



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JÉSSICA GRAÇA SANT ANNA

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA MORTALIDADE POR CÂNCER DE
CABEÇA E PESCOÇO NO ESTADO ESPÍRITO SANTO E
INDICADORES DE PROGNÓSTICO**

VITÓRIA, ES

2020

JÉSSICA GRAÇA SANT ANNA

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA MORTALIDADE POR CÂNCER DE
CABEÇA E PESCOÇO NO ESTADO ESPÍRITO SANTO E
INDICADORES DE PROGNÓSTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler

Co-orientador: Prof. Dr. Maria Paula Curado

VITÓRIA, ES

2020

DEDICATÓRIA

Sou grata ao meu Deus, toda honra e toda glória, pois tem me sustentado até aqui com suas mãos poderosas, pois de nada sou merecedora, mas tenho tudo em Sua presença.

À minha mãe, amiga, parceira, meu porto-seguro e incentivadora, não me deixa desistir.

À minha avó Sônia, pelo conhecimento e experiência de vida

À minha família todo o carinho e orgulho, sou muito abençoada.

À minha Orientadora Sandra, que nos incentiva, que nos desafia, que nos apoia, que torna nossas ideias possíveis e nos valoriza.

À Prof.^a Maria Paula e ao Prof. Max Moura, por toda a disposição e paciência em dividir conhecimento e ensinar. E ainda agradeço a toda equipe do A.C Camargo por gentilmente me receber.

À minha linda equipe do laboratório de imunopatologia, Priscila, Camila, Willene, Thabata, Paola, Gabriela, Pamela, Anna Clara, Isabella, Brenda, Roberta, Regina, Glênia, Renan, Steeven e Luciana e aos Ics Amanda, Deyverton e Suzana grupo que se tornou minha família, juntos em momentos de tristezas e de alegrias. E ainda aqueles que mesmo ausentes hoje, torceram para o meu sucesso, Régia, Andres, Divan, Estevão e Caio.

A toda equipe de cabeça e pescoço do Hospital Santa Rita, em especial, com muito carinho às quintas de ambulatório, ao Dr Podestá, as Dentistas Solange e Helenita, a Assistente social Bianca e equipe de enfermagem Beatriz, Adenir, Kelly, e ainda mais uma vez minha amiga Wilene, por quatro anos de ambulatório, muitos bolos de aniversário, risadas e aprendizado.

Aos meus amigos da Igreja Cristã Maranata, por toda a paciência nos momentos de desabafo, além de todo incentivo e força.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo.

À Fundação de amparo à pesquisa e inovação do Espírito Santo (FAPES) por fomentar e viabilizar a execução deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Nível de Superior - Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

Ao Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) por ter proporcionando espaço físico, profissionais capacitados, acessos aos prontuários e pela motivação na busca de resultados científicos que irão contribuir para a melhor qualidade de vida dos pacientes com câncer.

Ao Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes e do Hospital Santa Rita de Cassia (HSRC), em especial ao Dr. José Roberto Vasconcelos de Podestá, por permitirem o acompanhamento às consultas dos pacientes e por todo aprendizado.

Ao professor Hisham Mehanna diretor do Institute of Head and Neck Studies and Education da University of Birmingham , Reino Unido pela colaboração, e à University Hospitals Coventry and Warwickshire NHS Trust, por permitir o acesso às amostras biológicas.

À Prof^a Maria Paula Curado e ao Prof. Max Moura de Oliveira e toda equipe do A.C.Camargo Cancer Center - Centro Internacional de Pesquisa (CIPE), pela expansão do conhecimento.

Aos pacientes acometidos por Câncer de Cabeça e Pescoço toda a solidariedade, afeto e respeito. Aos que gentilmente responderam aos questionários, compartilhando das suas histórias de vida com os pesquisadores, toda gratidão e a certeza de que vocês são o motivo maior da realização desta pesquisa e que esforços não serão medidos até a obtenção de resultados científicos que contribuam com o diagnóstico precoce da doença, melhor resposta ao tratamento e aumento da qualidade de vida.

“Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e juntamente entendam que a mão do Senhor fez isso, e o Santo de Israel o criou”.

(Isaías 41:20)

RESUMO

SANT ANNA, J.G. **Distribuição espacial da mortalidade por câncer de cabeça e pescoço no estado do Espírito Santo e indicadores de prognóstico**. 2020. 73f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)– Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O conhecimento sobre a mortalidade de câncer e evolução permite ferramentas cruciais para programas regionais no controle do câncer, e os estudos de biomarcadores moleculares, são essenciais no prognóstico de pacientes com câncer de cabeça e pescoço (CCP). A expressão da proteína p53 nos tumores pode presumir estadio avançado ou metástase, levando a maior relevância deste biomarcador para o carcinoma epidermóide oral (CEO). O objetivo deste trabalho foi investigar a taxa de mortalidade do câncer de cabeça e pescoço em seus aspectos epidemiológicos, espacial e temporal no estado do Espírito Santo bem como averiguar a expressão da proteína p53 em carcinoma epidermóide oral, sua relação com dados clínicopatológicos, histopatológicos e seu potencial uso como biomarcador de prognóstico. Foram reunidos dados no período de 1998 a 2017, de óbitos confirmados por câncer de cabeça e pescoço com dados obtidos pelo programa Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS, Brasil) no estado do Espírito Santo, assim como, casos de carcinoma epidermoide oral de um estudo multicêntrico do Brasil e Reino Unido no período de 2010-2017. Trata-se de um estudo ecológico exploratório temporal das taxas de mortalidade por câncer de cabeça e pescoço, utilizando análise de regressão linear, na qual a variável independente foi o ano do óbito. Os modelos foram ajustados para variáveis selecionadas, e taxas padronizadas por microrregião do estado distribuídos espacialmente. O estudo longitudinal prospectivo com lâminas histológicas obtidas de 95 casos de carcinoma epidermóide oral com a construção de microarranjo tecidual (TMA) de três regiões distintas: epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor, e submetidas à imuno-histoquímica para investigação da expressão de p53. Para análise de regressão linear foi utilizado o percentual anual médio (AAPC) da mortalidade de casos com CCP, cauculados a partir do software “jointpoint” e para averiguar a expressão de p53 considerando a marcação nuclear em queratinócitos através de H-Score. O nível de significância considerado para todos os testes estatísticos foi de 95%. Teste Qui-Quadrado foi

empregado para instituir associações entre as variáveis clinicopatológicas estudadas na expressão da proteína. Dos resultados obtidos, 85% da mortalidade de câncer de cabeça e pescoço no período estudado foi em homens, sendo observado no mesmo período o aumento da tendência em todos as regionais de saúde do Estado, além dos valores dos sítios a cavidade oral (APPC 1,1% anual), orofaringe (APPC 4,7% anual), e laringe (APPC 2,6% anual). Entre as mulheres o aumento foi na região central do Estado e na cavidade oral (APPC 6,6% anual). Em relação a expressão de p53 na cavidade oral, houve significância entre a expressão e o padrão de invasão ($p=0,046$). Dentre a investigação das taxas de mortalidade no estado do Espírito Santo no sexo masculino, observamos significância nas variáveis faixa etária de 40 a 59 e 60 anos e mais, nas regiões de saúde: Central, Metropolitana, Norte, Sul e nas topografias da cavidade oral, orofaringe e laringe. Em relação ao sexo feminino a região de saúde Central e a topografia cavidade oral mostraram significância. As taxas podem estar relacionadas com distinção em aspectos socioeconômicos e sociodemográficos. Possibilitando estratégias de ação para o combate do CCP no estado. Na investigação da expressão da proteína p53 houve associação significativa com o padrão de invasão, mostrando um participação importante nos estágios iniciais da tumorigênese. Porém não foi observada associação com demais aspectos clinopatológicos e histopatológicos, mostrando que a proteína p53 e sua aplicação como biomarcador não foi suportada.

Palavras-chave: Câncer de cabeça e pescoço. Biomarcador. Mortalidade. Cavidade oral.

ABSTRACT

SPATIAL DISTRIBUTION OF MORTALITY FROM HEAD AND NECK CANCER IN THE STATE OF ESPÍRITO SANTO AND PROGNOSTIC INDICATORS

SANT ANNA, J.G. Spatial distribution of mortality from head and neck cancer in the State Espírito Santo and prognostic indicators. 2020. 73f. (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Knowledge about cancer mortality and evolution allows crucial tools for regional cancer control programs, and studies of molecular biomarkers are essential in the prognosis of patients with head and neck cancer (CCP). The expression of p53 protein in tumors may presume an advanced stage or metastasis, leading to a greater relevance of this biomarker for oral squamous cell carcinoma (CEO). The aim of this study was to investigate the mortality rate of head and neck cancer in its epidemiological, spatial and temporal aspects in the state of Espírito Santo, as well as to investigate the expression of p53 protein in oral squamous cell carcinoma, its relationship with clinical, pathological, histopathological and its potential use as a prognostic biomarker. Data were collected from 1998 to 2017, of deaths confirmed by head and neck cancer, with data obtained by the Department of Informatics of the Unified Health System (DATASUS, Brazil) in the state of Espírito Santo, as well as cases of squamous cell carcinoma presentation of a multicenter study from Brazil and the United Kingdom in the period 2010-2017. This is an ecological exploratory study of mortality rates due to head and neck cancer, using linear regression analysis, in which the independent variable was the year of death. The models were adjusted for selected variables, and rates standardized by state micro-region distributed spatially. The prospective longitudinal study with histological slides obtained from 95 cases of oral squamous cell carcinoma with the construction of tissue microarray (TMA) from three distinct regions: epithelium adjacent to the tumor, dysplasia and tumor, and submitted to immunohistochemistry to investigate p53 expression. For linear regression analysis, the average annual percentage (AAPC) of mortality of cases with PCC, used from the jointpoint software, was used to ascertain the expression of p53 considering the nuclear marking in keratinocytes through H-Score. The level of significance considered for all statistical tests was 95%. Chi-square test was used to establish associations between the clinicopathological variables studied in the expression of the protein. Of the results obtained, 85% of the mortality from head and neck cancer in the studied

period was in men, with an increase in the trend being observed in all regional health regions of the State, in addition to the values of the oral cavity sites (APPC 1 , 1% per year), oropharynx (APPC 4.7% per year), and larynx (APPC 2.6% per year). Among women, the increase was in the central region of the state and in the oral cavity (APPC 6.6% per year). Regarding the expression of p53 in the oral cavity, there was significance between the expression and the invasion pattern ($p = 0.046$). Among the investigation of mortality rates in the state of Espírito Santo in males, we observed significance in the variables age group from 40 to 59 and 60 years and over, in the health regions: Central, Metropolitan, North, South and in the topographies of the oral cavity , oropharynx and larynx. In relation to females, the Central health region and the topography of the oral cavity showed significance. Rates may be related to distinction in socioeconomic and sociodemographic aspects. Enabling action strategies to combat CCP in the state. In the investigation of p53 protein expression, there was a significant association with the invasion pattern, showing an important participation in the early stages of tumorigenesis. However, no association was observed with other clinipathological and histopathological aspects, showing that the p53 protein and its application as a biomarker was not supported.

Key words: Head and neck cancer. Biomarker.Mortality. Oral Cavity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Taxas estimadas de incidência padronizadas por idade (Mundo) em 2018: lábio, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, nasofaringe, laringe, ambos os sexos, todas as idades, Fonte: Globocan, 2018. 17
- Figura 2.** Taxas estimadas de mortalidade padronizadas por idade (Mundo) em 2018: lábio, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, nasofaringe, laringe, ambos os sexos, todas as idades, Fonte: Globocan, 2018. 18
- Figura 3.** Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da cavidade oral), Fonte: INCA, 2018. 20
- Figura 4.** A p53 intervém na resposta a vários sinais de estresse celular, muitos dos quais são encontrados durante o desenvolvimento e a progressão tumoral. Esses sinais induzem a estabilidade de p53, o que leva a um aumento nos níveis intracelulares desta proteína. A forma mutante, através da ligação não cíclica estável, estabiliza-se e impede a degradação proteossomal, estimulando suas propriedades negativas dominantes e facilitando a transformação maligna. 24
- Figura 5.** Taxas padronizados de mortalidade por faixa etária, ambos os sexos, Espírito Santo, período 1998-2017. 35
- Figura 6.** Taxas padronizados de mortalidade por regional, sexo masculino, Espírito Santo, período 1998-2017. 36
- Figura 7.** Taxas padronizados de mortalidade por regional, sexo feminino, Espírito Santo, período 1998-2017. 36
- Figura 8.** Taxas padronizados de mortalidade masculina por sítio anatômico, Espírito Santo, período 1998-2017. 37
- Figura 9.** Taxas padronizados de mortalidade feminina, por sítio anatômico no Espírito Santo, período 1998-2017. 37
- Figura 10.** Distribuição de taxas padronizados de mortalidade do sexo masculino, por câncer de CCP no estado do Espírito Santo. 39

Figura 11. Distribuição de taxas padronizados de mortalidade do sexo feminino, por câncer de CCP no estado do Espírito Santo.....	40
Figura 12. Fotomicrografia ilustrativa do padrão do infiltrado linfocitário tumoral em CEO. Baixo infiltrado linfocitário (A, B); Moderado infiltrado linfocitário (C,D); Alto infiltrado linfocitário (E,F). Coloração HE. Magnificação original A, C, E 200x e B,D, F 500x.	43
Figura 13. Fotomicrografia de CEO representando o padrão de invasão tumoral conforme proposto por Bryne et al 1992. (A) Padrão de invasão tipo I; (B) Padrão de invasão tipo II; (C) Padrão de invasão tipo III; (D) Padrão de invasão tipo IV. Coloração HE. Magnificação original 100x e 500x.	44
Figura 14. Fotomicrografia de CEO representativa de Invasão perineural (A); Invasão linfovascular (B,C); Coloração HE. Magnificação 200x.....	44
Figura 15. Expressão da proteína p53 nos segmentos de epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor.	46
Figura 16. Fotomicrografia da expressão de P53 nos segmentos epitélio adjacente, displasia e CEO. Imunomarcção moderada em epitélio adjacente (A, B); Imunomarcção forte em displasia (C,D); Imunomarcção forte em tecido tumoral (E,F); Controle positivo; adenocarcinoma mamário (G); Controle negativo (H). Magnificações originais de 100x, 200x e 400x.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tendência das taxas de mortalidade por câncer de cabeça e pescoço no período de 1998 a 2017 no estado do Espírito Santo.	38
Tabela 2. Associação entre as características clínicopatológicas e a expressão de p53 em carcinoma epidermoide.	41
Tabela 3. Associação entre as características histopatológicas e a expressão de p53 em CEO.....	42
Tabela 4. Expressão de p53 em epitélio adjacente, displasia e tecido tumoral.	45
Tabela 5. Correlação entre a expressão de p53 e progressão tumoral.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPC	Percentual anual média (do inglês, Average annual percent change)
CCP	Câncer de cabeça e pescoço
CEO	Carcinoma epidermóide oral
CID	Classificação internacional de doenças
DAB	3.3'-Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
HE	Hematoxilina-eosina
HPV	Papiloma Vírus Humano (do inglês, Human Papilomavirus)
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes
HSRC	Hospital Santa Rita de Cássia
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
SLD	Sobrevida livre de doença
SIM	Sistema de informação de mortalidade
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N+	Presença de metástase em linfonodos regionais SG Sobrevida global
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão

T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
T4	Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face
TIL	Infiltrado linfocitário tumoral (do inglês, Tumor Infiltrating Lymphocytes)
TMA	Mircroarranjo tecidual (do inglês, Tissue Micrarray)
TP53	Gene que codifica proteína citoplasmática, de massa molecular 53 kDa

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO	17
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	17
1.2 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO.....	19
1.2.1 Aspectos Clínicopatológicos	19
1.2.2 Fatores de Risco	21
1.2.3 Novo Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos	22
1.2.4 TP53	22
2 OBJETIVO	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3 METODOLOGIA	27
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	27
3.1.1 Estudo Ecológico.....	27
3.1.1.1 Fonte dos dados	28
3.1.1.2 Local de estudo	28
3.1.1.3 Análise descritiva, taxas específicas e padronizadas de mortalidade	28
3.1.1.4 Análise de tendência das taxas padronizadas	29
3.1.1.5 Distribuição espacial das taxas padronizadas	29
3.1.2 Estudo longitudinal prospectivo para análise de biomarcador de prognóstico	30
3.1.2.1 Casuística	30
3.1.2.2 Análise histopatológica	31
3.1.2.3 Construção do microarranjo tecidual	32
3.1.2.4 Imuno-histoquímica	33
3.1.2.5 Análise da expressão de p53	33
3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	34
4 RESULTADOS	35
4.1 ESTUDO ECOLÓGICO	35
4.2 ANÁLISE DE p53 COMO BIOMARCADOR DE PROGNÓSTICO EM CEO	40
4.2.1 Análise da expressão da proteína p53 na progressão tumoral	45
4.3 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA	48
5 DISCUSSÃO	50
5.1 ESTUDO ECOLÓGICO	50
5.2.1 Análise da expressão da proteína p53 na progressão tumoral	53
6 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO À SAÚDE	63

ANEXO B – PARECER DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA	65
ANEXO C – PARECER DO NATIONAL RESEARCH ETHICS SERVICE.....	67
ANEXO D– QUESTIONÁRIO INICIAL SOBRE HÁBITOS E ESTILO DE VIDA SERVICE	68
ANEXO E – FORMULÁRIO DE DADOS CLÍNICOS.....	71
ANEXO F – FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO CLÍNICO	72

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Os estudos epidemiológicos sobre câncer de cabeça e pescoço (CCP) têm mostrado que estes tumores ocupam a sétima posição entre os mais frequentes no mundo, com mais de 600.000 mil novos casos diagnosticados por ano, tornando esta doença um relevante problema de saúde pública (BRAY et al., 2018; GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005; ROCHA et al., 2017). O CCP é uma classe de tumores heterogêneos que ocorre nas vias aerodigestivas superiores. São incluídos nesta classificação os tumores presentes na região da cavidade oral, faringe, laringe, cavidade nasal, seios paranasais, tireoide e glândulas salivares (AHMEDIN JEMAL; FORMAN, 2011; LOTHAIRE et al., 2006).

A incidência de câncer de cabeça e pescoço no ano de 2018 foi maior na Hungria com 22,7 casos por 100.000 habitantes, enquanto Índia e França apresentaram 16,8 e 15,3 casos por 100.000 habitantes, respectivamente, figura 1. O CCP corresponde a cerca de 6,3% de todos os cânceres nos Estados Unidos e 15,3% na China (GLOBOCAN, 2018). No Brasil, estima um total de 17.590 novos casos de câncer de lábio, cavidade oral e laringe em homens e 4.780 em mulheres (INCA, 2018).

