagiu com muitos nucléolos das células presentes em centros germinativos, mas não reagiu com células linfóides presentes fora do centro germinativo e nem com outras células, como plasmócitos e fibroblastos. Foram realizados testes em diversos tecidos humanos com padrão de proliferação conhecido e os resultados foram semelhantes aos obtidos nas duas décadas anteriores através de estudos de captação de timidina [H3] nos mesmos tecidos, evidenciando a associação do Ki-67 com a proliferação celular.

O Ki-67 é um antígeno expresso nas células em proliferação, constituído de um complexo biomolecular com peso molecular de 345 e 395 kDa com quase 30.000 pares de bases dentro do genoma humano, localizado no cromossomo 10 (10q25), presente em todas as fases da proliferação celular, exceto em células em repouso (fase G0) (Schonk et al., 1989; Gerdes et al., 1983; Gerdes et al., 1984).

Uma restrição à utilização desse marcador era o fato dele só poder ser utilizado em material a fresco ou congelado. Gerdes et al. (1992) e

Cattoretti et al. (1992) descrevem a produção de dois novos anticorpos (MIB-1 e MIB-3) capazes de detectar a expressão da proteína do Ki-67 em material embebido em parafina, que, associado à descoberta de métodos de recuperação antigênica, possibilitou a sua utilização em material arquivado em blocos de parafina, mesmo por longo tempo, já que os resultados foram semelhantes, quando comparados à detecção do antígeno Ki-67 em material congelado.

Existem diversas vantagens na utilização do Ki-67 em relação ao PCNA, pois o Ki-67 cora basicamente o núcleo e/ou nucléolo, ao passo que o PCNA pode estar superexpresso em alguns tipos de tumores malignos, não necessariamente durante as fases proliferativas do ciclo celular; células normais adjacentes à neoplasia e fora do ciclo celular podem expressar o antígeno. Além disso, o Ki-67 apresenta meia vida curta, com o antígeno sendo degradado uma hora, ou menos, após a mitose (Bruno e Darzynkiewicz, 1992), o que garante que células que já tenham saído do ciclo celular não expressem o antígeno. Já o PCNA tem meia vida longa, em torno de 20 horas, o que, contrariamente ao Ki-67, permite que células que há muito deixaram o ciclo celular continuem expressando o antígeno. Outras diferenças existem entre estes dois marcadores, sempre a favor da utilização do Ki-67, como: não influência do tempo de fixação e menor influência da diluição dos anticorpos para o Ki-67 na leitura da imunistoquímica. Devido a esses motivos, optamos pela utilização do Ki-67, sem contar que diversos laboratórios já o têm utilizado na sua prática diária, facilitando a sua utilização caso os resultados sejam a favor dessa conduta.

Pacientes com baixa expressão de Ki-67 apresentam alta probabilidade de não responderem à radioterapia (Raybaud-Diogène et al., 1997; Dijkema et al., 2000; Grabenbauer et al., 2000; Raybaud et al., 2000; Couture et al., 2001). Entretanto, Hirvikoski et al. (1999), Koelbel et al. (2001) e Ataman et al. (2004) não encontram correlação entre os índices de Ki-67 com a sobrevida em pacientes tratados com radioterapia, portadores de tumores de laringe, cavidade oral e cabeça e pescoço respectivamente.

Xie et al. (1999) estudaram 85 pacientes portadores de carcinoma epidermóide da língua oral tratados entre 1989 a 1992 e concluíram que marcadores de proliferação e de apoptose, principalmente a sua combinação, têm valor prognóstico significativo na sobrevida livre de doença ($p < 0,01$). Entretanto, além de se tratar de um tumor da cavidade oral, mais da metade dos pacientes desse estudo foram submetidos a tratamento com radioterapia associada à cirurgia, dificultando ainda mais a comparação dos dados com o nosso estudo.

Existem evidências de que a carcinogênese está relacionada com a resistência adquirida à apoptose (Hanahan, Weinberg, 2000). Historicamente, a apoptose foi descrita como um fenômeno caracteristicamente morfológico e distinto da morte celular por necrose (Kerr, 2002; Wyllie et al., 1972). Na necrose, ocorre o aumento do volume celular, das organelas e do núcleo e perda da integridade da membrana celular com vazamento do conteúdo celular com conseqüente reação inflamatória local. Já, na apoptose, as modificações na morfologia celular ocorrem de maneira

cronologicamente controlada, não havendo vazamento de material celular e não havendo reação inflamatória. Os produtos da degeneração nuclear e celular são englobados pela membrana citoplasmática como se formassem bolhas e são chamados de corpos apoptóticos. Funcionalmente, a morte celular programada é um fenômeno que se inicia pelo núcleo e mantém íntegras as organelas, principalmente as membranas citoplasmáticas e intracelulares, enquanto a necrose ou morte celular aguda se caracteriza por ser um fenômeno citoplasmático, com desorganização da estrutura das organelas e ruptura das membranas celulares.

A apoptose é a morte celular geneticamente regulada e envolve a morte celular tanto em células normais como em células tumorais (Wyllie, 1985). Genes da família do Bcl-2, entre eles Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-xs, Mcl-1, Bax e Bad parecem estar envolvidos na regulação da apoptose [Reed, 1994; Xie et al., 1999 (a)]. Enquanto as proteínas Bcl-2, Bcl-xl e Mcl-1, aparentemente, inibem apoptose, as proteínas Bax, Bad e Bcl-xs, aparentemente, promovem apoptose (Reed, 1994; Boise et al., 1995). Há evidências de que proteínas da família do gene Bcl-2 heterodimerizem ou homodimerizem entre si e a proporção relativa desses dímeros podem determinar se a célula inicia ou não a apoptose.

O gene bcl-2 foi originalmente detectado nos linfomas foliculares de células B. Trata-se de um proto-oncogene localizado no cromossomo 18q21, onde a translocação cromossômica t(14;18), q(21;32) desregula a codificação do mRNA, gerando uma superprodução de uma proteína de 26

KD, o Bcl-2 (Tsujiimoto, Croce, 1986). A proteína bcl-2 atua na inibição dos mecanismos de apoptose e reside, predominantemente, na membrana externa da mitocôndria, na membrana do retículo endoplasmático e na membrana nuclear (Krajewski et al., 1993; Akao et al., 1994). A habilidade da proteína Bcl-2 em inibir a apoptose sem afetar a proliferação celular definiu o gene Bcl-2 como uma nova e importante categoria de oncogenes (Reed, 1987; Reed, 1994; Vairo et al., 1996; Reed, 2000). O oncogene Bcl-2 (*B-cell lymphoma-leukemia-2* ou linfoma de célula B/leucemia-2) tem papel na “imortalização” da célula, por inibir a apoptose aumentando assim a resistência à terapêutica e aumentando o tempo de vida e o crescimento da célula tumoral. A sua expressão tem sido associada ao bloqueio da apoptose e/ou ser preditiva de radiorresistência (Miyashita et al., 1994; Gallo et al., 1996; Jordan et al., 1996; Gallo et al., 1999; Hotz et al., 1999; Reed, 1994; Reed, 1987; Reed, 2000).

O Bax, Bcl-2-associado à proteína X, é uma proteína de 21 kDa que induz à apoptose através da interação com o bcl-2 (Oltvai et al., 1993). A expressão aumentada da proteína Bax está associada à melhora nas taxas de sobrevivência (Hotz et al., 1999), por tornar as células tumorais mais responsivas à quimioterapia e à radioterapia (Sakakura et al., 1996).

As proteínas Bax e Bcl-2 são homólogas, apesar de Bax atuar como um acelerador da apoptose, enquanto Bcl-2 atua prolongando a vida da célula (Oltvai et al., 1993; Reed, 1994). Há relatos de que o balanço entre os níveis de Bax e Bcl-2 vai determinar se a célula entra, ou não, em apoptose

(Oltvai et al., 1993). A expressão aumentada de Bax e a relação Bcl-2/Bax >1 têm sido fortemente associadas a um pior prognóstico (Xie et al., 1999(a); Loro et al., 2000). A apoptose é regulada por uma complexa inter-relação entre diversos genes e suas proteínas, incluindo o gene supressor de tumor TP53 e membros da família da proteína Bcl-2. A apoptose é estimulada, ou inibida, como resultado da ativação, ou inibição, desses genes e proteínas, mas os estudos, em cabeça e pescoço, a exemplo dos relatos referentes aos outros marcadores, são escassos, muitas vezes com casuísticas inexpressivas, comparam sítios de comportamento biológico diferente e utilizam diversas formas de tratamento. Esses fatos justificam, em parte, os resultados controversos da literatura, já que alguns trabalhos encontram tais genes freqüentemente expressos (Ito et al., 1999; Xie et al., 1999 (a); Xie et al., 1999 (b); Hotz et al., 1999) e outros não (Homma et al., 1999; Condon et al., 2002; Kunz et al., 2003; Tsuzuki et al., 2005; Crowe, Sinha, 2006).

Visto que o crescimento tumoral pode ser o resultado do equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular programada (Thompson, 1995), é possível que a ativação precoce do proto-oncogene Bcl-2 durante a carcinogênese, inibindo a morte celular programada, possa conduzir à seleção de tumores menos proliferativos e indolentes, com prolongada sobrevida do tumor, em oposição às altas taxas de proliferação, sendo a chave do mecanismo determinante do crescimento tumoral.

A inibição da apoptose parece ter valor crítico no desenvolvimento do câncer, bem como na determinação de sua resposta terapêutica, tendo

como membros principais desse processo as proteínas da família Bcl-2. Entretanto, são inúmeras as proteínas expressas na via apoptótica. A detecção das respectivas proteínas, bem como das proteínas reguladoras da proliferação celular, não apenas delineiam o comportamento biológico do tumor, mas, também, podem caracterizar e predizer a resposta tumoral ao tratamento dos pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, como demonstrado por vários autores (Gallo et al., 1996; Gallo et al., 1999; Homma et al., 1999; Pena et al., 1999; Ito et al., 1999; Xie et al., 1999 (a); Xie et al., 1999 (b); Hotz et al., 1999; Ravi et al., 2001).

4. MÉTODOS

Foram selecionados do Serviço de Arquivo Médico (SAME), todos os prontuários de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole admitidos para tratamento no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A. C. Camargo, em São Paulo, no período de janeiro de 1970 a dezembro de 2000.

4.1 Critérios de elegibilidade

Foram adotados os seguintes critérios de elegibilidade para inclusão de casos no estudo:

- diagnóstico histológico confirmado de carcinoma epidermóide do palato mole (superfície inferior do palato mole e úvula);
- tratados exclusivamente por radioterapia nessa Instituição, com intenção curativa;
- ausência de outras neoplasias malignas primitivas prévias ou simultâneas;
- ausência de metástases à distância (M0) à admissão;
- não tratados previamente;
- disponibilidade dos blocos de parafina viáveis para a confecção das lâminas de “tissue microarray”;

- lâminas de “tissue microarray” viáveis para a análise imunoistoquímica da expressão dos marcadores tumorais p53, Ki-67, Bcl-2 e Bax.

4.2 Métodos propedêuticos

Todos os pacientes foram examinados por um ou mais médicos do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A. C. Camargo. Na primeira consulta ambulatorial foi obtida a história clínica detalhada do paciente, através dos seus relatos das queixas e duração dos sintomas. Além disso, foram formuladas questões específicas com respeito a outros sinais e sintomas não relatados ou mal esclarecidos anteriormente, assim como sobre os antecedentes de tabagismo e etilismo.

4.3 Exame loco-regional

O exame físico loco-regional de rotina consistiu em:

- inspeção da face e pescoço;
- rinoscopias anterior e posterior (em casos selecionados);
- oroscopia;
- laringoscopia indireta e/ou videolaringoscopia;
- palpação do pescoço.

Os dados foram detalhadamente descritos nas fichas clínicas quanto à localização, extensão, limites, tamanho e macroscopia das lesões. Esses aspectos foram, geralmente, registrados graficamente por meio de carimbos da região em questão, desenhando-se as lesões.

A palpação de todos os grupos de linfonodos cervicais foi rotineiramente bilateral e descrita na ficha clínica quanto à localização, mobilidade, superfície, consistência e dimensões. Consideramos clinicamente metastáticos os linfonodos situados na área de drenagem regional, apresentando consistência endurecida, superfície irregular, com ou sem alteração na mobilidade e, geralmente, com diâmetro superior a 1 cm. Esses dados foram registrados nos prontuários. Para este estudo, os dados foram reclassificados, adotando-se a classificação utilizada no “Memorial Sloan-Kettering Cancer Center” (Shah et al. 1990), para a descrição dos níveis de comprometimento linfonodal cervical e registro gráfico, por meio de carimbo, na ficha clínica.

- nível I: linfonodos do triângulo submental e submandibular;
- nível II: linfonodos jugular alto, ou terço superior do pescoço;
- nível III: linfonodos jugular médio, ou terço médio do pescoço;
- nível IV: linfonodos jugular baixo, ou terço inferior do pescoço;
- nível V: linfonodos da fossa supraclavicular ou do triângulo posterior.

As biópsias foram realizadas sob visão direta, sob anestesia tópica e/ou local.

4.4 Ficha de coleta de dados

As informações de cada paciente foram obtidas através da revisão dos prontuários médicos e digitadas em um banco de dados. A ficha de coleta de dados foi padronizada, na qual se coletaram informações detalhadas dos casos referentes a:

- características demográficas: raça, gênero, idade;
- características clínicas:
 - consumo de tabaco e de álcool;
 - tempo de história;
 - número de sítios comprometidos;
 - estadiamento clínico baseado no TNM (Sobin e Wittekind 2002).
- características do tratamento:
 - tipo de aparelho utilizado e dose aplicada;
- características histopatológicas:
 - grau de diferenciação histológica.
- seguimento:
 - local, data do diagnóstico e tratamento do segundo tumor primário;
 - local, data e tratamento da recorrência;
 - data e estado de saúde do paciente na última informação objetiva de seguimento.

Quanto ao hábito de consumo de tabaco foram considerados tabagistas todos os pacientes que relataram consumo regular de tabaco.

Quanto ao hábito de consumo de bebidas alcoólicas foram considerados etilistas todos os pacientes que relataram consumo regular de bebidas alcoólicas.

4.5 Estádio clínico

Todos os casos foram re-estadiados segundo critérios de classificação dos tumores publicado pela UICC (Sobin e Wittekind 2002).

O Sistema TNM para descrever a extensão anatômica da doença está baseado na avaliação de três categorias:

- Categoria T: extensão do tumor primário;
- Categoria N: ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais;
- Categoria M: ausência ou presença de metástase à distância, sendo a presença, um critério de exclusão.

Categoria T – Tumor primário

- T X – o tumor primário não pode ser avaliado;
- T 0 – não há evidência de tumor primário;
- T is – carcinoma “in situ”;

- T 1 – tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão;
- T 2 – tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão;
- T 3 – tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão;
- T4a – o tumor invade quaisquer das seguintes estruturas: laringe, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), músculo pterigóideo medial, palato duro e/ou mandíbula;
- T4b – o tumor invade quaisquer das seguintes estruturas: músculo pterigóideo lateral, lâminas pterigóides, nasofaringe lateral, base de crânio e/ou envolve a artéria carótida.

Categoria N – Linfonodos regionais

- N X – os linfonodos regionais não podem ser avaliados;
- N 0 - ausência de metástase em linfonodos regionais;
- N 1 - metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão;
- N 2a - metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão;
- N 2b - metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão;
- N 2c - metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão;
- N 3 - metástase em linfonodos com mais de 6 cm em sua maior dimensão.

Nota: os linfonodos da linha média são considerados linfonodos homolaterais.

Categoria M – Metástase à Distância

M X – a presença de metástase à distância não pode ser avaliada;

M 0 – ausência de metástase à distância;

M 1 – presença de metástase à distância.

O agrupamento do TNM resulta em Estádios Clínicos da doença (Quadro 1).

QUADRO I - Estádio Clínico

EC	T	N	M
EC 0	Tis	N0	M0
EC I	T1	N0	M0
EC II	T2	N0	M0
EC III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
EC IV A	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
EC IV B	T4b	qualquer N	M0
	qualquer T	N3	M0
EC IV C	qualquer T	qualquer N	M1

Para fins de análise, agrupamos em estádios iniciais, os Estádios Clínicos I e II e em estádios avançados, os Estádios Clínicos III e IV.

