

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Influência dos polimorfismos genéticos relacionados
à invasão e metástase, inflamação e reparo de DNA
no prognóstico do carcinoma epidermóide de laringe**

Rossana Verónica Mendoza López

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde Pública para
obtenção do título de Mestre em Saúde
Pública.**

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Victor Wunsch Filho

**São Paulo
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MENDOZA-LÓPEZ RV

**Influência dos polimorfismos genéticos relacionados
à invasão e metástase, inflamação e reparo de DNA
no prognóstico do carcinoma epidermóide de laringe**

**MESTRADO
FSP-USP
2007**

Influência dos polimorfismos genéticos relacionados à invasão e metástase, inflamação e reparo de DNA no prognóstico do carcinoma epidermóide de laringe

Rossana Verónica Mendoza López

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Victor Wunsch Filho

**São Paulo
2007**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

Aos dois anjinhos da minha vida: Fabián e Gabriel

Agradecimentos

A Deus, pela maravilha da vida...

Ao Prof. Dr. Victor Wunsch Filho, pela valiosa orientação durante este período de aprendizado no mestrado, pela amizade e pela motivação para continuar o trabalho mesmo com dificuldades, por me permitir a oportunidade de aprender e gostar da Epidemiologia.

Ao Prof. Dr. Jose Eluf Neto e o Prof. Dr. Marcos Brasilino de Carvalho pelas valiosas sugestões e comentários no meu exame de qualificação e no texto submetido à pré-banca.

À FAPESP pelo financiamento do projeto temático “Polimorfismos genéticos e prognóstico de tumores de cabeça e pescoço” do qual deriva o presente trabalho.

Aos professores do departamento de Epidemiologia da FSP, que contribuíram na minha formação e me incentivaram a conhecer mais sobre o mundo da Epidemiologia.

Ao pessoal da Epidemiologia da FSP: Natalia, Rose, Rejane, Dalva e Anderson, pessoas que me brindaram amizade, carinho, e apoio nos momentos que mais precisei.

À Fátima Sueli e Esther pela amizade e carinho que sempre tiveram comigo.

À minha turma da FSP: Maysa, Agda, Sandra, Luana, Paula, Christine e Clovis, pela amizade, as conversas e as partilhas das inquietudes, medos, alegrias e expectativas durante o mestrado.

À Carmen Helena pelo trabalho conjunto de levantamento dos dados e seguimento dos casos em São Paulo, Goiânia e Porto Alegre.

Ao pessoal do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia, em especial à Dra. Maria Paula Curado, e os integrantes da equipe: Carleane, Edésio, Matinair e Elcivone. Ao pessoal dos arquivos médicos dos hospitais participantes pela colaboração com a pesquisa.

À Dalila Zanette do Laboratório de Genética Molecular da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto pelo trabalho de genotipagem dos polimorfismos e a orientação na parte de genética molecular.

Aos meus amigos peruanos Pilar, Carlita, Rita, Nicolas, Nico, Anita, Elvis, Charito, Charlie, Melchor, Justo, Mario, Thony e Roger, que permitiram manter um pedacinho da nossa querida terra no Brasil.

A minha família no Peru: meus pais, minhas irmãs, sobrinhos, tios e primos que sempre me incentivaram para lutar pelos meus sonhos e mesmo longe estão presentes em cada minuto da minha vida. Eles são a minha Grande Família! Muchas gracias, los amo.

*Voici mon secret. Il est très simple: on ne voit
rien qu'avec le cœur. L'essentiel est invisible
pour les yeux.*

Le Petit Prince
Antoine de Saint-Exupéry

Financiamento do projeto de pesquisa
“Polimorfismos genéticos e prognóstico de
tumores de cabeça e pescoço” da Fundação de
Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP) Processo número 05/50832-6



Resumo

Mendoza-López RV. Influência dos polimorfismos genéticos relacionados à invasão e metástase, inflamação e reparo de DNA no prognóstico do carcinoma epidermóide de laringe [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2007.

Introdução: O prognóstico dos carcinomas epidermóides de laringe é limitado e a taxa de sobrevida em cinco anos é menor que 70%. A relação de características clínicas e epidemiológicas tem sido investigada na sobrevida de pacientes com tumores de laringe, mas pouco se conhece sobre o efeito dos polimorfismos genéticos no prognóstico da doença. **Objetivo:** Estudar o papel dos polimorfismos genéticos de genes relacionados aos processos de invasão e metástase (MMP1 e MMP3), de inflamação (Interleucina 2, Interleucina 6, LTA) e reparo de DNA (XRCC1) no prognóstico do carcinoma epidermóide de laringe. **Material e métodos:** Coorte com 170 pacientes com carcinoma epidermóide de laringe, confirmados por exame anátomo-patológico. Os casos tiveram origem em estudo caso-controle conduzido em cinco hospitais de São Paulo, um hospital em Porto Alegre e outro em Goiânia. As informações sobre o status vital dos pacientes foram levantadas dos prontuários médicos e dos bancos de óbitos municipais e estaduais. A extração do DNA das amostras de sangue dos pacientes foi realizada pelo Instituto de Medicina Tropical da USP e a genotipagem dos polimorfismos genéticos pela Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina da USP. **Resultados:** Os polimorfismos genéticos estudados (MMP1 1607, MMP1 -519, MMP3 -1171, IL2 -384, IL2 114, IL6 -174, LTA 252 e XRCC1) não apresentaram efeitos com significância estatística na sobrevida global ou específica pela doença quando analisados isoladamente. Para a sobrevida global, o consumo excessivo de álcool, em g/L/dia, reduziu a sobrevida dos pacientes (80-119 g/L/dia: *hazard ratio* (HR)=4,0 intervalos com 95% de confiança (IC95%)=1,10-14,53; ≥ 120 g/L/dia: HR=5,6 IC95%=1,71-18,24). No modelo de Cox múltiplo, quando ajustados pelo polimorfismo genético MMP3 -1171, a sobrevida piorou para esses pacientes (80-119 g/L/dia: HR=4,9 IC95%=1,07-22,91; ≥ 120 g/L/dia: HR=6,3 IC95%=1,49-26,84). Para a sobrevida específica pela doença, o estadiamento clínico IV reduziu a sobrevida dos pacientes (HR=3,5 IC95%=1,67-7,28). No modelo de Cox múltiplo, com ajuste pelos polimorfismos genéticos IL6 -174 e MMP1 1607, a sobrevida específica pela doença piorou para esses pacientes (HR=4,7 IC95%=1,38-16,25). **Conclusões:** Na coorte examinada, somente três dos oito polimorfismos genéticos estudados relacionaram-se com a sobrevida global e específica pela doença, porém, apenas alterando o efeito dos valores dos HR brutos dos fatores consumo de álcool e estadiamento clínico, respectivamente na sobrevida global e sobrevida específica pela doença. Isoladamente, nenhum polimorfismo genético estudado interferiu na sobrevida dos pacientes com câncer de laringe.

Descritores: Tumores de laringe. Polimorfismos genéticos. Análise de sobrevida. Estudo de coorte.

Abstract

Mendoza-López RV. Influence of genetic polymorphisms related with invasion and metastasis, inflammation and repair of DNA and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. [Master degree thesis]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2007.

Introduction: The prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma is limited and survival rate is lower than 70%. The relationships between clinical and epidemiological characteristics have been fully investigated on the survival of patients with laryngeal tumors, but the effect of genetics polymorphisms on squamous cell carcinoma of larynx is not well-known. **Objective:** To study the role of genetic polymorphisms of genes related to the processes of invasion and metastasis (MMP1 and MMP3), inflammation (Interleukin 2, Interleukin 6, and LTA) and repair of DNA (XRCC1) in the prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. **Material and methods:** Cohort with 170 laryngeal squamous cell carcinoma patients with histological confirmation. The cases have their origin in a case-control study carried out in hospitals of Sao Paulo, Porto Alegre and Goiania. The information about vital status of patients had been raised from medical records. The extraction of DNA was carried out by Institute of Tropical Medicine of USP and genotyping was carried out by the Center of Cellular Therapy of the Hemocentro of Ribeirao Preto of Medical School of USP. **Results:** The studied genetic polymorphisms (MMP1 1607, MMP1 -519, MMP3 -1171, IL2 -384, IL2 114, IL6 -174, LTA 252 and XRCC1), separately analyzed, did not have any statistical significant effect on the overall and cause-specific survival. High levels of alcohol consumption (g/L/day) reduced the overall survival (80-119 g/L/day: hazard ratio (HR)=4.0 intervals with 95% of confidence (95%CI)=1.10-14.53; ≥ 120 g/L/day: HR=5.6 95%CI=1.71-18.24). Multiple Cox model revealed, when adjusted for MMP3 -1171 genetic polymorphism, lower survival for those patients (80-119 g/L/day: HR=4.9 95%CI=1.07-22.91; ≥ 120 g/L/day: HR=6.3 95%CI=1.49-26.84). The clinical staging (CS) IV was a factor for low cause-specific survival (CS IV: HR=3.5 95%CI 1.67-7.28). In the multiple Cox model, adjusted for genetic polymorphism IL6 -174 and MMP1 1607, the survival of those patients dropped (HR=4.7 95%CI=1.38-16.25). **Conclusions:** In this cohort, only three of eight genetic polymorphisms studied were showed to be related with overall and cause-specific survival, however only modifying the effect of unadjusted HR of alcohol consumption and tumor clinical staging in the overall and cause-specific survival respectively. None of the studied genetic polymorphisms, when analyzed separately, affected the survival of laryngeal cancer patients.

Descriptors: Larynx cancer. Genetic polymorphisms. Survival analysis. Cohort study.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	18
	1.1 CÂNCER DE LARINGE E FATORES DE RISCO	19
	1.2 CÂNCER DE LARINGE E FATORES PROGNÓSTICOS	20
	1.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E CÂNCER	21
	1.3.1 Polimorfismos de Genes Co-responsáveis por Invasão e Metástase	22
	1.3.2 Polimorfismos de Genes com Ação nos Processos de Inflamação	24
	1.3.3 Polimorfismo Genético de Reparo de DNA	25
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	28
	3.1 OBJETIVO GERAL	28
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
	4.1 RESUMO DO PROJETO MULTICÊNTRICO INTERNACIONAL LATINO-AMERICANO	29
	4.2 DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DO ESTUDO	30
	4.2.1 Banco de Dados do Projeto Multicêntrico Internacional do IARC e Informação do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da USP	31
	4.2.2 Seguimento dos Pacientes da Coorte	32
	4.2.2.1 Revisão dos Prontuários Hospitalares	33
	4.2.2.2 Rastreamento das Declarações de Óbitos	35

4.3 MATERIAL BIOLÓGICO, EXTRAÇÃO DO DNA E ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS	36
4.3.1 Extração do DNA	36
4.3.2 Análise dos Polimorfismos Genéticos pelo <i>Taqman SNP Genotyping Assays</i>	37
4.4 VARIÁVEIS DO ESTUDO	39
4.4.1 Variáveis Explanatórias ou Preditores	39
4.4.2 Variáveis Desfechos	41
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	43
5 RESULTADOS	44
5.1 ANÁLISE DESCRITIVA	44
5.1.1 Características Demográficas	44
5.1.2 Consumo de Tabaco e Álcool	46
5.1.3 Características Clínicas do Tumor no Diagnóstico	47
5.1.4 Seguimento dos Pacientes	48
5.1.5 Polimorfismos Genéticos	50
5.2 ANÁLISE DE SOBREVIDA	54
5.2.1 Sobrevida Global	57
5.2.1.1 Regressão de Cox Univariada	71
5.2.1.2 Regressão de Cox Múltipla	75
5.2.2 Sobrevida Específica pela Doença	76
5.2.2.1 Regressão de Cox Univariada	90
5.2.2.2 Regressão de Cox Múltipla	94
6 DISCUSSÃO	95
7 CONCLUSÕES	98
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