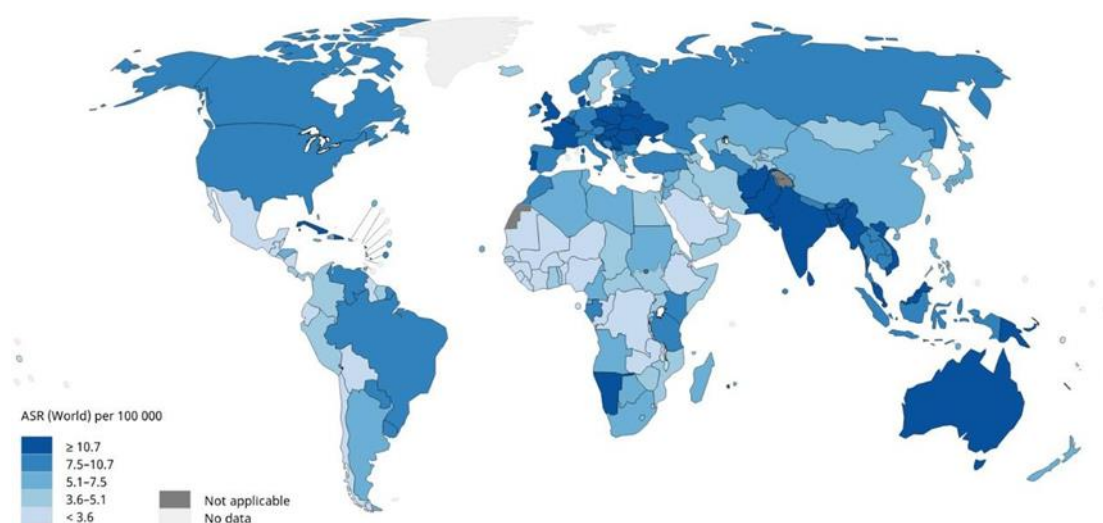


Figura 1. Taxas estimadas de incidência padronizadas por idade (Mundo) em 2018: lábio, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, nasofaringe, laringe, ambos os sexos, todas as idades, Fonte: Globocan, 2018.

O CCP apresenta elevada taxa de mortalidade no mundo (Figura 2), com

cerca de 300.000 mil ao ano, sendo que no Brasil é a sexta causa de morte por câncer, mantendo uma sobrevida global inferior a 60 meses na maioria dos casos. O Brasil apresenta a segunda taxa de mortalidade mais alta da América do Sul, com 5,4 óbitos por 100 mil habitantes.

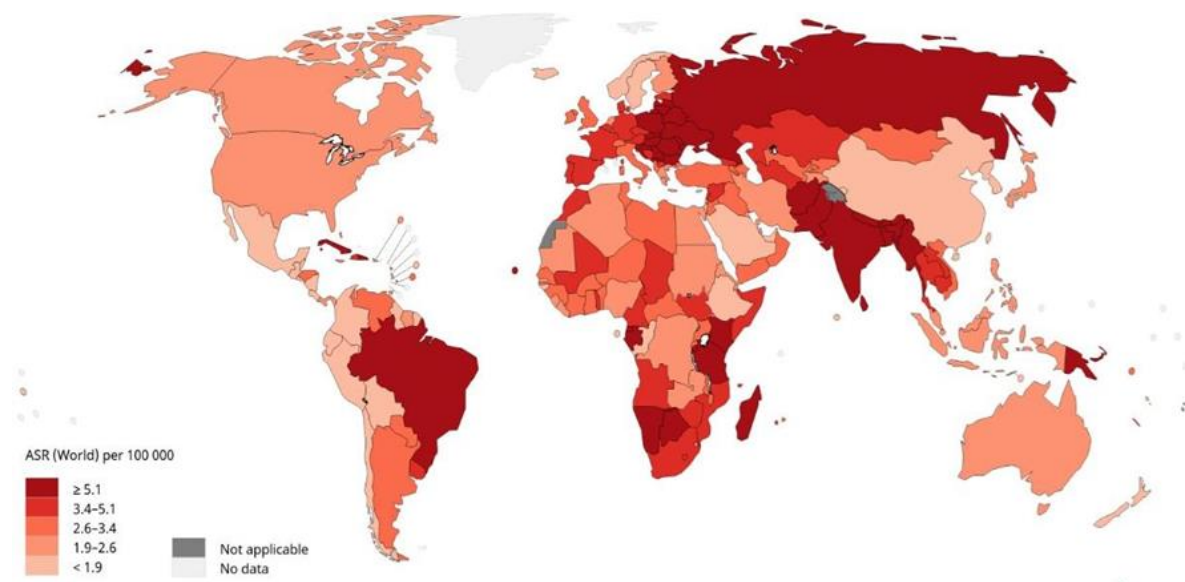


Figura 2. Taxas estimadas de mortalidade padronizadas por idade (Mundo) em 2018: lábio, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, nasofaringe, laringe, ambos os sexos, todas as idades, Fonte: Globocan, 2018.

De acordo com Bray e colaboradores (2018) as taxas de mortalidade mundias variam regionalmente, com mudanças que ocorrem, principalmente, por características socioeconômicas, hábitos de vida, fatores ambientais de vida, raça, educação preventiva e qualidade da assistência de saúde. Além disso, são altamente dependentes dos fatores etiológicos envolvidos e também podem variar de acordo com o sítio anatômico acometido (DOBROSSY, 2005). No Brasil, as maiores taxas de mortalidade são observadas na população das regiões sudeste e sul, podendo estar associadas a fatores de risco específicos, que também estão presentes nas populações da Argentina e do Uruguai, como alta exposição ao tabagismo e etilismo, além de alto consumo de carne vermelha (WÜNSCH, 2004).

O CCP é uma doença que apresenta crescente incidência, sendo seu prognóstico reflexo do diagnóstico tardio, com predomínio de casos que apresentam tumores avançados ao diagnóstico, com altas taxas de recidiva e pior sobrevida (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005; SOARES et al., 2015; THOMSON, 2018).

Assim, estudos epidemiológicos, os quais tem como foco central identificar a distribuição e as características determinantes da frequência de diferentes doenças, gerando dados que podem ser transformados em indicadores de saúde, proporcionando análises de contexto, semelhanças entre populações e avaliação de mudanças ao longo do tempo, são de fundamental importância em oncologia (ANDRADE, 1995; RAMOS et al., 2016). Esses estudos produzem informações sobre doenças, óbitos ou outros agravos de risco à saúde, utilizando de diversas tecnologias e ferramentas. Uma destas ferramentas é geoprocessamento que tem como finalidade apoiar a produção de conhecimento e foi utilizado neste estudo para auxiliar na elaboração de estratégias de ação e intervenção saúde (BARRETO, 2002).

1.2 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

1.2.1 Aspectos Clínicopatológicos

Dentre as neoplasias malignas da região de cabeça e pescoço, o principal tipo histológico é o carcinoma epidermoide, representando mais de 90% de todos os tumores (GOUVEA et al., 2010; MASSANO et al., 2006). Caracterizado por ilhas e cordões invasivos de células epiteliais pleomórficas e anaplásicas com habilidade variável de ceratinização, o carcinoma epidermoide é uma neoplasia maligna originada das células da camada espinhosa do epitélio estratificado.

A agressividade dessa neoplasia está relacionada a vários fatores, dentre eles a idade, o estado geral de saúde do paciente e a exposição aos fatores de risco tabaco e álcool. Adicionalmente, quanto maior o intervalo de tempo entre os primeiros sinais e sintomas e o diagnóstico, maiores serão os prejuízos para o indivíduo, que além de ter suas chances de cura reduzidas, precisará muitas vezes ser submetido a terapia multimodal que reduzem a qualidade de vida e trazem sequelas definitivas para seu bem-estar físico, mental e social. Além disso, o diagnóstico tardio aumenta as taxas de recidiva e reduz a sobrevida (LINDEMANN et al., 2018).

Considerando os sítios anatômicos da região da cabeça e pescoço, a cavidade bucal é o sítio mais frequentemente acometido pelo carcinoma epidermoide

oral (CEO). Esta neoplasia é comumente encontrada tanto em países em subdesenvolvimento como em países desenvolvidos.

Em 2018 foram estimados mais de 177 mil óbitos por câncer de boca no mundo, sendo 119,6 mil entre homens e 58,6 mil entre as mulheres. No Brasil, foram estimados 14.700 novos casos de câncer de boca para cada ano do biênio 2018-2019 sendo, 11.200 casos em homens e 3.500 em mulheres. Foram consideradas nesta estimativa as neoplasias malignas com localização primária nos lábios, cavidade oral, glândulas salivares e orofaringe (C00-C10), segundo a CID 10 (BRAY et al., 2018; INCA, 2018).

O CEO é 5,2% mais frequente no sexo masculino. O estado do Espírito Santo apresenta a maior incidência desses tumores no país (14,58), conforme pode ser observado na figura 3 (BRAY et al., 2018; INCA, 2018).

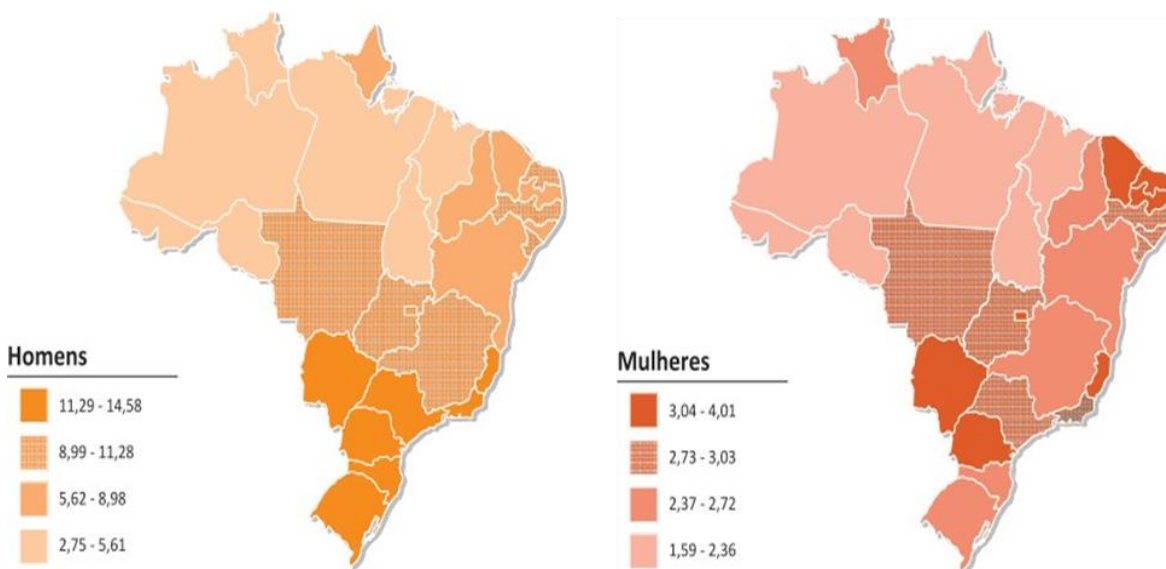


Figura 3. Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da cavidade oral), Fonte: INCA, 2018.

O tratamento de primeira escolha para o CEO é a ressecção cirúrgica, podendo ser acompanhada de terapia adjuvante radioquimioterápica pós-operatória. O tratamento cirúrgico associado à radioterapia ou quimioterapia adjuvante são necessários em casos mais avançados e pode contribuir para obtenção de melhores taxas de sobrevida. O êxito da terapia em pacientes com câncer oral depende da

intervenção de uma equipe multidisciplinar para potencializar o controle oncológico e diminuir os efeitos adversos do tratamento (MONTERO; PATEL, 2015).

1.2.2 Fatores de Risco

O CEO é uma neoplasia de origem multifatorial. O uso do tabaco e o consumo excessivo de álcool são os fatores de risco mais importantes (CARDOSO et al., 2005; HOMANN et al., 1997; MONTERO; PATEL, 2015; NABULSI et al., 1993).

Há muitas evidências de risco aumentado pela ação de compostos genotóxicos gerados pelo uso contínuo de álcool e tabaco (APPLEBAUM et al., 2007; HEALY et al., 2014). A combustão do tabaco gera muitas substâncias carcinogênicas, especialmente hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e nitrosaminas (MONTERO; PATEL, 2015), capazes de produzir adutos de DNA, que interferem nos mecanismos de replicação (JOHNSON; D, 1991).

O álcool, por sua vez, aumenta a permeabilidade da mucosa oral facilitando a penetração de agentes químicos, incluindo aqueles provenientes do tabaco, favorecendo a ocorrência de mutações no DNA das células da mucosa de revestimento (MASHBERG et al., 1993; NUNES, 2006; PIRES et al., 2008). Adicionalmente, estudos já mostraram os efeitos do etanol e do acetaldeído, um dos metabólitos gerados pela conversão do etanol, sobre as células da mucosa oral, as quais sofreram alterações estruturais e funcionais no DNA, como a interrupção na síntese e nos mecanismos de reparo do DNA (MONTERO; PATEL, 2015). Por este motivo, o uso concomitante do tabaco e do álcool, excede a soma do risco individual (HASHIBE et al., 2009). Assim, o uso do tabaco independente pode ser responsável por um aumento de duas a três vezes no risco de desenvolvimento deste câncer. Todavia, o risco de câncer de cavidade oral aumenta em mais de 15 vezes quando o uso do tabaco é combinado ao consumo do álcool (DOBROSSY, 2005).

Outros fatores também podem estar associados ao maior risco de desenvolver estes tumores, e dentre eles podemos citar a exposição a agentes carcinogênicos como radiação e compostos químicos presentes nos alimentos. O envelhecimento e o estado de saúde geral do indivíduos também podem influenciar

no risco aumentado para o desenvolvimento desta condição, favorecendo a ocorrência de mutações em genes relacionados ao controle de proliferação e diferenciação celular (HEALY et al., 2014).

1.2.3 Novo Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos

Para o diagnóstico das neoplasias malignas são necessários basicamente os procedimentos de caracterização histopatológica do tumor e a classificação clínica que permite analisar o grau de disseminação da neoplasia maligna. Em dezembro de 2017 a União Internacional Contra o Câncer (UICC) publicou o novo Sistema TNM de Classificação dos Tumores malignos, além dos parâmetros já conhecidos de tamanho do tumor (T), comprometimento linfonodal (N) e metástase à distância (M), foram inseridos outros indicadores de prognóstico. Para os tumores da cavidade oral foram acrescentados na classificação a medida da profundidade de invasão tumoral e a avaliação da presença de extravasamento extranodal. Essa classificação é utilizada internacionalmente e, além de ser determinante para a tomada de decisão terapêutica, também tem importante valor prognóstico. Assim, os avanços no conhecimento de novos biomarcadores em CEO podem trazer contribuição importante para o diagnóstico, possibilitando a estratificação de pacientes para um tratamento mais individualizado e também contribuindo para informações sobre o prognóstico (POLLAERS et al., 2018; RIVERA; VENEGAS, 2014).

1.2.4 TP53

Os avanços no conhecimento dos processos moleculares envolvidos na gênese e progressão do câncer de cabeça e pescoço têm sido importantes para o estabelecimento de novos marcadores moleculares de prognóstico e de estratificação de pacientes, o que auxilia na escolha de terapias um pouco mais individualizadas (RUIZ et al., 2006).

Dentre os candidatos a biomarcadores está o gene TP53, envolvido na

gênese de muitos tumores, incluindo o CCP (ZILFOU; LOWE, 2009). O TP53 é um gene supressor tumoral, localizado no braço curto do cromossomo 17 e responsável por codificar a proteína p53. Esse gene é pertencente a uma pequena família com mais dois membros, TP63 e TP73. A p53 é uma fosfoproteína com 393 aminoácidos, cuja função é transmitir sinais com características antiproliferativas em diversas respostas celulares (JOERGER; FERSHT, 2007; OGDEN et al., 1992; VOUSDEN; LU, 2002).

A proteína p53, em sua forma selvagem, sinaliza o bloqueio do ciclo celular nos pontos de verificação G1 / S e G2 / M, em repostas a danos causados no DNA. Além disso, regula processos intracelulares, como resultado de interações com outras proteínas encontradas dentro da célula, associados à senescência e apoptose. Estes mecanismos são capazes de modular a própria ação de p53, assim como sua ativação biológica, promovendo múltiplas interações para controlar o crescimento das células neoplásicas (LUO et al., 2000; OREN, 2003; SZNARKOWSKA; OLSZEWSKI; ZAWACKA-PANKAU, 2010).

A proteína p53 também está envolvida em outros processos extracelulares, entre eles, a inibição da angiogênese. Em homeostase, quando a célula está em G0, p53 é mantida em níveis baixos; durante o ciclo celular, quando está ativa, o nível de p53 é controlado por inibidor específico, a proteína MDM2 (PEKOVA et al., 2011; SZNARKOWSKA; OLSZEWSKI; ZAWACKA-PANKAU, 2010)

Mutações no gene TP53 associadas à tumorigênese são predominantemente pontuais e resultam em substituições únicas de aminoácidos, levando à inativação proteica. A proteína p53 mutada é frequentemente mais estável que a p53 selvagem e está presente em níveis altos na célula tumoral. Tumores que abrigam mutações em TP53 também mostram perda de heterozigose, eliminando efetivamente o alelo do tipo selvagem. A inativação da função de p53 selvagem e sua substituição pela forma mutante, permitindo alguma vantagem seletiva durante a progressão tumoral (VOUSDEN; LU, 2002). Modificações na estrutura de p53 possibilitam a geração de células com a maior capacidade de proliferação e, portanto, maior chance de transformação maligna (figura 4). Clinicamente, mutações em TP53 estão significativamente associadas a tempo de sobrevida e resistência tumoral à

radioterapia e quimioterapia em pacientes com CEO (MANTOVANI; COLLAVIN; DEL SAL, 2019).