4.6 Análise histopatológica

Inicialmente foram selecionados 119 casos consecutivos que preenchem os critérios para o estudo. Desses, 19 foram submetidos à biópsia em outro Serviço e, portanto, não tínhamos os blocos de parafina correspondentes; 11 blocos não foram encontrados e 5 blocos não apresentavam condições para a realização de cortes histológicos. Após a confecção de lâminas para análise histológica com a coloração de HE (hematoxilina-eosina), não foi encontrado tumor viável para análise em 7 blocos. Portanto, foram selecionados 77 casos, os quais foram re-analisados por médicos patologistas (FAS e HT) do Hospital A. C. Camargo, para confirmação do diagnóstico, reclassificação do grau de diferenciação histológica e delimitação, no bloco de parafina, da área mais significativa de cada tumor para a confecção de lâminas de “tissue microarray”.

Os graus de diferenciação histológica foram determinados com base nos critérios propostos pela Organização Mundial da Saúde, que levam em conta a proporção de queratinização, pleomorfismo nuclear e celular e atividade mitótica do tecido em análise (Pindborg et al. 1977). Os graus são:

Grau 1 - Bem diferenciado: o aspecto histológico e citológico se assemelha ao epitélio de revestimento habitual da mucosa orofaríngea. Há uma grande proporção de células basais e células epidermóides com pontes intercelulares; a queratinização é um aspecto proeminente; poucas figuras de mitose são vistas e mitoses

atípicas ou células epiteliais multinucleadas são extremamente raras; pleomorfismo nuclear e celular é mínimo;

Grau 2 - Moderadamente diferenciado: essa é uma neoplasia com aspecto intermediário entre bem diferenciado e pouco diferenciado. Comparado com o carcinoma epidermóide bem diferenciado, tem menos queratinização e mais pleomorfismo nuclear e celular; há mais figuras de mitose e algumas são de forma atípica; as pontes intercelulares são menos evidentes;

Grau 3 - Pouco diferenciado: histológica e citologicamente há apenas uma pequena semelhança com o epitélio escamoso estratificado da mucosa orofaríngea. A queratinização raramente está presente e as pontes intercelulares são extremamente escassas; figuras de mitose são freqüentes e mitoses atípicas podem ser observadas; pleomorfismo nuclear e celular são evidentes e células multinucleadas são freqüentes.

4.7 Método de tissue microarray (TMA)

Os 77 tumores previamente selecionados foram incluídos na construção de um “bloco receptor, de parafina,” de TMA (Beecher Instruments, Silver Spring, MD), a partir de amostras colhidas com agulha de 1,0 mm de diâmetro (TMArrayer punch MP 10x1,0mm), no local previamente

demarcado pelo patologista, no “bloco doador original, de parafina,” referente à área mais representativa de neoplasia. Os casos foram dispostos, no bloco receptor, em ordem numérica crescente e realizamos, por microtomia mecânica, 100 cortes histológicos seriados com 3 µm de espessura cada 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 e as lâminas foram avaliadas quanto à sua representação tumoral por um patologista (FAS).

4.8 Análise imunoistoquímica

Após a constatação da representatividade tumoral nas lâminas de “tissue microarray” coradas em H.E. realizou-se a desparafinização dos cortes de 3µm de espessura, em lâminas previamente tratadas com 3-Aminopropyltriethoxy-silano (Sigma, A-3648, EUA) e deixadas por 24hs em estufa a 60°C. Os cortes foram desparafinados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol:

Xilol a 60°C por 20 minutos;

Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos;

Etanol 100% 30 segundos cada passagem;

Etanol 85% 30 segundos;

Etanol 70% 30 segundos;

Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.

Para recuperação dos antígenos, as lâminas foram mergulhadas em solução tampão de ácido cítrico 10mM pH 6,0 e aquecidas em panela de pressão elétrica (National, SR-206N) por 15 minutos, após o início da pressão. As lâminas foram retiradas e deixadas para esfriar por 20 minutos, à temperatura ambiente, e lavadas em água corrente e destilada. A seguir, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%, (água oxigenada 10 vol) com 3 trocas de 5 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e, após, com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4, por 5 minutos. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido (Quadro 2), em tampão PBS, contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, USA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 2 horas à temperatura ambiente em câmara úmida.

QUADRO 2 - Anticorpos utilizados e sua diluição

ANTICORPOS	CLONES	TÍTULOS	FABRICANTES
Bcl-2	124	1:50	DAKO
Bax	Policlonal	1:200	DAKO
Ki-67	Ki-S5	1:100	DAKO
p53	DO-7	1:500	DAKO

Em seguida, as lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e incubadas com o anticorpo secundário biotinizado (Biotinylated Link Universal) do Kit LSAB + System-HRP (DAKO, K0690, CA

93013,USA) por 20 minutos à temperatura ambiente. Foram, então, lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e, após, incubadas com o complexo-(Streptavidin-HRP) por 20 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e reveladas através da incubação em solução substrato: 3,3'Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 100mg% (Sigma, D-5637, EUA); 1ml de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1ml de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol); 100ml de PBS; 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Após isso, observou-se, ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação. Procedeu-se à lavagem das lâminas em água corrente e água destilada por 3 minutos e, após, contracolorou-se com hematoxilina de Harris (Merck®) por 1 minuto, sucedida de abundante lavagem em água corrente e destilada. A seguir, imergiu-se 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando-se, em seguida, em água corrente e destilada.

As lâminas foram desidratadas em:

Etanol 50%, 30 segundos;

Etanol 80%, 30 segundos;

Etanol 95%, 30 segundos;

Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada;

Xilol 4 vezes, 30 segundos cada.

Procedeu-se à montagem das lâminas em Entellan neu (Merck - Alemanha).

As reações imunoistoquímicas foram realizadas em 2 níveis para cada caso. Para o anticorpo p53, foram utilizadas as lâminas dos níveis 12 e 47; para o anticorpo Ki-67, as lâminas dos níveis 11 e 46; para o anticorpo Bcl-2, as lâminas dos níveis 09 e 45 e para o anticorpo Bax, foram utilizadas as lâminas dos níveis 08 e 44.

Todos os casos foram analisados por pelo menos dois de três médicos patologistas (FAS, CALP e CK), sendo (FAS e CALP) do Hospital do Câncer A. C. Camargo - SP e (CK) do Serviço de Medicina Diagnóstica de Erechim-RS. As leituras das lâminas feitas pelos patologistas FAS e CALP foram realizadas em microscópio óptico (Nikon Labofhot – amplitude de 400x). As leituras das lâminas feitas pelo patologista CK foram realizadas em microscópio óptico Nikon Eclipse E200 trinocular, com câmera Samsung Digital color SCC-131 dupla cabeça Y-THF com objetivas Nikon E Plan (4X/0.10; 10X/0.25; 20X/0.4; 40X/0.65; 100x/1.25).

Dos 77 casos que constituíram a lâmina de “tissue microarray”, em 4 (5,2%) casos houve impossibilidade de leitura para todos os marcadores, totalizando 73 casos viáveis. Destes, 4 casos não foram viáveis para análise do p53; 3 para análise do Bax; 2 para análise do Ki-67. Portanto, a nossa casuística ficou constituída de 73 casos, sendo: 73 casos de Bcl-2; 71 de Ki-67; 70 de Bax e 69 de p53.

A leitura das reações de imunoistoquímica foi realizada baseada nos trabalhos inicialmente relatados por Allred et al. (1998). Com exceção do Ki-67, para todos os outros marcadores foram atribuídos escores que variaram de zero até oito, referentes à soma dos escores “proporção” e “intensidade”

da coloração das células observadas em um determinado campo (núcleo, no caso do p53 e Ki-67, citoplasma e membrana, no caso do Bcl-2 e citoplasma no caso de Bax). À proporção foi atribuído um escore de zero a cinco, sendo: zero, quando nenhuma “célula” foi observada corada; 1, quando 1 em um campo de 100; 2, quando $> 1/100$ e $\leq 1/10$; 3, quando $> 1/10$ e $\leq 1/3$; 4, quando $> 1/3$ e $\leq 2/3$ e 5, quando $> 2/3$ (campo predominantemente ou totalmente corado). À intensidade foi atribuído um escore de zero a três, baseado na intensidade da coloração, segundo a seguinte classificação: zero, quando nenhuma célula foi observada corada; 1, quando era fraca; 2, quando intermediária ou média e 3, quando a intensidade da coloração das células era forte (castanho escuro). Todos marcadores continham controles negativos e positivos para a comparação da proporção e da intensidade e para a consequente confirmação da positividade do teste. O escore final corresponde à soma dos escores proporção e intensidade, exceção feita ao Ki-67, onde consideramos a proporção das células coradas, independentemente da intensidade da coloração. A figura 1 ilustra o escore utilizado nas interpretações das colorações.

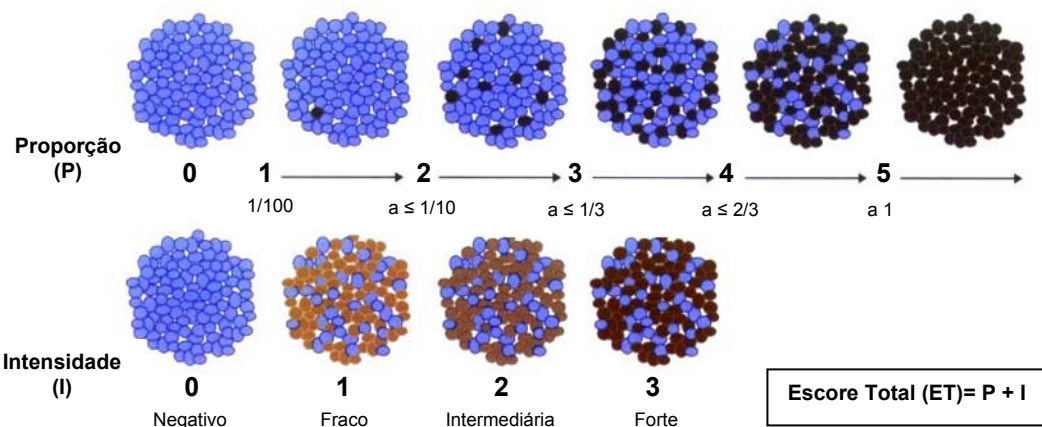


FIGURA 1 - Escores: Modificado de Allred et al. (1998).

Para cada marcador foram analisadas duas lâminas de “tissue microarray”, sendo considerada, a lâmina de maior escore. Para fins de análise estatística a expressão dos antígenos foi considerada negativa, ou positiva. A expressão dos marcadores p53, Ki-67 e Bcl-2 foi considerada negativa quando o escore foi ≤ 2 e positiva, quando >2 . A expressão de Bax foi considerada negativa quando o escore foi ≤ 6 e positiva, quando >6 . A figura 2 ilustra casos de escore negativo e positivo.

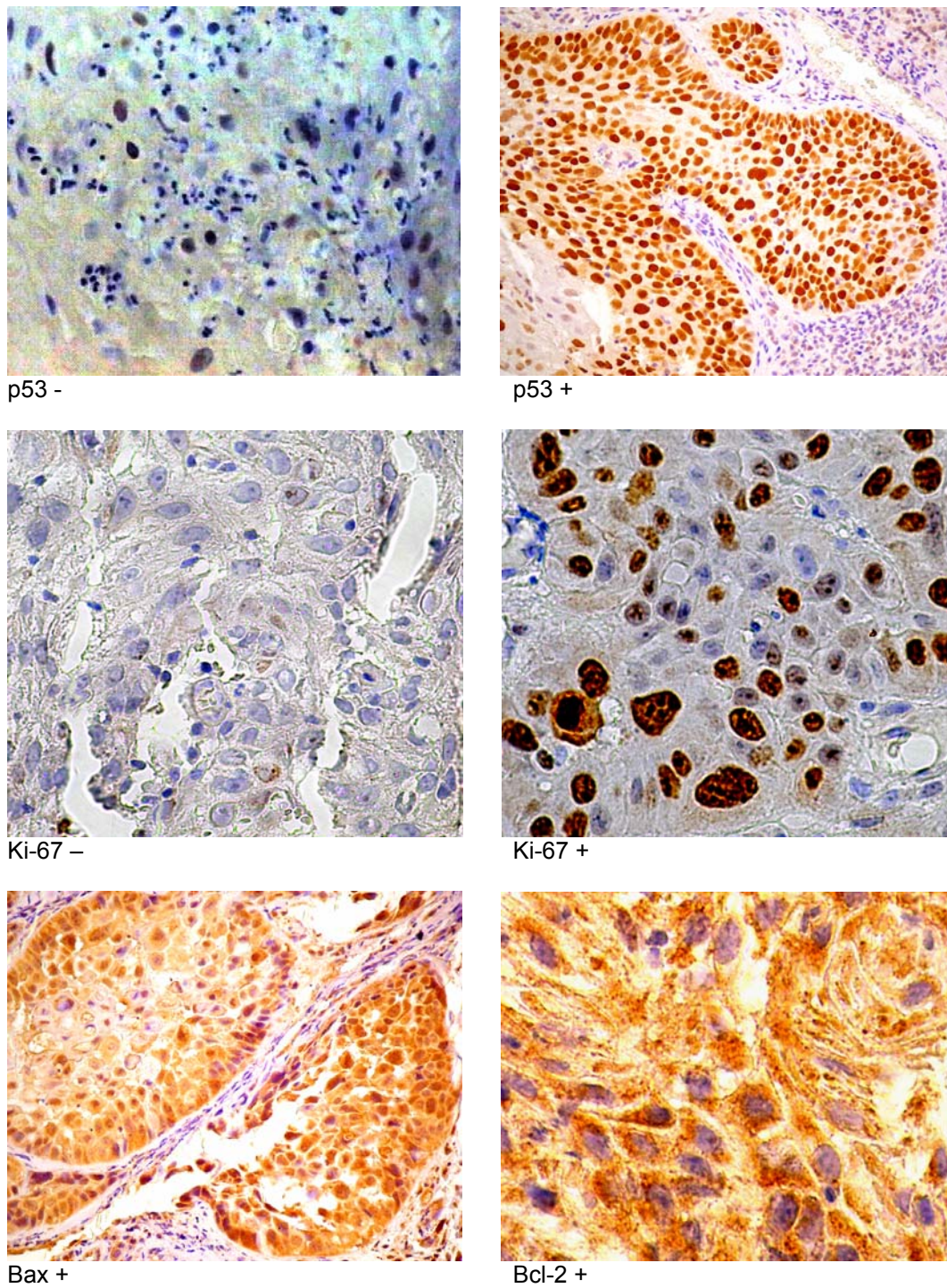


FIGURA 2 - Exemplos de escores negativos e positivos segundo a expressão ou não dos marcadores p53, Ki-67, Bcl-2 e Bax.

4.9 Tratamento

Todos os pacientes foram submetidos à radioterapia exclusiva e utilizaram Bomba de Cobalto ou Acelerador Linear de Partículas de 4 Mev, com doses administradas no leito tumoral e no campo cervical (pescoço e fossa supraclavicular) com doses de 50 Gy (em 25 frações diárias de 2 Gy) e administravam-se mais 20 Gy no leito tumoral. Ao irradiar somente o tumor primário, chamamos de campo facial. Quando foi irradiado o tumor primário e uma ou mais cadeia linfonodal cervical, chamamos de campo cérvico-facial e quando foi irradiada, também, a fossa supraclavicular, chamamos de campo de fossa supraclavicular.

4.10 Falência do tratamento

Consideramos como persistência da doença quando se observou a presença da doença, seja local, ou regional, em alguma consulta durante os seis primeiros meses após a data do início do tratamento com radioterapia exclusiva. Utilizamos a expressão “recorrência da neoplasia”, para o reaparecimento da doença primariamente tratada com radioterapia exclusiva, após este período de 6 meses, seja local e/ou regional e/ou à distância e, sempre que possível, confirmada histologicamente.

Tanto os casos de persistência quanto os de recidiva tiveram a sua terapêutica planejada individualmente, levando-se em conta critérios de operabilidade e ressecabilidade. O critério de operabilidade baseou-se na possibilidade do paciente ser submetido à cirurgia, dadas as suas condições clínicas. O critério de ressecabilidade diz respeito à possibilidade da neoplasia ser ressecada radicalmente, ou com intenção curativa, ou paliativa.