ANEXOS	109
Anexo 1 - Hospitais e instituições participantes nos diferentes centros do Estudo Multicêntrico Latino-americano de Fatores Ambientais, Vírus e Câncer de Cavidade Oral e Laringe	109
Anexo 2 – Questionário aplicado aos pacientes participantes do Estudo Multicêntrico Latino-americano de Fatores Ambientais, Vírus e Câncer de Cavidade Oral e Laringe	112
Anexo 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido do Estudo Multicêntrico Latino-americano de Fatores Ambientais, Vírus e Câncer de Cavidade Oral e Laringe	137
Anexo 4 – Formulário prontuário	140
Anexo 5 – Polimorfismos genéticos selecionados	146
Anexo 6 – <i>Primers</i> do PCR usados para análise dos polimorfismos genéticos	148
Anexo 7 – TNM AJC- UICC, revisão de 1997	150

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 – Exclusões de membros da coorte de acordo com as informações obtidas pela análise do banco de dados, dos questionários e amostras de sangue no IMT	32
Tabela 4.2 – Pacientes elegíveis para o estudo após revisão dos prontuários médicos	33
Tabela 4.3 – Status vital dos pacientes da coorte em 30 de junho de 2005, por centro, de acordo com as informações obtidas dos prontuários médicos	34
Tabela 4.4 – Resultados do rastreamento de pacientes mortos e perdidos de acompanhamento nas bases de Declarações de Óbito municipais e estaduais	36
Tabela 5.1 – Características demográficas dos pacientes com tumores de laringe do estudo	45
Tabela 5.2 – Distribuição dos pacientes com tumores de laringe do estudo por tabagismo e consumo de álcool	46
Tabela 5.3 – Características clínicas dos tumores de laringe no diagnóstico de pacientes da coorte	47
Tabela 5.4 – Tratamento clínico do tumor primário dos pacientes da coorte	48
Tabela 5.5 – Recidivas, metástases e segundo tumor primário: localização e tratamento realizado	49
Tabela 5.6 – Comorbidades presentes nos pacientes da coorte	50
Tabela 5.7 – Polimorfismos de DNA dos genes selecionados e frequências dos genótipos	51
Tabela 5.8 – Haplótipos dos genes das metaloproteinases (MMPs)	52
Tabela 5.9 – Haplótipos dos genes das interleucinas (ILs)	53
Tabela 5.10 – Status vital dos pacientes da coorte em 30 de junho de 2005	54
Tabela 5.11 – Sobrevida global e sobrevida específica pela doença (em dias) após o diagnóstico nos pacientes da coorte	55
Tabela 5.12 – Probabilidade de sobrevida acumulada (sobrevida global e sobrevida específica pela doença) pelo método atuarial dos pacientes da coorte	55
Tabela 5.13 – Modelo de regressão de Cox univariada para a sobrevida global segundo as características demográficas e consumo de tabaco e álcool	72

Tabela 5.14 – Modelo de regressão de Cox univariada para a sobrevida global segundo o estadiamento e tratamento para tumor primário	73
Tabela 5.15 – Modelo de regressão de Cox univariada para a sobrevida global segundo os polimorfismos genéticos	74
Tabela 5.16 – Modelo de regressão de Cox final para a sobrevida global	75
Tabela 5.17 – Modelo de regressão de Cox univariada para a sobrevida específica pela doença segundo as características demográficas e consumo de tabaco e álcool	91
Tabela 5.18 – Modelo de regressão de Cox univariada para a sobrevida específica pela doença segundo estadiamento e tratamento para tumor primário	92
Tabela 5.19 – Modelo de regressão de Cox univariada para a sobrevida específica pela doença segundo os polimorfismos genéticos	93
Tabela 5.20 – Modelo de regressão de Cox final para a sobrevida específica pela doença	94

Lista de figuras

Figura 4.1 – Representação das etapas da genotipagem dos polimorfismos genéticos	38
Figura 5.1 – Probabilidade de sobrevida global dos casos da coorte	56
Figura 5.2 – Probabilidade de sobrevida específica pelo câncer de laringe dos casos da coorte	56
Figura 5.3 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo faixa etária	57
Figura 5.4 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo sexo	58
Figura 5.5 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo anos de escolaridade	59
Figura 5.6 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo hábito de fumar (maços-ano)	60
Figura 5.7 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo consumo de bebida alcoólica (g/L/dia)	61
Figura 5.8 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo estadiamento clínico	62
Figura 5.9 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo tratamento para tumor primário em pacientes que receberam tratamento	63
Figura 5.10 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético MMP1 1607 1G/2G	64
Figura 5.11 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético MMP1 -519 A/G ⁷²	65
Figura 5.12 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético MMP3 -1171 (5A/6A)	66
Figura 5.13 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético IL2 -384	67
Figura 5.14 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético IL2 114	68
Figura 5.15 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético IL6 -174 G>C	69

Figura 5.16 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético LTA 252 A>G (Intron 1)	70
Figura 5.17 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético XRCC1 Arg399Gln	71
Figura 5.18 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo faixa etária	76
Figura 5.19 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo sexo	77
Figura 5.20 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo anos de escolaridade	78
Figura 5.21 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo hábito de fumar (maços-ano)	79
Figura 5.22 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo consumo de bebida alcoólica (g/L/dia)	80
Figura 5.23 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo estadiamento clínico	81
Figura 5.24 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo tratamento para tumor primário em pacientes que receberam tratamento	82
Figura 5.25 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético MMP1 1607 1G/2G	83
Figura 5.26 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético MMP1 -519 A/G ⁷²	84
Figura 5.27 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético MMP3 -1171 (5A/6A)	85
Figura 5.28 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético IL2 -384	86
Figura 5.29 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético IL2 114	87
Figura 5.30 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético IL6 -174 G>C	88

Figura 5.31 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético LTA 252 A>G (Intron 1)	89
Figura 5.32 – Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético XRCC1 Arg399Gln	90

Lista de Siglas utilizadas

CID-10 – Classificação Estatística Internacional de Doenças e problemas relacionados à Saúde, Décima Revisão

CID-O – Classificação Internacional de Doenças para Oncologia

DNA – Deoxyribonucleic Acid

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

HR – Hazard ratio

HPV – Human papilloma virus

IARC – International Agency for Research on Cancer

IC – Intervalo de confiança

IL – Interleucinas

IMT – Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

MMP – Metaloproteinasas

NIS – Núcleo de Informações de Saúde

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Polymerase Chain Reaction

PRO-AIM – Programa de Aprimoramento das Informações de Mortalidade no Município de São Paulo

SEADE – Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

USP – Universidade de São Paulo

1 INTRODUÇÃO

A frequência mundial de câncer de laringe é de 160,000 novos casos por ano, representando aproximadamente 2% de todas as neoplasias malignas no mundo (STEWART e KLEIHUES, 2003). No Brasil, 2% do total de casos novos de câncer são atribuídos ao câncer de laringe, aproximadamente 8,000 casos novos por ano (WÜNSCH FILHO, 2004). O câncer de laringe é responsável por 3,8% das mortes por câncer entre os homens e 0,6% entre as mulheres no Brasil (BRASIL, 2002).

Os tumores de laringe eram raramente diagnosticados até 1860, quando o tenor Garcia utilizou um conjunto de espelhos para observar as suas pregas vocais na hora de cantar (RODRIGUEZ CÉSPEDES, 2000). A laringe é dividida em três regiões anatômicas diferenciadas: supraglote, glote e subglote. A glote está conformada pelas pregas vocais e as comissuras anterior e posterior. Os tumores na região da supraglote têm uma alta tendência a envolver órgãos adjacentes, seja por extensão direta (como a hipofaringe) ou por disseminação aos linfonodos regionais (WÜNSCH FILHO, 2004).

Estudos sobre fatores de risco têm sido desenvolvidos para determinar a etiologia da doença, mas pouco se conhece sobre estudos prognósticos principalmente aqueles relacionados com o papel dos polimorfismos genéticos. A presente pesquisa pretende relacionar o papel dos polimorfismos genéticos e outras variáveis clínicas e epidemiológicas no prognóstico de pacientes com carcinoma epidermóide de laringe.

1.1 Câncer de Laringe e Fatores de Risco

Dois são os fatores de risco mais comuns reconhecidos para os tumores malignos de laringe: consumo de tabaco e álcool (WÜNSCH FILHO 2004; BROWN, 2005; BOFFETA e HASHIBE, 2006; HASHIBE et al., 2007). CATTARUZZA et al. (1996) relacionam como outros fatores de risco a serem considerados a dieta e nutrição, ocupacionais (exposição a asbestos e diesel) e infecção pelo Papilomavírus humano (*Human papilloma virus HPV*).

Tumores de laringe são mais comuns em homens, mas estudos em mulheres têm relacionado o consumo de tabaco e bebida alcoólica como fortemente associados com o câncer de laringe (SAS-KORCZYNSKA et al, 2003).

O papel do HPV nos tumores de laringe ainda não é claro. Alguns estudos que relacionaram pacientes infectados com HPV tipo 16 e carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço estabeleceram a presença desse tipo de HPV como fator de risco (DAHLSTROM et al., 2003; MANJARREZ et al., 2006). No entanto, outros estudos não identificaram associação entre o HPV e os carcinomas de cabeça e pescoço (ALMADORI et al., 1996; SNIJDERS et al., 1996; PINTOS et al., 1999; MORSHED et al., 2005).

1.2 Câncer de Laringe e Fatores Prognósticos

Embora tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas sejam reconhecidos como fatores de risco no câncer de laringe, o papel destes fatores na sobrevida dos pacientes com tumores de laringe não está claro. Estudo de pacientes com carcinoma epidermóide de laringe sugeriu que tabaco e consumo de álcool antes do diagnóstico teriam alguma influência na sobrevida global dos pacientes, enquanto que o consumo de vegetais e vitamina C seriam fatores favoráveis no prognóstico destes pacientes (DIKSHIT et al., 2005). Outros estudos de prognóstico não indicaram o consumo de tabaco e álcool como fatores relacionados à sobrevida dos pacientes com tumores de laringe (LASSALETTA et al., 2001; JOHANSEN et al., 2003; THARIAT et al., 2004).

BOFFETTA et al. (1997) analisaram um grupo de pacientes da região de Turin (Itália) e encontraram que a presença de linfonodos era um forte preditor da piora de sobrevida. Os autores também notaram que baixo nível socioeconômico e a condição de fumante estavam relacionados à piora da sobrevida.

Estudos de seguimento também têm sido inconclusivos sobre o papel do HPV na sobrevida dos pacientes com câncer de laringe. CLAYMAN et al. (1994) encontraram que a presença de HPV estaria relacionada com o pior prognóstico de pacientes com câncer de laringe e hipofaringe. Outro estudo, também revelou piora na sobrevida em pacientes com câncer de laringe na presença de HPV (SZLÁDEK et al., 2005). Outros estudos não encontraram papel significativo do HPV com a sobrevida global dos pacientes (PAZ et al, 1997; PINTOS et al., 1999).

1.3 Polimorfismos Genéticos e Câncer

Polimorfismo é uma condição relacionada à frequência de um gene. Os alelos são denominados polimórficos quando sua frequência na população for acima de 1% (SMITH e EBRAHIM, 2003). Existem várias classificações possíveis dos polimorfismos genéticos. Os mais estudados na sua relação com câncer são aqueles relacionados ao metabolismo celular de substâncias (fases I e II), à reparação de DNA, aos mecanismos do ciclo celular, e aos mecanismos inflamatórios.

São inúmeros os estudos que buscaram relacionar polimorfismos de genes com papel na fase I e II de metabolização de substâncias carcinogênicas com a incidência de diferentes tipos de câncer. Mas, mesmo sobre investigações com resultados estatisticamente significantes, permanecem dúvidas sobre a plausibilidade biológica dos resultados (TUMA, 2004).

Estudos relacionando polimorfismos genéticos e câncer têm aumentando consideravelmente devido à crescente importância de fatores genéticos na etiologia do câncer após o sequenciamento do genoma humano (WÜNSCH FILHO e ZAGO, 2005). Porém, são pouco frequentes na literatura os estudos sobre a relação de polimorfismos genéticos e prognóstico e condições clínicas dos pacientes com câncer, particularmente tumores de laringe, a exemplo das pesquisas de GEISLER et al. (2005) e RODRIGO et al. (2000, 2002).

Resultados com associação positiva entre polimorfismos genéticos e câncer de cabeça e pescoço encontram-se nos estudos de JOURENKOVA-MIRONOVA et al. (1999), e MONTEIRO et al. (2004); resultados de não associação ou frágil associação foram encontrados por YANG et al. (2005) e OLSHAN et al. (2000).