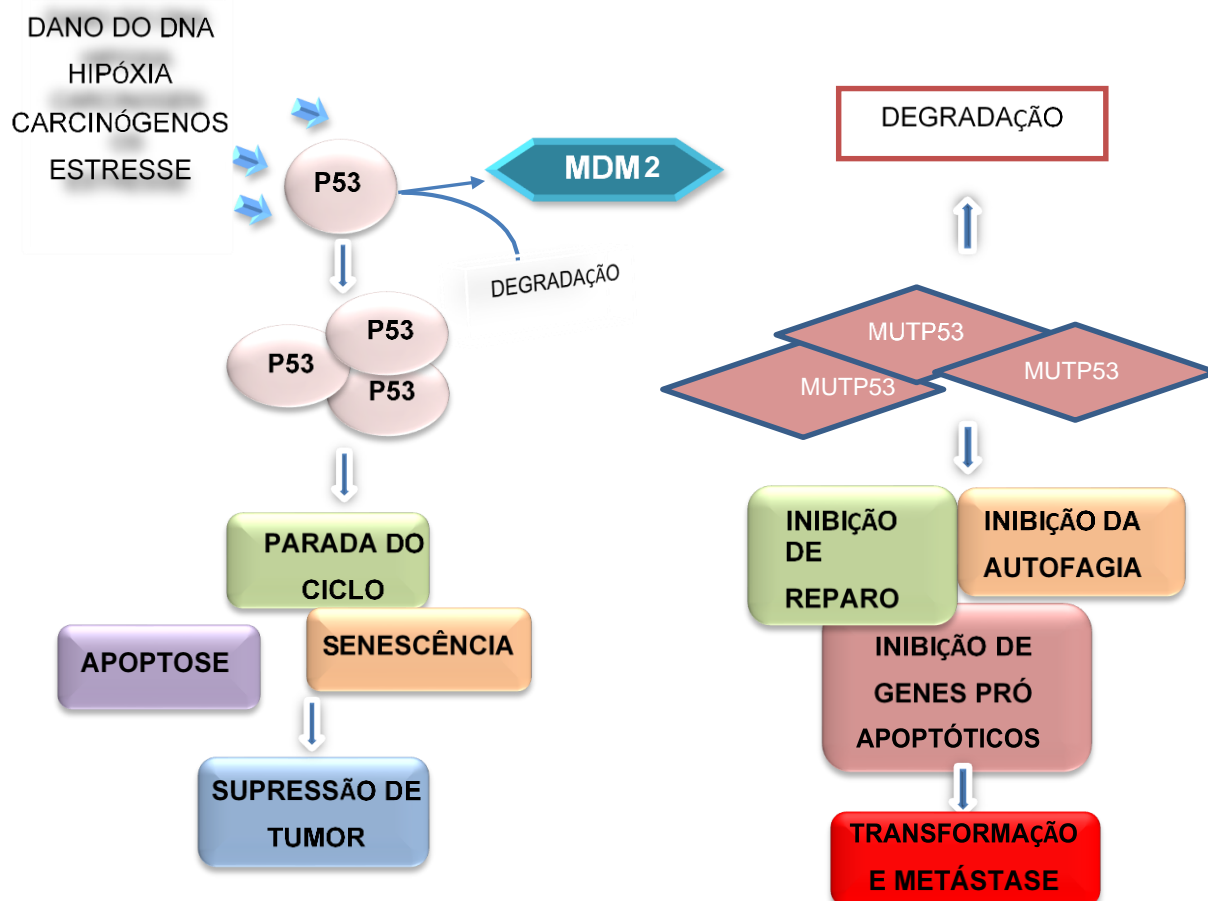


Figura 4. A p53 intervém na resposta a vários sinais de estresse celular, muitos dos quais são encontrados durante o desenvolvimento e a progressão tumoral. Esses sinais induzem a estabilidade de p53, o que leva a um aumento nos níveis intracelulares desta proteína. A forma mutante, através da ligação não cíclica estável, estabiliza-se e impede a degradação proteossomal, estimulando suas propriedades negativas dominantes e facilitando a transformação maligna. Fonte:Próprio autor.

A presença de mutações no gene TP53 de queratinócitos da mucosa oral com alterações pré-cancerosas indicam um risco maior de transformação maligna,

enquanto a alta expressão de p53 mutante no núcleo celular, associa-se a um risco aumentado de progressão da doença. Se detectada nas camadas suprabasais do epitélio de revestimento de lesões pré-cancerosas, esta proteína pode predizer transformação maligna melhor do que quando comparada à avaliação histológica do grau de displasia. Dessa forma, mutações no gene TP53 provavelmente estão implicadas na carcinogênese do CEO, porém sua importância na determinação do prognóstico ainda não está bem esclarecida (ŚWIAŹKOWSKI et al., 2018).

Existe grande conhecimento e utilização atual em mapeamento geográfico e de biomarcadores utilizados em prognóstico de câncer, porém não há estudos que utilizam da técnica de distribuição espacial para o câncer de cabeça e pescoço no estado do Espírito Santo, ou até mesmo de biomarcadores direcionados ao carcinoma epidermóide oral. Este estudo visa obter possíveis relações com intuito de contribuir com ações que direcionam políticas públicas de saúde em estratégias, que contribuam com diagnóstico precoce nas regiões no estado do Espírito Santo, além de somar em pesquisas que comprovem a inclusão de biomarcadores de prognósticos na rotina clínica, a fim de promover terapias individualizadas, propiciando melhor qualidade de vida aos pacientes portadores de carcinoma epidermóide oral.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a taxa de mortalidade do câncer de cabeça e pescoço em seus aspectos epidemiológicos, espacial e temporal no estado do Espírito Santo bem como correlacionar a expressão da proteína p53 e dados clinicopatológicos e histopatológicos em carcinoma epidermoide oral averiguando a sua aplicação como potencial biomarcador de prognóstico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar as taxas padronizadas de mortalidade por CCP nos municípios do estado do Espírito Santo no período de 1998 a 2017;
- Realizar a distribuição espacial dos óbitos por CCP nos municípios e regiões de saúde do estado do Espírito Santo;
- Investigar a expressão da proteína p53 em CEO;
- Correlacionar as características clinicopatológicas e histopatológicas do CEO;
- Averiguar a aplicação da proteína p53 como biomarcador de prognóstico em CEO.

3 METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo foi estruturado em duas partes. A primeira é um estudo ecológico, onde foram analisados dados de agregados populacionais (MEDRONHO, 2008). A segunda parte é uma análise longitudinal prospectiva para identificação de biomarcador de prognóstico.

No estudo ecológico foram utilizados dados secundários obtidos do DATASUS e disponíveis para acesso público. O dados obtidos para o estudo longitudinal foram obtidos do Estudo do Câncer de Cabeça e Pescoço na América do Sul (InterCHANGE), aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde, Vitória – ES (número 318/2011) e pelo National Research Ethics Service (NRES) Committee West Midlands – Coventry & Warwickshire (número 10/H1210/9). Todos os preceitos éticos conforme resolução 466 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde foram respeitados.

3.1.1 Estudo Ecológico

No estudo ecológico foram utilizados dados dos óbitos por câncer de cabeça e pescoço (C00-C14, C32) ocorridos em residentes do estado do Espírito Santo, entre os anos de 1998 e 2017.

3.1.1.1 Fonte dos dados

As informações sobre os óbitos, registrados no Sistema de Informação de Mortalidade (SIM), e os dados populacionais, estimados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estão disponibilizados publicamente e foram extraídos do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) (<http://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude/tabnet>) em 14 de Junho de 2019.

3.1.1.2 Local de estudo

A pesquisa foi desenvolvida no estado do Espírito Santo, localizado na Região Sudeste do Brasil. O Estado tem uma área de 46.074,444 km² de extensão, e é constituído por 78 municípios, com população estimada de 3.972.388 habitantes em 2018. O Espírito Santo está organizado em quatro regionais de saúde: Norte, Central, Metropolitana e Sul (IBGE, 2018). <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/es/panorama>.

3.1.1.3 Análise descritiva, taxas específicas e padronizadas de mortalidade

Foram descritos os números absolutos (N) e relativos (%) dos óbitos. Foram calculadas as taxas padronizadas de mortalidade pelo método direto. As taxas específicas foram feitas por sexo e calculadas pela razão entre o número de óbitos e pela população de risco, multiplicado por 10ⁿ como mostra a fórmula abaixo. A padronização é uma técnica utilizada para comparar as taxas de localidades ou períodos que apresentem estruturas etárias diferentes (GORDIS, 2009). Para a padronização, utilizou-se, como população padrão, a população mundial de Segi revisada por Doll e Smith (SEGI, 1960; DOLL, PAYNE, WATERHOUSE, 1966).

$$\text{Taxa de mortalidade} = \frac{\text{Número de óbitos no período}}{\text{População do período}} \times 100.000$$

Para os cálculos das taxas de mortalidade específicas por sexo e padronizadas, foi utilizado o programa *Microsoft Office Excel 2007*.

As taxas de mortalidade foram calculadas por sexo, segundo faixa etária (40 a 59 anos; 60 anos e mais), Regiões de Saúde (Central, Metropolitana, Norte e Sul), Topografia (Cavidade Oral [C00-06], Orofaringe [C09-10], Hipofaringe [C12-13], Laringe [C32] e Mal definidas [C14]. Também foram calculadas as taxas padronizadas por sexo segundo municípios de residência (78 municípios) e períodos da ocorrência dos óbitos (1998-2007, 2008-2017).

3.1.1.4 Análise de tendência das taxas padronizadas

Para a análise de tendência, a variável dependente foi a taxa de mortalidade e a variável independente foi o ano do óbito. A tendência foi estimada pela variação percentual anual média (AAPC, da sigla em inglês *average annual percent change*). O AAPC é a média dos melhores pontos de ajuste (“joinpoints”). Estes representam os momentos em que a taxa muda significativamente (aumento ou diminuição). No modelo final, cada ponto de junção (se houver) informa uma mudança estatisticamente significativa na tendência (KIM et al., 2000).

A percentagem anual de alterações é testada para determinar se é diferente da hipótese nula que a variação percentual anual é 0%. Assim, o AAPC é uma regressão resultante da média ponderada e foi utilizada para descrever as tendências (KIM et al., 2000). Estas análises foram realizadas no software Jointpoint, versão 4.7.0.0 (Surveillance Research, National Cancer Institute, USA), disponibilizado pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos, com acesso gratuito (<http://surveillance.cancer.gov/joinpoint/>).

3.1.1.5 Distribuição espacial das taxas padronizadas

A análise espacial permite visualização de ocorrências de saúde e/ou ambientais, a partir da confecção de mapas simples. O estudo exploratório por sua

vez, é usado para representar distribuições geográficas, levantando hipóteses entre as variáveis apresentadas (MEDRONHO, 2008).

Para a distribuição espacial foram calculadas as taxas de mortalidade padronizadas dos municípios do estado do Espírito Santo, segundo sexo e período (1998-2007 e 2008-2017). Estes resultados foram distribuídos espacialmente. As malhas digitais, foram adquiridas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em arquivo compatível com o software QGIS 3.6.1., disponível em <https://www.qgis.org/pt_BR/site/forusers/download.html>.

3.1.2 Estudo longitudinal prospectivo para análise de biomarcador de prognóstico

3.1.2.1 Casuística

Os dados e amostras biológicas utilizados neste estudo foram coletados no período de 2010 a 2017 e são provenientes de 95 pacientes de ambos os sexos, com idades entre 32 a 98 anos com diagnóstico confirmado de CEO, atendidos nos Serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço dos Hospitais Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) da Universidade Federal do Espírito Santo e Hospital Santa Rita de Cássia (HSRC) no Brasil, e na University Hospitals Coventry and Warwickshire NHS Trust, localizada no Reino Unido.

Os critérios de inclusão foram casos que possuíam blocos e lâminas com tecido íntegro disponível, com no mínimo 75% de área total ocupada por tumor do tipo histológico carcinoma epidermóide e confirmados por microscopia (CID Morfológico M8070, M8071, M8072, M8076, M8051 e M8083) e CID topográfico correspondente à cavidade oral (C00.3-C00.9; C01-C06), de acordo com a Classificação Internacional de Doenças para Oncologia, 3ª edição (CID-O-3) (Fritz 2000). Foram excluídos os casos que não realizaram seguimento clínico mínimo de 02 anos e, aqueles submetidos a tratamentos progressos.

As informações sobre sexo, idade, hábitos de vida (consumo de álcool e tabaco) foram obtidas por meio de entrevistas estruturadas (ANEXO D,E,F) realizado

pelo estudo INTECHANGE. Os dados clinicopatológicos foram extraídos dos prontuários e durante a consulta clínica e consistiram de sítio anatômico do tumor, estadiamento clínico com as informações sobre tamanho do tumor primário (T), comprometimento linfonodal (N) e metástase à distância (M), de acordo com o sistema de classificação TNM, 8ª edição UICC.

O seguimento dos casos foi realizado pela equipe médica e de pesquisa, por um período no mínimo dois anos e máximo de cinco anos, tendo ocorrido em 4 etapas. O primeiro seguimento foi realizado entre 6 a 18 meses após o primeiro diagnóstico, o segundo seguimento de 6 a 12 meses do primeiro seguimento, e os demais seguimentos em 30 e 60 meses do diagnóstico clínico.

3.1.2.2 Análise histopatológica

Fragmentos de tecidos tumorais provenientes de biópsia para diagnóstico ou ressecção cirúrgica foram fixados em formalina, emblocados em parafina e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE). As lâminas obtidas foram analisadas e classificadas de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (BARNES et al., 2005).

Adicionalmente foram avaliados os critérios histopatológicos de invasão perineural, linfática e sanguínea; padrão de invasão tumoral e infiltrado linfocitário tumoral (TIL), ambos utilizando lâminas coradas em HE. Seguindo os critérios estabelecidos pelo The Royal College of Pathologists (HIRSCHOWITZ et al., 2010), invasão perineural, linfática e vascular foram consideradas presentes quando as células tumorais puderam ser identificadas no espaço perineural, linfático e vascular, respectivamente.

A classificação do padrão de invasão tumoral foi realizada analisando-se a infiltração das células tumorais no tecido circunjacente. A avaliação do fronte de invasão tumoral seguiu os critérios estabelecidos por Bryne et al. (1992), sendo assim categorizadas em: padrão I, compressivo com bordas infiltrantes bem delineadas; padrão II, margens de progressão tumoral infiltrando como cordões sólidos ou faixas;

padrão III, tumor cujas margens infiltrativas contêm grupos pequenos ou cordões de células; e padrão IV, onde o fronte de invasão mostrou marcante dissociação celular em pequenos grupos ou células isoladas.

O TIL foi classificado seguindo os critérios estabelecidos por (MARSH et al., 2011): alto, moderado e baixo. Foi avaliado como alto quando difuso, com presença do infiltrado em mais de 80% do tumor/estroma; moderado, quando desigual, e presente entre 10-80% do tumor/estroma; e baixo, quando fraco ou ausente, presente em menos que 20% do tumor/estroma.

3.1.2.3 Construção do microarranjo tecidual

O Microarranjo tecidual (TMA, Tissue Microarray) foi construído a partir de fragmentos representativos das amostras tumorais embebidas em parafina. Lâminas coradas em HE, digitalizadas na plataforma Pannoramic digital slide scanner (3DHISTECH®, Budapeste, Hungria). Após obtenção das imagens, estas foram analisadas na plataforma de avaliação de imagens *Pannoramic Viewer software* (versão 1.15 3DHISTECH®, Budapeste, Hungria). Áreas correspondentes a tumor, displasia e epitélio adjacente ao tumor foram identificadas e as 3 áreas melhor representativas de cada região e marcada usando a ferramenta *TMA maker* do *Pannoramic Viewer software*.

Após esse processo de avaliação, os blocos doadores, equivalentes às lâminas anteriormente selecionadas, foram digitalizados no equipamento TMA Master II (3DHISTECH®, Budapeste, Hungria), permitindo equiparar as imagens das lâminas selecionadas para confecção do TMA com as imagens obtidas dos blocos. Após alinhamento das imagens, 3 fragmentos de 0,6mm de cada região foram adquiridos dos blocos doadores e inseridos de forma automatizada em espaços pré-definidos em uma matriz construída de um novo bloco vazio, chamado bloco receptor. A técnica foi realizada no The Nottingham Health Science Biobank, localizado no Reino Unido, e validada em estudo posteriores (MONTEIRO et al., 2010; PETERS et al., 2004).

Após construção do bloco receptor, cortes histológicos de 3µm de

espessura foram seccionados em um micrótomo e dispostos em lâmina polarizada (StarFrost® Advanced Polycat, Braunschweig, Alemanha). Essa

3.1.2.4 Imuno-histoquímica

As secções provenientes dos TMA construídos foram preparadas para a técnica de imuno-histoquímica. Primeiramente, foi realizada a desparafinização das amostras e posteriormente efetuou-se a recuperação antigênica com o uso da solução de recuperação antigênica EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (Dako), em uma proporção de 1:50 em água destilada à 97°C por 20 minutos. Após esta etapa, as lâminas contendo os cortes tumorais foram resfriadas em temperatura ambiente e lavadas com EnVision™ FLEX Wash Buffer Dako, durante 5 minutos. Após a desparafinização e rehidratação, deu-se prosseguimento à imunomarcagem, utilizando sistema automatizado para imuno-histoquímica no equipamento Autostainer link 48 (Dako). Os reagentes foram pipetados automaticamente e incubados em Envision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis), por 5 minutos, e posteriormente incubados com o anticorpo primário anti-p53 (DO-7, Ventana) diluição pronta para uso. O reagente aplicado para a revelação da reação de imuno-histoquímica e a contra-coloração com hematoxilina de Harrys (HHS80, 28 Sigma-Aldrich®) foi o EnVision FLEX substrate Working Solution, contendo DAB EnVision FLEX + Chromogen. Concluído o procedimento de coloração, as lâminas foram finalizadas com solução de resina não aquosa (Entelan® - Merck Millipore) e cobertas por lamínulas. Para o controle positivo da reação foram utilizados fragmentos de adenocarcinoma mamário. O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário anti-p53, o qual foi substituído por TBS com Triton.

3.1.2.5 Análise da expressão de p53

Para avaliar a expressão de p53 considerou-se a marcação nuclear em queratinócitos utilizando o método H-score (PICKHARD et al., 2014). Este método consiste em uma análise semi-quantitativa obtida pelo produto da intensidade da coloração com uma escala de 0 a 3 (onde 0 representa ausência de marcação; 1,

representa marcação de fraca intensidade; 2, marcação de intensidade moderada e 3, marcação de intensidade forte), pelo percentual de células marcadas em cada nível de intensidade (0 a 100%). A categorização em alta e baixa expressão da proteína p53 foi determinada com base na mediana obtida pelo cálculo do H-score.

3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística dos dados foi realizada no software estatístico SPSS® v.20 (Chicago, IL, EUA). Os testes de Qui Quadrado, quando aplicável, foi utilizado para avaliar as categóricas clínicopatológicas e histopatológica e a expressão da proteína p53. Para a progressão tumoral foi feito o teste de normalidade das amostras, o teste de Shapiro-Wilk indicou uma distribuição não normal dos dados numéricos e o teste de Friedman foi aplicado. Método de Kaplan-Meier foi utilizado para análise de sobrevida. As análises descritivas dos dados foram expressas em intervalo de confiança (IC). Foi considerado significativa valor de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO ECOLÓGICO

No período de 1998 e 2017, no estado do Espírito Santo foram registrados 4.222 óbitos por câncer de cabeça e pescoço. Destes, 3579 (85%) ocorreram no do sexo masculino. Quanto à faixa etária, a maioria dos óbitos ocorreram em indivíduos de 60 anos e mais, sendo 51,6% em homens e 68,9% em mulheres. A taxa de mortalidade em homens foi de 29,82/100.000 em 1998 e 43,27/100.000 em 2017, com incremento significativo de 2,3% a.a. [ao ano]. Em mulheres, a taxa de mortalidade foi de 5,61/100.000 em 1998 e 5,69/100.000 em 2017. figura 5. Quanto à faixa etária, o aumento foi significativo em homens de 40 a 59 anos (AAPC 2,0% a.a. [ao ano]), e 60 anos e mais (AAPC 1,7% a.a.). Dados detalhados podem ser observados na tabela 1.