4.11 Segundo tumor primário

O diagnóstico de segundo tumor primário se baseou nos critérios de Warren-Gates (1932):

- histologia de neoplasia maligna;
- topograficamente distinto do tumor primário e separado por tecidos normais;
- descartada a hipótese de se tratar de metástase do tumor primário.

4.12 Seguimento

Todos os pacientes foram orientados a procurar o ambulatório médico em períodos preestabelecidos, ou em qualquer momento, caso suspeitassem da possibilidade de recorrência neoplásica.

O acompanhamento dos pacientes, após o tratamento, foi realizado em consultas ambulatoriais, geralmente de 1 a 3 meses no primeiro ano, de 2 a 4 meses no segundo ano, de 3 a 6 meses no terceiro ano, de 4 a 6 meses no quarto e quinto anos e anual, após o quinto ano.

Nas consultas, avaliamos os pacientes conforme já descrito no exame loco-regional. Em termos de exames subsidiários foi realizado raio X de tórax anualmente. Outros exames foram indicados de forma individualizada, conforme as queixas e achados ao exame clínico.

4.13 Critérios de avaliação dos resultados

No período de seguimento, verificaram-se as seguintes possibilidades de resultado do tratamento:

- paciente vivo sem doença;
- morte causada pelo câncer (MOCA);
- morte assintomática (devida a causas não relacionadas diretamente com o câncer);
- perda de seguimento.

4.14 Análise estatística

Utilizou-se o programa estatístico SPSS 13.0 for Windows para a análise estatística dos dados (SPSS, 2003).

Para a comparação entre as variáveis estudadas utilizou-se o teste de qui-quadrado.

Para estudar o efeito isolado das variáveis sobre o prognóstico, mediram-se os dados em termos de sobrevida específica por câncer e sobrevida global.

O tempo de sobrevida específica por câncer foi calculado como o período entre o início do tratamento e a data da ocorrência do óbito, decorrente do câncer de palato ou como o período entre o início do tratamento e a data da última observação objetiva de seguimento (para os pacientes vivos, ou que faleceram por causa não decorrente da doença).

O tempo de sobrevida global foi calculado como o período entre o início do tratamento e a data do óbito, decorrente de qualquer motivo, ou a data da última observação objetiva de seguimento (para os pacientes vivos nessa data).

A análise de sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meier e a comparação das curvas através do teste de log-rank (Campos-Filho, Franco, 1988).

O modelo de regressão de Cox foi utilizado para o cálculo das “hazard ratios” para óbito (HR). A técnica “stepwise forward” foi utilizada para a construção dos modelos multivariados. Foram selecionadas, para o modelo de regressão de Cox, todas as variáveis com $p < 0,20$ na análise univariada.

Para os cálculos de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier ou para utilização da regressão de Cox foram considerados não censurados:

- no cálculo de sobrevida específica por câncer: pacientes vivos na data do último seguimento ou pacientes que faleceram e cuja **causa mortis** não foi relacionada ao câncer;
- no cálculo de sobrevida global: pacientes vivos na data do último seguimento.

Pacientes que não compareceram ao hospital, por um período maior do que 2 vezes ao período estipulado pelo médico para o seu retorno, foram considerados como perdidos de seguimento na data da última informação obtida. Foram realizados telefonemas, envio de cartas, fax, pesquisa pela Internet, ou qualquer forma de tentativa de obtenção de informações a respeito do estado de saúde desses pacientes. Os pacientes encontrados eram convidados a comparecer em uma consulta de revisão, ou, nos casos de impossibilidade geográfica, eram solicitadas informações sobre o seu estado de saúde. No caso de falecimento, eram solicitados, aos familiares, a data, a causa da morte e o envio de cópia, ou fax, do atestado de óbito, para anexá-lo ao prontuário. Caso não se obtivessem informações, continuavam

categorizados como “perdidos de seguimento”, a partir da data da sua última consulta. Esses pacientes contribuíram para a curva de sobrevida até esta data, sendo, então, classificados como “sob censura”.

A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0,05$ bicaudal. Para o modelo de regressão de Cox considerou-se a significância estatística para um valor de $p \leq 0,10$ bicaudal;

4.15 Considerações éticas

Por se tratar de um estudo retrospectivo, sem a identificação de qualquer paciente como indivíduo, torna-se desnecessária a aplicação do termo de consentimento pós-informado aos mesmos.

Esse projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C.Camargo sob o protocolo N° 619/04 e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o protocolo N° 242/05.

5. RESULTADOS

5.1 Dados demográficos

Foram selecionados 73 pacientes que preencheram os critérios de inclusão. A idade variou de 41 a 90 anos, com média de 60 anos e mediana de 59 anos. O sexo masculino foi predominante, com uma proporção de 5,1 casos masculinos para cada caso feminino, assim como a cor branca foi predominante. Os detalhes da distribuição dos dados demográficos são apresentados na tabela 1.

TABELA 1 - Distribuição dos dados demográficos

Variável	Categoria	anos
Idade	Variação	41-90
	Média	60
	Mediana	59
		n (%)
Sexo	Masculino	61 (83,6)
	Feminino	12 (16,4)
Raça	Branca	59 (80,8)
	Negra	6 (8,2)
	Parda/outra	8 (11,0)

5.2 Dados clínicos

O tempo de história entre a percepção dos sintomas e a primeira consulta variou de 1 a 12 meses com média de 5,9 meses e mediana de 3 meses. A maioria dos pacientes relatou consumo de tabaco (86,3%) e consumo regular de bebidas alcoólicas (76,7%).

O exame clínico evidenciou que 52 pacientes (71,2%) apresentavam o tumor ultrapassando a linha média. Quanto aos sítios envolvidos, em apenas 3 casos (4,1%), o tumor comprometia somente o palato mole. Nos demais casos, havia comprometimento de uma ou mais regiões adjacentes. O diâmetro da lesão, à primeira consulta, variou de 1,5 a 10 cm, sendo que 38 pacientes (52,1%) apresentavam lesões maiores de 4cm. Em 8 pacientes (11,0%) havia a suspeita clínica de invasão óssea.

Os detalhes da distribuição referentes ao tempo de história, tabagismo, etilismo, sítios comprometidos, invasão de osso, lateralidade e diâmetro da lesão são apresentados na tabela 2.

Quanto ao tamanho do tumor (categoria T), observamos que em 47 (64,4%) pacientes o estágio T era avançado (T3 ou T4). Quanto ao comprometimento linfonodal do pescoço (categoria N), observamos que em 36 (49,3%) pacientes havia linfonodos clinicamente positivos previamente ao início do tratamento. Desses, 25 (69,4%) foram classificados nas categorias N2 ou N3.

TABELA 2 - Distribuição das variáveis clínicas

Variável	Categoria	n (%)
Tempo História (meses)	1 – 4	46 (63,0)
	5 – 6	14 (19,2)
	7 – 12	12 (16,4)
	Ignorado	1 (1,4)
Tabagismo	Não	3 (4,1)
	Sim	63 (86,3)
	Ignorado	7 (9,6)
Etilismo	Não	14 (19,2)
	Sim	56 (76,7)
	Ignorado	3 (4,1)
Sítios Comprometidos	1	3 (4,1)
	2 -3	29 (39,7)
	≥ 4	41 (56,2)
Invasão óssea	Não	65 (89,0)
	Maxilar	7 (9,6)
	Mandíbula	1 (1,4)
Lateralidade	Unilateral	10 (13,7)
	Linha média	11 (15,1)
	Bilateral	52 (71,2)
Diâmetro (cm)	1,5 – 4	35 (47,9)
	> 4	38 (52,1)

Quanto ao estágio clínico, observamos que 53 (72,6%) pacientes apresentavam tumores em estágio clínico avançado (EC III e IV). Os detalhes da distribuição destes dados clínicos, segundo as categorias T, N e EC, são apresentados na tabela 3.

TABELA 3 - Distribuição dos casos de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole de acordo com a associação entre as categorias T,N e estágio clínico (EC) pela classificação tnm da uicc 2002 (sobin e wittekind, 2002)

		N0	N1	N2a	N2b	N2c	N3	TOTAL
EC I	T1	2	0	0	0	2	0	4
EC II	T2	18	2	2	0	0	0	22
EC III	T3	7	5	1	1	3	0	17
EC IVA	T4a	10	3	2	0	3	0	18
EC IVB	T4b	0	1	2	0	4	5	12
TOTAL		37	11	7	1	12	5	73

5.3 Dados anatomopatológicos

Quanto ao grau de diferenciação histológica, observamos um predomínio para os graus I e II (bem e moderadamente diferenciados), totalizando 51 (69,9%) casos. A tabela 4 apresenta os dados referentes ao exame anatomopatológico.

TABELA 4 - Distribuição dos casos quanto aos dados histológicos

Variável	Categoria	n(%)
Grau histológico		
	Grau 1	28 (38,4)
	Grau 2	23 (31,5)
	Grau 3	22 (30,1)

5.4 Dados imunoistoquímicos

Os escores encontrados para os marcadores tumorais p53, Ki-67, Bcl-2 e Bax estão apresentados na tabela 5.

TABELA 5 - Distribuição dos casos quanto aos escores imunoistoquímicos

Marcador	p53	Ki-67	Bcl-2	Bax
Score				
0	28	2	52	0
1	0	9	0	0
2	0	20	2	0
3	3	19	10	0
4	8	14	3	0
5	9	7	3	3
6	5	--	3	15
7	11	--	0	23
8	5	--	0	29
Sub total	69	71	73	70
Ignorado	4	2	0	3
Total	73	73	73	73

Para fins de análise estatística, o teste foi considerado negativo, ou positivo, sendo considerado negativo quando o escore foi ≤ 2 e positivo quando >2 para os marcadores p53, Ki-67 e Bcl-2. Para Bax, o escore foi considerado negativo quando ≤ 6 e positivo quando >6 (Tabela 6) .

TABELA 6 - Distribuição dos casos quanto aos dados imunoistoquímicos considerados como negativos ou positivos

Marcador	p53	Ki-67	Bcl-2	Bax
Escore	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Negativo	28 (40,6)	31 (43,7)	54 (74,0)	18 (25,7)
Positivo	41 (59,4)	40 (56,3)	19 (26,0)	52 (74,3)
Total	69 (100,0)	71 (100,0)	73 (100,0)	70 (100,0)

5.5 Terapêutica

Todos os pacientes foram submetidos à radioterapia exclusiva, sendo que a maioria 68 (93,2%) utilizou um acelerador linear de 4 Mev, ao passo que em apenas 5 (6,8%) pacientes utilizou-se a Bomba de Cobalto.

Dos 73 pacientes, um foi submetido apenas à irradiação no campo facial, tendo recebido a dose de 60 Gy. Todos os outros foram submetidos à irradiação no campo cérvico-facial, dos quais em 56 foi incluído o campo da

fossa supraclavicular. A maioria dos pacientes recebeu doses acima de 60 Gy no campo cérvico-facial e de 50 Gy na fossa supraclavicular. A tabela 7 apresenta os dados referentes ao tratamento no que tange à dose e ao local da irradiação.

TABELA 7 - Distribuição dos casos de acordo com os campos de irradiação e dose recebida

Campo de irradiação	Dose de Irradiação (Gy)	n
Facial		
	60	1
Cérvico-facial		
	40 a < 60	5
	60 a ≤70	60
	71 a 78	7
Fossa supraclavicular		
00	00	17
34 a 48	34 a 48	7
50	50	49

5.6 Seguimento

5.6.1 Falência do tratamento

O tempo de seguimento variou entre 50 dias a 276,4 meses, com mediana de 21,6 meses.

Dos 73 casos, observamos que em 47 (64,4%) houve a constatação da presença de neoplasia em alguma fase do seguimento (Tabela 8).

TABELA 8 - Distribuição dos casos de acordo com a presença, ou ausência de tumor após o tratamento

Ausência/Presença de doença	n (%)
Ausente	26 (35,6)
Presente	47 (64,4)

Entre os 47 casos em que houve a presença de neoplasia em algum período do seguimento, em 23 (48,9%) casos constatou-se a presença local e/ou locorregional do tumor nos 6 primeiros meses, sendo estes casos considerados como “persistência tumoral”. A presença de doença após os 6 meses de seguimento foi considerada como recorrência da doença, assim como a presença de metástase à distância. A tabela 9 apresenta os dados referentes à presença de tumor após o tratamento.

TABELA 9 – Distribuição dos casos de acordo com a presença de tumor após o tratamento

Doença	Persistência tumoral	Recorrência	Total
Presente	23 (48,9)	24 (51,1)	47 (100,0)
a) Local (L)	18 (38,3)	18 (38,3)	36 (76,6)
b) Locorregional:			
(Ni)	3 (6,4)	2 (4,3)	5 (10,6)
(L) + (Ni)	2 (4,3)	2 (4,3)	4 (8,5)
(Ni) + (Nc)	0 (0,0)	1 (2,1)	1 (2,1)
c) À Distância			
Osso		1 (2,1)	1 (2,1)

Ni= linfonodo cervical ipsi-lateral

Entre os 47 casos que apresentaram falência do tratamento, a maioria ocorreu nos 2 primeiros anos, após o término do tratamento (Tabela 10).

TABELA 10 - Distribuição dos casos de acordo com o tempo para diagnóstico de persistência ou recorrência da doença

Tempo de aparecimento da doença (meses)	n (%)
≤ 6	24 (51,1)
> 6 a ≤ 12	12 (25,5)
> 12 a ≤ 18	3 (6,4)
> 18 a ≤ 24	3 (6,4)
>24 a ≤ 36	4 (8,5)
> 36 a ≤ 95	1 (2,1)
Total	47 (100,0)

5.6.2 Tratamento das falências do tratamento inicial

Dos 47 casos que apresentaram persistência ou recorrência tumoral, 22 (46,8%) estavam fora de possibilidade terapêutica, sendo submetidos somente a cuidados paliativos. Os 25 casos restantes foram submetidos a

diversas formas de tratamento, onde a cirurgia, associada ou não à radioterapia e/ou à quimioterapia foi o tratamento mais empregado (21/25 casos). A tabela 11 apresenta os tratamentos realizados.

TABELA 11 - Distribuição dos casos com persistência e recorrência tumoral segundo o tratamento de resgate ou de suporte

Tratamento de resgate ou de suporte	n (%)
Somente Suporte Clínico	22 (46,8)
Baseado em Cirurgia	21 (44,7)
(com ou sem RT e/ou QT)	
Reirradiação	1 (2,1)
Quimioterapia (QT)	2 (4,3)
Reirradiação + QT	1 (2,1)
Total	47 (100,0)

5.6.2 Segundo tumor primário

Durante o período de seguimento, observamos a ocorrência de 10 (13,7%) casos de aparecimento de um segundo tumor primário, sendo 5 (50%), na região da cabeça e pescoço (Tabela 12).

TABELA 12 - Distribuição dos casos de acordo com o diagnóstico de segunda neoplasia primária

Local do 2º Tumor Primário	n (%)
Língua	1 (10,0)
Assoalho boca	1 (10,0)
Gengiva inferior	1 (10,0)
Laringe	2 (20,0)
Esôfago	2 (20,0)
Estômago	1 (10,0)
Fígado	1 (10,0)
Colo Uterino	1 (10,0)
Total	10 (100,0)

5.6.3 Situação ao final do seguimento

Na data da última avaliação objetiva da atualização do seguimento, realizada em maio de 2006, observamos que a maioria dos pacientes, 51 (69,9%), havia morrido de carcinoma epidermóide de palato mole. Quatorze pacientes haviam morrido por outras causas não relacionadas ao tumor primário e apenas 4 (5,5%) apresentavam-se vivos sem doença. Quatro pacientes estavam vivos na última observação clínica, mas não retornaram para consulta, sendo considerados “perdidos de seguimento” (Tabela 13).

TABELA 13 - Distribuição dos casos de acordo com status

Status	n (%)
Vivos sem doença	4 (5,5)
Mortos por câncer	51 (69,9)
Mortos por outras causas	14 (19,2)
Perdidos de seguimento	4 (5,5)
Total	73 (100,0)

5.7 Análises das correlações entre as variáveis estudadas

5.7.1 Análise da correlação entre os marcadores tumorais e as variáveis demográficas, clínicas e grau histológico

Quando analisamos a expressão dos marcadores imunoistoquímicos p53, Ki-67, Bcl-2 e Bax em relação às variáveis demográficas, clínicas e o grau de diferenciação histológica, não observamos associações estatisticamente significativas em relação a nenhuma variável estudada (Tabelas 14 a17).