Poucos estudos relacionaram a ocorrência do câncer de laringe com determinados polimorfismos genéticos e os resultados não foram concordantes. Em estudo caso-controle com pacientes com câncer de laringe, não foram observadas diferenças significativas entre a frequência dos heterozigotos GSTM1 A/B e homozigotos GSTM3 B/B entre casos e controles, mas encontrou-se que as frequências do genótipo GSTT1 nulo foram maiores nos casos comparados aos controles (JAHNKE et al., 1996). Na Polônia, outro estudo caso-controle com pacientes de sexo masculino, GAJECKA et al. (2005), notaram que certas combinações dos genótipos CYP1A1*1/*4, CYP2D6*4/*4, NAT2*4/*6A, assim como os alelos CYP1A1*4, CYP2D6*4 e NAT2*4, apresentaram-se em frequências altamente significativas entre os casos, indicando esses genótipos como fatores que aumentam o risco do carcinoma epidermóide de laringe.

GEISLER et al. (2005), avaliaram a capacidade prognóstica dos polimorfismos genéticos da glutathione S-transferase na sobrevivência de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, encontrando que pacientes com genótipo funcional GSTT1 presente têm chance de morrer de 3,4 vezes em relação aos pacientes que apresentam o GSTT1. Não foram encontradas diferenças significativas entre as localizações do tumor (oral, faringe e laringe).

1.3.1 Polimorfismos de Genes Co-responsáveis por Invasão e Metástase

Os polimorfismos genéticos relacionados à invasão tumoral e potencial metastático podem influir na sobrevivência de pacientes com tumores de

laringe, pois estão diretamente vinculados à ocorrência de recidivas locoregionais e metástases. São divididos em subgrupos: metaloproteinases (MMPs), antagonistas das metaloproteinases (TIMPs) e a integrina- β -3. Para o prognóstico dos tumores de cabeça e pescoço, a integrina- β -3 e algumas MMPs são consideradas as mais importantes, pois alteram os mecanismos de transcrição genética e podem também alterar o comportamento migratório das células na matriz extracelular (SAJID et al., 2002).

As MMPs são proteinases que cumprem papel fundamental na degradação da matriz extracelular, essencial para a invasão tecidual das células tumorais. Considera-se que o estroma tumoral não só produz suas próprias MMPs, como também aumenta a utilização das MMPs produzidas pelo tecido normal (THOMAS et al., 1999). A elevação da expressão da MMP1 foi relacionada a comportamento mais agressivo dos tumores epidermóides de cavidade oral e redução na sobrevida (YORIOKA et al., 2002).

A MMP3 é uma estromelisina intensamente produzida por células cancerosas e cuja expressão tem sido correlacionada com tumores maiores, mais espessos e com maior invasão das margens cirúrgicas (THOMAS et al., 1999). A manifestação polimórfica com expressão local tem sido considerada como fator promotor no câncer de mama (GHILARDI et al., 2002).

A MMP12 altera a transcrição genética e geralmente é estudada em conjunto com outras metaloproteases. A ausência de MMP12, MMP7 ou MMP9 seria indicador de prognóstico favorável para câncer oral (IMPOLA et al., 2004).

A integrina- β -3 age alterando a migração das células na matriz extracelular (SAJID et al., 2002). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a expressão das integrinas pode ter papel importante em neoplasias orais, mas a grande variação quantitativa entre os indivíduos impediu até o momento avaliar adequadamente o seu valor diagnóstico ou prognóstico (THOMAS et al., 1999).

1.3.2 Polimorfismos de Genes com Ação nos Processos de Inflamação

Trabalhos recentes têm associado o prognóstico de câncer aos polimorfismos genéticos com ação nos processos de inflamação. A inflamação é um mecanismo de defesa e proteínas ligadas à fase aguda da inflamação estariam relacionadas ao aparecimento e à evolução de câncer. Estas proteínas apresentam variação quantitativa de pelo menos 25% durante a fase aguda da inflamação, com aumento ou diminuição de sua concentração plasmática (GABAY e KUSHNER, 1999). Estas proteínas são produzidas ou sofrem ativação de polipeptídios especiais, as citocinas, produzidas principalmente pelos macrófagos e monócitos. As citocinas são um grupo bastante heterogêneo e incluem substâncias muito diferentes como o interferon, o fator de crescimento tumoral (TGF), as interleucinas (IL) e os fatores de necrose tumoral (TNF) (GABAY e KUSHNER, 1999). A produção de algumas destas substâncias é regida por certos genes polimórficos.

Entre os polimorfismos genéticos relacionados à resposta inflamatória os mais importantes para o estudo das neoplasias se encontram no grupo das interleucinas, no qual se destacam as interleucinas 2 e 6. De maneira geral,

considera-se que as interleucinas abreviariam a resposta inflamatória (GABAY e KUSHNER, 1999). Com relação à interleucina-6 (IL6), pesquisa com 86 pacientes portadores de carcinoma epidermóide oral mostrou que altos níveis de IL6 e de seu receptor estavam associados a tumores de maiores dimensões e menos diferenciados. A presença de RNA mensageiro de IL6 foi inversamente associada com a presença de envolvimento linfonodal, metástases e segundo tumor primário (WANG et al., 2002). Em estudo realizado com 85 indivíduos portadores de carcinoma epidermóide, a presença de altos níveis de IL2-R no momento do diagnóstico foi o principal fator prognóstico para a sobrevida global dos pacientes (TARTOUR et al., 1997).

1.3.3 Polimorfismo Genético de Reparo de DNA

O gene XRCC1 tem um papel reconhecido na ação reparadora de DNA em vários tipos de câncer como mama, pulmão, bexiga, esôfago e cabeça e pescoço (HU et al., 2005; BERWICK et al., 2006; CAO et al., 2006).

Alguns estudos analisaram o papel de genes relacionados com reparo do DNA no risco de tumores de cabeça e pescoço, principalmente o XRCC1 (GAJECKA et al., 2005; HUANG et al., 2005). Os resultados não são conclusivos sobre o papel do gene XRCC1 como fator de risco ou proteção nos tumores de cabeça e pescoço. Estudo caso-controle conduzido na Turquia apontou que não existem diferenças significativas entre as frequências alélicas do XRCC1 Arg399Gln entre casos e controles (DEMOKAN et al., 2005). Estudo caso-controle multicêntrico nos Estados Unidos e Porto Rico, somente detectou a presença do alelo Gln/Gln

como fator de proteção para a população branca, mas não para a população geral do estudo em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (HUANG et al., 2005). Ainda assim são necessários estudos com amostras maiores para poder determinar a associação dos genes relacionados com o processo reparador do DNA.

O polimorfismo genético XRCC1 Arg399Gln junto com outros polimorfismos genéticos foram estudados por QUINTELA-FANDINO et al. (2006) no prognóstico de pacientes com tumores de cabeça e pescoço. Os autores encontraram que a presença de variantes polimórficas reduz o risco de óbito.

2 JUSTIFICATIVA

Os carcinomas epidermóides de laringe constituem umas das neoplasias importantes na região da cabeça e pescoço. Estudos têm sido conduzidos para determinar os fatores de risco para estes tumores, no entanto, poucos estudos foram desenvolvidos para investigar a influência de polimorfismos genéticos na sobrevida dos pacientes com tumores de laringe.

Estudos sobre o papel dos polimorfismos genéticos relacionados à invasão e metástase e inflamação na sobrevida dos pacientes são encontrados na literatura, mas não há referências sobre o papel do gene reparador do DNA XRCC1 no prognóstico dos pacientes com carcinoma de laringe.

Com esta pesquisa buscar-se-á examinar o papel dos polimorfismos genéticos relacionados com invasão e metástase e com ação nos processos de inflamação e de reparo de DNA no comportamento dos carcinomas epidermóides de laringe.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o papel dos polimorfismos genéticos relacionados aos processos de invasão e metástase (MMP1 e MMP3), inflamação (Interleucina-2, Interleucina-6, LTA) e reparo do DNA (XRCC1) no prognóstico de pacientes com carcinoma epidermóide de laringe.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1. Examinar a frequência dos polimorfismos genéticos de invasão e metástase, inflamação e reparo do DNA nos tumores de laringe, observando:

- Polimorfismos genéticos e sobrevida global e sobrevida específica por câncer de laringe
- Polimorfismos genéticos e estadiamento clínico e tratamento para tumor primário em pacientes com câncer de laringe

3.2.2. Examinar o efeito conjunto dos diferentes polimorfismos genéticos na sobrevida global e na sobrevida específica dos pacientes com câncer de laringe.

3.2.3 Examinar os efeitos de outras variáveis de interesse como consumo de álcool e tabagismo, assim como idade, sexo, estadiamento clínico e tratamento para tumor primário na sobrevida global e na sobrevida específica pela doença.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo de sobrevida deriva do projeto multicêntrico *International Study of Environment, Viruses and Cancer of the Oral Cavity and the Larynx*, estudo caso-controle conduzido na América Latina e coordenado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), entre novembro de 1998 e abril de 2003.

4.1 Resumo do Projeto Multicêntrico Internacional Latino-americano

O projeto multicêntrico latino-americano foi financiado pela Comunidade Européia (IC18 CT970222). O centro de São Paulo teve suporte financeiro adicional da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2001/01768-2), o que permitiu manter o recrutamento de casos e controles no centro de São Paulo por um período mais longo. O estudo com desenho caso-controle foi conduzido em cinco centros no Brasil (São Paulo, Rio de Janeiro, Goiânia, Porto Alegre e Pelotas), um centro na Argentina (Buenos Aires) e outro em Cuba (Havana) com recrutamento de casos e controles em vários hospitais (**Anexo 1**). Cada centro recrutou dois grupos de casos, com diagnóstico recente (casos incidentes) e sem tratamento prévio, um com tumores de cavidade oral (incluindo orofaringe) e outro com tumores de laringe e um grupo de controles hospitalares. O grupo de controles serviu de base para comparações com as duas séries de casos. Casos e controles foram entrevistados com respeito à história de exposições a fatores relacionados ao estilo de vida (por exemplo, tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, dieta) e ambientais (por

exemplo, experiência ocupacional). O questionário utilizado para levantar essas informações para o estudo está no **Anexo 2**. Amostras de sangue e células da mucosa oral foram obtidas dos casos e controles, e amostras de tecido fresco ou blocos de parafina do tumor foram obtidos dos casos. Essas amostras encontram-se armazenadas em freezer -70°C no Instituto de Medicina Tropical (IMT) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com exceção do material biológico dos pacientes de Havana armazenado no IARC/OMS, Lyon, França.

4.2 Delineamento e População do Estudo

O presente estudo caracteriza-se como uma coorte prospectiva, inicialmente com 311 casos de tumores de laringe, confirmados pelo exame anátomo-patológico (Classificação Estatística Internacional de Doenças CID-10: C32.0-C32.9) (OMS, 1997), dos centros de São Paulo, Goiânia e Porto Alegre, entrevistados entre novembro de 1998 e maio de 2003. Desse número inicial foram excluídos 34 casos de Porto Alegre (Hospital Nossa Senhora da Conceição: 32 casos; Hospital de Clínicas de Porto Alegre: 2 casos), e 4 casos de São Paulo (Hospital do Servidor Público de São Paulo) por dificuldades na revisão dos prontuários médicos nesses hospitais. Após esta primeira exclusão restaram 273 casos de tumores de laringe.

O seguimento desses pacientes foi realizado até o dia 30 de junho de 2005. Os casos são originários de sete hospitais nos três centros que aceitaram participar do estudo e a seguir declinados:

São Paulo

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Hospital do Câncer AC Camargo

Hospital Heliópolis

Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo

Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho

Goiânia

Hospital Araújo Jorge

Porto Alegre

Hospital Santa Rita da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

4.2.1 Banco de Dados do Projeto Multicêntrico Internacional do IARC e Informação do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da USP

O banco de dados do projeto multicêntrico contendo as informações dos casos incluídos nos três centros participantes do estudo (São Paulo, Goiânia e Porto Alegre) foi o ponto de partida para a enumeração de pacientes para a coorte. Para completar as informações no banco de dados usaram-se os questionários impressos (sob a guarda de cada centro), bem como a informação do IMT sobre a disponibilidade de amostras de sangue de cada paciente para posterior extração de DNA e genotipagem dos polimorfismos genéticos. O conjunto destas informações dos casos da coorte foi organizado em banco de dados no *SPSS for Windows* 12.0.