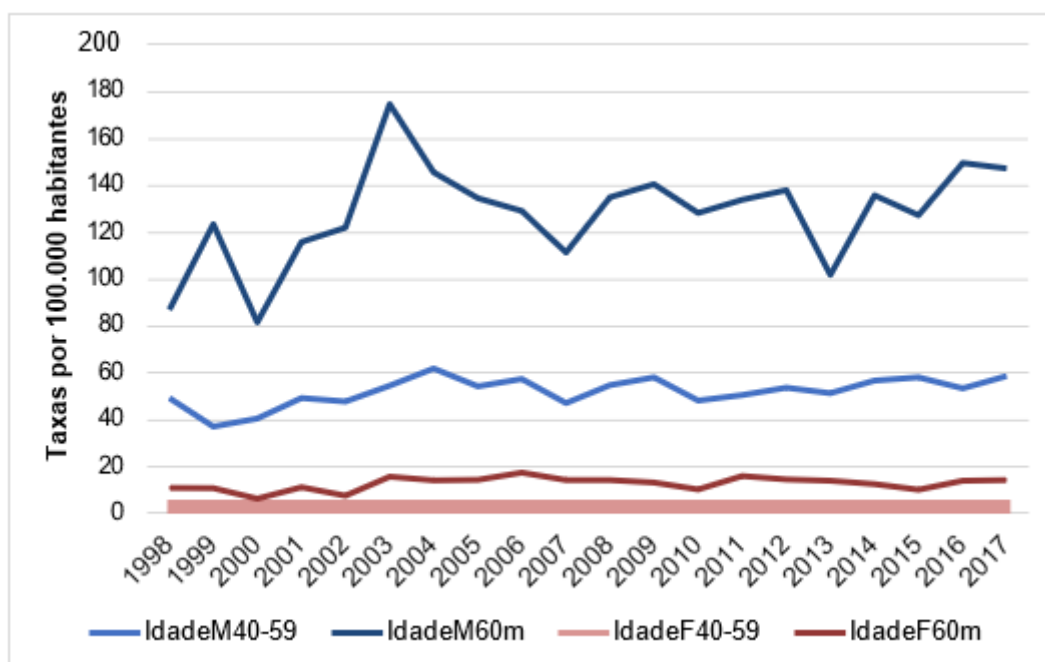


Figura 5. Taxas padronizadas de mortalidade por faixa etária, ambos os sexos, Espírito Santo, período 1998-2017.

Ao analisar as regionais de saúde, observou-se aumento da mortalidade em homens residentes nas quatro regiões apresentadas, com maiores taxas na região Central (AAPC 4,2% a.a.) seguidos da região Norte (AAPC 3,7% a.a.), as menores

taxas foram verificadas no Sul (AAPC 2,3% a.a.) e região Metropolitana (AAPC 1,1% a.a.), representadas na figura 6. Dentre as mulheres houve aumento na região Central (AAPC 6,6% a.a.), conforme tabela 1 e figuras 7.

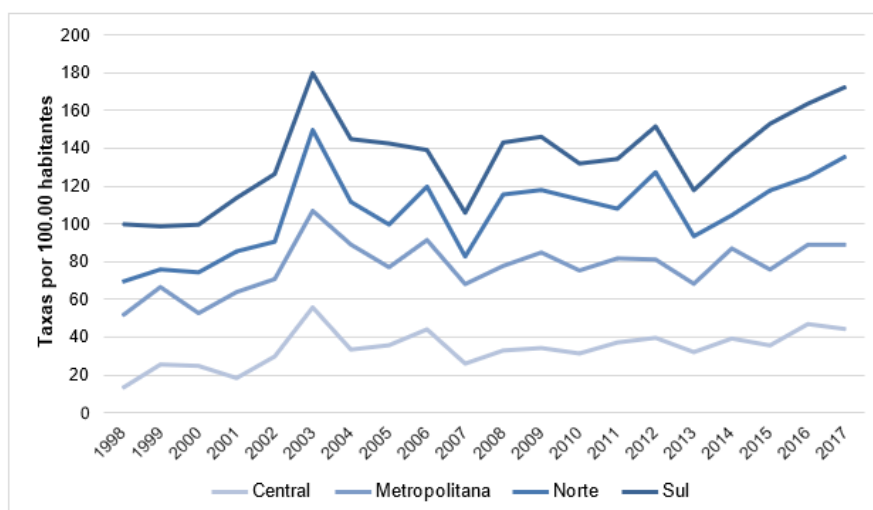


Figura 6. Taxas padronizadas de mortalidade por regional, sexo masculino, Espírito Santo, período 1998-2017.

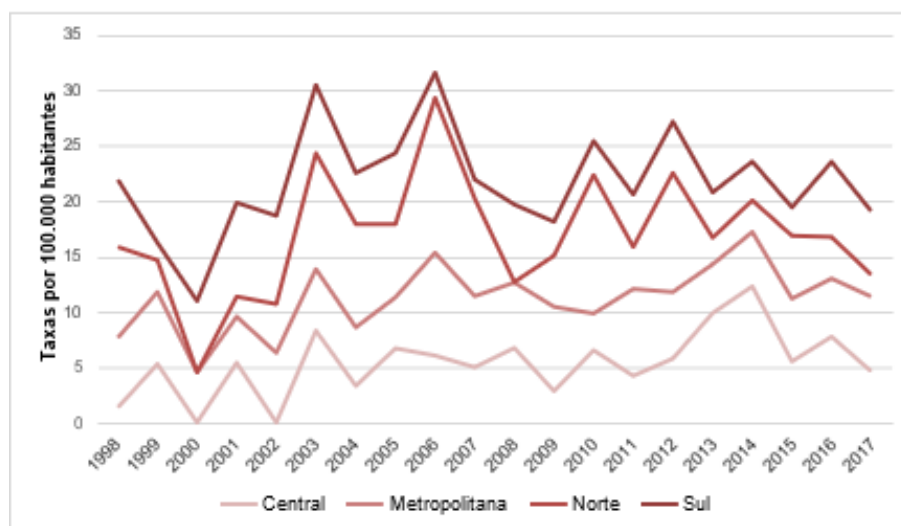


Figura 7. Taxas padronizadas de mortalidade por regional, sexo feminino, Espírito Santo, período 1998-2017.

Em relação as topografias, em homens, a orofaringe (APPC 4,7% a.a.), laringe (APPC 2,6% a.a.) e cavidade oral (APPS 1,1% a.a.) apresentaram tendência de aumento da mortalidade como mostrado na figura 8, em mulheres, este aumento foi significativo para cavidade oral (APPC 2,9% a.a.), representados com detalhes na

figura 9.

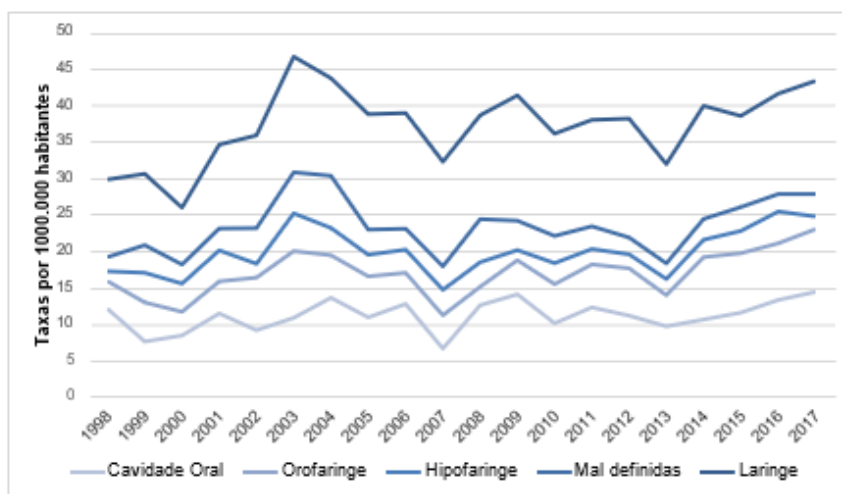


Figura 8. Taxas padronizadas de mortalidade masculina por sítio anatômico, Espírito Santo, período 1998-2017.

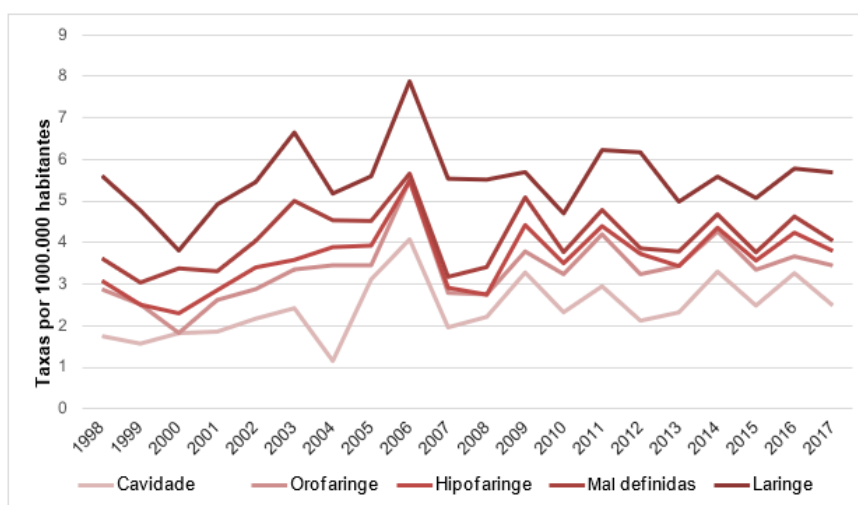


Figura 9. Taxas padronizadas de mortalidade feminina, por sítio anatômico no Espírito Santo, período 1998-2017.

Tabela 1. Tendência das taxas de mortalidade por câncer de cabeça e pescoço no período de 1998 a 2017 no estado do Espírito Santo.

Variáveis	Masculino					Feminino				
	N	(%)	Taxa		Tendência (IC95%)	N	%	Taxa		Tendência (IC95%)
			1998	2017				1998	2017	
Faixa etária										
40 a 59 anos	1733	48,4	48,96	58,24	2,0*(1,1;2,9)	200	31,1	3,19	2,25	-0,6(-1,8;0,6)
60 anos e mais	1846	51,6	41,88	73,80	1,7*(0,1;3,3)	443	68,9	10,56	14,05	*1,0(-2,0;4,1)
Regiões de Saúde										
Central	550	15,4	13,30	44,28	4,2*(1,8;6,6)	107	16,6	1,34	4,63	6,6*(3,8;9,5)
Metropolitana	2134	59,6	37,94	44,54	1,0*(0,0;2,0)	361	56,1	6,28	6,76	0,2(-4,0;4,6)
Norte	320	8,9	17,90	47,37	3,7*(2,1;5,3)	69	10,7	8,22	1,94	4,4(-3,2;12,7)
Sul	574	16	30,90	36,43	2,3*(0,1;4,6)	106	16,5	6,04	5,71	-0,5(-5,0;4,1)
Topografia										
Cavidade Oral	1064	29,7	11,94	14,26	1,1*(0,3;2,0)	286	44,5	1,75	2,48	2,9*(1,4;4,4)
Orofaringe	580	16,2	3,90	8,77	4,7*(1,6;7,9)	104	16,2	1,12	0,96	1,7(-11,5;16,9)
Hipofaringe	266	7,4	1,24	1,56	-0,3 (-3,6;3,0)	35	5,4	0,21	0,36	-1,5(-6,9;4,2)
Laringe	342	9,6	10,70	15,46	2,6*(1,8;3,4)	55	8,6	2,00	1,66	-0,1(-2,1;2,0)
Mal definidas	1327	37,1	2,04	3,23	-0,4 (-3,9;3,1)	163	25,3	0,53	0,23	-7,2(-9,4;-5,0)
Total	3579	100	29,82	43,27	2,3*(0,6;4,0)	643	100	5,61	5,69	0,9 (-0,2;2,0)

*AAPC é estatisticamente diferente de 0 (valor de p<0,05).

A maior taxa de mortalidade observada no período de 1998-2007 entre homens foi 28,3 óbitos por 100.000 habitantes no município de Afonso Cláudio e a menor taxa do mesmo período foi em Brejetuba com 2,62 óbitos por 100.000 habitantes, ambas situadas na região Metropolitana. Em relação ao período que compreende 2008-2017, verificou-se maior taxa em Afonso cláudio (30 óbitos por 100.000 habitantes), localizada da região Metropolitana de saúde e a menor taxa foi no município de Irupí com 1,5 óbitos por habitantes, situada na região Sul do estado. No geral, municípios localizados na região Central apresentaram as maiores taxas nos períodos analisados (Figura 10).

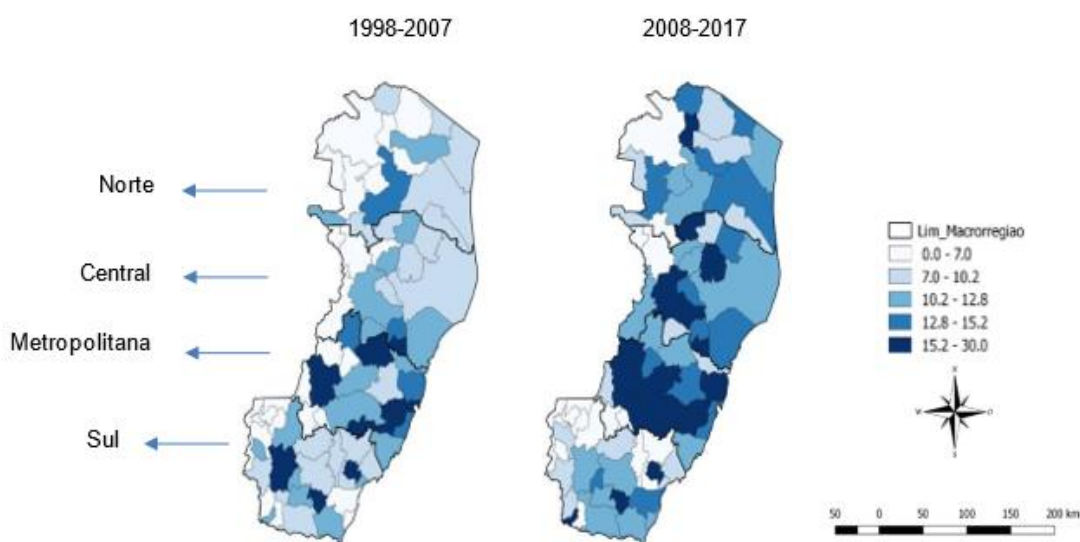


Figura 10. Distribuição de taxas padronizadas de mortalidade do sexo masculino, por 100 mil habitantes, por câncer de CCP no estado Espírito Santo.

Em relação ao sexo feminino, foi representada as maiores taxas nos municípios de Guaçuí com 0,51 óbitos por 100.000 habitantes, e a maior taxa em Alegre com 5,7 óbitos por 100.000 habitantes no período de 1998-200, ambos municípios situados na região Sul de saúde. Dentre o período de 2008-2017 foi observado menor taxa no município de Barra de São Francisco, com 0,2 óbitos por 100.000 habitantes e com maior taxa em Boa Esperança com 6,3 óbitos por 100.000 habitantes, ambos municípios localizados na região Norte de saúde do estado. Além disso, no geral, não houve uma concentração das taxas de mortalidade em uma determinada região de saúde (Figura 11).

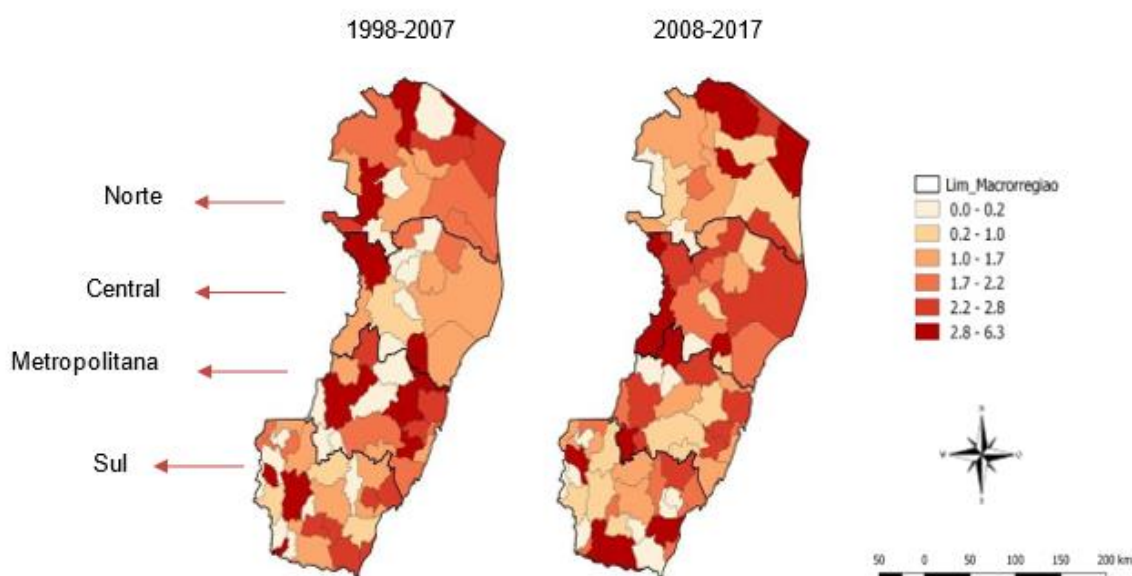


Figura 11. Distribuição de taxas padronizadas de mortalidade do sexo feminino, por 100 mil habitantes, por câncer de CCP no estado do Espírito Santo.

4.2 ANÁLISE DE p53 COMO BIOMARCADOR DE PROGNÓSTICO EM CEO

Dos 95 casos de CEO selecionados para análise da expressão da proteína p53, houve predomínio de indivíduos do sexo masculino (77,9%) com idade média de 60,1 anos (Mínimo: 32 anos; Máximo: 98 anos), sendo que 52,6% da população tinha menos de 60 anos de idade. Não houve significância estatística entre a expressão da proteína p53 e as variáveis gênero e idade (tabela 2).