TABELA 14 - Parâmetros demográficos, clínicos e patológicos segundo a expressão de p53

Variável	Categoria	n = 69	negativo	positivo	p
Idade (anos)	≤ 60	37	17	20	0,329
	> 60	32	11	21	
Sexo	Masculino	58	25	33	0,327
	Feminino	11	3	8	
Raça	Branca	56	22	34	0,650
	Não Branca	13	6	7	
Tabagismo	Não	3	1	2	0,845
	Sim	59	23	36	
Alcoolismo	Não	13	3	10	0,144
	Sim	53	24	29	
Categoria T	T(1 + 2)	24	11	13	0,516
	T(3 + 4)	45	17	28	
Categoria N	Negativo	33	13	20	0,848
	Positivo	36	15	21	
Estádio Clínico	EC (I + II)	18	8	10	0,698
	EC (III + IV)	51	20	31	
Grau Histológico	G (1 + 2)	48	19	29	0,799
	G 3	21	9	12	

TABELA 15 - Parâmetros demográficos, clínicos e patológicos segundo a expressão de Ki-67

Variável	Categoria	n = 71	negativo	positivo	p
Idade (anos)	≤ 60	36	16	20	0,893
	> 60	35	15	20	
Sexo	Masculino	59	23	36	0,078
	Feminino	12	8	4	
Raça	Branca	57	25	32	0,946
	Não Branca	14	6	8	
Tabagismo	Não	3	2	1	0,347
	Sim	61	24	37	
Alcoolismo	Não	14	8	6	0,271
	Sim	54	22	32	
Categoria T	T (1 + 2)	24	11	13	0,792
	T (3 + 4)	47	20	27	
Categoria N	Negativo	36	16	20	0,893
	Positivo	35	15	20	
Estádio Clínico	EC (I + II)	19	8	11	0,873
	EC (III + IV)	52	23	29	
Grau Histológico	G (1 + 2)	50	22	28	0,929
	G 3	21	9	12	

TABELA 16 - Parâmetros demográficos, clínicos e patológicos segundo a expressão de Bcl-2

Variável	Categoria	n = 73	negativo	positivo	p
Idade (anos)	≤ 60	38	30	8	0,313
	> 60	35	24	11	
Sexo	Masculino	61	44	17	0,419
	Feminino	12	10	2	
Raça	Branca	59	45	14	0,358
	Não Branca	14	9	5	
Tabagismo	Não	3	2	1	0,809
	Sim	63	46	17	
Alcoolismo	Não	14	9	5	0,420
	Sim	56	42	14	
Categoria T	T (1 + 2)	26	20	6	0,669
	T (3 + 4)	47	34	13	
Categoria N	Negativo	37	26	11	0,465
	Positivo	36	28	8	
Estádio Clínico	EC (I + II)	20	15	5	0,902
	EC (III + IV)	53	39	14	
Grau Histológico	G (1 + 2)	51	38	13	0,873
	G 3	22	16	6	

TABELA 17 - Parâmetros demográficos, clínicos e patológicos segundo a expressão de Bax

Variável	Categoria	n = 70	negativo	positivo	p
Idade (anos)	≤ 60	37	11	26	0,416
	> 60	33	7	26	
Sexo	Masculino	58	13	45	0,165
	Feminino	12	5	7	
Raça	Branca	57	15	42	0,809
	Não Branca	13	3	10	
Tabagismo	Não	3	1	2	0,746
	Sim	60	15	45	
Alcoolismo	Não	14	3	11	0,606
	Sim	53	15	38	
Categoria T	T (1 + 2)	24	7	17	0,633
	T (3 + 4)	46	11	35	
Categoria N	Negativo	34	11	23	0,217
	Positivo	36	7	29	
Estádio Clínico	EC (I + II)	18	6	12	0,391
	EC (III + IV)	52	12	40	
Grau Histológico	G (1 + 2)	48	12	36	0,840
	G 3	22	6	16	

5.8 Análise de Sobrevida Atuarial

5.8.1 Análise Univariadas

5.8.1.1 Sobrevida específica por câncer (SEC)

A sobrevida específica por câncer, em 5 anos, calculada pela técnica de Kaplan-Meier foi de 25,1%. A figura 3 evidencia a distribuição dos casos ao longo do tempo.

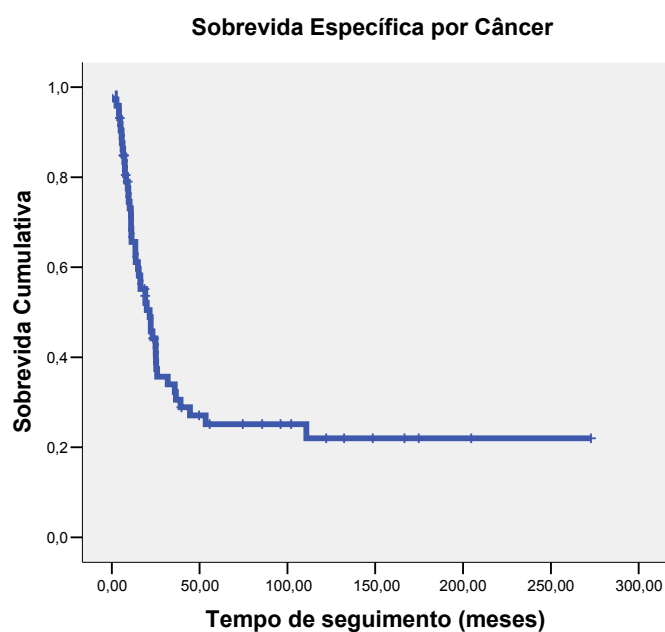


FIGURA 3 - Gráfico da sobrevida específica por câncer dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole submetidos a tratamento com radioterapia.

5.8.1.2 Sobrevida Global (SG)

A sobrevida global, em 5 anos, calculada pela técnica de Kaplan-Meier foi de 17,3%. A figura 4 evidencia a distribuição dos casos ao longo do tempo.

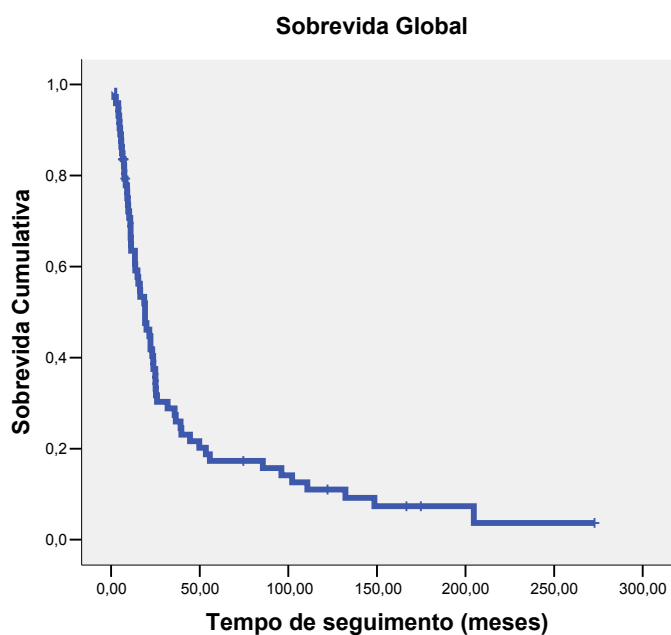


FIGURA 4 - Gráfico da Sobrevida Global dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole submetidos a tratamento com radioterapia.

5.8.1.3 Sobrevida específica por câncer e sobrevida global segundo as variáveis demográficas

A análise da sobrevida específica por câncer não evidenciou diferenças significativas quanto às variáveis idade e sexo. Pacientes não brancos apresentam tempo de SEC e SG menor que os pacientes brancos (Tabela 18).

TABELA 18 - Sobrevida específica por câncer e sobrevida global quanto às variáveis demográficas

Variável	Categoria	n	SEC %/5anos	p	SG %/5anos	p
Idade		73				
	≤ 60	38	22,8		19,0	
	> 60	35	27,5	0,660	15,3	0,820
Sexo		73				
	Masculino	61	25,6		15,7	
	Feminino	12	25,0	0,722	25,0	0,251
Raça		73				
	Branca	59	29,0		19,8	
	Não Branca	14	8,9	0,051	7,1	0,045

5.8.1.4 Sobrevida específica por câncer e sobrevida global segundo as variáveis clínicas e histopatológicas

A análise da sobrevida específica por câncer evidenciou diferenças significativas quanto às variáveis categoria T, categoria N e estágio clínico; entretanto, não observamos diferenças estatisticamente significativas quanto às variáveis tabagismo, etilismo e grau histológico. Na análise de sobrevida global, somente o estágio clínico mostrou-se associado à diferença significativa (Tabela 19).

TABELA 19 - Sobrevida específica por câncer e sobrevida global quanto às variáveis clínicas, e histológicas

Variável	Categoria	n	SEC %/5anos	p	SG %/5anos	
Tabagismo						
	Sim	63	26,2		18,5	
	Não	3	0,0	0,488	0,0	0,650
Alcoolismo						
	Sim	56	29,7		21,0	
	Não	14	8,9	0,367	7,1	0,516
Grau Histológico		73				
	G (1 + 2)	51	33,2		20,6	
	G 3	22	9,7	0,085	9,7	0,463
Categoria T						
	T (1 + 2)	26	40,3		24,0	
	T (3 + 4)	47	17,3	0,015	13,6	0,114
Categoria N						
	Negativo	37	36,3		22,3	
	Positivo	36	13,5	0,015	12,0	0,072
Estádio Clínico						
	EC (I + II)	20	51,8		30,0	
	EC (III + IV)	53	15,5	0,001	12,2	0,030

5.8.1.5 Sobrevida específica por câncer e sobrevida global segundo a expressão imunoistoquímica de p53, Ki-67, Bcl-2 e Bax

A análise da sobrevida específica por câncer não evidenciou diferenças significativas em relação às variáveis correspondentes à imunorreatividade aos marcadores p53, Ki-67, Bcl-2 e Bax (Tabelas 20 a 23 e Figuras 5 a 12).

TABELA 20 - Sobrevida específica por câncer e sobrevida global em casos de carcinoma epidermóide de palato mole, segundo a expressão imunoistoquímica de p53

Variável	n	SEC % / 5 anos	p	SG % / 5 anos	p
Expressão de p53	69				
≤2 (negativo)	28 (40,6)	32,1		25,0	
>2 (positivo)	41 (59,4)	14,6	0,142	8,1	0,166

SEC = Sobrevida Específica por Câncer
SG = Sobrevida Global

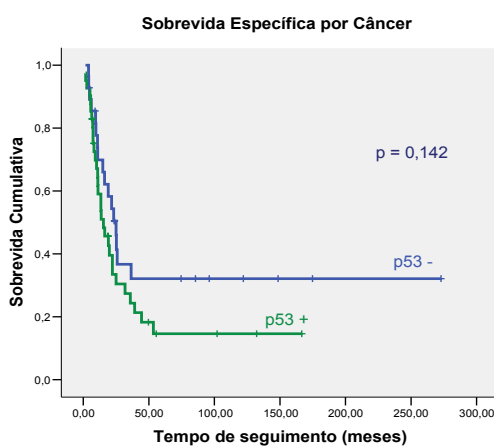


FIGURA 5 - SEC segundo p53

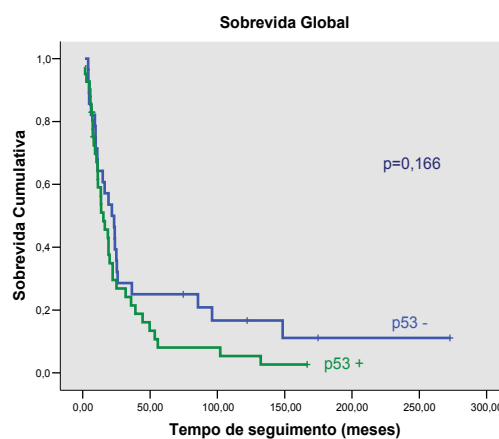


FIGURA 6 - SG segundo p53

TABELA 21 - Sobrevida específica por câncer e sobrevida global em casos de carcinoma epidermóide de palato mole, segundo a expressão imunohistoquímica de ki-67

Variável	n	SEC	p	SG	p
		% / 5 anos		% / 5 anos	
Expressão de Ki-67	71 (100,0)				
≤2 (negativo)	31 (43,7)	22,6		16,7	
>2 (positivo)	40 (56,3)	26,2	0,839	16,2	0,430

SEC = Sobrevida Específica por Câncer
SG = Sobrevida Global

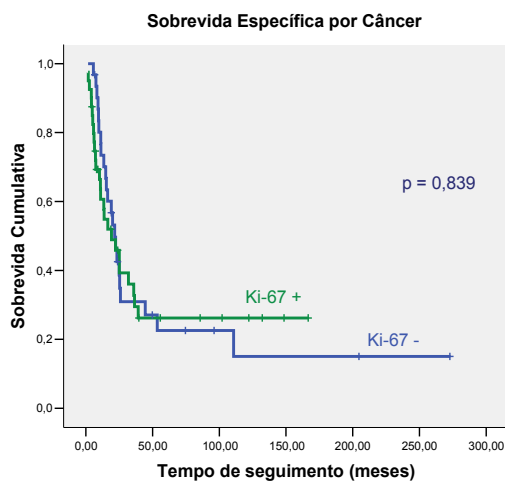


FIGURA 7 - SEC segundo Ki-67

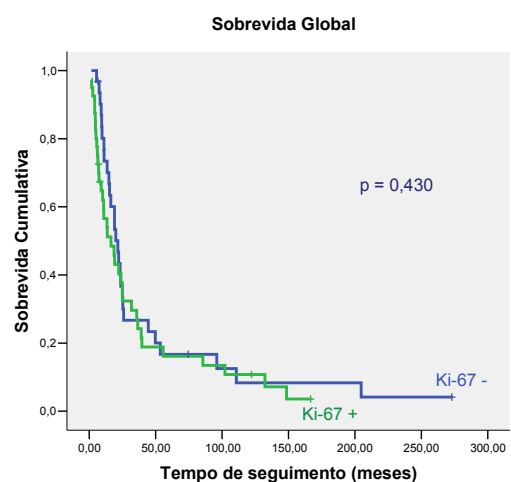


FIGURA 8 - SG segundo Ki-67

TABELA 22 - Sobrevida específica por câncer e sobrevida global em casos de carcinoma epidermóide de palato mole, segundo a expressão imunohistoquímica de Bcl-2

Variável	n	SEC	p	SG	p
		% / 5 anos		% / 5 anos	
Expressão de Bcl-2	73 (100,0)				
≤2 (negativo)	54 (74,0)	27,7		18,9	
>2 (positivo)	19 (26,0)	15,5	0,715	12,0	0,543

SEC = Sobrevida Específica por Câncer
SG = Sobrevida Global

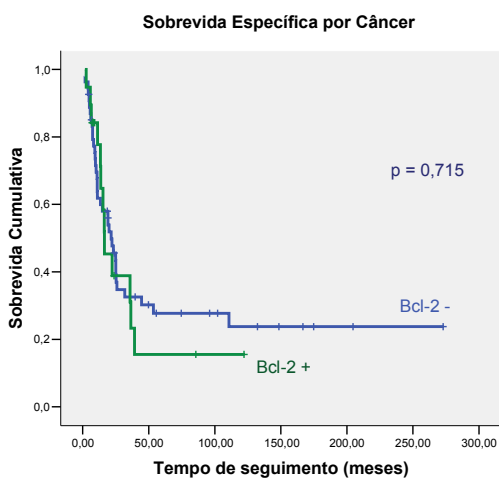


FIGURA 9 - SEC segundo Bcl-2

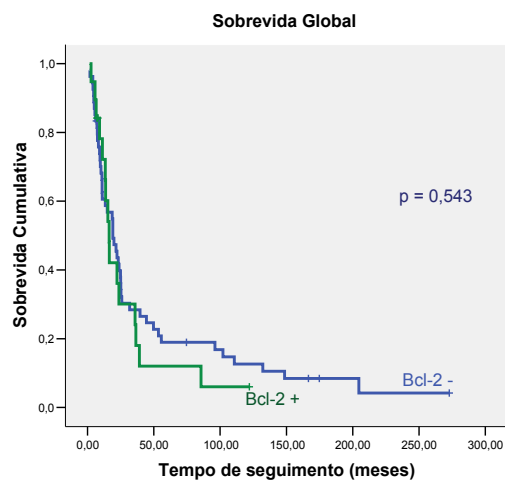


FIGURA 10 - SG segundo Bcl-2

TABELA 23 - Sobrevida específica por câncer e sobrevida global em casos de carcinoma epidermóide de palato mole, segundo a expressão imunohistoquímica de Bax