Do total de 273 pacientes com tumores de laringe desta coorte inicial e incluídos no banco de dados base, definiram-se os seguintes critérios de exclusão:

1. Pacientes com carcinomas não epidermóides, com histologia diferente da classificação M8070/3 ou M8071/3, de acordo com a Classificação Internacional de Doenças para Oncologia CID-O (OMS, 1996).
2. Pacientes sem amostra de sangue armazenada no IMT.
3. Pacientes com questionário incompleto.

Após esta primeira etapa de exclusão restaram na coorte 186 casos elegíveis (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1 - Exclusões de membros da coorte de acordo com as informações obtidas pela análise do banco de dados, dos questionários e amostras de sangue no IMT.

Centro	Casos iniciais	Exclusões			Total excluídos	Total elegíveis
		Questionário incompleto	Sem amostra de sangue	Outra histologia*		
São Paulo	121	1	17	4	22	99
Goiânia	127	0	53	0	53	74
Porto Alegre	25	0	12	0	12	13
Total	273	1	82	4	87	186

* Carcinomas não epidermóides.

4.2.2 Seguimento dos Pacientes da Coorte

O seguimento dos pacientes foi feito por meio da revisão dos prontuários médicos hospitalares e da consulta das declarações de óbito armazenados nos bancos de óbitos municipais e estaduais.

4.2.2.1 Revisão dos Prontuários Hospitalares

Na revisão dos prontuários médicos buscou-se obter informações sobre o status vital dos pacientes (vivos, mortos ou perdidos de acompanhamento) e, também, informações adicionais sobre tratamento, aparecimento de metástases, recidivas e segundo tumor primário (**Anexo 4:** Formulário Prontuário). Na **Tabela 4.2** descreve-se os números dos prontuários não localizados em cada centro e a exclusão realizada (caso com neoplasia maligna não confirmada) após revisão dos prontuários dos pacientes nos arquivos médicos dos hospitais de origem dos casos. Foram localizados 92% dos prontuários hospitalares.

Tabela 4.2 – Pacientes elegíveis para o estudo após revisão dos prontuários médicos.

Centros/ Hospitais	Casos	Prontuários não localizados	Elegíveis com prontuários localizados	Neoplasia maligna não confirmada	Elegíveis restantes
São Paulo					
Clínicas	32	4	28	0	28
AC Camargo	19	0	19	0	19
Heliópolis	13	0	13	0	13
São Paulo	21	2	19	1	18
ICAVC	14	3	11	0	11
Goiânia					
Araújo Jorge	74	4	70	0	70
Porto Alegre					
Santa Rita	13	2	11	0	11
Total	186	15	171	1	170

O status vital dos pacientes definidos por meio dos prontuários médicos de cada centro ao final do seguimento (30 de junho de 2005) é apresentado na **Tabela 4.3**.

Tabela 4.3 – Status vital dos pacientes da coorte em 30 de junho de 2005, por centro, de acordo com as informações obtidas dos prontuários médicos.

Centro	Elegíveis	Vivos		Óbitos		Perdidos de acompanhamento	
		n	%	n	%	n	%
São Paulo	89	35	39,3	43	48,3	11	12,4
Goiânia	70	16	22,9	13	18,6	41	58,5
Porto Alegre	11	4	36,4	1	9,1	6	54,5
Total	170	55	32,4	57	33,5	58	33,1

Nesta etapa, os óbitos mais os perdidos de acompanhamento correspondiam a 66,6% da coorte. Procedeu-se, então, a busca da declaração de óbito desses pacientes nos bancos de óbitos da Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (SEADE) e do Programa de Aprimoramento das Informações de Mortalidade (PRO-AIM) em São Paulo, da Secretaria Estadual de Saúde de Goiânia e do Núcleo de Informações de Saúde (NIS) de Porto Alegre.

4.2.2.2 Rastreamento das Declarações de Óbitos

A busca das declarações de óbito dos pacientes mortos foi feita para se obter a confirmação das causas de morte (morte por câncer de laringe ou câncer de cabeça e pescoço, morte por outro câncer, morte por outra causa que não câncer). Pacientes com declaração de óbito na qual a causa básica ou algumas das causas de morte fosse o câncer de laringe ou uma outra localização da região de cabeça e pescoço foram considerados como causa de morte por câncer de laringe. Este critério foi adotado em vista que alguns pacientes morriam no domicílio ou em algum outro hospital (diferente daquele onde receberam o diagnóstico e tratamento) podendo aparecer como causa básica alguma outra localização da cabeça e pescoço, embora o exame anátomo-patológico tenha confirmado o caso como carcinoma epidermóide de laringe.

Em São Paulo, o PRO-AIM e a Fundação SEADE disponibilizaram os bancos eletrônicos de mortalidade. Em Goiânia, o Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia dispõe do banco de óbitos do município de Goiânia, solicitação de informações adicionais dos casos não localizados no município foi enviada para a Secretaria Estadual de Saúde. Em Porto Alegre, o NIS não localizou as informações sobre as declarações de óbito.

Os pacientes considerados perdidos de acompanhamento também foram procurados nas fontes acima mencionadas. A **Tabela 4.4** apresenta o resultado do rastreamento das declarações de óbito dos pacientes mortos e dos pacientes perdidos de acompanhamento nos três centros.

Tabela 4.4 – Resultados do rastreamento de pacientes mortos e perdidos de acompanhamento nas bases de Declarações de Óbito municipais e estaduais.

Centro	Declaração de óbito			
	Localizada		Não localizada	
	Óbitos	Perdidos de acompanhamento	Óbitos	Perdidos de acompanhamento
São Paulo	41	0	2	11
Goiânia	12	14	1	27
Porto Alegre	0	0	1	6
Total	53	14	4	44

4.3 Material Biológico, Extração do DNA e Análise dos Polimorfismos Genéticos

O material biológico (sangue) dos pacientes dos hospitais participantes do estudo foi armazenado no IMT. A extração do DNA foi realizada no próprio IMT e depois encaminhada para o Centro de Terapia Celular da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina da USP onde foi feita a genotipagem dos polimorfismos genéticos.

4.3.1 Extração do DNA

O kit da *Qiagen* vale-se da afinidade dos ácidos nucléicos por sílica presente em uma membrana de sílica-gel e disposta em microcolunas. A amostra é submetida à lise proteolítica seguida de tratamento com reagente caotrópico e, então,

passada nesta membrana. Enquanto os ácidos nucleicos se ligam com extrema afinidade à sílica, os inibidores e contaminantes passam e são desprezados. Após lavagens o DNA é eluído da coluna. O método é extremamente reprodutível e isola quantidades homogêneas de DNA ultra-puro e próprio para a realização de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e técnicas de hibridização. Não requer o uso de solventes orgânicos.

4.3.2 Análise dos Polimorfismos Genéticos pelo *TaqMan SNP Genotyping Assays*

Para a genotipagem dos polimorfismos genéticos foram seguidos os seguintes procedimentos: a) Amplificação da região de interesse; b) Análise dos dados e c) Genotipagem (**Figura 4.1**).

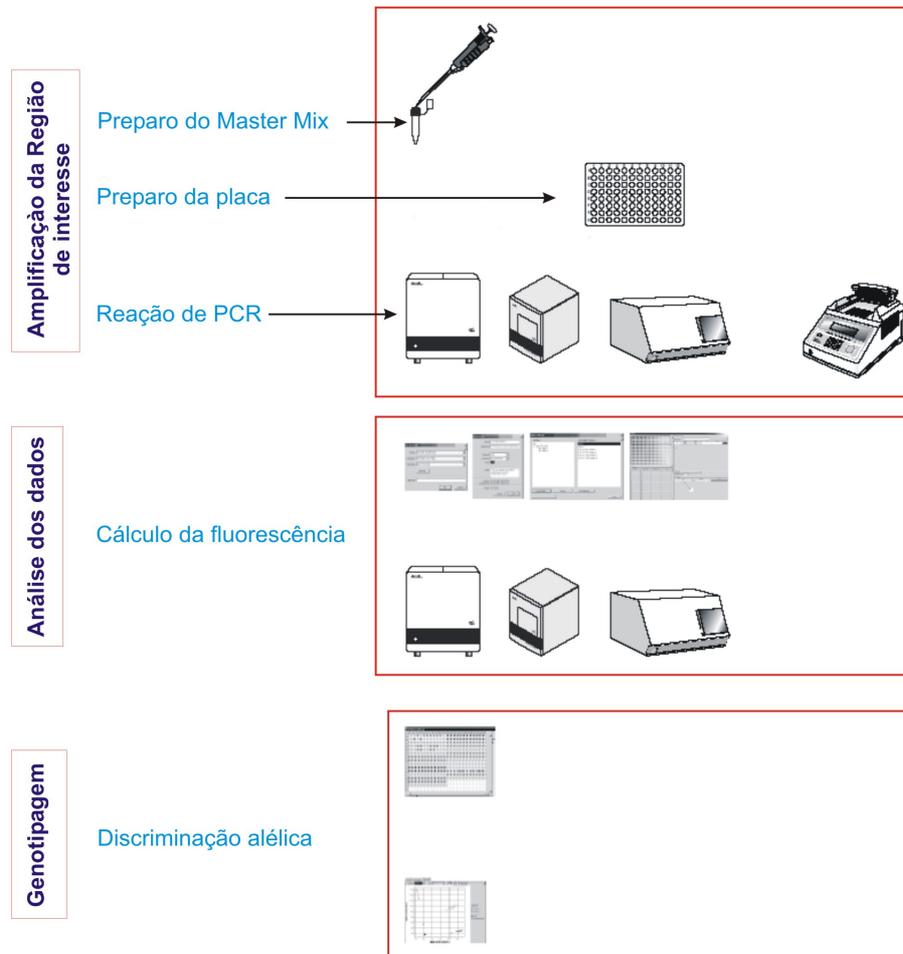


Figura 4.1 Representação das etapas da genotipagem dos polimorfismos genéticos

Sondas específicas para os polimorfismos genéticos foram preparadas obedecendo aos critérios especificados pelo fabricante. Para tanto foram isoladas de cada gene diferentes regiões dependendo do tamanho de cada polimorfismo genético (**Anexo 5** e **Anexo 6**). As sondas alelo-específicas foram marcadas com a fluorescência *FAM dye* e *VIC dye*.

As reações de *PCR* foram realizadas usando o *Master mix* universal *TaqMan* com os *primers* e sondas na concentração recomendada pelo fabricante. As

reações se realizaram em placa de 96 poços em um volume total de reação de 12,5µl usando 6ng de DNA genômico. No aparelho de *7500 Real Time PCR System*, as reações foram conduzidas com as seguintes temperaturas: inicialmente 95°C por 10 min, seguida por 50 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min.

Imediatamente após a reação de PCR, os dados passam a ser analisados pelo programa *7500 System Software* vinculado ao sistema de PCR em Tempo-Real, onde a intensidade de fluorescência de cada poço é lida e os resultados são armazenados em uma base de dados para estudo de associação.

4.4 Variáveis do Estudo

Os desfechos investigados neste estudo (morte por todas as causas e morte pelo câncer de laringe) foram analisados de acordo com a frequência do genótipo dos polimorfismos genéticos selecionados e outras variáveis de interesse.

4.4.1 Variáveis Explanatórias ou Preditores

1. Polimorfismos genéticos: são apresentadas as frequências dos genótipos dos genes segundo o tipo de polimorfismo genético estudado: i) inflamação; ii) invasão e metástases e iii) reparo de DNA.
2. Idade: considerada a idade em anos na data de entrevista do projeto multicêntrico latino-americano, na forma contínua e por faixa etária.
3. Sexo: variável categórica (categorias: masculino e feminino).
4. Localização topográfica: classificação segundo o CID-10 (OMS, 1997).