Em relação aos hábitos de vida, dos indivíduos que relataram ter hábito de fumar e consumir bebidas alcólicas, 83,7% e 88,7%, respectivamente, eram homens. Dos pacientes entrevistados, 53,7% mencionaram fazer uso de bebidas alcólicas e fumarem simultaneamente.

Dentre as amostras analisadas em nosso estudo, a língua foi o sítio anatômico mais acometido (73,7%), seguido do assoalho bucal (9,5%). Quanto ao estadiamento clínico utilizando o sistema TNM, observou-se predomínio dos tamanhos T1/T2 (55,3%). Comprometimento linfonodal foi observado em 49,5% dos casos. Portanto, em nosso estudo houve predomínio de doença avançada (61,4%) com estádios III e IV. Não foi observada diferença significativa entre as variáveis sítio anatômico, tamanho do tumor, metástase linfonodal e estadiamento clínico quanto

associadas com a expressão da proteína p53 (Tabela 2).

Tabela 2. Associação entre as características clinicopatológicas e a expressão de p53 em carcinoma epidermoide.

Variáveis	Expressão de p53				p
	Baixa		Alta		
	n	%	N	%	
Gênero					
Masculino	41	43,1	33	34,7	0,217
Feminino	8	8,4	13	13,6	
Idade (anos)					
≤ 60 anos	25	26,3	25	26,3	0,838
> 60 anos	24	25,2	21	22,1	
Tabagismo					
Sim	21	28,7	22	30,1	1,000
Não	14	19,1	16	21,9	
Etilismo					
Sim	21	33,3	23	36,5	1,000
Não	9	14,2	10	15,8	
Tabagismo+Etilismo					
Sim	18	26,8	18	26,8	1,000
Não	15	22,3	16	23,8	
Sítio Anatômico					
Língua	37	38,9	33	34,7	0,344
Assoalho Bucal	6	6,3	3	3,1	
outros	6	6,3	10	10,5	

*Teste Qui Quadrado, $p \leq 0,05$. Dados perdidos: Tabagista -n=22; Etilista-n=22; Tabagista + etilista-n=28.

Os resultados da associação entre as variáveis histopatológicas estudadas e a expressão da proteína p53 estão descritos na tabela 3. Apesar de não termos encontrado associação entre o TIL e a expressão de p53 (tabela 3).

Tabela 3. Associação entre as características histopatológicas e a expressão de p53 em CEO.

Variáveis	Expressão de p53				p
	Baixa		Alta		
	N	%	N	%	
Tamanho do tumor					
T1/2	26	27,6	26	27,6	0,682
T3/4	23	24,4	19	20,2	
Metástase Linfonodal					
N0	18	20,9	21	24,4	0,665
N+	25	29	22	25,5	
Estadiamento clínico					
I/II	18	20,4	16	18,1	1,00
III/IV	28	31,8	26	29,5	
Invasão Perineural					
Sim	14	25,9	13	24	0,760
Não	10	18,5	17	31,4	
Invasão Linfovascular					
Sim	39	43,8	40	44,9	0,739
Não	6	6,7	4	4,4	
Padrão de invasão					
I/II	6	6,45	14	15	0,046*
III/IV	41	44	32	34,4	
TIL					
Baixa	9	9,6	14	15	0,208
Moderada	30	32,2	21	22,5	
Alta	8	8,6	11	11,8	

*Teste Qui Quadrado, $p \leq 0,05$. Dados perdidos: Tamanho do tumor-n=1; metástase linfonodal -n=9; estadiamento -n=7 Invasão perineural-n=41; Invasão linfovascular-n=3; Padrão de invasão-n=2; TIL-n=2.

Quantidade alta (20,4%) e moderada (54,8%) foi observado nas amostras analisada e está ilustrado na Figura 12.

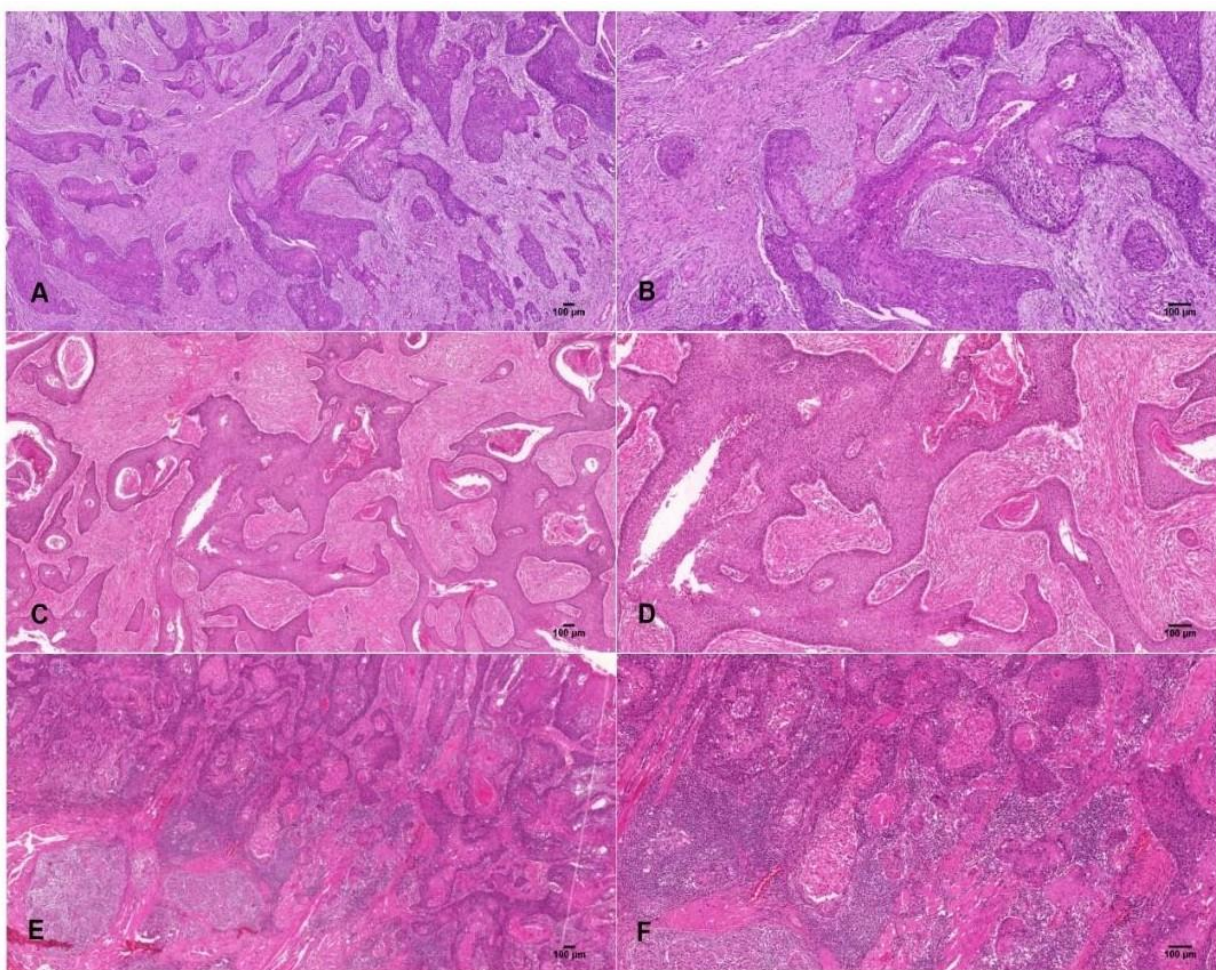


Figura 12. Fotomicrografia ilustrativa do padrão do infiltrado linfocitário tumoral em CEO. Baixo infiltrado linfocitário (A, B); Moderado infiltrado linfocitário (C,D); Alto infiltrado linfocitário (E,F). Coloração HE. Escala=100µ.

O padrão de invasão tumoral mais encontrado na população estudada foi o padrão III (39,8%), o qual caracteriza-se pelo predomínio de cordões de células infiltrantes, seguido do tipo IV, com 38,7%, o qual é representado pela disseminação de células isoladas ou pequenas ilhas (tabela 3). O padrão de menor frequência foi o tipo I com 6,5%, com bordas bem delineadas e bandas amplas, e o tipo II ,15,1%, com característica infiltrante com bandas ou fios (Figura 13). Nas análises realizadas foi encontrado significância entre o padrão de invasão III/IV com elevada expressão da proteína p53 ($p=0,046$).

A Figura 13 ilustra os diferentes padrões de invasão tumoral, de acordo com Bryne e colaboradores (BRYNE et al., 1992).

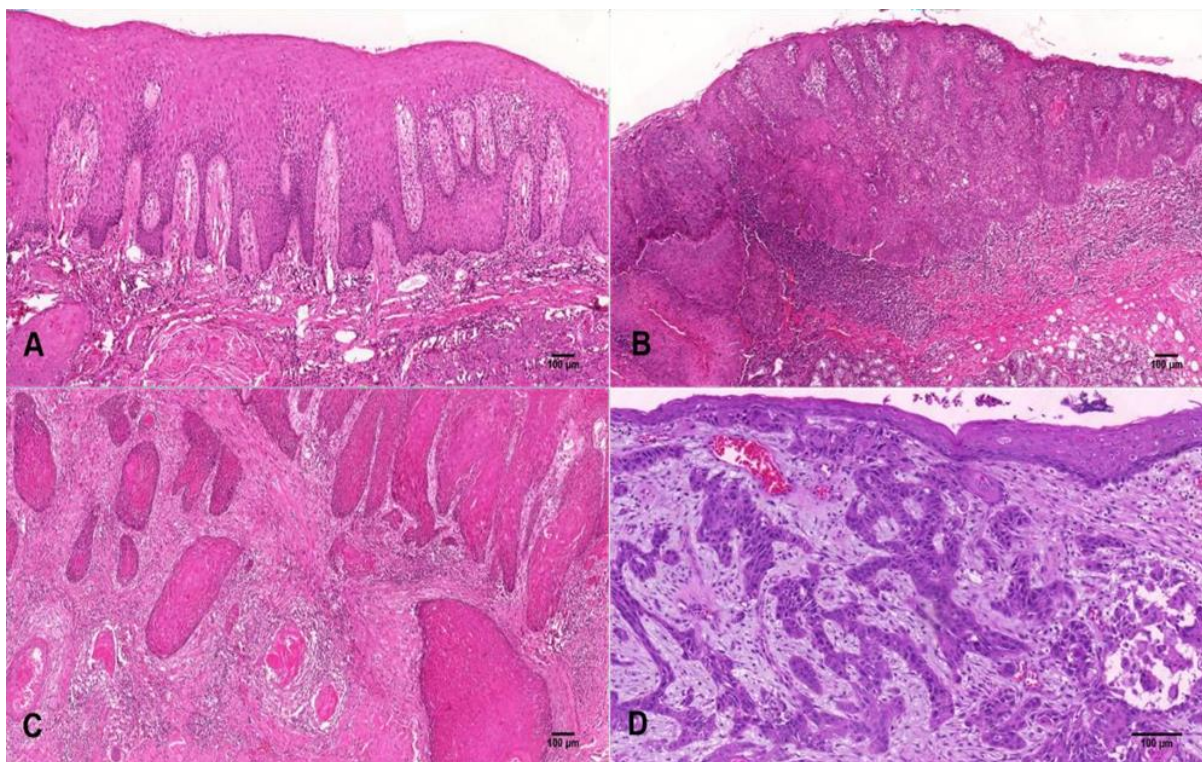


Figura 13. Fotomicrografia de CEO representando o padrão de invasão tumoral conforme proposto por Bryne et al 1992. (A) Padrão de invasão tipo I; (B) Padrão de invasão tipo II; (C) Padrão de invasão tipo III; (D) Padrão de invasão tipo IV. Coloração HE. Escala=100µm.

Foram observadas invasão linfovascular em 88,8% dos casos de CEO analisados, desses 59,6% estavam relacionados aos estádios III e IV.

As invasões perineural (A) linfovascular (B) e por células neoplásicas em CEO estão representadas na Figura 14.

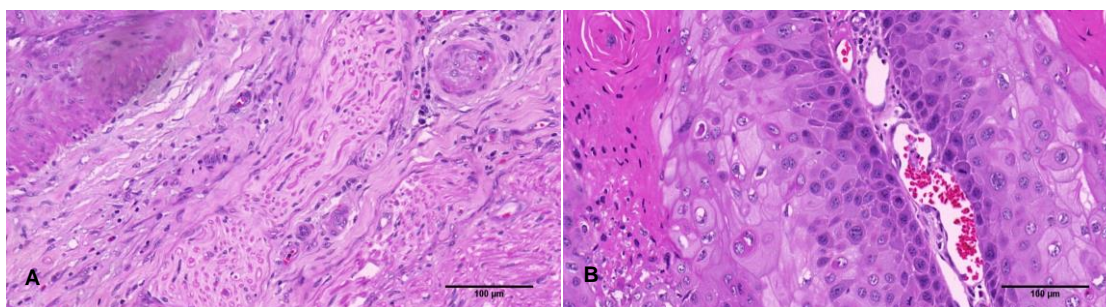


Figura 14. Fotomicrografia de CEO representativa de Invasão perineural (A); Invasão linfovascular (B); Coloração HE. Escala=100µm.

Invasão perineural, estava presente em 61,4% dos tumores analisados, e desses, 52% apresentavam-se nos estádios III e IV. Nosso estudo não mostrou

significância estatística desta variável com a expressão da proteína p53 (Tabela 3).

4.2.1 Análise da expressão da proteína p53 na progressão tumoral

Avaliando a expressão da proteína p53 em fragmentos de tecido provenientes de epitélio adjacente ao tumor, displasia e carcinoma epidermoide, observa-se predomínio da alta expressão da proteína p53, conforme pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4. Expressão de p53 em epitélio adjacente, displasia e tecido tumoral.

Expressão de p53	Epitélio adjacente		Displasia		Tumor	
	n=34	%	n=46	%	n=95	%
Alta	21	61,7	24	52,1	49	51,5
Baixa	13	38,2	22	47,8	46	48,4

No entanto, comparando as diferentes regiões de tecido analisadas, não observamos diferença na expressão de p53 entre fragmentos de epitélio adjacente, displasia e tumor, conforme pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Correlação entre a expressão de p53 e progressão tumoral.

	Média	Desvio Padrão	H-Score Mínimo	H-Score Máximo	p
H-Score epitélio adjacente	20,49	17,16	0	5,00	0,779
H-Score displasia	30,68	31,62	0	12,00	
H-Score tumor	53,64	63,06	0	217,00	

**Teste de Friedman, $p \leq 0,05$*

A Figura 15 ilustra o padrão de expressão observado na Tabela 5, com a imunomarcagem de p53 nos segmentos de epitélio adjacente, displasia e tumor.

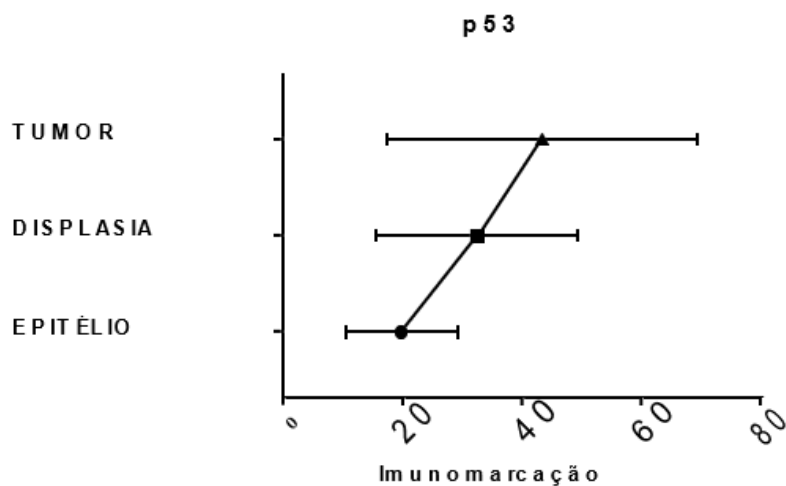


Figura 15. Expressão da proteína p53 nos segmentos de epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor.

O padrão de imunomarcaçã o da proteína p53 é nuclear e pode ser visualizada na Figura 16. Áreas representativas do epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor, bem como controle positivo e negativo podem ser observados nesta imagem.

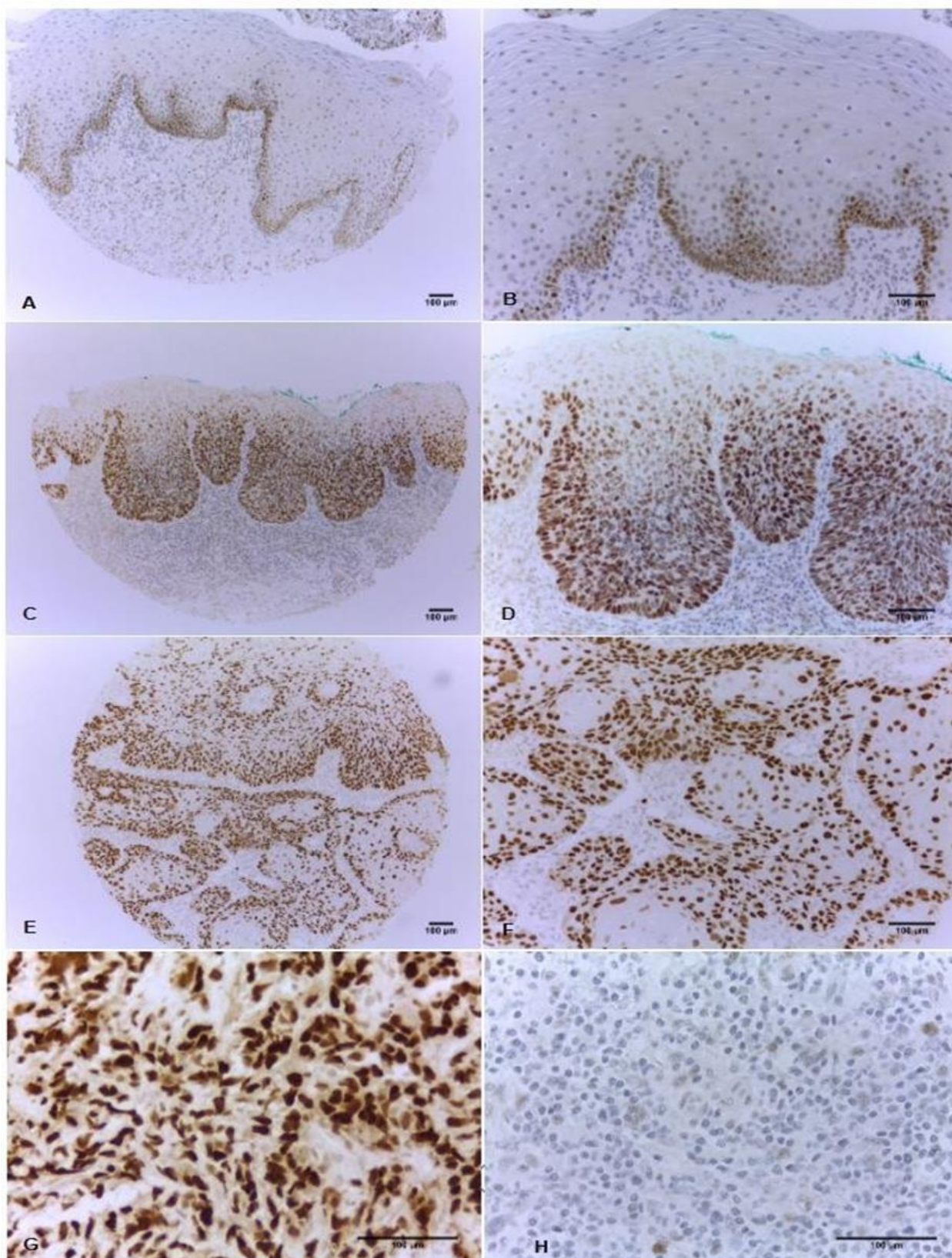


Figura 16. Fotomicrografia da expressão de P53 nos segmentos epitélio adjacente, displasia e CEO. Imunomarcção moderada em epitélio adjacente (A, B); Imunomarcção forte em displasia (C,D); Imunomarcção forte em tecido tumoral (E,F); Controle positivo; adenocarcinoma mamário (G); Controle negativo (H). Escala=100µm.