Variável	n	SEC	p	SG	p
		% / 5 anos		% / 5 anos	
Expressão de Bax	70 (100,0)				
≤2 (negativo)	18 (25,7)	13,9		11,9	
>2 (positivo)	52 (74,3)	24,1	0,841	16,2	0,921

SEC = Sobrevida Específica por Câncer

SG = Sobrevida Global

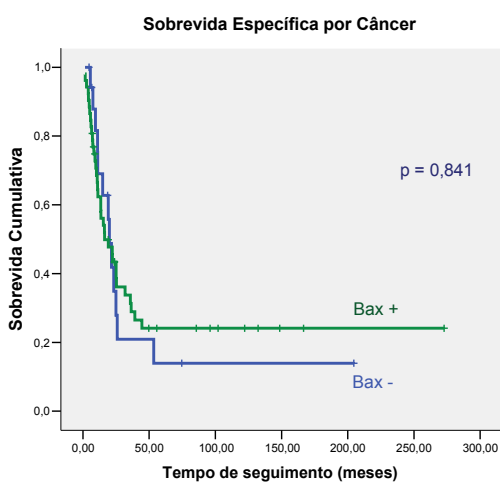


FIGURA 11 - SEC segundo Bax

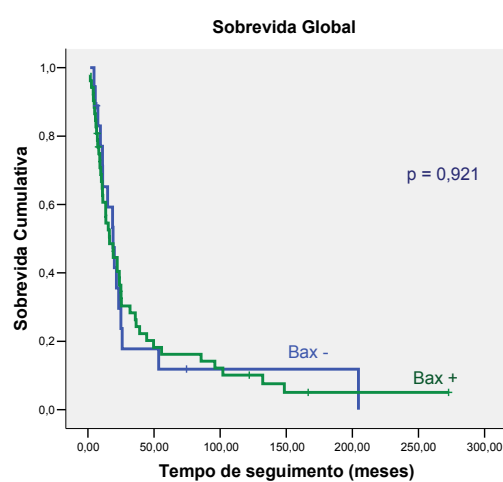


FIGURA 12 - SG segundo Bax

5.8.2 Análises multivariadas

5.8.2.1 Risco de óbito por câncer

A análise multivariada do risco de óbito por câncer evidenciou que, para os pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole submetidos à radioterapia exclusiva, as variáveis estágio clínico, expressão de p53 e grau de diferenciação histológica apresentaram valor prognóstico independente. Os pacientes com tumores em estágio clínico avançado (III + IV) apresentam risco 3,1 vezes maior de morrer da doença, em relação aos pacientes com tumores em estágios clínicos iniciais (I + II). Os pacientes com tumores que expressam p53 têm risco de 1,8 vezes maior de morrer da doença em relação aos que não expressam p53. Os pacientes com tumores com grau 3 (pouco diferenciados) têm risco 1,7 vezes maior de morrer da doença em relação aos casos com carcinomas graus 1 e 2 (Tabela 24).

TABELA 24 - Modelo multivariado de risco de óbito por câncer

Variável	Categoria	HR	IC 95%	p
Estádio Clínico	I + II	1	Referência	
	III + IV	3,1	1,4 – 6,6	0,005
p53	negativo	1	Referência	
	positivo	1,8	1,0 – 3,3	0,056
Grau histológico	1 + 2	1		
	3	1,7	0,9 – 3,0	0,100

5.8.2.2 Risco de óbito

A análise multivariada do risco de óbito evidenciou que apenas estágio clínico é variável independente e que há um risco relativo de 1,8 vezes maior de morte nos pacientes com tumores em estágio clínico avançado, quando comparados com os casos com tumores em estágio clínico inicial (Tabela 25).

TABELA 25 -Modelo multivariado de risco de óbito

Variável	Categoria	HR	IC 95%	p
Estádio Clínico	I + II	1	Referência	
	III + IV	1,8	1,1 – 3,2	0,032

6. DISCUSSÃO

Em nossa revisão bibliográfica evidenciamos que são raros os estudos específicos sobre carcinoma epidermóide do palato mole e quando o associamos aos marcadores tumorais, não encontramos nenhum trabalho. Sendo assim, a nossa discussão, referente à correlação entre a expressão dos marcadores tumorais e as variáveis estudadas, será em relação aos trabalhos que estudaram carcinoma epidermóide da orofaringe submetidos a tratamento com radioterapia. Entretanto, a maioria desses estudos inclui tumores da cavidade oral, ou laringe e/ou outras regiões da cabeça e pescoço. Isso deve ser interpretado com cautela, pois diversos relatos referem diferenças nas respostas terapêuticas dependendo do sítio comprometido (Gallo et al., 1996; Gallo et al., 1999; Bjork-Eriksson et al., 1999; Obata et al., 2000; Corvo et al., 2001; Couture et al., 2002; Carvalho et al., 2005; Sundaram et al., 2005).

6.1 Análise da correlação entre a expressão de p53, Ki-67, Bcl-2 e Bax e as variáveis demográficas, clínicas e grau de diferenciação histológica

A técnica de “tissue microarray” foi baseada nos trabalhos de Kononen et al. (1988) e propicia a racionalização de custos e de tempo dispendidos no estudo de cortes histológicos e imunoistoquímicos, com

comprovada acurácia e validação dos resultados das análises (Moch et al., 2001; Gulmann et al., 2003; Simon et al., 2004; Lee et al., 2006), inclusive em tumores de cabeça e pescoço (Logullo et al., 2000; Griffin et al., 2003; Gomaa et al., 2005). A leitura das reações de imunistoquímica foi realizada baseada nos trabalhos inicialmente relatados por Allred et al. (1998).

A expressão - ou não - de todos os marcadores estudados não evidenciou correlação com as variáveis estudadas (idade, sexo, raça, tabagismo, alcoolismo, grau de diferenciação histológica, categoria T, categoria N e estágio clínico). Na literatura, não encontramos dados referentes especificamente para o palato mole. Alguns trabalhos relatam em suas casuísticas tumores do sítio da orofaringe e submetidos a tratamento com radioterapia. Obata et al. (2000) estudaram somente tumores de orofaringe, em relação à expressão de p53 e às variáveis sexo, idade, tabagismo, etilismo, grau de diferenciação histológica, categoria T, categoria N e estágio clínico e, a exemplo da nossa casuística, também não observaram correlações significativas. Todos os outros trabalhos incluíram em suas casuísticas algum outro sítio além da orofaringe. Awwad et al. (1996) incluíram na sua casuística cerca de 1/3 de pacientes com tumores de orofaringe, mas 2/3 eram de outros sítios da cabeça e pescoço. Estudaram as variáveis idade, sexo, tempo de seguimento, dose de tratamento com radioterapia, tabagismo, alcoolismo, sítios (orofaringe, laringe, cavidade oral, hipofaringe), categoria N, estágio clínico, recorrência, tempo de recorrência e correlacionaram com p53. Não observaram diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis estudadas e a expressão de p53, exceto quanto

à variável tabagismo. Gallo et al. (1996) incluíram na sua casuística a grande maioria dos tumores pertencentes a outros sítios e, somente 12,7% pertenciam à faringe, sem relatar quantos pertenciam à orofaringe. Estudaram as variáveis sexo, idade, sítios envolvidos (laringe, cavidade oral e faringe), categoria T, metástases à distância, grau de diferenciação histológica, tabagismo, alcoolismo e dose de radioterapia. Não observaram diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis estudadas e a expressão de Bcl-2. Raybaud et al. (1997) incluíram na sua casuística cerca de 2/3 de pacientes com tumores de orofaringe, mas 1/3 eram de outros sítios. Estudaram as variáveis sexo, grau de diferenciação histológica, categoria T, categoria N, sítio da orofaringe e cavidade oral. Não observaram diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis estudadas e a expressão de p53 e Ki-67. Resultados semelhantes foram apresentados por Couture et al. (2002), exceto em relação à casuística, onde relatam cerca de 1/3 de pacientes com tumores de orofaringe. Gallo et al. (1999) incluíram na sua casuística a grande maioria dos tumores pertencentes a outros sítios e, somente 17,7% pertenciam à faringe, sem relatar quantos pertenciam à orofaringe. Estudaram as variáveis sexo, idade, sítios envolvidos (laringe, cavidade oral e faringe), categoria T, categoria N, grau de diferenciação histológica, tabagismo e alcoolismo. Não observaram diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis estudadas e a expressão de Bcl-2 e p53, exceto para a variável tabagismo, para ambos marcadores, com piora na sobrevida livre de doença nos pacientes tabagistas pesados (>40 cigarros/dia). Raybaud et al. (2000) incluíram na sua casuística 2/3 de

pacientes com tumores de orofaringe e 1/3 de cavidade oral. Eles relacionaram as variáveis sexo, grau de diferenciação histológica, categoria T, categoria N, sítio comprometido (orofaringe, ou cavidade oral) e a expressão dos marcadores tumorais p53 e Ki-67, com a ploidia. Eles não correlacionaram p53 e Ki-67 com as variáveis clínicas, demográficas.

Diversas pesquisas, em cabeça e pescoço, evidenciam que o tabagismo e o alcoolismo têm potencial mutagêncio (Wiencke et al., 2002; Weber, 2002). Sendo assim, poderíamos esperar encontrar resultados que expressassem p53 mutado e/ou bcl-2 aumentado e baixa expressão de Bax e/ou altas taxas de Ki-67 > 20% a exemplo dos relatos de Awwad et al. (1996) e Gallo et al. (1999) que encontraram correlação entre p53 e bcl-2. Entretanto, em nossa casuística, não encontramos tais achados, provavelmente devido ao baixo número relativo de casos, ainda que seja uma casuística relativamente alta por se tratar de um sítio relativamente raro, como o palato mole. Outra explicação plausível é a baixa freqüência de tumores de palato mole em não fumantes.

6.2 Análise da sobrevida atuarial

Como o nosso estudo é um estudo retrospectivo, algumas informações são insuficientes para responder às perguntas que agora se fazem importantes, mas que, por algum motivo, na época, não foram

valorizadas. Assim, não dispomos de informações referentes à reposta ao tratamento na data do término do mesmo.

Devido ao fato de ter ocorrido persistência tumoral dentro dos 6 primeiros meses após o início do tratamento em 23 (48,9%) dos 47 casos em que foi constatada a presença de neoplasia em alguma fase do seguimento - sendo que 11 (47,8%) destes 23 casos ocorreram já nos 3 primeiros meses - e pelo fato de, em alguns casos, termos apenas a data do óbito, o cálculo da sobrevida livre de doença torna-se de valor questionável, pois muitos casos não tiveram período livre de doença. Por estes motivos, procedemos aos cálculos em relação à sobrevida específica por câncer e sobrevida global. A primeira leva em consideração a data do óbito causado pelo câncer de palato mole, no caso, e não a data do retorno do câncer, a qual é utilizada na sobrevida livre de doença, sendo, portanto, mais útil e confiável pelos motivos expostos; já a sobrevida global leva em consideração a data do óbito por qualquer causa.

Em nossa casuística, dos 73 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole submetidos a tratamento com radioterapia, a sobrevida específica por câncer, em 5 anos, foi de 25,1% e a sobrevida global foi de 17,3%. Na literatura, tais taxas têm grande variabilidade, dependendo dos estádios clínicos analisados. Sendo assim, encontramos taxas que variam entre 50 a 91% no EC I, podendo reduzir-se à zero no estágio clínico IV (New, Hallberg, 1941; Martin, 1942; Fletcher, Lindberg, 1966; Ratzner et al., 1970; Eneroth et al., 1972; Russ et al., 1977; Chung et

al., 1979; Fee et al., 1979; Evans, Shah, 1981; Garret, Beale, 1984; Amdur et al., 1987; Calais et al., 1988; Esche et al., 1988; Keus et al., 1988; Weber et al., 1988; Horton et al., 1989; Tandon et al., 1992; Mak-Kregar et al., 1994; Medini et al., 1997; Rao et al., 1998; Erkal et al., 2001).

6.2.1 Análise da sobrevida referente aos fatores demográficos, clínicos e histológicos

Na nossa casuística, a média de idade foi de 60,0 anos, semelhante à maioria dos relatos da literatura que refere médias de idade em torno da sexta ou sétima década. Houve predomínio do sexo masculino em relação ao feminino, assim como na literatura, mas sem influência na sobrevida específica por câncer, ou na sobrevida global (New, Hallberg, 1941; Martin, 1942; Fletcher, Lindberg, 1966; Ratzler et al., 1970; Eneroth et al., 1972; Russ et al., 1977; Chung et al., 1979; Fee et al., 1979; Evans, Shah, 1981; Garret, Beale, 1984; Amdur et al., 1987; Calais et al., 1988; Esche et al., 1988; Keus et al., 1988; Weber et al., 1988; Horton et al., 1989; Tandon et al., 1992; Mak-Kregar et al., 1994; Medini et al., 1997; Rao et al., 1998; Erkal et al., 2001).

Quanto à idade, Evans e Shah (1981) relatam idade menor do que 60 anos (em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato como um todo), como fator prognóstico significativo, com aumento da sobrevida em 5 anos ($p < 0,05$), o mesmo sendo relatado por Russ et al. (1977) referente a tumores do palato mole. Estes resultados não se confirmaram na

nossa casuística, provavelmente devido ao estágio clínico avançado, independentemente da idade dos pacientes.

Quanto à raça, houve predomínio da raça branca em relação à não branca. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quanto à sobrevida específica por câncer, mas houve diferença estatisticamente significativa em relação à sobrevida global ($p = 0,045$). A exemplo do nosso estudo, vários relatos evidenciam diferenças significativas quanto à raça. De um modo geral, estas diferenças têm sido atribuídas a questões sociais de acesso aos tratamentos adequados (Chung et al., 1979; Amdur et al., 1987; Swango, 1996; Erkal et al., 2001; Tomar et al., 2004; Morse, Kerr, 2006; Mclean et al., 2006).

Hábitos de consumo de tabaco e álcool são associados ao aumento no risco de desenvolver câncer de cabeça e pescoço como um todo, ou câncer de orofaringe, incluindo o palato mole (Elwood et al., 1984; Franco et al., 1989; Oreggia et al., 1991; Maier et al., 1992; Vokes et al., 1993; Spitz, 1994; Muir, Weiland, 1995; Schlecht et al., 1999; Johnson, 2001; Schlecht et al., 2001; Tromp et al., 2004; Brouha et al., 2005; Chandran et al., 2005). Na nossa casuística, tais variáveis não se apresentaram como fator prognóstico de sobrevida, provavelmente devido ao pequeno relativo número de casos de não tabagistas e não etilistas. Gallo et al. (1999) relatam que tabagistas pesados (>40cig/dia) têm pior sobrevida livre de doença, provavelmente devido à ação carcinogênica do tabaco.

Dados coletados referentes aos sítios envolvidos, presença de invasão óssea, diâmetro da lesão e lateralidade, estão representados na

categoria T, tamanho do tumor. Quanto maior o tamanho do tumor, maior a probabilidade dele atingir outros sítios vizinhos, muitas vezes ultrapassando a linha média e/ou com maiores chances de disseminação profunda, podendo, inclusive, invadir estruturas ósseas e isso se reflete diretamente no aumento do estadiamento do TNM. Por esta razão, decidimos realizar as análises de sobrevida referentes aos dados do TNM. Constatamos que 95,9% dos nossos casos apresentaram invasão além do palato à primeira consulta, além da presença de 10% de invasão óssea e de 71,2% dos tumores se apresentarem bilateralmente à primeira consulta, evidenciando a maioria dos casos em estádios avançados da doença.