5. Estadiamento Clínico: considerado o estadiamento clínico do tumor primário de laringe segundo a classificação dos tumores malignos TNM (revisão 1997, **Anexo 7**).
6. Tratamento para tumor principal: tipo de tratamento para o tumor primário (cirurgia, radioterapia ou quimioterapia).
7. Recidiva: presença ou não de recidiva local ou regional.
8. Tratamento para recidiva: tipo de tratamento para a recidiva (cirurgia, radioterapia ou quimioterapia).
9. Metástases: presença ou não de metástases.
10. Localização da metástase: classificação segundo CID-10.
11. Tratamento para metástase: tipo de tratamento para metástase (cirurgia, radioterapia ou quimioterapia).
12. Segundo tumor primário: presença ou não de segundo tumor primário.
13. Localização de segundo tumor primário: classificação segundo CID-10.
14. Tratamento para segundo tumor primário: tipo de tratamento para segundo tumor primário (cirurgia, radioterapia ou quimioterapia).
15. Comorbidades: foram consideradas algumas comorbidades nos pacientes com câncer de laringe (hipertensão arterial, diabetes, infecção por HIV).
16. Consumo de tabaco: consumo de tabaco em número de maços-ano antes do diagnóstico de câncer de laringe.
17. Consumo de álcool: consumo de álcool em gramas/litro/dia (g/L/dia) antes do diagnóstico de câncer de laringe.

4.4.2 Variáveis Desfechos

A análise de sobrevida teve dois desfechos a partir dos quais foram construídos os modelos para determinar os fatores prognósticos:

1. Óbito geral: tempo decorrido entre o diagnóstico de câncer de laringe pelo exame anátomo-patológico e o óbito do paciente (todas as causas de óbito).
2. Óbito específico pela doença: decorrido entre o diagnóstico de câncer de laringe pelo exame anátomo-patológico e o óbito do paciente pelo câncer de laringe (ou câncer de cabeça e pescoço segundo a declaração de óbito).

4.5 Análise Estatística

Inicialmente foi realizada a descrição das variáveis qualitativas (tabelas de frequências e porcentagens) e das variáveis quantitativas (medidas de tendência central e dispersão).

O evento de interesse principal na análise de sobrevida foi a data de ocorrência do óbito por câncer de laringe (sobrevida específica pela doença), também foi calculada a sobrevida global considerando todas as causas de morte. Os pacientes vivos ao final do estudo (30/06/2005) foram censurados seja para a sobrevida global como a sobrevida específica pela doença. Pacientes perdidos do acompanhamento e falecidos por outras causas que não câncer de laringe foram também censurados no cálculo da sobrevida específica pela doença.

Tabelas de vida segundo o método atuarial foram construídas para o cálculo da probabilidade de sobrevida após um, dois, três, quatro e cinco anos tanto para a sobrevida global quanto para a sobrevida específica pela doença.

As funções de sobrevida foram estimadas empregando-se o método de produto-limite ou Kaplan-Meier, assim como os gráficos correspondentes para as variáveis qualitativas que permitiram a comparação entre grupos segundo teste log-rank (CARVALHO et al., 2005).

Na modelagem do tempo de sobrevida, uma análise univariada das variáveis explanatórias permitiu escolher aquelas candidatas para a modelagem múltipla (ponto de corte: nível descritivo $p \leq 0,20$). A avaliação dos efeitos dos fatores associados ao prognóstico foi feita para o conjunto dos tumores de laringe baseada no cálculo das *hazard ratios* (HR), intervalos com 95% de confiança foram calculados para as variáveis de interesse (CARVALHO et al., 2005). As variáveis independentes no tempo de sobrevida global e sobrevida específica pela doença foram selecionadas segundo nível descritivo $p < 0,05$. Outras variáveis serviram de ajuste no modelo quando comparadas com o modelo reduzido, sempre que ao introduzi-las no modelo houvesse uma variação não menor de 10% no ajuste da variável independente.

Para análise estatística foram usados os pacotes estatísticos *Intercooled Stata 8.0 for Windows* e *SPSS 12.0 for Windows*.

4.6 Considerações Éticas

A pesquisa foi aprovada pelos comitês de ética de todas as instituições participantes no estudo, e também, pelo comitê de ética da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (**Anexo 3**).

5 RESULTADOS

5.1 Análise Descritiva

5.1.1 Características Demográficas

Após exclusões, a coorte final do estudo constitui-se de 170 pacientes com carcinomas epidermóides de laringe diagnosticados entre 25/11/1998 e 26/08/2002 e seguidos até 30 de junho de 2005. Oitenta e nove pacientes (52,3%) procediam de hospitais do centro de São Paulo, 70 (41,2%) pacientes de Goiânia e 11 (6,5%) de Porto Alegre. Deste total de casos, 146 (85,9%) eram do sexo masculino e 24 (14,1%) do sexo feminino, portanto, a razão homens:mulheres (6:1) manteve-se após as exclusões, semelhante à incidência habitual dos tumores de laringe por sexo. A idade média foi 59,4 anos (desvio padrão: 10,4 anos), com uma mediana de idade de 59 anos. As cores mais freqüentes foram a branca (54,7%) e a mulata (14,7%). Em relação à escolaridade, 72,3% dos participantes do estudo tinham menos de cinco anos de estudo (**Tabela 5.1**).

Tabela 5.1 - Características demográficas dos pacientes com tumores de laringe do estudo.

	Casos (n=170)	%
Hospital de procedência		
Clínicas FMUSP, São Paulo	28	16,5
AC Camargo, São Paulo	19	11,2
Heliópolis, São Paulo	13	7,6
São Paulo UNIFESP, São Paulo	18	10,6
ICAVC, São Paulo	11	6,5
Araújo Jorge, Goiânia	70	41,2
Santa Rita, Porto Alegre	11	6,5
Faixa etária (anos) †		
≤ 50 anos	35	20,6
51-60 anos	56	32,9
61-70 anos	51	30,0
>70 anos	28	16,5
Sexo		
Masculino	146	85,9
Feminino	24	14,1
Cor		
Branco	93	54,7
Mulato	25	14,7
Negro	11	6,5
Índio	1	0,6
Não informado	40	23,5
Escolaridade (anos)		
Nenhuma	42	24,7
1-4 anos	81	47,6
5-8 anos	35	20,6
> 8 anos	12	7,1

† Média (desvio padrão) (anos) = 59,4 (10,4); Mediana (idade mínima – idade máxima) (anos) 59 (32-87)

5.1.2 Consumo de Tabaco e Álcool

O consumo de tabaco foi calculado em maços-ano, este cálculo foi realizado considerando o consumo médio de maços de cigarro fumados por dia multiplicado pelo número de anos como fumante. A média de consumo de tabaco foi de 44,6 maços-ano (desvio padrão: 40,7 maços-ano).

O consumo de álcool foi mensurado pelo consumo médio em gramas de etanol por litro por dia (g/L/dia), considerando todos os tipos de bebidas alcoólicas (cerveja, vinho e destilados). O consumo médio de álcool entre os pacientes com tumores de laringe foi de 167,3 g/L/dia (desvio padrão: 266,2 g/L/dia) (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Distribuição dos pacientes com tumores de laringe do estudo por tabagismo e consumo de álcool.

	Casos (n=170)	%
Tabaco (maços-ano)[†]		
Não fumantes	9	5,3
≤ 20	42	24,7
21-40	49	28,8
41-59	26	15,3
60 e mais	44	25,9
Álcool[‡] (g/L/dia)		
Não consomem	21	12,4
≤ 39	52	30,6
40-79	16	9,4
80-119	20	11,8
120 e mais	61	35,9

[†] Média (Desvio padrão) (maços-ano)= 44,6 (40,7)

[‡] Média (Desvio padrão) (g/L/dia)= 167,3 (266,2)

5.1.3 Características Clínicas do Tumor no Diagnóstico

Informações sobre as características clínicas do tumor no diagnóstico foram levantadas nos questionários do estudo multicêntrico e são apresentadas na **Tabela 5.3**. A localização mais freqüente foi a glote (74 casos, 43,5%), seguida da região supraglótica (47 casos, 27,6%), porém muitos casos foram classificados como laringe não especificada (41 casos, 24,1%).

Com respeito ao estadiamento clínico, mais da metade dos pacientes (64,2%) apresentaram ao diagnóstico tumores avançados (EC III e IV). O estadio clínico I foi atribuído a 31 casos (18,2%) e o estadio clínico II a 25 casos (14,7%).

Tabela 5.3 - Características clínicas dos tumores de laringe no diagnóstico de pacientes da coorte.

Características clínicas	Casos (n=170)	%
Localização do tumor (CID-10)		
Glote (C32.0)	74	43,5
Região supraglótica (C32.1)	47	27,6
Região subglótica (C32.2)	2	1,2
Lesão invasiva da laringe (C32.8)	6	3,5
Laringe não especificada (C32.9)	41	24,1
Estadiamento Clínico (EC)		
EC I: T1 N0 M0	31	18,2
EC II: T2 N0 M0	25	14,7
EC III: T3 N0 M0, T1 T2 T3 N1 M0	38	22,4
EC IV: T4 N0 M0, T4 N1 M0	71	41,8
Qualquer T N2 M0, qualquer T N3 M0		
Qualquer T, qualquer N M1		
Sem informação	5	2,9

5.1.4 Seguimento dos Pacientes

No seguimento os pacientes foram avaliados com respeito ao status vital, tratamento para o tumor primário, presença de recidiva (local e regional), presença de metástases, segundo tumor primário e comorbidades.

Para tratamento do tumor primário, 96 (56,5%) pacientes foram submetidos à cirurgia ou cirurgia juntamente com radioterapia. Somente radioterapia ou radioterapia juntamente com quimioterapia foram aplicados em 36 pacientes (21,2%) (**Tabela 5.4**).

Recidivas ocorreram em 20 pacientes (13 local, 6 regional e 1 loco-regional). Dos pacientes com presença de recidiva, 7 casos foram submetidos à cirurgia ou cirurgia juntamente com radioterapia, 2 casos à radioterapia e 6 casos receberam outro tratamento (**Tabela 5.5**).

Tabela 5.4 - Tratamento clínico do tumor primário dos pacientes da coorte.

	Casos (n=170)	%
Tipo de tratamento		
Cirurgia, cirurgia e radioterapia	96	56,5
Radioterapia, radioterapia e quimioterapia	36	21,2
Outro tratamento	20	11,8
Sem informação	18	10,6

Tabela 5.5 – Recidivas, metástases e segundo tumor primário: localização e tratamento realizado.

	Casos (n=170)	%
Localização da recidiva		
Local	13	7,6
Regional	6	3,5
Local e regional	1	0,6
Sem recidiva	150	88,3
Tipo de tratamento da recidiva (n=20)		
Cirurgia, cirurgia e radioterapia	7	35,0
Radioterapia	2	10,0
Outro tratamento	6	30,0
Sem tratamento	5	25,0
Localização da metástase		
Sistema nervoso central	1	0,6
Pulmão	2	1,2
Pulmão e Fígado	1	0,6
Ossos	2	1,2
Outro órgão	2	1,2
Sem metástase	162	95,2
Localização do segundo tumor primário		
Esôfago	1	0,6
Pulmão	2	1,2
Esôfago e pulmão	1	0,6
Outra localização	5	2,9
Sem segundo tumor primário	161	94,7

Do total de pacientes com carcinoma epidermóide de laringe, 8 casos apresentaram metástases a distância (1 no sistema nervoso central, 2 no pulmão, 1 no pulmão e fígado, 2 em ossos e dois em outras localizações). A ocorrência de segundo tumor primário esteve presente em 9 pacientes (5,3%) (**Tabela 5.5**).

Com relação às comorbidades a hipertensão arterial foi a ocorrência de maior frequência (**Tabela 5.6**).

Tabela 5.6 - Comorbidades presentes nos pacientes da coorte.

	Casos (n=170)	%
Comorbidades		
Hipertensão arterial	6	3,5
Diabetes <i>mellitus</i>	2	1,2
Hipertensão arterial e diabetes <i>mellitus</i>	2	1,2
Outras comorbidades	43	25,3
Sem comorbidades	117	68,8

5.1.5 Polimorfismos Genéticos

Os resultados dos polimorfismos genéticos selecionados para o estudo são apresentados pelas frequências dos genótipos. Algumas dificuldades com a qualidade do DNA não permitiram a identificação das frequências dos genótipos para todos os casos (**Tabela 5.7**).

As frequências e porcentagens por haplótipos para as MMPs e ILs são apresentados na **Tabela 5.8** e na **Tabela 5.9** respectivamente.

Tabela 5.7 – Polimorfismos de DNA dos genes selecionados e frequências dos genótipos.