4.3 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA

Para avaliar a sobrevida global dos indivíduos (SG), foi considerado um período de 60 meses, sendo observado neste intervalo que 47,8% dos pacientes evoluíram a óbito (Figura 17). Nossos resultados reforçam o que a literatura tem mostrado, que apesar dos recentes avanços no diagnóstico e tratamento do câncer da cavidade oral, a taxa de sobrevida em 5 anos tem mantido em torno de 50% nas últimas décadas. Adicionalmente, estudos realizados por Kumar e colaboradores (2016) e Awan e colaboradores (2017) também não observaram correlação entre a sobrevida global e a expressão de p53 (AWAN et al., 2017; KUMAR et al., 2016).

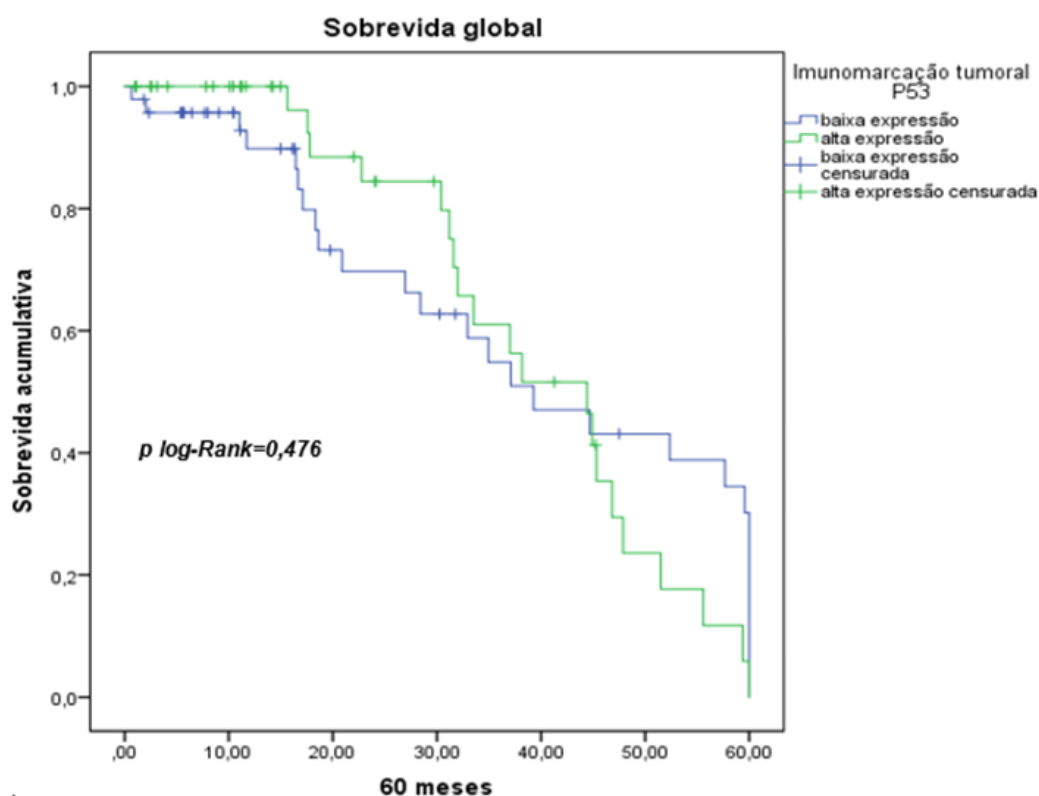


Figura 17. Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank segundo a expressão de p53.

Em relação a sobrevida livre de doença (SLD), 22,6% dos pacientes apresentaram recidivas locais ou regionais. No entanto, não foi observada correlação significativa entre a expressão de p53 e SLD (Figura 18).

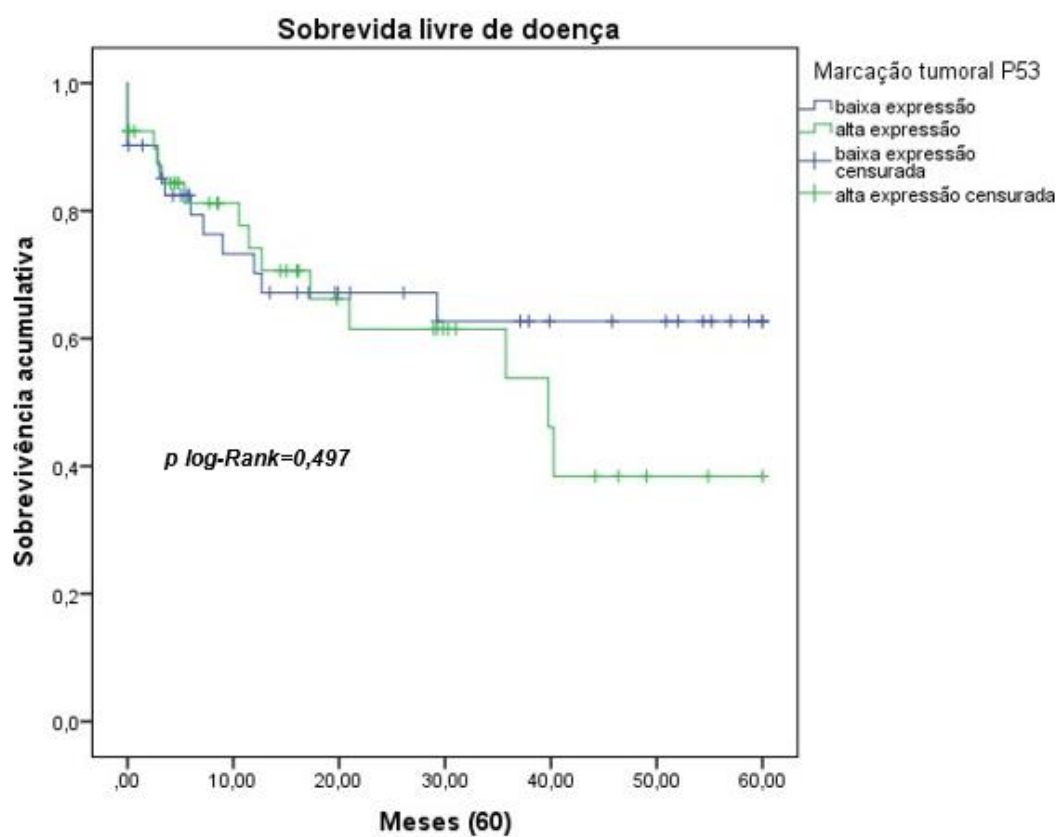


Figura 18. Curva de sobrevida livre de doença pelo método Kaplan-Meier e log-rank segundo a expressão de p53.

5 DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO ECOLÓGICO

A investigação da mortalidade no período de 1998 e 2017 no estado do Espírito Santo registrou 4.222 óbitos por câncer de cabeça e pescoço, a maioria dos óbitos ocorreu em homens com 60 anos e mais, com valores crescentes de 1998 a 2017, corroborando com a literatura que diz que, embora as proporções variem por região geográfica mundial, os homens possuem risco entre duas a cinco vezes maior de CCP do que as mulheres. Adicionalmente, estudos têm mostrado aumento de risco no final da sexta e sétima décadas de vida (RETTIG; D'SOUZA, 2015; SIMARD; TORRE; JEMAL, 2014).

Esses tumores geralmente apresentam perfis diferentes entre indivíduos do sexo masculino e feminino, conforme observado em nossos resultados, entre regiões dentro do mesmo estado, mostrando a existência de acentuada diversidade geográfica, com a persistência de fatores de risco locais e populações em fases diferentes de transição social e econômica (BRAY et al., 2018).

Foi possível observar que no estado Espírito Santo segue o perfil mundial de mortalidade por sexo, como descrito anteriormente por Chaturvedi e colaboradores (2013). Assim, o câncer de cavidade oral e de orofaringe estão entre os tumores mais comuns em todo o mundo, com um número estimado de 400.000 novos casos e 223.000 mortes por ano, sendo a maior parte delas diretamente relacionada com exposição aos fatores de risco tabaco e álcool (CHATURVEDI et al., 2013).

Na investigação das regiões de saúde do estado do Espírito Santo as maiores taxas de mortalidade foram observadas na região Metropolitana, entretanto, o maior aumento da mortalidade no período 1998-2017, foi encontrado nas regiões Central e Norte do estado, sugerindo que a localização geográfica dentro das diferentes regiões do estado, pode ser determinante para a mortalidade, seja pela caracterização como áreas menos desenvolvidas ou até mesmo pela dificuldade de acesso aos serviços de saúde, contribuindo para o diagnóstico tardio da doença

(WÜNSCH, 2004). A distribuição mostra claramente, no sexo masculino, o aumento na taxa de mortalidade nas microrregiões, tanto no período de 1998-2007 quanto 2008-2017 (Figura 10), que podem ser explicados tanto pela redução do nível socioeconômico quanto pela precarização do desenvolvimento cultural, conforme sugerido por Soares e colaboradores (2015), e demora à procura de auxílio (GÓMEZ et al., 2009). Dentre os hábitos de vida, indivíduos tabagistas tendem a procurar mais rápido o serviço de saúde do que indivíduos etilistas, (ROGERS et al., 2007; SCOTT; GRUNFELD; MCGURK, 2005), enquanto as mulheres procuram assistência à saúde mais rápido e com mais frequência, o que pode, em parte explicar, as diferenças nas taxas de mortalidade entre homens e mulheres. No Brasil, o diagnóstico tardio tem sido apontado como o principal motivo da ocorrência de baixas taxas de sobrevivência em indivíduos com CCP (AQUINO et al., 2015).

5.2 ANÁLISE DE p53 COMO BIOMARCADOR DE PROGNÓSTICO EM CEO

Dentre os 95 casos de CEO selecionados para investigação da expressão da proteína p53, os resultados mostraram o predomínio de indivíduos do sexo masculino com idade média de 60,1 anos. Estudos anteriores mostram maior incidência de CEO na população masculina. No continente asiático é o 8º câncer mais frequente, enquanto na Austrália ocupa a nona posição. No Japão a proporção de homem acometidos em relação às mulheres é de 45:1. Nos Estados Unidos, os tumores da cavidade oral e orofaringe correspondem a 3% de todas as doenças malignas que acometem o sexo masculino (GUPTA et al., 2017; VIDYA et al., 2013).

Nas análises dos grupos etários, mesmo que 52,6% dos casos estejam na faixa etária >60 anos, a idade média da população estudada foi de 60,1 anos, estando de acordo com a maior parte dos estudos previamente publicados (LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2001; MALEKI et al., 2015). No entanto, alguns estudos têm mostrado incidência crescente de câncer da cavidade oral e orofaringe em adultos jovens (<45 anos) (CHITAPANARUX et al., 2006 ;MAJCHRZAK et al., 2014). Assim como relatado por Udeabor e colaboradores (2012), indivíduos mais jovens possuem, em geral, menor tempo de exposição aos fatores de risco já bem

estabelecidos para estas neoplasias, como tabaco e álcool e, por esse motivo, é necessário considerar outros fatores etiológicos que justifiquem o aumento na incidência, como por exemplo infecções pelo Papilomavírus humano (HPV) (UDEABOR et al., 2012).

Os resultados desse estudo mostrou que a maioria dos pacientes possuíam hábitos etilistas e tabagistas. Pesquisas realizadas em relação ao hábitos de vida confirmam que o álcool e tabaco são fatores etiológicos importantes para o câncer de cavidade oral. Há relatos na literatura que 90% da população masculina com estes tumores tem o hábito de fumar e consumir bebidas alcólicas. Em mulheres, a exposição a estes fatores de risco é menor, sugerindo a participação de outros fatores de risco como hormônios, deficiência nutricional e HPV (GUPTA et al., 2017; RADOÏ; LUCE, 2013).

De acordo com Brennan e colaboradores (1995) e Zaid e colaboradores (2018) o tabagismo está associado a mutações no gene TP53 em CCP e em lesões pré-malignas. De acordo com Lazarus e colaboradores (1995), a mutação em TP53 pode ser um evento muito precoce no desenvolvimento e progressão dos tumores da cavidade oral. Além disso, demonstrou que lesões pré-malignas obtidas de pacientes não fumantes, não exibem mutações em TP53.

A correlação significativa nas análises histopatológica entre o padrão de invasão III/IV com a alta expressão da proteína p53 sugerem que esta associação pode estar relacionada a maior agressividade tumoral, como também observado por Viveka e colaboradores (VIVEKA et al., 2016). Estudos recentes relacionaram o mutante p53 com ganho de função, ou seja, benefícios adquiridos pelas células neoplásicas. O mutante p53 torna-se estabilizado e ativado em resposta à condições de estresse celular e por esse motivo evidências estão surgindo de que o p53 mutante, pode fornecer às células cancerígenas a capacidade de lidar com condições adversas originadas durante a tumorigênese, incluindo à proliferação celular descontrolada, favorecendo assim a progressão tumoral (MANTOVANI; COLLAVIN; DEL SAL, 2019)

Em relação A expressão de p53 nas células da camada suprabasal do epitélio é considerada um estágio inicial da carcinogênese oral e um indicador do início

do desenvolvimento de um carcinoma epidermoide oral. No entanto, apesar destas evidências, nossos resultados houve significância estatística entre hábitos de fumar e consumir bebidas alcoólicas com a expressão da proteína p53 (BRENNAN et al., 1995; LAZARUS et al., 1995; ZAID et al., 2018).

A avaliação da invasão linfovascular é considerada valiosa, pois sua detecção em secções aleatórias implica estatisticamente um número considerável de células tumorais, que estão entrando no compartimento vascular, aumentando assim, a probabilidade de surgimento de metástases (figura 14). Acredita-se que a invasão preceda a disseminação perineural, onde as células tumorais se espalham ao longo do nervo periférico dentro do espaço perineural, longe do ponto inicial da invasão, denotando agressividade tumoral, o que pode estar relacionado a um pior prognóstico (WARREN et al., 2016; WOOLGAR, 2006).

5.2.1 Análise da expressão da proteína p53 na progressão tumoral

Alterações no gene TP53 são responsáveis pela produção da proteína p53 em sua forma mutada, essas mudanças, podem sugerir pior prognóstico destes tumores. No entanto, Slootweg e colaboradores (1996) mostraram que células neoplásicas malignas poderiam apresentar aumento do potencial proliferativo, sem necessariamente apresentar alterações detectáveis da proteína p53 por imunohistoquímica. Adicionalmente, a alta expressão de p53 nas células da camada suprabasal é considerada preditiva da transformação maligna em displasia severa, todavia a transformação maligna também ocorre na ausência da expressão de p53 nestas mesmas células. Em nosso estudo, apesar de observamos um incremento na expressão de p53 no tumor em relação à displasia e epitélio adjacente, porém, não houve correlação significativa. Dessa forma, nossos resultados sugerem que p53 pode não ser sensível o suficiente para prever quais lesões pré-cancerosas progredirão para o câncer (GONZALEZ et al., 2016; SLOOTWEG, 1996; WARNAKULASURIYA; JOHNSON, 1992; YAN; TZENG; JIN, 1996).

O CEO apresenta elevadas taxas de recorrência local ou regional (RUSSOLO et al., 2002). De acordo com Zaman e colaboradores (2018), a chance de recorrência é de 30% e são principalmente causadas por margens cirúrgicas positivas

onde, após excisão do tumor primário, o tecido circundante pode abrigar clones de células malignas com alterações moleculares semelhantes às do tumor primário. Adicionalmente, Rettig e D'souza (2015) mostraram que fumantes têm um aumento de quatro vezes no risco de um segundo câncer aerodigestivo em comparação com os não fumantes e ex-fumantes levando ao aumento do risco de recorrência ou desenvolvimento de tumores secundários. (HAKEEM et al., 2013; RETTIG; D'SOUZA, 2015; ZAMAN; AQIL; SULAIMAN, 2018).

Assim como Tandon e colaboradores (2010), nossos resultados não nos permitiram associar a expressão de p53 com os indicadores conhecidos de prognóstico, como T, N ou estágio clínico ou mesmo em relação aos sítios anatômicos, visto que não observamos relação estatística. Entretanto, nosso estudo confirma que a língua é o sítio anatômico mais afetado, estando de acordo com diversos estudos que apontam que este sítio contribui com até 42% de todos os sítios orais em adultos de todas as idades (FARHOOD et al., 2019; GARCÍA-KASS; HERRERO-SÁNCHEZ; ESPARZA-GÓMEZ, 2016; TANDON et al., 2013; VIDYA et al., 2013). O estágio clínico mais encontrado em nossa população foi o IV, com baixas chances de cura. De acordo com o estudo de LO et al (2003), as taxas de sobrevida em cinco anos variam de 75%, 65,6%, 49% e 30% para os estágios I, II, III e IV da doença, respectivamente.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou determinar as taxas de mortalidade no estado do Espírito Santo, no período de 1998-2017. Dentre a investigação das taxas de mortalidade no estado do Espírito Santo no sexo masculino, observamos significância nas variáveis faixa etária de 40 a 59 e 60 anos e mais, nas regiões de saúde: Central, Metropolitana, Norte, Sul e nas topografias da cavidade oral, orofaringe e laringe. Em relação ao sexo feminino a região de saúde Central e a topografia cavidade oral mostraram significância no período. As taxas podem estar relacionadas com distinção em aspectos socioeconômicos e sociodemográficos. Com estes dados, será possível traçar estratégias e ações para o combate do câncer de cabeça e pescoço no Estado.