Da mesma forma, entendemos que o tempo de história está, pelo menos em parte, representado no estadiamento baseado no TNM. Por se tratar de um estudo retrospectivo, o tempo de história pode estar sendo subestimado, já que a pergunta facultada ao paciente sobre a percepção do início dos sintomas muitas vezes estava registrada de modo pouco preciso (“...há mais de um ano...”, “...há cerca de 6 meses...”, etc.). Alguns trabalhos relatam que quanto maior for o tempo de história até o início do tratamento, maior será a probabilidade do tumor se apresentar em estágio clínico mais avançado, sendo que a demora no diagnóstico piora o prognóstico (Kowalski et al., 1994; Carvalho et al., 2002; Brouha et al., 2005; Tromp et al., 2005). Entretanto, alguns casos com curto tempo de história clínica apresentam-se com tumores em estádios clínicos avançados, enquanto outros, com longo tempo de história apresentam-se com tumores em estádios clínicos iniciais. Algumas explicações para tal fato vão desde a velocidade de crescimento do

tumor (Wild et al., 1995; Rubright et al., 1996), até o crescimento indolente de muitos tumores, principalmente quando ocorrem em regiões não visíveis, ou não examinadas com freqüência, até o fato de alguns autores criticarem a associação do tempo de percepção dos sintomas com o tamanho do tumor pois, isto é muito variável. Rindum e Pindborg (1989) relatam que 15% dos seus pacientes que se apresentam com tumores maiores do que 4 cm, não apresentam sintomas. McGurk et al.(2005) referem que dos 174 pacientes analisados, 29% se apresentavam com tumores grandes, de boca, à primeira consulta, mesmo antes dos 3 meses de tempo de história. Além disso, existem fatores psicológicos que podem interferir no tempo de procura de atendimento médico (Tromp et al., 2004). Alguns trabalhos também relatam a associação da demora na procura de atendimento especializado com o uso de tabaco e, principalmente, de álcool (Tromp et al., 2004; Brouha et al., 2005).

Estudos mais específicos sobre a questão devem ser realizados, mas, no mínimo, devemos incorporar à nossa rotina diária o hábito de valorizar questões como o tempo de história, coleta de informações concernentes ao tabagismo e ao alcoolismo, assim como em relação à história clínica como um todo, na tentativa de se obter a informação mais precisa possível.

Quanto à categoria T, a maioria (64,4%) dos pacientes estudados apresentava tumores avançados (T3 e T4), sendo o tamanho do tumor um importante fator prognóstico à análise univariada, com taxas de sobrevida específica por câncer, em 5 anos, significativamente menores em relação

aos pacientes que apresentavam tumores em estádios iniciais ($p = 0,015$). Tais achados não se refletiram na sobrevida global, provavelmente devido ao baixo relativo número de casos iniciais. A literatura também evidencia estes achados de pior prognóstico para os tumores avançados de palato mole (Russ et al., 1977; Fee et al., 1979; Evans, Shah, 1981; Garret, Beale, 1984; Calais et al., 1988; Rao et al., 1998; Erkal et al., 2001).

A literatura evidencia um alto risco de metástases para os linfonodos cervicais, à primeira consulta (cerca de 14 a 54% dos casos), sendo a maioria para os linfonodos jugulares altos, atingindo 20% de metástases bilaterais no início da doença, havendo relatos de até 40% de disseminação contralateral (Fletcher, Lindberg, 1966; Ratzner et al., 1970; Lindberg, 1972; Russ et al., 1977; Chung et al., 1979; Fee et al., 1979; Evans, Shah, 1981; Garret, Beale, 1984; Barnes, Johnson, 1986; Amdur et al., 1987; Calais et al., 1988; Esche et al., 1988; Keus et al., 1988; Horton et al., 1989; Tandon et al., 1992; Mak-Kregar et al., 1994; Medini et al., 1997; Rao et al., 1998; Erkal et al., 2001). O comprometimento linfonodal foi observado em 49,3% dos nossos casos, dos quais 69,4% foram classificados nas categorias N2 e N3, novamente refletindo o estágio avançado da doença. A análise de sobrevida evidenciou a categoria N como um importante fator prognóstico quanto à sobrevida específica por câncer ($p = 0,015$), sendo que os pacientes portadores de tumores sem comprometimento linfonodal, à primeira consulta, apresentam melhor taxa de sobrevida específica por câncer. Os resultados não foram estatisticamente significativos quanto à sobrevida global. Diversos estudos demonstram importante significado

prognóstico da metástase linfonodal em relação à sobrevida (Fee et al., 1979; Garret, Beale, 1984; Calais et al., 1988).

Quanto ao estágio clínico (EC), observamos que a maioria dos nossos pacientes (72,6%), apresentava tumores nos estádios avançados (EC III e IV) e teve sobrevida, tanto específica por câncer, como sobrevida global, em 5 anos, significativamente menor em relação àqueles com tumores em estádios iniciais ($p = 0,001$ e $0,030$ respectivamente), sendo um importante fator prognóstico à análise univariada. Tais achados se confirmam à análise multivariada, na qual o estágio clínico aparece como variável independente, com risco 3,1 vezes maior de morte por câncer e de 1,8 de morte em geral, nos pacientes portadores de tumores em estágio clínico avançado. Estes achados também foram observados por Fee et al. (1979), Evans e Shah (1981), Garret e Beale (1984) e Calais et al. (1988). Deve-se salientar que Fee et al. (1979) e Evans e Shah (1981) referem não haver diferença significativa entre os casos com tumores em estádios clínicos II e III.

Quanto ao grau de diferenciação histológica, observamos que a maioria dos nossos pacientes (69,9%) apresentava carcinomas em graus I e II de diferenciação e, ainda que a taxa de sobrevida específica por câncer em 5 anos tenha sido melhor nestes pacientes, elas não alcançaram significância estatística. Entretanto, quando realizamos análise multivariada observamos que o grau de diferenciação histológica foi variável independente, evidenciando que pacientes portadores de carcinoma pouco diferenciado de palato mole submetidos à radioterapia exclusiva têm risco

maior de morrer de câncer (HR = 1,7), em relação aos pacientes portadores de tumores bem ou moderadamente diferenciados. Tais achados não se refletem na sobrevida global. Provavelmente, tais resultados se devem ao relativamente baixo número de casos de tumores pouco diferenciados. Na literatura, são poucos os trabalhos que relatam tal variável, em relação ao palato mole. Martin (1942), Ratzer et al. (1970) e Eneroth et al. (1972) já referiam, à época, que os carcinomas epidermóides de palato, bem diferenciados, tinham melhor sobrevida em relação aos pouco diferenciados. Fee et al. (1979) referem diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes com carcinoma epidermóide de palato mole de graus de diferenciação moderadamente bem diferenciados, em relação aos com tumores pobremente diferenciados (segundo a classificação por ele utilizada em: bem, moderadamente bem, moderadamente e pobremente diferenciados, respectivamente). Evans e Shah (1981) referem diferenças significativas entre os casos de pacientes com carcinoma epidermóide de palato bem diferenciados em relação aos pouco diferenciados.

6.3 Análise da Falência do tratamento

Persistência tumoral, ou recidiva tumoral ocorreu em 64,4% dos casos, sendo a grande maioria (76,6%) local, ou local e regional (97,9%). Cerca da metade dos casos (48,9%) ocorreu dentro dos 6 primeiros meses, e a maioria (89,4%) dentro dos 2 primeiros anos de seguimento. Um

paciente apresentou recorrência da doença com 94,8 meses de seguimento. Esses dados reforçam a importância do seguimento rigoroso, com exame clínico minucioso de rotina, principalmente nos 2 primeiros anos após o tratamento. Além disso, as altas taxas de persistência de tumor (antes dos 6 meses) evidenciam uma baixa resposta ao tratamento empregado traduzindo-se como tumores radorresistentes.

Quanto ao tratamento da recorrência, cerca da metade dos pacientes (46,8%) encontrava-se fora de possibilidade de se submeter a alguma terapia de resgate, seja ela cirurgia, radioterapia, quimioterapia, ou a associação entre elas e foram submetidos a suporte clínico. O restante foi submetido a algum tipo de tratamento incluindo, predominantemente, cirurgia. Dos 23 casos com doença persistente após radioterapia exclusiva, 12 (52,2%) foram candidatos a tratamento de resgate. Dos 23 casos com recidiva (> 6 meses), 13 (56,5%) foram candidatos a tratamento de resgate. Pacientes que foram submetidos a tratamento de resgate tiveram melhor sobrevida em relação aos que não foram submetidos a algum tratamento de resgate ($p = 0,007$), evidenciando a importância de tal conduta. A literatura refere achados semelhantes, com taxas de falência que variam de 18% a 51% (Fletcher, Lindberg, 1966; Chung et al., 1979; Fee et al., 1979; Evans, Shah, 1981; Garret, Beale, 1984; Amdur et al., 1987; Calais et al., 1988; Esche et al., 1988; Keus et al., 1988; Horton et al., 1989; Tandon et al., 1992; Mak-Kregar et al., 1994; Medini et al., 1997; Raybauld et al., 1997; Raybauld et al., 2000; Erkal et al., 2001)

Segundo tumor primário foi encontrado em 10 casos (13,7%), sendo 50,0% em algum sítio da cabeça e pescoço e, portanto, facilmente diagnosticável nos exames de rotina, o que reforça a importância do seguimento e do exame clínico. Na literatura, também encontramos valores semelhantes aos nossos, com taxas que variaram entre 3 a 48% (Fletcher, Lindberg, 1966; Russ et al., 1977; Chung et al., 1979; Fee et al., 1979; Evans, Shah, 1981; Garret, Beale, 1984; Amdur et al., 1987; Calais et al., 1988; Esche et al., 1988; Keus et al., 1988; Horton et al., 1989; Tandon et al., 1992; Mak-Kregar et al., 1994; Sturgis, Miller, 1995; Medini et al., 1997; Erkal et al., 2001; Rhee et al., 2004).

6.4 Análise da sobrevida referente aos fatores imunoistoquímicos.

Não encontramos nenhum estudo correlacionando algum marcador tumoral por nós analisado, referente a casuísticas de pacientes com carcinoma epidermóide do palato mole submetidos a tratamento com radioterapia exclusiva. Portanto, a nossa discussão será referente aos escassos trabalhos publicados que relatem alguma casuística do sítio da orofaringe em pacientes submetidos a tratamento com radioterapia e que tenham sido analisados quanto a, pelo menos, um dos marcadores estudados.

6.4.1 Análise da sobrevida referente à expressão imunohistoquímica de p53

Em nossa casuística, observamos que a proteína p53 estava expressa, previamente ao tratamento, em 59,4% dos casos de pacientes portadores de carcinoma epidermóide do palato mole e submetidos a tratamento com radioterapia exclusiva, não havendo diferença estatisticamente significativa entre tais expressões, ou não, em relação à sobrevida específica por câncer e à sobrevida global, em 5 anos à análise univariada. Já à análise multivariada, quando o efeito prognóstico é ajustado por outras variáveis com impacto prognóstico independente evidenciou-se que, p53 é variável também independente, com risco 1,8 vezes maior de morte por câncer nos pacientes portadores de tumores que expressam, à imunohistoquímica, a proteína p53 mutada. Todavia, não se observou significância no risco de óbito (geral). Alguns trabalhos evidenciam que a mutação do gene TP53 está relacionada a uma menor resposta à radioterapia, com dados estatisticamente significativos quanto à recidiva local, sobrevida livre de doença e sobrevida global (Raybaud et al., 1997; Gallo et al., 1999; Obata et al., 2000; Raybaud et al., 2000; Couture et al., 2002;). Entretanto, a exemplo dos nossos dados, os estudos de Wilson et al. (1995), Awwad et al. (1996) e Ataman et al. (2004) não evidenciaram associação entre a expressão da proteína p53 com a sobrevida livre de doença e/ou com a sobrevida global.

6.4.2 Análise da sobrevida referente à expressão imunohistoquímica de Ki-67

Em nossa casuística, observamos, em relação aos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de palato mole submetidos à radioterapia exclusiva, que a proteína Ki-67 estava expressa, previamente ao tratamento, em 56,3%, não havendo diferença estatisticamente significativa entre tais expressões, ou não, em relação à sobrevida específica por câncer e à sobrevida global, em 5 anos.

Na literatura, alguns trabalhos evidenciam que a baixa expressão de Ki-67 (geralmente < 20%) está associada ao pior prognóstico dos pacientes portadores de CEC de orofaringe submetidos a tratamento com radioterapia (Raybauld et al., 1997; Raybauld et al., 2000; Couture et al., 2002), com piora ainda maior do prognóstico nos casos onde há associação de p53 mutado e Ki-67 hipoexpresso (Raybauld et al., 1997; Couture et al., 2002). Outros trabalhos, a exemplo do nosso, não evidenciaram tal associação (Ataman et al., 2004; Raybauld et al., 2000).

6.4.3 Análise da sobrevida referente à expressão imunohistoquímica de Bcl-2

Quanto à expressão de Bcl-2, na nossa casuística observamos a sua expressão, previamente ao tratamento, em 26,0% dos casos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre a sua expressão, ou não, em relação à sobrevida específica por câncer e à sobrevida global, em 5 anos.

Gallo et al. (1996) e Gallo et al. (1999) referem que a expressão de Bcl-2 tem sido associada ao bloqueio da apoptose, com a conseqüente perpetuação da célula afetada, sendo um importante determinante de radiorresistência. Ambos os trabalhos relatam que a expressão de Bcl-2 encontra-se aumentada, com piora da sobrevida livre de doença e da sobrevida global e, quando ocorre a expressão de p53 e a expressão de Bcl2, há piora acentuada da sobrevida, tanto livre de doença quanto global. Contrariamente a tais achados, Ataman et al. (2004) relata que a expressão de Bcl-2 promove radiosensibilidade e a expressão de Bcl-2 é um fator prognóstico favorável.

6.4.4 Análise da sobrevida referente à expressão imunohistoquímica de Bax

Quanto à expressão de Bax, na nossa casuística observamos que ele estava superexpresso, em biópsias prévias ao tratamento, em 74,3% dos casos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre a sua superexpressão, ou não, em relação à sobrevida específica por câncer e à sobrevida global, em 5 anos, apesar da forte expressão na análise dos nossos casos.

Não encontramos nenhum relato referente à expressão de Bax tanto referente ao sítio do palato mole quanto ao da orofaringe, em pacientes submetidos à radioterapia.

6.5 Considerações finais

Como pudemos observar, os resultados são escassos e, algumas vezes, controversos, havendo diferentes respostas para o mesmo marcador em estudo.

Diversos fatores devem estar envolvidos nestes resultados controversos. Entre eles:

- a maioria dos relatos refere-se a casuísticas relativamente pequenas e heterogêneas quanto ao tamanho da amostra, tipo de tratamento empregado e localização do tumor primário;
- geralmente, trata-se de trabalhos retrospectivos e, portanto, os dados podem não conter todas as informações necessárias;
- falta de padronização da técnica da imunohistoquímica, desde a coleta do material até o seu processamento, interpretação e análise dos dados, definição dos valores de corte entre expresso e não expresso;
- falta de padronização quanto ao tratamento empregado;
- inclusão de pacientes portadores de tumores em sítios de comportamento biológico e clínico diferentes do sítio em estudo;
- complexidade dos mecanismos envolvidos no controle do ciclo celular, com provável participação de outros fatores de controle do ciclo celular.

Apenas a expressão da proteína p53 mutada foi identificada como fator prognóstico de risco de morte por câncer na população estudada. Os nossos outros resultados, apesar de negativos para os marcadores Ki-67, Bcl-2 e Bax, podem contribuir para a escassa literatura. A realização de estudos multi-institucionais bem padronizados técnica e metodologicamente provavelmente seria o caminho para minimizar os pontos críticos aqui relatados.

7. CONCLUSÕES

- A maioria dos pacientes era do sexo masculino, de cor branca, com idade superior a 50 anos, tabagista, etilista e apresentava tumores em estágio clínico avançado à primeira consulta;

- Não foram observadas associações estatisticamente significativas quanto à expressão, ou não, das proteínas p53, Ki-67, Bax e Bcl-2 em relação às outras variáveis estudadas (idade, sexo, raça, tabagismo, etilismo, categoria T, categoria N, estágio clínico e grau de diferenciação histológica);

- Entre as variáveis demográficas, clínicas, histológicas e imunoistoquímicas (p53, Ki-67, Bcl-2 e Bax) estudadas, somente categoria T inicial (I e II), categoria N0 e estágio clínico inicial foram fatores significativos de melhor prognóstico na análise univariada de sobrevida específica por câncer;

- Entre todas as variáveis demográficas, clínicas, histológicas e imunoistoquímicas (p53, Ki-67, Bcl-2 e Bax) estudadas, somente raça e estágio clínico inicial foram identificados como fatores significativos de melhor prognóstico na análise univariada da sobrevida global, mas somente a variável estágio clínico permaneceu como variável independente à análise multivariada;

- As variáveis estágio clínico avançado (III e IV), p53 expresso e grau de diferenciação histológica pouco diferenciado (G3) foram fatores significativos de maior risco de morte por câncer na análise multivariada.