Gene	Polimorfismo	Genótipo	n=170	%
MMP1	1607 1G/2G	1G/1G	23	13,5
		1G/2G	69	40,6
		2G/2G	24	14,1
		Sem identificação *	54	31,8
MMP1	-519 A>G ⁷²	A/A	59	34,7
		A/G	63	37,1
		G/G	13	7,6
		Sem identificação *	35	20,6
MMP3	-1171 (5A/6A)	5A/5A	19	11,2
		5A/6A	63	37,1
		6A/6A	50	29,4
		Sem identificação *	38	22,4
IL2	-384	G/G	18	10,6
		G/T	46	27,1
		T/T	59	34,7
		Sem identificação *	47	27,6
IL2	114	G/G	58	34,1
		G/T	61	35,9
		T/T	9	5,3
		Sem identificação *	42	24,7
IL6	-174 G>C	C/C	72	42,4
		C/G	49	28,8
		G/G	11	6,5
		Sem identificação *	38	22,4
LTA	252 A>G	A/A	60	35,3
		A/G	54	31,8
		G/G	22	12,9
		Sem identificação *	34	20,0
XRCC1	Arg399Gln	Arg/Arg	59	34,7
		Arg/Gln	53	31,2
		Gln/Gln	9	5,3
		Sem identificação *	49	28,8

* DNA disponível inadequado para genotipagem.

Tabela 5.8 – Haplótipos dos genes das metaloproteinases (MMPs).

Gene	Polimorfismo	Haplótipo	n=170	%
MMP1	1607 1G/2G -519 A>G ⁷²	1G/1G A/A	19	57,6
		2G/2G A/A	4	12,1
		2G/2G G/G	10	30,3
		Total	33	
MMP1 e MMP3	1607 1G/2G -1171 (5A/6A)	1G/1G 5A/5A	2	7,7
		1G/1G 6A/6A	13	50,0
		2G/2G 5A/5A	7	26,9
		2G/2G 6A/6A	4	15,4
		Total	26	
MMP1 e MMP3	-519 A>G ⁷² -1171 (5A/6A)	A/A 5A/5A	4	8,3
		A/A 6A/6A	36	75,0
		G/G 5A/5A	7	14,6
		G/G 6A/6A	1	2,1
		Total	48	
MMP1 e MMP3	1607 1G/2G -519 A>G ⁷² -1171 (5A/6A)	1G/1G A/A 5A/5A	2	9,1
		1G/1G A/A 6A/6A	11	50,0
		2G/2G A/A 6A/6A	2	9,1
		2G/2G G/G 5A/5A	6	27,3
		2G/2G G/G 6A/6A	1	4,5
		Total	22	

Tabela 5.9 – Haplótipos dos genes das interleucinas (ILs).

Gene	Polimorfismo	Haplótipo	n=170	%
IL2	-384 114	G/G G/G	9	22,5
		G/G T/T	4	10,0
		T/T G/G	23	57,5
		T/T T/T	4	10,0
		Total	40	
IL2 e IL6	-384 -174 G>C	G/G C/C	8	17,0
		G/G G/G	2	4,3
		T/T C/C	31	66,0
		T/T G/G	6	12,8
		Total	47	
IL2 e IL6	114 -174 G>C	G/G C/C	34	73,9
		G/G G/G	7	15,2
		T/T C/C	4	8,7
		T/T G/G	1	2,2
		Total	46	
IL2 e IL6	-384 114 -174 G>C	G/G G/G C/C	6	21,4
		G/G G/G G/G	2	7,1
		G/G T/T C/C	1	3,6
		T/T G/G C/C	13	46,4
		T/T G/G G/G	3	10,7
		T/T T/T C/C	2	7,1
		T/T T/T G/G	1	3,6
		Total	28	

5.2 Análise de Sobrevida

Do total de pacientes da coorte, 55 (31,4%) estavam vivos no final do acompanhamento, 71 (43,4%) morreram e 44 (25,1%) foram perdidos de acompanhamento e a declaração de óbito não foi localizada. Dos pacientes que morreram segundo a causa de morte na declaração de óbito, 43 foram por causa do câncer de laringe e 10 por câncer de alguma localização da cabeça e pescoço, 7 morreram por outro câncer não de cabeça e pescoço e 11 morreram por outras causas (**Tabela 5.10**).

Foi calculada a sobrevida global e sobrevida pelo câncer de laringe segundo o método de Kaplan-Meier. Os tempos de sobrevida (em dias) são apresentados na **Tabela 5.11**. O tempo médio de sobrevida global foi de 1777 dias (aproximadamente 4 anos e 10 meses), 50% dos casos tinham sobrevivido a 5 anos (tempo mediano de sobrevida: 1953 dias). O tempo mínimo de sobrevida foi 7 dias e o tempo máximo foi de 2868 dias.

Tabela 5.10 - Status vital dos pacientes da coorte em 30 de Junho de 2005.

Status vital	Casos (n=170)	%
Vivos	55	31,4
Óbitos	71	43,4
Câncer de laringe	43	
Câncer outra localização de cabeça e pescoço	10	
Outro câncer	7	
Outra causa	11	
Perdidos de acompanhamento	44	25,1

Tabela 5.11 - Sobrevida global e sobrevida específica pela doença (em dias) após o diagnóstico nos pacientes da coorte.

Sobrevida (em dias)	Média (erro padrão)	Mediana	Tempo mínimo	Tempo máximo
Global	1777,0 (97,6)	1953,0	7	2868
Específica pela doença	2030,0 (92,2)			

As probabilidades de sobrevida foram calculadas pelo método atuarial à 1, 2, 3, 4 e 5 anos segundo a sobrevida global e sobrevida específica pela doença (**Tabela 5.12**).

Tabela 5.12 – Probabilidade de sobrevida acumulada (sobrevida global e sobrevida específica pela doença) pelo método atuarial dos pacientes da coorte.

Sobrevida	Probabilidade de sobrevida acumulada (%)				
	1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos
Global	87,5	74,0	68,3	59,0	53,3
Específica pela doença	88,7	78,9	74,3	68,2	62,7

As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier ou produto-limite e apresentadas nas **Figuras 5.1** e **5.2** para a sobrevida global e sobrevida específica pela doença respectivamente.

A curva de sobrevida global tem um rápido decréscimo até o quinto ano para logo mostrar uma ligeira estabilidade na sobrevida (**Figura 5.1**). A curva da sobrevida específica pela doença também apresentou uma estabilidade a partir do quinto ano de seguimento, mas com uma ligeira melhora na sobrevida comparada com a curva de sobrevida global (**Figura 5.2**).

Figura 5.1 - Probabilidade de sobrevida global dos casos da coorte.

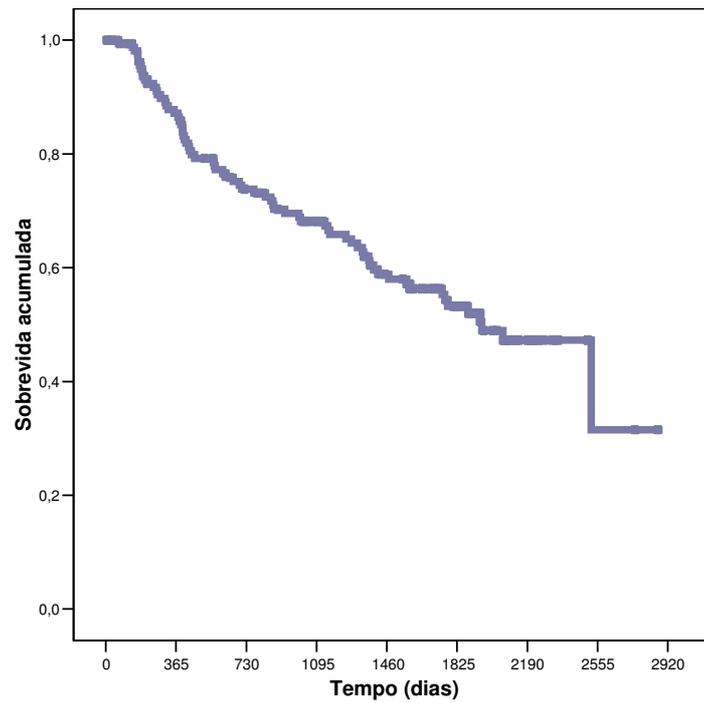
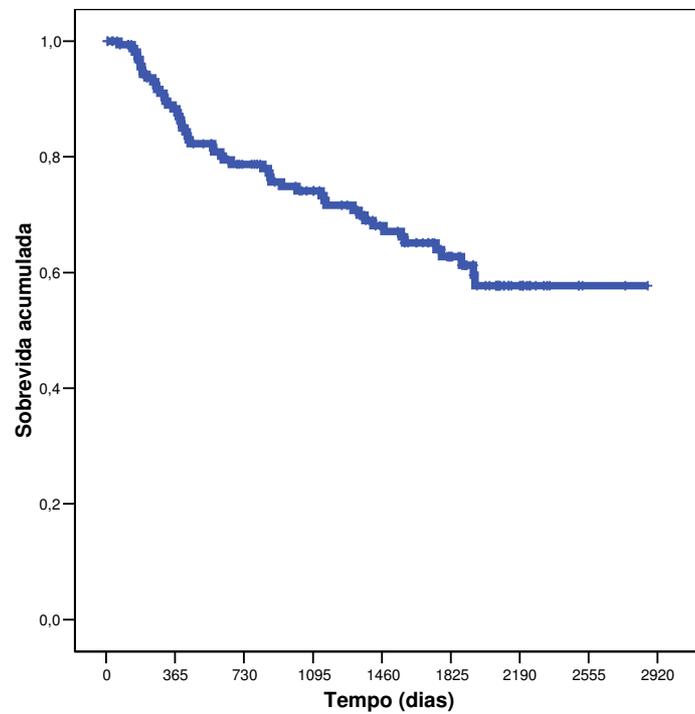


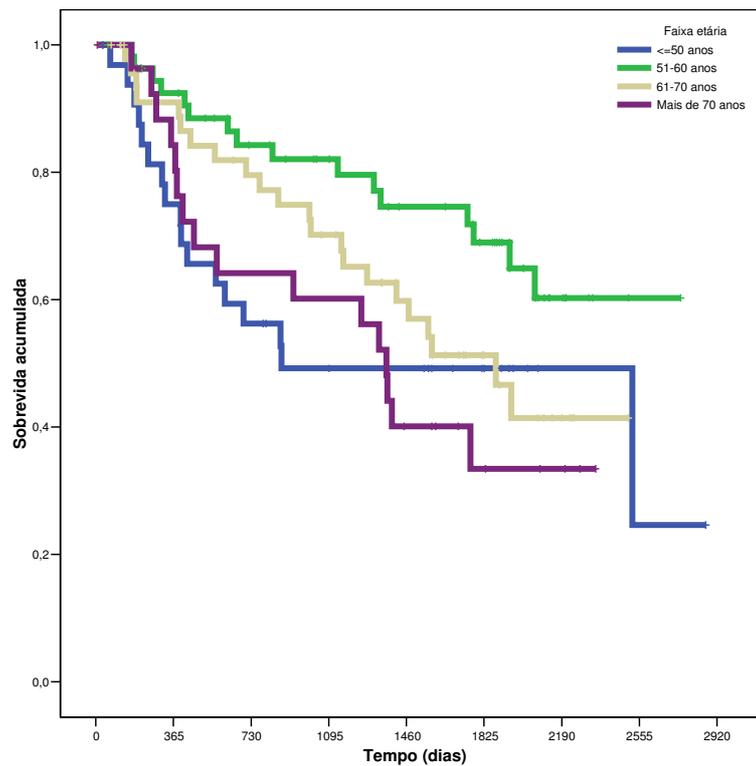
Figura 5.2 - Probabilidade de sobrevida específica pelo câncer de laringe dos casos da coorte.