A investigação da expressão da proteína p53 mostrou associação significativa com o padrão de invasão, o que nos faz sugerir que sua participação é mais importante nos estágios iniciais da tumorigênese e não nas etapas de progressão e invasão tumoral em CEO. Porém não foi observada associação com demais aspectos clinopatológicos e histopatológicos e análise de sobrevida avaliadas, mostrando que a proteína p53 e sua aplicação como biomarcador não foi suportada.

REFERÊNCIAS

- AHMEDIN JEMAL, DVM; Freddie Bray; Melissa M. Center; Jacques Ferlay;; FORMAN, Elizabeth Ward; David. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; **Ca Cancer J Clin**, v. 61, n. 1, p. 69–90, 2011.
- ALBERS, Andreas E. et al. Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer+ p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 54, n. 11, p. 1072–1081, 2005.
- ANDRADE, Selma Maffei De. *Epidemiologia e Indicadores de Saúde*. p. 183–210, 1995.
- APPLEBAUM, Katie M. et al. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 23, p. 1801–1810, 2007.
- AQUINO, Rodrigo César Abreu de et al. Aspectos epidemiológicos da mortalidade por câncer de boca: conhecendo os riscos para possibilitar a detecção precoce das alterações na comunicação. **Revista CEFAC**, v. 17, n. 4, p. 1254–1261, 2015.
- AWAN, Muhammad S et al. Correlation of TP53 Overexpression and Clinical Parameters with Five-Year Survival in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. **Cureus**, v. 9, n. 6, 2017.
- BARNES, Leon et al. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. **WHO Classification of Tumour**, n. 9, p. 163–175, 2005.
- BARRETO, Mauricio L. Papel da epidemiologia no desenvolvimento do Sistema Único de Saúde no Brasil: histórico, fundamentos e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. suppl 1, p. 4–17, 2002.
- BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593>>.
- BRENNAN, JOSEPH A. B et al. SQUAMOUS-CELL CARCINOMA OF THE HEAD AND NECK. **THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE**, v. 332, n. 11, p. 712–717, 1995.
- BRYNE, Magne et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **The Journal of Pathology**, v. 166, n. 4, p. 375–381, 1992.
- CARDOSO, Maria de Fátima Aparecida et al. Prevenção e controle das seqüelas bucais em pacientes irradiados por tumores de cabeça e pescoço. **Radiologia Brasileira**, v. 38, n. 2, p. 107–115, 2005.

CHATURVEDI, Anil K. et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 36, p. 4550–4559, 2013.

CHITAPANARUX, Imjai et al. Oral cavity cancers at a young age: Analysis of patient, tumor and treatment characteristics in Chiang Mai University Hospital. **Oral Oncology**, v. 42, n. 1, p. 82–87, 2006.

DOBROSSY, Lajos. Epidemiology of head and neck cancer: Magnitude of the problem. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 24, n. 1, p. 9–17, 2005.

FARHOOD, Zachary et al. Does anatomic subsite influence oral cavity cancer mortality? A SEER database analysis. **Laryngoscope**, v. 129, n. 6, p. 1400–1406, 2019.

GARCÍA-KASS, Ana Isabel; HERRERO-SÁNCHEZ, Alicia; ESPARZA-GÓMEZ, Germán. Oral tongue cancer in public hospitals in Madrid, Spain (1990-2008). **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 21, n. 6, p. e658–e664, 2016.

GÓMEZ, Iria et al. Is diagnostic delay related to advanced-stage oral cancer? A meta-analysis. **European Journal of Oral Sciences**, v. 117, n. 5, p. 541–546, 2009.

GONZALEZ, Juan C.Cuevas et al. P53 and p16 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: A study of 208 cases. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 153–158, 2016.

GOUVEA, Sonia Alves et al. Artigo Original Aspectos clínicos e epidemiológicos do câncer bucal em um hospital oncológico : predomínio de doença localmente avançada. p. 261–265, 2010.

GUERRA, Maximiliano Ribeiro; GALLO, Cláudia Vitória De; MENDONÇA, Gulnar Azevedo E Silva. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227–234, 2005.

GUPTA, Neha et al. Changing Trends in oral cancer – a global scenario. **Nepal Journal of Epidemiology**, v. 6, n. 4, p. 613–619, 2017.

HAKHEEM, Arsheed H. et al. Outcome of per oral wide excision of T1-2 N0 localized squamous cell cancer of the buccal mucosaa-analysis of 156 cases. **Laryngoscope**, v. 123, n. 1, p. 177–180, 2013.

HASHIBE, Mia et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer Epidemiology consortium. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 18, n. 2, p. 541–550, 2009.

HEALY, Claire M. et al. Oral health, dental care and mouthwash associated with upper aerodigestive tract cancer risk in Europe: The ARCAGE study. **Oral Oncology**, v. 50, n. 6, p. 616–625, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.03.001>>.

HIRSCHOWITZ, Lynn et al. Standards and datasets for reporting cancers. **The Royal College of Pathologists**, v. G071, n. April 2011, p. 1–26, 2010.

HOMANN, Nils et al. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: Methodological aspects and pathogenetic implications. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 9, p. 1739–1743, 1997.

INCA. **Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil**. [S.l.: s.n.], 2018.

JOERGER, A. C.; FERSHT, A. R. Structure-function-rescue: The diverse nature of common p53 cancer mutants. **Oncogene**, v. 26, n. 15, p. 2226–2242, 2007.

JOHNSON, Newell; D, Ph. Tobacco Use and Oral Cancer : A Global Perspective. **Journal of Dental Education**, v. 65, n. 4, p. 328–339, 1991. Disponível em: <<http://www.jdentaled.org/content/jde/65/4/328.full.pdf>>.

KUMAR, Malay et al. Oral cancer : Etiology and risk factors : A review. 2016.

LAZARUS, P. et al. of the Oral Cavity From Non-Tobacco Users. **International Union Agarnst Cance**, v. 60, p. 458–463, 1995.

LINDEMANN, A. et al. Targeting the DNA Damage Response in OSCC with TP53 Mutations. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 6, p. 635–644, 2018.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A.A.S. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people - A comprehensive literature review. **Oral Oncology**, v. 37, n. 5, p. 401–418, 2001.

LOTHAIRE, Phillipe et al. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: Promising signs in need of prospective evaluation. **Head and Neck**, v. 28, n. 3, p. 256–269, 2006.

LUO, Jianyuan et al. membrane 16 and physically interacts with the EGFR. v. 408, n. November, p. 377–381, 2000. Disponível em: <www.nature.com>.

MAJCHRZAK, Ewa et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: A review of the literature. **Radiology and Oncology**, v. 48, n. 1, p. 1–10, 2014.

MALEKI, Davood et al. Epidemiology of oral cancer in Iran: A systematic review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 13, p. 5427–5432, 2015.

MANTOVANI, Fiamma; COLLAVIN, Licio; DEL SAL, Giannino. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. **Cell Death and Differentiation**, v. 26, n. 2, p. 199–212, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41418-018-0246-9>>.

MARSH, Daniel et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. **Journal of Pathology**, v. 223, n. 4, p. 470–481, 2011.

MASHBERG, Arthur et al. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral

cavity and oropharynx among U.S. veterans. **Cancer**, v. 72, n. 4, p. 1369–1375, 1993.
MASSANO, João et al. Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 102, n. 1, p. 67–76, 2006.

MONTERO, Pablo H.; PATEL, Snehal G. Cancer of the Oral Cavity. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 24, n. 3, p. 491–508, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2015.03.006>>.

MONTEIRO, Luís Silva et al. Combined cytoplasmic and membranous EGFR and p53 overexpression is a poor prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 41, n. 7, p. 559–567, 2012.

NABULSI, Azmi et al. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at MCMaster UNIVERSITY HEALTH SCI LIB on November 3, 2011. For personal use only. No other uses without permission. Copyright © 1993 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 15, p. 1069–1075, 1993.

NUNES, EMÍLIA. Consumo de tabaco. Efeitos na saúde. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, v. 22, n. 2, p. 225–244, 2006.

OGDEN, Graham R. et al. Assessment of p53 protein expression in normal, benign, and malignant oral mucosa. **The Journal of Pathology**, v. 166, n. 4, p. 389–394, 1992.
OREN, Moshe. Decision making by p53: Life, death and cancer. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, n. 4, p. 431–442, 2003.

PEKOVA, Sona et al. A comprehensive study of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia: Analysis of 1287 diagnostic and 1148 follow-up CLL samples. **Leukemia Research**, v. 35, n. 7, p. 889–898, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2010.12.016>>.

PETERS, S. et al. Tissue-microarrays. Wertigkeit bei immunhistochemischen proliferation sassozierten Reihenuntersuchungen von Kopf-Hals-Karzinomen. **Hno**, v. 52, n. 5, p. 409–412, 2004.

PIRES, Aline Segatto et al. Álcool e Câncer Bucal : Considerações sobre os Mecanismos Relacionados Alcohol and Oral Cancer : Comments on Related Mechanisms. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n. 1, p. 49–56, 2008.

POLLAERS, Katherine et al. AJCC 8th Edition oral cavity squamous cell carcinoma staging – Is it an improvement on the AJCC 7th Edition? **Oral Oncology**, v. 82, n. April, p. 23–28, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.04.018>>.

RADOÏ, Loredana; LUCE, Danièle. A review of risk factors for oral cavity cancer: The importance of a standardized case definition. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 41, n. 2, p. 97–109, 2013.

RAMOS, Francisco Lúzio de Paula et al. As contribuições da epidemiologia social para a pesquisa clínica em doenças infecciosas. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7,

n. esp, p. 221–229, dez. 2016. Disponível em:

<http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232016000500221&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 26 jan. 2020.

RETTIG, Eleni M.; D'SOUZA, Gypsyamber. Epidemiology of Head and Neck Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 24, n. 3, p. 379–396, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2015.03.001>>.

RIVERA, César; VENEGAS, Bernardo. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, v. 8, n. 1, p. 7–11, 2014.

ROCHA, Thiago Augusto Hernandez et al. Oral primary care: An analysis of its impact on the incidence and mortality rates of oral cancer. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2017.

ROGERS, S. N. et al. An assessment of deprivation as a factor in the delays in presentation, diagnosis and treatment in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 43, n. 7, p. 648–655, 2007.

RUSSOLO, Mario et al. Prognostic indicators of occult metastases in oral cancer. **Laryngoscope**, v. 112, n. 3, p. 449–452, 2002.

SCOTT, S. E.; GRUNFELD, E. A.; MCGURK, M. The idiosyncratic relationship between diagnostic delay and stage of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 41, n. 4, p. 396–403, 2005.

SIMARD, Edgar P.; TORRE, Lindsey A.; JEMAL, Ahmedin. International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomical site. **Oral Oncology**, 2014.

SLOOTWEG, P. J. Suppressor protein p53 and its occurrence in oral tumours. **Current topics in pathology. Ergebnisse der Pathologie**, v. 90, p. 179–200, 1996.

SOARES, João Marcos Arantes et al. Why do we treat mouth cancer in advanced stages? **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 25, n. 3, p. 411–415, 2015.

ŚWIĄTKOWSKI, Wojciech et al. Association between clinical stage of oral cancer and expression of immunohistochemical markers. **Polish Journal of Surgery**, v. 89, n. 6, p. 17–22, 2018.

SZMARKOWSKA, Alicja; OLSZEWSKI, Robert; ZAWACKA-PANKAU, Joanna. Farmakologiczna aktywacja supresora nowotworu, natywnego białka p53 jako obiecująca strategia zwalczania nowotworów. **Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej**, v. 64, n. 6126, p. 396–407, 2010.

TANDON, Sankalpa et al. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts A Systematic Review of p53 as a Prognostic Factor of Survival in Squamous Cell Carcinoma of the Four Main Anatomical Subsites of the Head and Neck. 2013.

THOMSON, P. J. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention—proliferation, position, progression and prediction. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 47, n. 9, p. 803–807, 2018.

UDEABOR, Samuel E. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: A 20-year analysis. **Head and Neck Oncology**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2012.

VIDYA, Sree et al. Epidemiology of Oral Cancer in Asia in the Past Decade- An Update (2000-2012). **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, p. 5567–77, 2013.

VIVEKA, Thangaraj Soundara et al. p53 expression helps identify high risk oral tongue pre-malignant lesions and correlates with patterns of invasive tumour front and tumour depth in oral tongue squamous cell carcinoma Cases. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 1, p. 189–195, 2016.

VOUSDEN, Karen H; LU, Xin. LIVE OR LET DIE : THE CELL ' S RESPONSE TO p53. v. 2, n. August, p. 594–604, 2002.

WARNAKULASURIYA, K. A.A.S.; JOHNSON, N. W. Expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 21, n. 9, p. 404–408, 1992.

WARREN, Timothy A. et al. Expression profiling of cutaneous squamous cell carcinoma with perineural invasion implicates the p53 pathway in the process. **Scientific Reports**, v. 6, n. September, p. 1–9, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Globocan Cancer Observatory. **International Agency for Research on Cancer**. 2018. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/>>

WOOLGAR, Julia A. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 42, n. 3, p. 229–239, 2006.

WÜNSCH, Victor. The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 122, n. 5, p. 188–194, 2004.


YAN, Jin-Jou; TZENG, Ching-Cherng; JIN, Ying-Tai. Overexpression of p53 protein in squamous cell carcinoma of buccal mucosa and tongue in Taiwan: an immunohistochemical and clinicopathological study. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 25, n. 2, p. 55–59, 1996.

ZAID, Khaled et al. p53 Overexpression in oral mucosa in relation to Shisha smoking in Syria and Lebanon. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 7, p. 1879–1882, 2018.

ZAMAN, Shakeel Uz; AQIL, Shakil; SULAIMAN, Mohammad Ahsan. Predictors of locoregional recurrence in early stage buccal cancer with pathologically clear surgical margins and negative neck. **Acta Otorrinolaringologica Espanola**, v. 69, n. 4, p. 226–230, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.otorri.2017.09.003>>.

ZILFOU, Jack T; LOWE, Scott W. Tumor suppressive functions of p53. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, p. a001883, 2009.

ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO À SAÚDE



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE
Unimed Vitória

Vitória, 27 de junho de 2011.
Projeto No: **318/2011**
Parecer: **21/2011** Inicial Conclusão

Título: Estudo de Câncer de Cabeça e Pescoço no Brasil
Instituição: Hospital Santa Rita de Cássia
Pesquisador: José Roberto V de Podestá
Grupo e Área Temática Especial: IA

Prezado Pesquisador

Após o recebimento e apreciação do projeto e das respostas as pendências formuladas, seguem as observações deste Comitê:

1. Adequar os objetivos de acordo com hipóteses formuladas em linha com a justificativa do projeto.
Parecer do CEP: pendência atendida

2. Incluir, na metodologia os critérios de seleção (inclusão e exclusão) amostral assim como características outras que sejam pertinentes. Explicitar, ainda na metodologia, o estudo piloto, e sua metodologia.
Parecer do CEP: Pendência atendida. O estudo piloto não foi contemplado na metodologia, mas é citado na página 17.

3. Justificar ausência do cálculo amostral
Parecer do CEP: Pendência atendida. É citado na página 10 (metodologia) que a amostra será de conveniência.

4. Adequar o TCLE à CNS 347/05 de Janeiro 2005 e incluir campos para identificação de quem aplicou o TCLE. É direito inalienável do sujeito de pesquisa saber ou não querer saber sobre seus resultados de exames realizados em sua propriedade biológica, tenha ou não aplicabilidade clínica. Pede-se, portanto, para rever a informação sobre o tema no TCLE.
Parecer do CEP: pendência atendida. TCLE devidamente adequado e, sobe nossa avaliação, dentro dos critérios éticos e alinhados com a resolução 196/1996 e suas complementares.

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CIAS Unimed Vitória
Av. Leitão da Silva, 2311, Bairro Itarané Vitória (ES) CEP: 29047-575 – 27 3335-5348 cep@unimedvx.com.br

Página 1 de 2



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE
Unimed Vitória

5. Corrigir o cronograma

Parecer do CEP: pendência atendida. Cronograma corrigido.

6. Incluir Declarações de Infraestrutura de todas as instituições hospitalares participantes, inclusive a do Hospital que assina a Folha de Rosto.

Parecer do CEP: pendência atendida. Declarações entregues.

7. Informar no dossiê se as amostras biológicas permanecerão identificadas e no país ou se serão exportadas e/ou desvinculadas dos respectivos sujeitos.

Parecer do CEP: pendência atendida

CONCLUSÃO

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa acima citado, foi considerado:

APROVADO

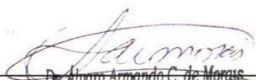
É parecer desse comitê que o referido projeto e demais documentos apresentados, **atende** aos aspectos da Resolução **CNS 196/96** e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Estamos aguardando o parecer final da CONEP.

Foram aprovados os seguintes documentos:

- Projeto de pesquisa versão de 1º de abril de 2011;
- Declaração de infraestrutura versão 27 de abril de 2011;
- Respostas as pendências versão 27 de abril de 2011;

O primeiro relatório de andamento do projeto deverá ser encaminhado a este CEP até o dia 27 de dezembro de 2011.

Atenciosamente,


Dr. Alvaro Armando Cavatini de Moraes
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CIAS



ANEXO B – PARECER DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER N°. 681/2011

Registro CONEP 16525 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – Não há CAAE ou nº de Folha de Rosto **Processo nº** 25000.098091/2011-05
Projeto de Pesquisa: *"Estudo de Câncer de cabeça e pescoço no Brasil"*. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de 10/04/2011.
Pesquisador Responsável: José Carlos de Oliveira
Instituição: ACCG/Instituto Ensino e Pesquisa/Hospital Araújo Jorge (**1º CENTRO BRASILEIRO**)
CEP de origem: CEP - ACCG - Instituto de Ensino e Pesquisa/GO
Área Temática Especial: Genética humana
Patrocinador: Não informado.

Sumário geral do protocolo

O câncer de cabeça e pescoço compreende um grupo de neoplasias que surgem na cavidade oral, faringe e laringe. É o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo, representando cerca de 6% dos casos de câncer. Em todo o mundo, mais de 500.000 novos casos e 300.000 óbitos por câncer de cabeça e pescoço são estimados para ocorrer a cada ano. Este meio milhão de casos inclui 262.700 cânceres da cavidade oral, 117.200 cânceres de faringe e 169.600 cânceres da laringe. As taxas de incidência padronizadas são 15,3 e 4,5 por 100.000 homens e mulheres, respectivamente. As taxas de incidência no Brasil são cerca de 22,1/100.000 e 3,3/100.000 para homens e mulheres, respectivamente.