8. REFERÊNCIAS

Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, Wagner H Jr, Kish JA, Ensley JF, Schuller DE, Forastiere AA. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Jan 1;21(1):92-8.

Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 1998 Feb;11(2):155-68. Review.

Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y. Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res*. 1994 May 1;54(9):2468-71.

Al-Sarraf M. Treatment of locally advanced head and neck cancer: historical and critical review. *Cancer Control*. 2002 Sep-Oct;9(5):387-99. Review.

Amdur RJ, Mendenhall WM, Parson JT, Isaacs JH, Million RR, Cassisi NJ. Carcinoma of the soft palate treated with irradiation: analysis of results and complications. *Radiother Oncol* 1987; 9:185-94.

Argiris A. Induction chemotherapy for head and neck cancer: will history repeat itself? *J Natl Compr Canc Netw*. 2005 May;3(3):393-403. Review. Erratum in: *J Natl Compr Canc Netw*. 2005 Jul;3(4):table of contents.

Ataman OU, Bentzen SM, Wilson GD, Daley FM, Richman PI, Saunders MI, Dische S. Molecular biomarkers and site of first recurrence after radiotherapy for head and neck cancer. *Eur J Cancer*. 2004 Dec;40(18):2734-41.

Awwad S, Jaros E, Somes J, Lunec J. P53 overexpression in head and neck carcinoma and radiotherapy results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996 Jan 15;34(2):323-32.

Barnes L, Johnson JT. Pathologic and clinical considerations in the evaluation of major head and neck specimens resected for cancer. *Pathol Annu* 1986;21(Pt 1):173-250.

Bjork-Eriksson T, West CM, Cvetskovska E, Svensson M, Karlsson E, Magnusson B, Slevin NJ, Edstrom S, Mercke C. The lack of correlation between proliferation (Ki-67, PCNA, LI, Tpot), p53 expression and radiosensitivity for head and neck cancers. *Br J Cancer*. 1999 Jul;80(9):1400-4.

Boise LH, Gottschalk AR, Quintans J, Thompson CB. Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;200:107-21. Review.

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, Yousoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006 Feb 9;354(6):567-78.

Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S. Cancer statistics, 1994. *CA Cancer J Clin*. 1994 Jan-Feb;44(1):7-26.

Bourhis J, Overgaard J, Audry H, Ang KK, Saunders M, Bernier J, Horiot JC, Le Maitre A, Pajak TF, Poulsen MG, O'Sullivan B, Dobrowsky W, Hliniak A, Skladowski K, Hay JH, Pinto LH, Fallai C, Fu KK, Sylvester R, Pignon JP; Meta-Analysis of Radiotherapy in Carcinomas of Head and neck (MARCH) Collaborative Group. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Lancet*. 2006 Sep 2;368(9538):843-54. Review.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. *Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA; 2006.

Brasilino de Carvalho M. Quantitative analysis of the extent of extracapsular invasion and its prognostic significance: a prospective study of 170 cases of carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Head Neck*. 1998 Jan;20(1):16-21.

Brouha X, Tromp D, Hordijk GJ, Winnubst J, De Leeuw R. Role of alcohol and smoking in diagnostic delay of head and neck cancer patients. *Acta Otolaryngol*. 2005 May;125(5):552-6.

Brown JS, Rogers SN, Lowe D. A comparison of tongue and soft palate squamous cell carcinoma treated by primary surgery in terms of survival and quality of life outcomes. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Mar;35(3):208-14.

Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif*. 1992 Jan;25(1):31-40.

Budach W, Hehr T, Budach V, Belka C, Dietz K. A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer*. 2006 Jan 31;6:28.

Calais G, Goga D, Chauvet B, Garand G, Beutter P, Le Floch O. Carcinomes du palais mou et de la lueite. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 1988;89(5):306-10.

Campos-Filho N, Franco EL. Microcomputer-assisted univariate survival data analysis using Kaplan-Meier life table estimators. *Comput Methods Programs Biomed.* 1988 Nov-Dec;27(3):223-8.

Carlson DJ, Stewart RD, Semenenko VA. Effects of oxygen on intrinsic radiation sensitivity: A test of the relationship between aerobic and hypoxic linear-quadratic (LQ) model parameters. *Med Phys.* 2006 Sep;33(9):3105-15.

Carvalho AL, Pintos J, Schlecht NF, Oliveira BV, Fava AS, Curado MP, Kowalski LP, Franco EL. Predictive factors for diagnosis of advanced-stage squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002 Mar;128(3):313-8.

Carvalho AL, Ikeda MK, Magrin J, Kowalski LP. Trends of oral and oropharyngeal cancer survival over five decades in 3267 patients treated in a single institution. *Oral Oncol.* 2004 (a) Jan;40(1):71-6.

Carvalho AL, Magrin J, Kowalski LP. Sites of recurrence in oral and oropharyngeal cancers according to the treatment approach. *Oral Dis.* 2003 May;9(3):112-8.

Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer.* 2005 May 1;114(5):806-16.

Carvalho AL, Salvajoli JV, Kowalski LP. A comparison of radiotherapy or radiochemotherapy with symptomatic treatment alone in patients with advanced head and neck carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2000;257(3):164-7.

Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Câncer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nations. *Head Neck*. 2004 (b);26(1):31-8.

Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 1992 Dec;168(4):357-63.

Chandran R, Laloo R, Myburgh NG, Chandran TM. Scientific. Risk of intraoral cancer associated with tobacco and alcohol--a case-control study. *SADJ*. 2005 Sep;60(8):326-8.

Chung CK, Constable WC. Squamous cell carcinoma of the soft palate and uvula. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1979 Jun;5(6):845-50

Cohen EE, Lingen MW, Vokes EE. The expanding role of systemic therapy in head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2004 May 1;22(9):1743-52. Review.

Condon LT, Ashman JN, Eil SR, Stafford ND, Greenman J, Cawkwell L. Overexpression of Bcl-2 in squamous cell carcinoma of the larynx: a marker of radioresistance. *Int J Cancer*. 2002 Aug 1;100(4):472-5.

Cordeiro PG, Santamaria E. A classification system and algorithm for reconstruction of maxillectomy and midfacial defects. *Plast Reconstr Surg* 2000;105(7):2331-48.

Corvo R, Antognoni P, Sanguineti G. Biological predictors of response to radiotherapy in head and neck cancer: recent advances and emerging perspectives. *Tumori*. 2001 Nov-Dec;87(6):355-63

Couture C, Raybaud-Diogene H, Tetu B, Bairati I, Murry D, Allard J, Fortin A. p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer*. 2002 Feb 1;94(3):713-22.

Crowe DL, Sinha UK. p53 apoptotic response to DNA damage dependent on bcl2 but not bax in head and neck squamous cell carcinoma lines. *Head Neck*. 2006 Jan;28(1):15-23.

De Crevoisier R, Bourhis J, Domenge C, Wibault P, Koscielny S, Lusinchi A, Mamelle G, Janot F, Julieron M, Leridant AM, Marandas P, Armand JP, Schwaab G, Luboinski B, Eschwege F. Full-dose reirradiation for unresectable head and neck carcinoma: experience at the Gustave-Roussy Institute in a series of 169 patients. *J Clin Oncol*. 1998 Nov;16(11):3556-62.

Dijkema IM, Struikmans H, Dullens HF, Kal HB, van der Tweel I, Battermann JJ. Influence of p53 and bcl-2 on proliferative activity and treatment outcome in head and neck cancer patients. *Oral Oncol*. 2000 Jan;36(1):54-60.

Elwood JM, Pearson JC, Skippen DH, Jackson SM. Alcohol, smoking, social and occupational factors in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. *Int J Cancer*. 1984 Nov 15;34(5):603-12.

Eneroth CM, Hjertman L, Moberger G. Squamous cell carcinoma of the palate. *Acta Otolaryngol* 1972;73:418-27.

Erkal HS, Serin M, Amdur RJ, Villaret DB, Stringer SP, Mendenhall WM. Squamous cell carcinomas of the soft palate treated with radiation therapy alone or followed by planned neck dissection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50(2): 359-66.

Esche BA, Haie CM, Gerbaulet AP, Eschwege F, Richard JM, Chassagne D. Interstitial and external radiotherapy in carcinoma of the soft palate and uvula. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988;15:619-25.

Evans JF, Shah JP. Epidermoid carcinoma of the palate. *Am J Surg* 1981;142:451-6.

Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnson JT. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998 Jun;124(6):637-40.

Fallai C, Bolner A, Signor M, Gava A, Franchin G, Ponticelli P, Taino R, Rossi F, Ardizzioia A, Oggioni M, Crispino S, Olmi P. Long-term results of conventional radiotherapy versus accelerated hyperfractionated radiotherapy versus concomitant radiotherapy and chemotherapy in locoregionally advanced carcinoma of the oropharynx. *Tumori*. 2006 Jan-Feb;92(1):41-54.

Fee WE, Schoepfel SL, Rubeinstein R, Goffinet DR, Goode RL, Boles, R, Tuschman M. Squamous cell carcinoma of the soft palate. *Arch Otolaryngol* 1979;105(Dec):1979.

Fletcher GH, Lindberg RD. Squamous cell carcinoma of the tonsillar area and palatine arch. *Am. J. Roentgen* 1966; 96:574-87.

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.

Gallo O, Boddi V, Calzolari A, Simonetti L, Trovati M, Bianchi S. bcl-2 protein expression correlates with recurrence and survival in early stage head and neck cancer treated by radiotherapy. *Clin Cancer Res*. 1996 Feb;2(2):261-7.

Gallo O, Chiarelli I, Boddi V, Bocciolini C, Bruschini L, Porfirio B. Cumulative prognostic value of p53 mutations and bcl-2 protein expression in head-and-neck cancer treated by radiotherapy. *Int J Cancer*. 1999 Dec 22;84(6):573-9.

Garret PG, Beale MB. Carcinoma of the oropharynx: soft palate. *J Otolaryngol* 1984;13:165-8.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984 Oct;133(4):1710-5.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983 Jan 15;31(1):13-20.

Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G. Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol*. 1992 Sep;168(1):85-6.

Gibson MK, Forastiere AA. Multidisciplinary approaches in the management of advanced head and neck tumors: state of the art. *Curr Opin Oncol*. 2004 May;16(3):220-4. Review.

Girod SC, Pfeiffer P, Ries J, Pape HD. Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as 'biomarkers' in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1998 Aug;36(4):252-60.

Gomaa W, Ke Y, Fujii H, Helliwell T. Tissue microarray of head and neck squamous carcinoma: validation of the methodology for the study of cutaneous fatty acid-binding protein, vascular endothelial growth factor, involucrin and Ki-67. *Virchows Arch*. 2005 Oct;447(4):701-9.

Grabenbauer GG, Muhlfriedel C, Rodel F, Niedobitek G, Hornung J, Rodel C, Martus P, Iro H, Kirchner T, Steininger H, Sauer R, Weidenbecher M, Distel L. Squamous cell carcinoma of the oropharynx: Ki-67 and p53 can identify patients at high risk for local recurrence after surgery and postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000 Nov 1;48(4):1041-50.

Grabenbauer GG, Suckorada O, Niedobitek G, Rodel F, Iro H, Sauer R, Rodel C, Schultze-Mosgau S, Distel L. Imbalance between proliferation and apoptosis may be responsible for treatment failure after postoperative radiotherapy in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Oral Oncol*. 2003 Jul;39(5):459-69.

Griffin MC, Robinson RA, Trask DK. Validation of tissue microarrays using p53 immunohistochemical studies of squamous cell carcinoma of the larynx. *Mod Pathol*. 2003 Dec;16(12):1181-8.

Gulmann C, Butler D, Kay E, Grace A, Leader M. Biopsy of a biopsy: validation of immunoprofiling in gastric cancer biopsy tissue microarrays. *Histopathology*. 2003 Jan;42(1):70-6

Gusterson BA, Anbazhagan R, Warren W, Midgely C, Lane DP, O'Hare M, Stamps A, Carter R, Jayatilake H. Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene*. 1991 Oct;6(10):1785-9.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70

Herchenhorn D, Dias FL. Advances in radiochemotherapy in the treatment of head and neck cancer. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2004 Jan;59(1):39-46. Epub 2004 Mar 15. Review.

Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Pirinen R, Salmi L, Halonen P, Johansson R, Kosma VM. Enhanced apoptosis correlates with poor survival in patients with laryngeal cancer but not with cell proliferation, bcl-2 or p53 expression. *Eur J Cancer*. 1999 Feb;35(2):231-7.

Homma A, Furuta Y, Oridate N, Nakano Y, Yagi K, Nagahashi T, Fukuda S, Inuyama Y. Correlation of clinicopathological parameters and biological markers related to apoptosis and proliferative activity with a clinical outcome in squamous cell carcinoma of the larynx treated with concurrent chemoradiotherapy. *Auris Nasus Larynx*. 2001 May;28 Suppl:S87-94.

Horton D, Tran L, Greenberg P, Selch MT, Parker RG. Primary radiation therapy in the treatment of squamous cell carcinoma of the soft palate. *Cancer* 1989;63:2442-5.

Hotz MA, Bosq J, Zbaeren P, Reed J, Schwab G, Krajewski S, Brousset P, Borner MM. Spontaneous apoptosis and the expression of p53 and Bcl-2 family proteins in locally advanced head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999 Apr;125(4):417-22.

Ildstad ST, Tollerud DJ, Bigelow ME, Remensnyder JP. A multivariate analysis of determinants of survival for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Surg*. 1989 Feb;209(2):237-41.

Ito T, Fujieda S, Tsuzuki H, Sunaga H, Fan G, Sugimoto C, Fukuda M, Saito H. Decreased expression of Bax is correlated with poor prognosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Cancer Lett*. 1999 Jun 1;140(1-2):81-91.

Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin*. 2003 Jan-Feb;53(1):5-26.

Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ.* 2001 Apr;65(4):328-39. Review.

Jordan RC, Catzavelos GC, Barrett AW, Speight PM. Differential expression of bcl-2 and bax in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996 Nov;32B(6):394-400.

Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, Homer L. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Nov;63(11):1599-605.

Keus RB, Pontvert D, Brunin F, Jaulerry Ch., Bataini JP. Results of irradiation in squamous cell carcinoma of the soft palate and uvula. *Radiother Oncol* 1988;11:311-7.

Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology.* 2002 Dec 27;181-182:471-4

Kildal M, Wei FC, Chang YM. Free vascularized bone grafts for reconstruction of traumatic bony defects of mandible and maxilla. *World J Surg* 2001;25(8):1067-74.

Koch W, Sidransky D. Molecular markers of radiation effectiveness in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Radiat Oncol.* 2004 Apr;14(2):130-8.

Koelbl O, Rosenwald A, Haberl M, Muller J, Reuther J, Flentje M. p53 and Ki-67 as predictive markers for radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the oral cavity? an immunohistochemical and clinicopathologic study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001 Jan 1;49(1):147-54.

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

Kowalski LP, Carvalho AL, Martins Priante AV, Magrin J. Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2005 May;41(5):534-41.

Kowalski LP, Franco EL, de Andrade Sobrinho J, Oliveira BV, Pontes PL. Prognostic factors in laryngeal cancer patients submitted to surgical treatment. *J Surg Oncol.* 1991 Oct;48(2):87-95.

Kowalski LP, Franco EL, Torloni H, Fava AS, de Andrade Sobrinho J, Ramos G, Oliveira BV, Curado MP. Lateness of diagnosis of oral and oropharyngeal carcinoma: factors related to the tumour, the patient and health professionals. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1994 May;30B(3):167-73.

Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1993 Oct 1;53(19):4701-14.

Kropveld A, Rozemuller EH, Leppers FG, Scheidel KC, de Weger RA, Koole R, Hordijk GJ, Slootweg PJ, Tilanus MG. Sequencing analysis of RNA and DNA of exons 1 through 11 shows p53 gene alterations to be present in almost 100% of head and neck squamous cell cancers. *Lab Invest.* 1999 Mar;79(3):347-53.

Krolls SO, Hoffman S. Squamous cell carcinoma of the oral soft tissues: a statistical analysis of 14,253 cases by age, sex, and race of patients. *J Am Dent Assoc* 1976;92:571-4.