5.2.1 Sobrevida Global

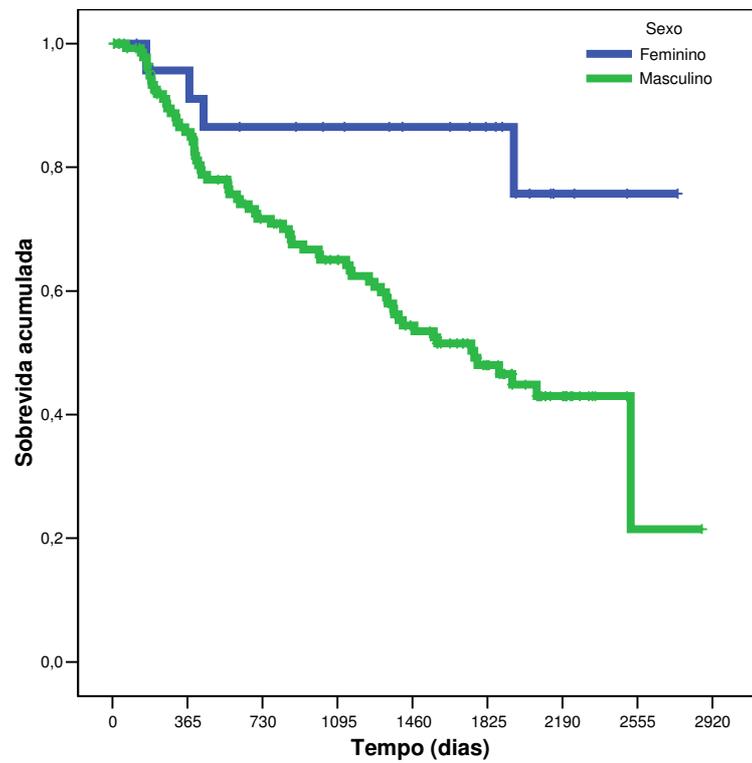
Foram calculadas as curvas de sobrevida acumulada de Kaplan-Meier para cada uma das variáveis de interesse e apresentadas nas **Figuras 5.3 a 5.17**.

Figura 5.3 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo faixa etária.



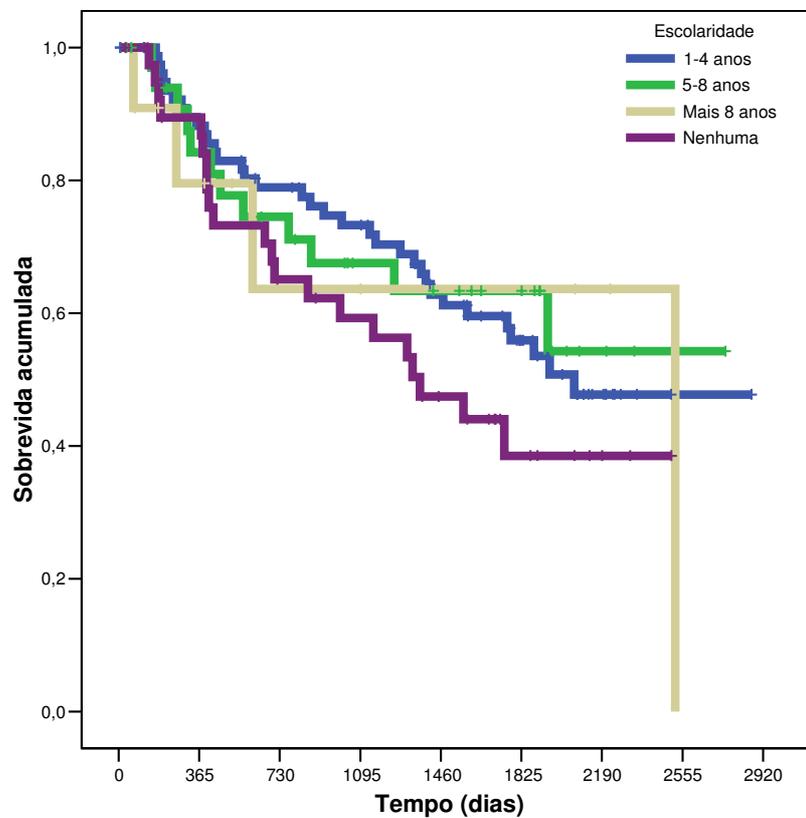
Observa-se que a sobrevida para os pacientes com 50 anos ou menos tem um forte declínio nos primeiros dois anos. As outras faixas etárias parecem mais uniformes na sobrevida, sendo que na medida em que faixa etária se incrementa, diminui a sobrevida acumulada (**Figura 5.3**).

Figura 5.4 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo sexo.



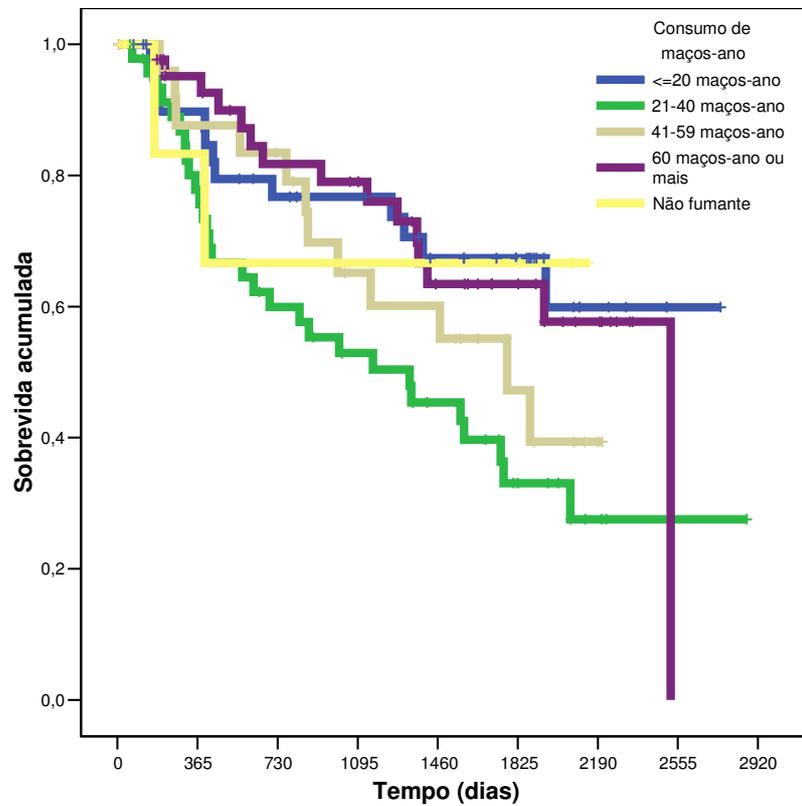
A curva de sobrevida para os homens tem um intenso declínio desde o primeiro ano de seguimento comparado com a curva de sobrevida das mulheres, talvez pelo maior número de casos de homens na coorte (**Figura 5.4**).

Figura 5.5 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo anos de escolaridade.



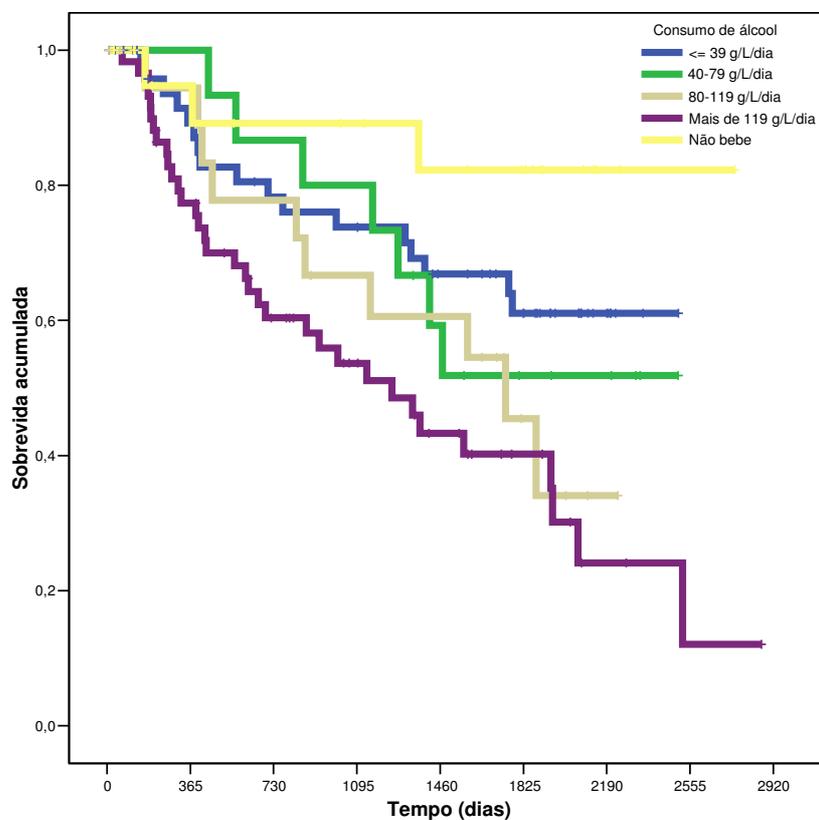
As curvas de sobrevida para os pacientes segundo os anos de escolaridade não apresentam um comportamento regular, as curvas se cruzam entre si, sendo que aqueles pacientes sem nenhum tipo de escolaridade apresentam uma sobrevida acumulada pior comparada com os outros pacientes (**Figura 5.5**).

Figura 5.6 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo hábito de fumar (maços-ano).



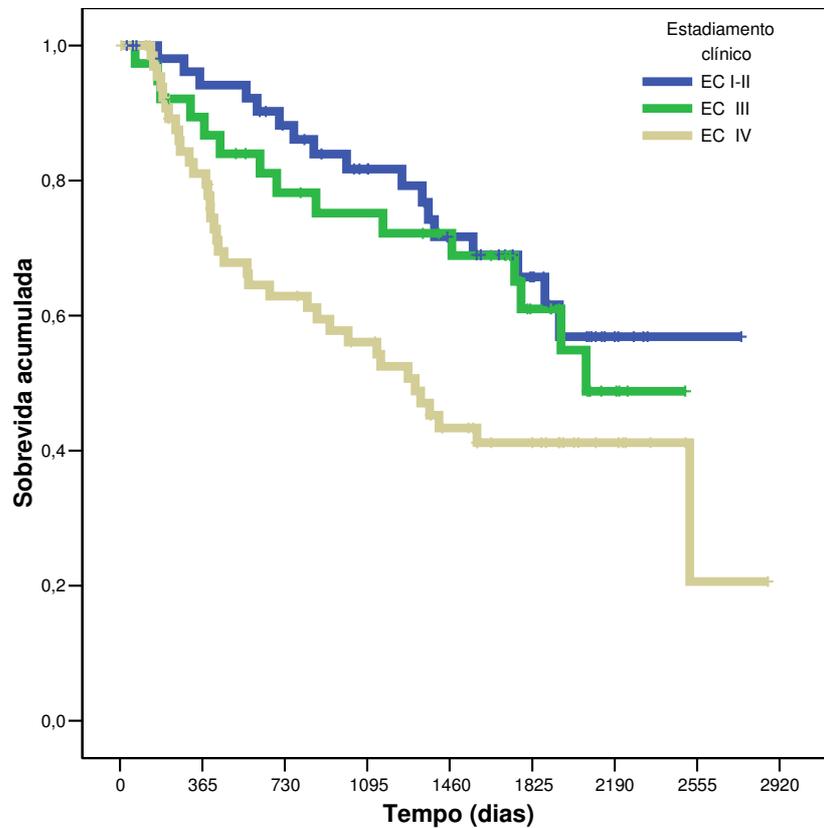
O consumo de tabaco apresenta curvas de sobrevida que se cruzam entre si, não apresentando nenhum comportamento segundo o incremento de consumo de tabaco por maços-ano (**Figura 5.6**).

Figura 5.7 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo consumo de bebida alcoólica (g/L/dia).