O tratamento primário varia de acordo com a localização anatômica e estágio da doença. Para a maioria dos tipos de câncer diagnosticados em estádios iniciais, a ressecção cirúrgica é a principal modalidade de tratamento. No entanto, para certos sítios anatômicos, como as amígdalas, a base da língua e o assoalho da boca, bem como para todos os cânceres localmente avançados, radioterapia é usada, isolada ou combinada com cirurgia. A quimioterapia pode ser utilizada em associação com a radioterapia. No entanto, no Brasil, a taxa de sobrevida em 5 anos ainda é inferior a 50%.

Publicações recentes sugerem um papel para infecção por HPV na sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (ver abaixo seção sobre HPV). Os Polimorfismos genéticos nos genes de reparo do DNA, os genes do ciclo celular, o metabolismo carcinogênico, e vias de genes do fator de crescimento foram analisados em relação à progressão e sobrevida de pacientes com câncer de vias aerodigestivas superiores (VADS). Polimorfismos nos genes XRCC1, FGFR e CCND1 foram associados com a sobrevida em pacientes com cânceres das VADS em pelo menos 2 estudos. No entanto, Hopkins *et al* criticou que esses estudos eram pequenos (<300 casos), muitas vezes tinham descrições inadequadas da população em estudo, não consideraram as comparações múltiplas de forma apropriada e podiam estar sujeitos a vies de publicação. Assim, não existem no momento estudos de seguimento de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, que permitam a avaliação simultânea do papel do fumo, álcool, HPV, genética e tratamento

Cont. Parecer CONEP nº. 681/2011

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

OBS: No Brasil, além do centro em tela, está prevista a participação dos seguintes centros: Hospital do Câncer de Barretos/SP (Dr. André Lopes Carvalho/CEP do Hospital Câncer Barretos); Hospital Erasto Gaertner/PR (Dr. Gyl Henrique Albrecht Ramos e Dra. Paola Pedruzzi/CEP do Hospital Erasto Gaertner); Hospital A C Camargo/SP (Dr. Luiz Paulo Kowalski e Dr. Mauro Kasuo Ikeda/CEP do Hospital do Câncer - A C Camargo/SP); Associação de Combate ao Câncer em Goiás/Hospital Araújo Jorge/GO (Dr. José Carlos de Oliveira e Drª. Maria Paula Curado/Comitê de Ética do Hospital Araújo); Departamento de Otorrinolaringologia UFGO Goiania/GO (Dr. Claudinei Cândido Costa/CEP do HC da UFG); Faculdade de Medicina do ABC/SP (Dra. Jossi Ledo Kanda/CEP NÃO INFORMADO); Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer/RN (Dr. Ricardo José Curioso da Silva e Dr. Luis Eduardo Barbalho de Melo /CEP da Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer); Instituto do Câncer do Ceará/CE (Dr. Eric Fernandes de Souza/CEP NÃO INFORMADO); FCECON - Fundação Centro Controle de Oncologia/AM (Dr. Marco Antonio Cruz Rocha e Dr. Jeferson Moreira de Medeiros/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Heliópolis/SP (Dr. Carlos Neutzling Lehn/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Santa Rita/AFECC - Associação Feminina de Educação e Combate ao Câncer/ES (Dr. Jose Roberto Vasconcelos de Podesta/Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS); Pontifícia Universidade Católica de Campinas/SP (Dr. José Francisco de Sales Chagas e Dr. Maria Beatriz Nogueira Pascoal/CEP da PUC Campinas); Hospital Universitário/UnB (Dr. Luiz Augusto Nascimento e Dr. Juliano de Padua Nakashima/Comitê de ética em Pesquisa - Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde); Instituto Nacional do Câncer – INCA/RJ (Dr. Fernando Luiz Dias, Dr. Roberto Araujo Lima e Dra. Isabella Costa Santos/Comitê de Ética e Pesquisa do INCA); Instituto Brasileiro de Controle do Câncer/SP (Dra. Adriana Sonderman, Dr. André Bandiera de Oliveira Santos e Dr. Fabio Roberto Pinto/CEP do BCC - Instituto Brasileiro de Controle do Câncer); Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da USP/SP (Dr. Lenine Garcia Brandão/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Amaral Carvalho FUNDAÇÃO AMARAL CARVALHO/SP (José Getulio Segalla/Comitê de Ética em Pesquisa Fundação Hospital Amaral Carvalho) e Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP/SP (Prof. Dr. Marcos B. Paiva/Comitê de Ética em Pesquisa).

Caso ocorra modificação nessa informação, o CEP do 1º Centro deve ser informado para comunicação à CONEP. O CEP deve enviar cópia dessa comunicação para o pesquisador responsável do seu Centro. Ressalta-se que os centros que não possuem Comitês de Ética em Pesquisa - CEP, devem solicitar a CONEP a indicação de um CEP para a análise do projeto.

NOTA: *Caso na execução do protocolo, em um determinado Centro, haja parceria de instituições no recrutamento e/ou atendimento de sujeitos de pesquisa, solicita-se ao CEP correspondente que observe cuidadosamente os seguintes aspectos, conforme exigências éticas explicitadas nos itens III.3.i, V.5, VI.2.h, VI.2.i, VI.3.d e VI.3.g da Resolução CNS 196/96 e item IV.1.m da Resolução CNS nº 251/97, com vistas à garantia da assistência ao sujeito da pesquisa, sem prejuízo ao Sistema Único de Saúde:*

1) *formas de recrutamento e referência de sujeitos de pesquisa; se serão pacientes do SUS e ou/ particulares; em que instituição estão registrados, ou seja, qual instituição assume as responsabilidades inerentes à "Instituição de Pesquisa";*

2) *descrição da infra-estrutura disponível para a realização da pesquisa;*

3) *vínculos do pesquisador;*

4) *anuência assinada pela diretoria técnica de instituições parceiras, para assistência dos sujeitos de pesquisa, quando for o caso, com apresentação de convênios ou outras relações envolvendo pessoas jurídicas;*

Ressalta-se que, havendo envolvimento do SUS em parcerias com instituições privadas, a avaliação desse aspecto extrapola as atribuições do Sistema CEPs-CONEP, devendo o pesquisador e o responsável pela instituição buscar a manifestação do Poder Público Correlato (estadual ou municipal), por meio da respectiva Assessoria Jurídica, em cumprimento à Lei Orgânica da Saúde 8080/91.

Brasília, 25 de outubro de 2011.

ANEXO C – PARECER DO NATIONAL RESEARCH ETHICS SERVICE



National Research Ethics Service

Coventry Research Ethics Committee

2nd floor West Wing
University Hospital
Clifford Bridge Road
Coventry
CV2 2DX

24 February 2010

Telephone: 024 7696 7529
Facsimile: 024 7696 5033

Professor Hisham Mehanna
Institute of Head & Neck Studies & Education
University Hospital
3rd floor opposite Ward 32
Clifford Bridge Road
Coventry CV2 2DX

Dear Professor Mehanna

Study Title: Improving treatment selection using Predictive Classifiers of Treatment Response for Head and Neck Cancers and dysplasia.
REC reference number: 10/H1210/9
Protocol number: Version 1.0

The Research Ethics Committee reviewed the above application at the meeting held on 16 February 2010. Thank you for attending to discuss the study.

Ethical opinion

You advised the Committee you were aiming to develop treatment response classification to help predict response to treatment for two types of patients; first patients who have laryngeal voice box or mouth and throat cancer; second patients with laryngeal and mouth dysplasia. Through using the formula you would be able to predict whether a patient with cancer with these characteristics would be best receiving surgery rather than chemotherapy similarly whether patients with oral dysplasia would better respond to surgery rather than a 'wait and see' approach thus individualising treatment for those patients. By linking a series of chemotherapy and genetic tests on the samples and responses to treatment in relevant cohort of patients you have target diseases or cancers by correlating biomarkers. This was a well known protocol for developing biomarkers and classifications in UK, i.e. biomarker road map.

According to the pilot study out of 100 patients 80 could not now be traced so the Committee wanted to know how you would know how the patients had progressed if you could not contact 80%. You explained that patients had been treated and biopsied in the local hospital then followed up, some died some didn't and you would follow up the local ones. You would ask the local team for patients' tissue and pseudo anonymised outcome data; i.e. link anonymised you had no way of tracking the code.

The local centres were responsible for consenting patients via the operating consent form so the Committee wondered if there was a possibility of tissue from someone who did not consent being included in the study. You stated that where there was agreement they would be included but before September 2006 patients' samples could be used without their express consent provided they were anonymised. Under

This Research Ethics Committee is an advisory committee to West Midlands Strategic Health Authority

The National Research Ethics Service (NRES) represents the NRES Directorate within the National Patient Safety Agency and Research Ethics Committees in England

ANEXO D- QUESTIONÁRIO INICIAL SOBRE HÁBITOS E ESTILO DE VIDA SERVICE

ID No. BR VIX - |_|_|_|_|_|

ESTUDO INTERNACIONAL SOBRE CÂNCER DE BOCA, FARINGE E LARINGE ANEXO 1A

Questionário Inicial sobre Hábitos e Estilo de Vida

- A1 Status
(1) Caso; (2) Controle
- Prontuário médico No (MV)..... Médico.....
- A3 Hospital
- A4 Entrevistador
- A5 Data da entrevista -----
Dia Mês Ano
- A6 Nome Paciente:
- A7 RG:.....
- A8 Endereço:
- A9 Telefone fixo:..... Telefones adicionais:.....
- A10 Nome da mãe:
- A11 Qual a sua data de nascimento? -----
Dia Mês Ano
- A12 Sexo
(1) Masculino (2) Feminino
- A13 Qual a sua idade?
- A14 Qual a sua raça (cor da pele)?
(1) Branco (2) Negro (3) Pardo ou Mulato (4) Amarelo (Asiático) (5) Indígena
- A15 Em que Município ou distrito você mora?
- A15 Em que Estado você mora?
- A16 Há quantos anos você vive nesse lugar?
(se há menos de um ano, codifique como 00)
- A17 Se você mora nesse lugar há menos de um ano, em que Município você morava antes?
- A19 Qual o seu grau de escolaridade?
(0) Analfabeto
(1) Ensino Fundamental Incompleto
(2) Ensino Fundamental Completo (concluiu a 8ª série)
(3) Ensino Médio Completo (concluiu o 3º colegial)
(4) Ensino Superior Completo
- A20 Você já teve diagnóstico de câncer no passado?
(1) Sim (2) Não
- Se Sim. Qual foi o tipo de câncer (o local principal)?
- Aproximadamente, quando foi diagnosticado o câncer anterior? ----
Mês Ano

ID No. BR VIX - [][][][][][]

HÁBITO DE FUMAR

- B1 Você fuma ou já fumou em média um cigarro/cachimbo regularmente, durante pelo menos 1 ano? [][]
 (1) Sim, ainda (2) Somente no passado (3) Não, nunca [se 'Não, nunca', vá para a questão C]

Se Sim ou somente no passado.

- B2 Normalmente, quantos cigarros/por dia, você fuma ou fumava? [][]
 B3 Idade em que começou a fumar (isto é, fumando na maioria dos dias) [][]

Somente para ex-fumantes

- B4 Idade em que parou de fumar [][]
 B5 Você parou de fumar porque estava doente? [][]
 (1) Sim (2) Não

CONSUMO DE BEBIDAS

- C1 Você ingere ou já ingeriu bebidas alcoólicas regularmente, durante pelo menos 1 ano? [][]
 (1) Sim, ainda (2) Somente no passado (3) Não, nunca [se 'Não, nunca', vá para a questão D]
- C2 Quantas vezes por semana você consome ou consumia bebidas alcoólicas? [][]
 0 - 7 (0 significa nenhuma vez na maioria das semanas)

Para as pessoas que consomem bebidas alcoólicas atualmente ou já consumiram no passado.
 O quanto normalmente você bebe ou costumava beber em uma semana?

Nota: Se o entrevistado responder em um intervalo (exemplo: de 2 a 3 garrafas), usar a maior quantidade (exemplo: 3 garrafas)

- C3 Cachaça ou outros destilados (vodca, uísque, tequila, rum, gim)
 [][][][] doses/semana ou [][] garrafas/semana
- C4 Vinho
 [][][][] taças/semana ou [][] garrafas/semana
- C5 Cerveja
 [][][][] latas/semana ou [][] garrafas/semana
- C6 Há quantos anos parou de beber? [][]
- C7 Você parou de beber porque estava doente? [][]
 (1) Sim (2) Não

ID No. BR VIX - |_|_|_|_|_|

SAÚDE BUCAL

- D1 Com qual frequência você escova seus dentes? |_|_|
 (0) Nunca
 (1) < uma vez por semana (5) 2 vezes/dia
 (2) 1-2 vezes por semana (6) 3 vezes/dia
 (3) Dia sim, dia não (7) > 3 vezes/dia
 (4) Uma vez por dia (8) Edêntulo (não tem dentes)
- D2 Você usa próteses removíveis ("dentadura", "ponte móvel")? |_|_|
 (1) Sim, prótese total (dentadura) (2) Sim, prótese parcial (2) Não
- Se sim:
- D4 Com qual idade você começou a usar próteses removíveis? |_|_|_|
- D5 Nos últimos 20 anos, com qual frequência você foi ao dentista? |_|_|
 (1) Todos os anos (3) A cada 5 anos ou mais
 (2) A cada 2-5 anos (4) Nunca
- D6 Recebeu orientação do Dentista de como tratar a saúde bucal? |_|_|
 (1) Sim (2) Não
- D7* Recebeu tratamento odontológico do SUS ou da Rede Privada? |_|_|
 (1) SUS (2) Privado
- D8* Você percebeu alguma lesão na cavidade bucal? |_|_|
 (1) Sim (2) Não
- Se sim:
- D9 Há quanto tempo percebeu sinais e sintomas? (em meses) |_|_|_|

ANEXO E – FORMULÁRIO DE DADOS CLÍNICOS

ID No. BR VIX - |_|_|_|_|_|

ANEXO 1B (Somente para os casos) FORMULÁRIO DE DADOS CLÍNICOS

Orientações: Somente para Primeira Consulta. Este formulário deverá ser preenchido pelo médico.

B1- Tratamento secundário será preenchido nos formulários de acompanhamento.

B2 - Data do preenchimento

|_|_|_|_|_|-|_|_|_|_|_|-|_|_|_|_|_|
Dia Mês Ano

Nome Paciente: _____

1. Dados de Referência, quando apropriado (DD/MM/AAAA):

- B3 - Biópsia |_|_|_|/|_|_|_|/|_|_|_|_|_|
- B4 - Diagnóstico clínico (consulta na oncologia) |_|_|_|/|_|_|_|/|_|_|_|_|_|
- B5- Diagnóstico patológico (laudo histopatológico) |_|_|_|/|_|_|_|/|_|_|_|_|_|

2. DADOS PATOLÓGICOS

B6- Nome laboratório de Patologia B7 - Laudo nº

B8 - Categoria do tipo histológico:

(1) Carcinoma epidermóide (2) Adenocarcinoma (3) Carcinoma in situ (displasia de alto grau)

(3) Outro (especificar):

B9 - Conclusão do laudo histopatológico (copiar conclusão completa)

.....

3. FORMULÁRIO DE ESTADIAMENTO (classificação TNM, 7ª edição):

B10 - Sítio primário do tumor (topografia), segundo a CID-O3, 2000¹: C|_|_|_|_|_|

B11 – Sítio primário do tumor

(1) Lábio (2) Cavidade oral (3) Orofaringe (4) Hipofaringe (5) Laringe |_|

B12 - Lateralidade do tumor: (1) Esquerda (2) Direita (3) Bilateral |_|

B13 -Tumor multifocal: (1) Sim (2) Não |_|

B14 - Diâmetro máximo, maior ou único do tumor em centímetros: |_|_|_|_|_|

Estadiamento clínico

B15 T |_|_|_|_|_|

B16 N |_|_|_|_|_|

B17 M |_|_|_|_|_| B18 - Se M1, sítio(s) de metástase: |_|_|_|_|_|

B19 Estadio |_|_|_|_|_|

TRATAMENTO PROPOSTO

|_|

(1) Cirurgia (2) Radioterapia (3) Quimioterapia (4) Cirurgia + Radioterapia (5) Cirurgia + Quimioterapia (6) Radioterapia + Quimioterapia (7) Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia

ANEXO F – FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO CLÍNICO

ID No. BR VIX - |__|__|__|__|

ANEXO 4 (somente para os casos) FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO CLÍNICO

ID No. INT-|__|__|__|__|__|__|

Momento de acompanhamento para o resultado:

- (1) 1ª visita de acompanhamento (F1)
- (2) 2ª visita de acompanhamento (F2):
- (3) 30 meses de acompanhamento
- (4) 60 meses de acompanhamento
- (5) Situação médica identificada em outro contexto
(Especificar: :

Formulário preenchido em (DD/MM/AAAA): |__|__|/|__|__|/|__|__|__|__|, por (Nome):

Fonte da informação (marque todas que se aplicam):

- (1) Registro de Mortalidade e câncer
- (2) Declaração de óbito
- (3) Contato com o paciente ou familiares do paciente
- (4) Consulta médica
- (5) Prontuários médicos
- (6) Outros, especificar:

Estado vital:

- (1) Vivo (2) Óbito (3) Perdido seguimento

Se Vivo:

Progressão do tumor:

- (1) Em remissão completa (2) Doença residual (3) Doença Sistêmica (metástase em outro órgão)
- (4) Recidiva (5) Segundo tumor primário CID |_____|

Se recidiva: (1) Local (2) Regional

Data da recidiva _____/_____/_____

Se óbito, causa do óbito:

Causa primária do óbito: código CID-10: |__|__|__|__|

Caso o CID não esteja disponível selecione uma das seguintes opções:

- (1) Câncer de cabeça e pescoço
- (2) Outro câncer
- (3) Toxicidade do tratamento usado para câncer de cabeça e pescoço
- (4) Outros, especificar:
- (5) Desconhecido

Data de óbito _____/_____/_____

Se perdido seguimento:

Última data conhecida por estar vivo (em caso de perdido de seguimento)

____/____/____

Para todos os pacientes, tratamentos adicionais (segunda linha) após o tratamento inicial:

Tratamento (assinale todos que se aplicam)	Data de início (dd/mm/aaaa)	Data de término (dd/mm/aaaa)
(1) Cirurgia		N/A
(2) Radioterapia		
(3) Quimioterapia		
(4) Cirurgia + Radioterapia		
(5) Cirurgia + Quimioterapia		
(6) Radioterapia + Quimioterapia		
(7) Cirurgia + Quimioterapia + Radioterapia		

Informações/comentários adicionais:

--