Kunz C, Bosch FX, Klein-Kuhne W, Nollert J, Rudat V, Conradt C, Dietz A. [Immunohistochemical determination of cell cycle regulatory proteins. No prognostic significance in advanced squamous epithelial carcinomas of the head-neck area] *HNO*. 2003 Oct;51(10):800-5.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6.

Lavertu P, Adelstein DJ, Myles J, Secic M. P53 and Ki-67 as outcome predictors for advanced squamous cell cancers of the head and neck treated with chemoradiotherapy. *Laryngoscope*. 2001 Nov;111(11 Pt 1):1878-92.

Lee HW, Park YR, Sim J, Park RW, Kim WH, Kim JH. The tissue microarray object model: a data model for storage, analysis, and exchange of tissue microarray experimental data. *Arch Pathol Lab Med*. 2006 Jul;130(7):1004-13.

Le Scodan R, Pommier P, Ardiet JM, Montbarbon X, Malet C, Favrel V, Zrounba P, Poupart M, Ceruse P, Ferlay C, Clippe S. Exclusive brachytherapy for T1 and T2 squamous cell carcinomas of the velotonsillar area: results in 44 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Oct 1;63(2):441-8.

Lefebvre JL, Chevalier D, Luboinski B, Kirkpatrick A, Collette L, Sahmoud T. Larynx preservation in pyriform sinus cancer: preliminary results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial. EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Jul 3;88(13):890-9.

Levendag P, Nijdam W, Noever I, Schmitz P, van de Pol M, Sipkema D, Braat C, de Boer M, Jansen P. Brachytherapy versus surgery in carcinoma of tonsillar fossa and/or soft palate: late adverse sequelae and performance status: can we be more selective and obtain better tissue sparing? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Jul 1;59(3):713-24.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature.* 1991 Jun 6;351(6326):453-6. Review.

Lindberg RD. Distribution of cervical lymph node metastasis from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 1972;29:1446-54.

Logullo AF, de Moura RP, Nonogaki S, Kowalski LP, Nagai MA, Simpson AJ. A proposal for the integration of immunohistochemical staining and DNA-based techniques for the determination of TP53 mutations in human carcinomas. *Diagn Mol Pathol.* 2000 Mar;9(1):35-40.

Luukkaa M, Minn H, Aitasalo K, Kronqvist P, Kulmala J, Pyrhonen S, Grenman R. Treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx and hypopharynx--an analysis of 174 patients in south western Finland. *Acta Oncol.* 2003;42(7):756-62.

Macdonald G, Hurman DC. Influence of anaemia in patients with head and neck cancer receiving adjuvant postoperative radiotherapy in the Grampian region. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2004 Feb;16(1):63-70.

McGurk M, Chan C, Jones J, O'regan E, Sherriff M. Delay in diagnosis and its effect on outcome in head and neck cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Aug;43(4):281-4.

McLean A, LeMay W, Vila P, Wegner M, Remington P. Disparities in oral and pharyngeal cancer incidence and mortality among Wisconsin residents, 1999-2002. *WMJ*. 2006 Sep;105(6):32-5.

Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD, Weidauer H. Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *Clin Investig*. 1992 Mar-Apr;70(3-4):320-7.

Mak-Kregar S, Keus RB, Balm AJ, Hilgers FJ. Carcinoma of the soft palate and the posterior oropharyngeal wall. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1994 Feb;19(1):22-7.

Mariani PB, Kowalski LP, Magrin J. Reconstruction of large defects postmandibulectomy for oral cancer using plates and myocutaneous flaps: a long-term follow-up. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006 May;35(5):427-32. Epub 2006 Jan 26.

Martin H. Tumors of the palate (benign and malignant). *Arch Surg* 1942;44:599-635.

Medini E, Medini A, Gapany M, Levitt SH. External beam radiation therapy for squamous cell carcinoma of the soft palate. *Int. J. Radiation Oncology Biol Phys* 1997;38(3):507-11.

Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res*. 1994 Jun 15;54(12):3131-5.

Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol*. 2001 Jan;8(1):14-20.

Molls M, Stadler P, Becker A, Feldmann HJ, Dunst J. Relevance of oxygen in radiation oncology. Mechanisms of action, correlation to low hemoglobin levels. *Strahlenther Onkol.* 1998 Dec;174 Suppl 4:13-6. Review.

Morse DE, Kerr AR. Disparities in oral and pharyngeal cancer incidence, mortality and survival among black and white Americans. *J Am Dent Assoc.* 2006 Feb;137(2):203-12. Erratum in: *J Am Dent Assoc.* 2006

Moyer JS, Wolf GT, Bradford CR. Current thoughts on the role of chemotherapy and radiation in advanced head and neck cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004 Apr;12(2):82-7. Review.

Muir C, Weiland L. Upper aerodigestive tract cancers. *Cancer.* 1995 Jan 1;75(1 Suppl):147-53. Erratum in: *Cancer* 1995 Jun 15;75(12):2978.

Nagai MA, Miracca EC, Yamamoto L, Moura RP, Simpson AJ, Kowalski LP, Brentani RR. TP53 genetic alterations in head-and-neck carcinomas from Brazil. *Int J Cancer.* 1998 Mar 30;76(1):13-8.

New GB, Hallberg OE. The end-results of the treatment of malignant tumors of the palate. *Surg Gynecol Obstet* 1941;73:520-4.

Nijdam W, Levendag P, Noever I, Uyl-de Groot C, van Agthoven M. Cost analysis comparing brachytherapy versus surgery for primary carcinoma of the tonsillar fossa and/or soft palate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Jun 1;59(2):488-94.

Nijdam W, Levendag P, Noever I, Groot CU, Agthoven M. Cancer in the oropharynx: cost calculation of different treatment modalities for controlled primaries, relapses and grade III/IV complications. *Radiother Oncol.* 2005 Oct;77(1):65-72.

Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med.* 2000 Oct;29(9):413-25.

Obata A, Eura M, Sasaki J, Saya H, Chikamatsu K, Tada M, Iggo RD, Yumoto E. Clinical significance of p53 functional loss in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Int J Cancer.* 2000 Mar 20;89(2):187-93.

Oblak I, Strojan P, Zakotnik B, Budihna M, Smid L. Hemoglobin as a factor influencing the outcome in inoperable oropharyngeal carcinoma treated by concomitant radiochemotherapy. *Neoplasma.* 2003;50(6):452-8.

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993 Aug 27;74(4):609-19.

Oreggia F, De Stefani E, Correa P, Fierro L. Risk factors for cancer of the tongue in Uruguay. *Cancer.* 1991 Jan 1;67(1):180

Osborne RF, Brown JJ. Carcinoma of the oral pharynx: an analysis of subsite treatment heterogeneity. *Surg Oncol Clin N Am.* 2004 Jan;13(1):71-80. Review.

Pena JC, Thompson CB, Recant W, Vokes EE, Rudin CM. Bcl-xL and Bcl-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 1999 Jan 1;85(1):164-70.

Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol.* 2004 Sep;15(9):1319-29. Review.

Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet*. 2000 Mar 18;355(9208):949-55.

Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I., Sobin LH, Pathologists in 9 Countries. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. [World Health Organization]. 2nd ed. Berlin: *Springer*, 1977:11-3.

Rahima B, Shingaki S, Nagata M, Saito C. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Apr;97(4):423-31.

Rao DN, Shroff PD, Chattopadhyay G, Dinshaw KA. Survival analysis of 5595 head and neck cancers results of conventional treatment in a high-risk population. *Br J Cancer* 1998;77:1514-8.

Ratzer ER, Schweitzer RJ, Frazell EL. Epidermoid carcinoma of the palate. *Am J Surg* 1970;119:294-7.

Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, Panikkar KR, Nair MK, Pillai MR. Apoptosis, angiogenesis and proliferation: trifunctional measure of tumour response to radiotherapy for oral cancer. *Oral Oncol*. 2001 Feb;37(2):164-71.

Raybaud-Diogene H, Fortin A, Morency R, Roy J, Monteil RA, Tetu B. Markers of radioresistance in squamous cell carcinomas of the head and neck: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *J Clin Oncol*. 1997 Mar;15(3):1030-8.

Raybaud H, Fortin A, Bairati I, Morency R, Monteil RA, Tetu B. Nuclear DNA content, an adjunct to p53 and Ki-67 as a marker of resistance to radiation therapy in oral cavity and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2000 Feb;29(1):36-41

Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.* 1994 Jan;124(1-2):1-6

Reed JC, Tsujimoto Y, Alpers JD, Croce CM, Nowell PC. Regulation of bcl-2 proto-oncogene expression during normal human lymphocyte proliferation. *Science.* 1987 Jun 5;236(4806):1295-9.

Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 2000 Nov;157(5):1415-30

Rhee JC, Khuri FR, Shin DM. Advances in chemoprevention of head and neck cancer. *Oncologist.* 2004;9(3):302-11. Review.

Rindum J, Pindborg JJ. Intraoral cancer: 100 consecutive cases. *Tandlaegebladet.* 1989 Sep;93(13):504-5.

Rinehart J, Ruff T, Cheung A, Hutchinson L, Tuggle R, Pinkston DR, Keville L, Wong L. Neoadjuvant and concomitant chemotherapy and radiation therapy in patients with advanced head and neck carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005 Jan;132(1):69-74.

Rubright WC, Hoffman HT, Lynch CF, Kohout FJ, Robinson RA, Graham S, Funk G, McCulloch T. Risk factors for advanced-stage oral cavity cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996 Jun;122(6):621-6.

Russ JE, Applebaum EL, Sisson GA. Squamous cell carcinoma of the soft palate. *Laryngoscope.* 1977

Sakuraba M, Kimata Y, Ota Y, Uchiyama K, Kishimoto S, Harii K, Ebihara S. Simple maxillary reconstruction using free tissue transfer and prostheses. *Plast Reconstr Surg* 2003;111(2):594-600.

Schlecht NF, Franco EL, Pintos J, Negassa A, Kowalski LP, Oliveira BV e Curado MP. Interaction between tobacco and alcohol consumption and the risk of câncers of the upper aero-digestive tract in Brazil. *Am J Epidemiol* 1999; 150 (11):1129-37.

Schlecht NF, Pintos J, Kowalski LP, Franco EL. Effect of type of alcoholic beverage on the risks of upper aerodigestive tract cancers in Brazil. *Cancer Causes Control*. 2001 Sep;12(7):579-87.

Schonk DM, Kuijpers HJ, van Drunen E, van Dalen CH, Geurts van Kessel AH, Verheijen R, Ramaekers FC. Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum Genet*. 1989 Oct;83(3):297-9.

Seiwert TY, Cohen EE. State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer. *Br J Cancer*. 2005 Apr 25;92(8):1341-8. Review.

Selek U, Garden AS, Morrison WH, El-Naggar AK, Rosenthal DI, Ang KK. Radiation therapy for early-stage carcinoma of the oropharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004 Jul 1;59(3):743-51.

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

Shikama N, Sasaki S, Nishikawa A, Koiwai K, Yoshino F, Hirase Y, Kawakami R, Kadoya M, Oguchi M. Risk factors for local-regional recurrence following preoperative radiation therapy and surgery for head and neck cancer (stage II-IVB). *Radiology*. 2003 Sep;228(3):789-94.

Shingaki S, Takada M, Sasai K, Bibi R, Kobayashi T, Nomura T, Saito C. Impact of lymph node metastasis on the pattern of failure and survival in oral carcinomas. *Am J Surg*. 2003

Sieczka E, Datta R, Singh A, Loree T, Rigual N, Orner J, Hicks W Jr. Cancer of the buccal mucosa: are margins and T-stage accurate predictors of local control? *Am J Otolaryngol*. 2001 Nov-Dec;22(6):395-9.

Silverberg E, Boring CC, Squires TS. Cancer statistics, 1990. *CA Cancer J Clin*.1990;40 (5):318-9.

Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *Biotechniques*. 2004 Jan;36(1):98-105. Review.

Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehulsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol*. 1999 Nov;35(6):583-9.

Smith BD, Haffty BG. Molecular markers as prognostic factors for local recurrence and radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiat Oncol Investig*. 1999;7(3):125-44. Review

Sobin LH, Wittekind CH. Head and neck tumours: lip and oral cavity and pharynx; 6th ed. In *TNM: classification of malignant tumors – UICC*. 2002 p.19-35.

SPSS. *Statistical package for social science, statistical data analysis for Windows*. Chicago: SPSS Inc, 2003.

Stadler P, Feldmann HJ, Creighton C, Kau R, Molls M. Changes in tumor oxygenation during combined treatment with split-course radiotherapy and chemotherapy in patients with head and neck cancer. *Radiother Oncol*. 1998 Aug;48(2):157-64.

Sturgis EM, Miller RH. Second primary malignancies in the head and neck cancer patient. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995 Dec;104(12):946-54. Review.

Sundaram K, Schwartz J, Har-El G, Lucente F. Carcinoma of the oropharynx: factors affecting outcome. *Laryngoscope*. 2005 Sep;115(9):1536-42.

Swango PA. Cancers of the oral cavity and pharynx in the United States: an epidemiologic overview. *J Public Health Dent*. 1996 Fall;56(6):309-18. Review.

Tandon DA, Bahadur S, Rath GK. Carcinoma of the soft palate. *J Laryngol Otol*. 1992 Feb;106(2):130-2.

Tomar SL, Loree M, Logan H. Racial differences in oral and pharyngeal cancer treatment and survival in Florida. *Cancer Causes Control*. 2004 Aug;15(6):601-9.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995 Mar 10;267(5203):1456-62. Review.

Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol*. 2005 Dec;86(6):347-63. Review.

Tromp DM, Brouha XD, De Leeuw JR, Hordijk GJ, Winnubst JA. Psychological factors and patient delay in patients with head and neck cancer. *Eur J Cancer*. 2004 Jul;40(10):1509-16.

Tromp DM, Brouha XD, Hordijk GJ, Winnubst JA, de Leeuw RJ. Patient and tumour factors associated with advanced carcinomas of the head and neck. *Oral Oncol*. 2005 Mar;41(3):313-9.

Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jul;83(14):5214-8

Tsuzuki H, Sunaga H, Ito T, Narita N, Sugimoto C, Fujieda S. Reliability of platelet-derived endothelial cell growth factor as a prognostic factor for oral and oropharyngeal carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005 Dec;131(12):1071-8.

Tytor M, Olofsson J. Prognostic factors in oral cavity carcinomas. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1992;492:75-8.

Vairo G, Innes KM, Adams JM. Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival. *Oncogene*. 1996 Oct 3;13(7):1511-9.

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med*. 1993 Jan 21;328(3):184-94. Review

Wagner W, Esser E, Ostkamp K. Osseointegration of dental implants in patients with and without radiotherapy. *Acta Oncol*. 1998;37(7-8):693-6.

Warren S e Gates O. Multiple primary malignant tumors: a survey of the literature and a statistical study. *Am J Cancer* 1932;16:1358-414.

Weber RS, Peters LJ, Wolf P, Guillaumondegui O. Squamous cell carcinoma of the soft palate, uvula, and anterior faucial pillar. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1988 Jul;99(1):16-23.

Wiencke JK. DNA adduct burden and tobacco carcinogenesis. *Oncogene*. 2002 Oct 21;21(48):7376-91. Review.

Wildt J, Bundgaard T, Bentzen SM. Delay in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1995 Feb;20(1):21-5.

Wilson GD, Richman PI, Dische S, Saunders MI, Robinson B, Daley FM, Ross DA. p53 status of head and neck cancer: relation to biological characteristics and outcome of radiotherapy. *Br J Cancer.* 1995 Jun;71(6):1248-52.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cellular events in the adrenal cortex following ACTH deprivation. *J Pathol.* 1972 Jan;106(1):Pix

Wyllie AH. The biology of cell death in tumours. *Anticancer Res.* 1985 Jan-Feb;5(1):131-6.

Xie X, Clausen OP, De Angelis P, Boysen M. The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer.* 1999(a) Sep 15;86(6):913-20

Xie X, De Angelis P, Clausen OP, Boysen M. Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 1999(b) Sep;35(5):502-9.

Xie X, Clausen OP, Boysen M. Prognostic significance of p21WAF1/CIP1 expression in tongue squamous cell carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002 Aug;128(8):897-902.

Yamazaki Y, Chiba I, Hirai A, Notani K, Kashiwazaki H, Tei K, Totsuka Y, Iizuka T, Kohgo T, Fukuda H. Radioresistance in oral squamous cell carcinoma with p53 DNA contact mutation. *Am J Clin Oncol.* 2003 Oct;26(5):e124-9.