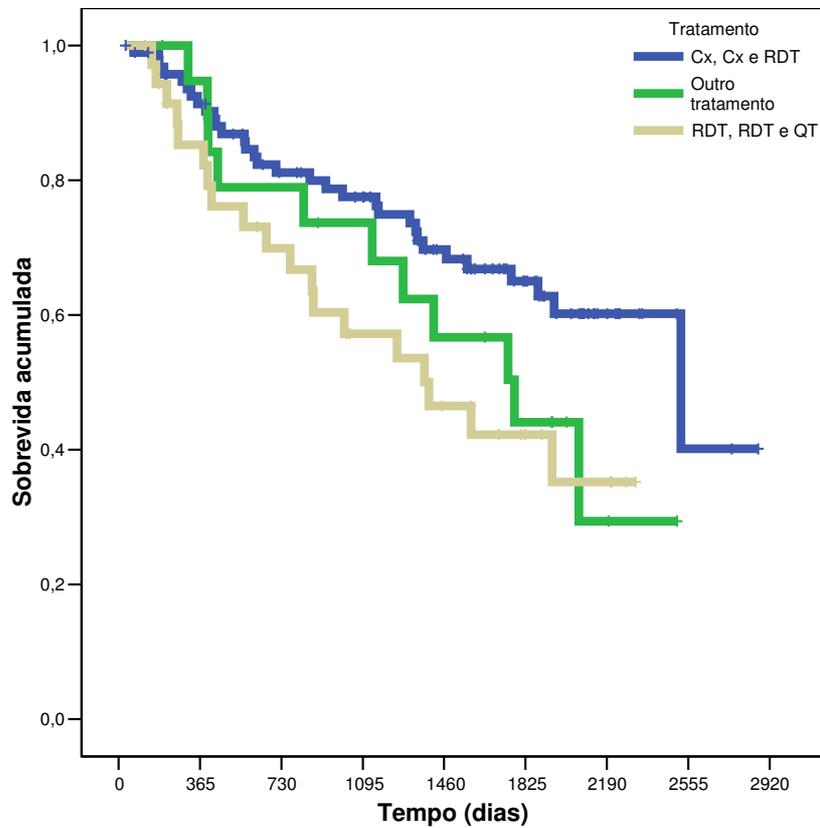
Observa-se uma notável diminuição na sobrevida acumulada para os pacientes que bebem mais de 119 g/L/dia de álcool quando comparada com as outras categorias. Pacientes que não bebem têm uma melhor sobrevida acumulada em relação a pacientes que bebem (**Figura 5.7**).

Figura 5.8 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo estadiamento clínico.



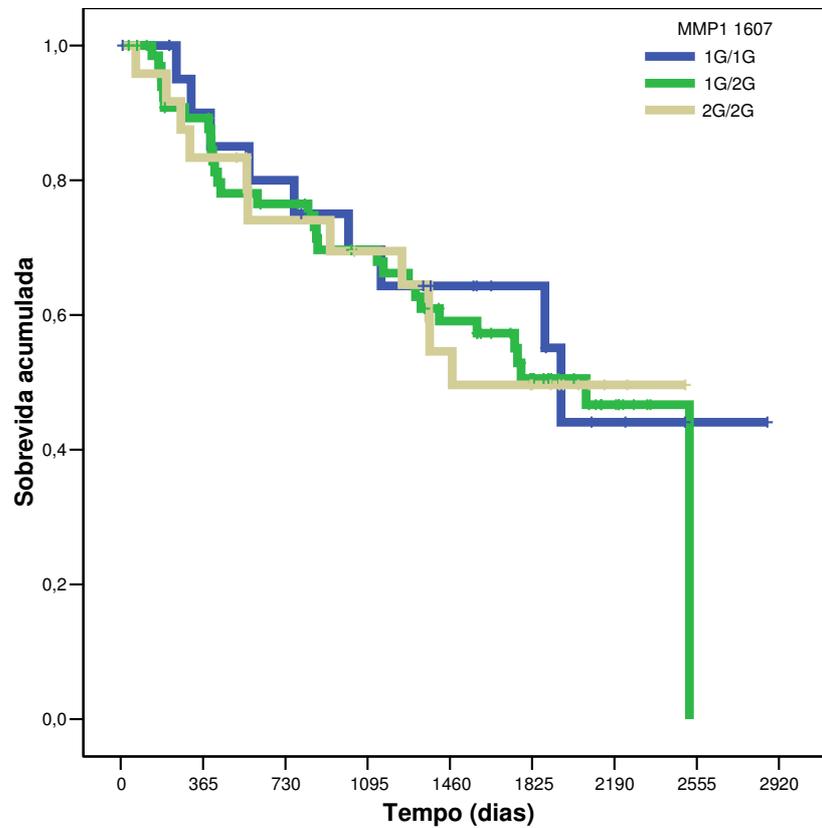
Pacientes com estadiamento clínico IV apresentam uma sobrevida pior que aqueles com estadiamento clínico I, II, e III. O estadiamento clínico III ainda resulta com pior probabilidade de sobrevida comparada com aqueles em estadiamento clínico I e II (**Figura 5.8**).

Figura 5.9 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo tratamento para tumor primário em pacientes que receberam tratamento.



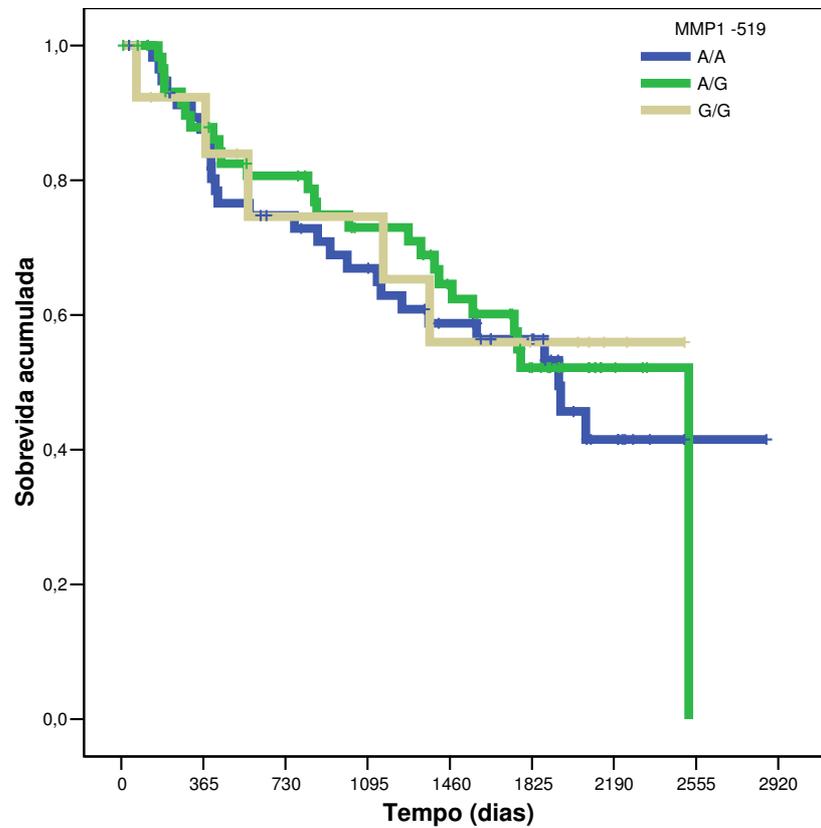
Pacientes tratados com cirurgia ou cirurgia combinada com radioterapia apresentam uma melhor sobrevida comparada com aqueles que receberam somente radioterapia ou radioterapia combinada com quimioterapia, ou ainda outro tratamento (**Figura 5.9**).

Figura 5.10 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético MMP1 1607 1G/2G.



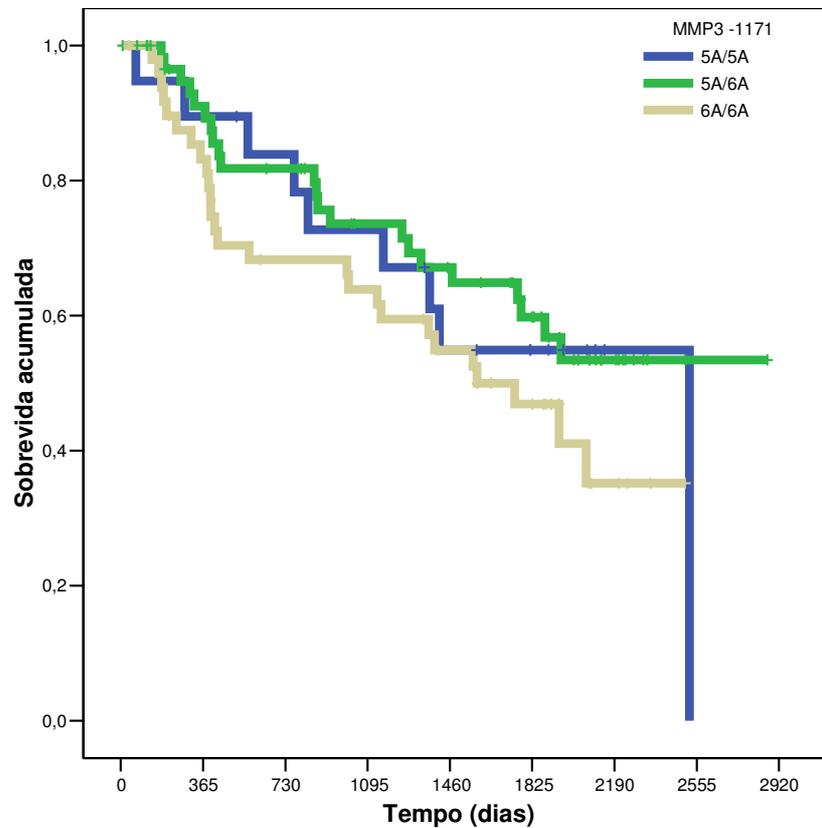
As curvas de sobrevida para as freqüências dos genótipos do gene MMP1 1607 não apresentam nenhuma diferença notável entre elas. As três curvas se cruzam entre si (**Figura 5.10**).

Figura 5.11 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético MMP1 -519 A/G⁷².



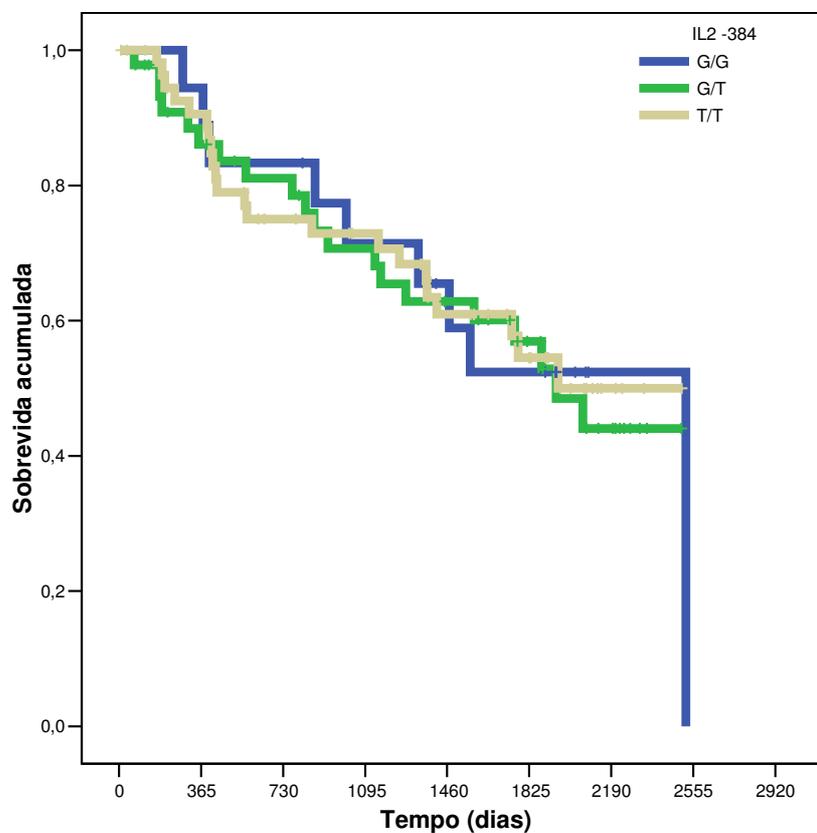
Nota-se que o comportamento do gene MMP1 -519 segundo as frequências dos genótipos não apresenta nenhuma diferença notável entre as curvas de sobrevida (**Figura 5.11**).

Figura 5.12 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético MMP3 -1171 (5A/6A).



A frequência do genótipo 6A/6A aparentemente apresenta uma probabilidade de sobrevida menor que as frequências dos genótipos 5A/5A e 5A/6A segundo o observado na figura 5.12.

Figura 5.13 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético IL2 -384.



As curvas de sobrevida para os genes IL2 -384, IL2 -114, IL6 -174, LTA 252 e XRCC1 não apresentam diferenças entre as frequências dos genótipos (Figuras 5.13 a 5.17).

Figura 5.14 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético IL2 114.

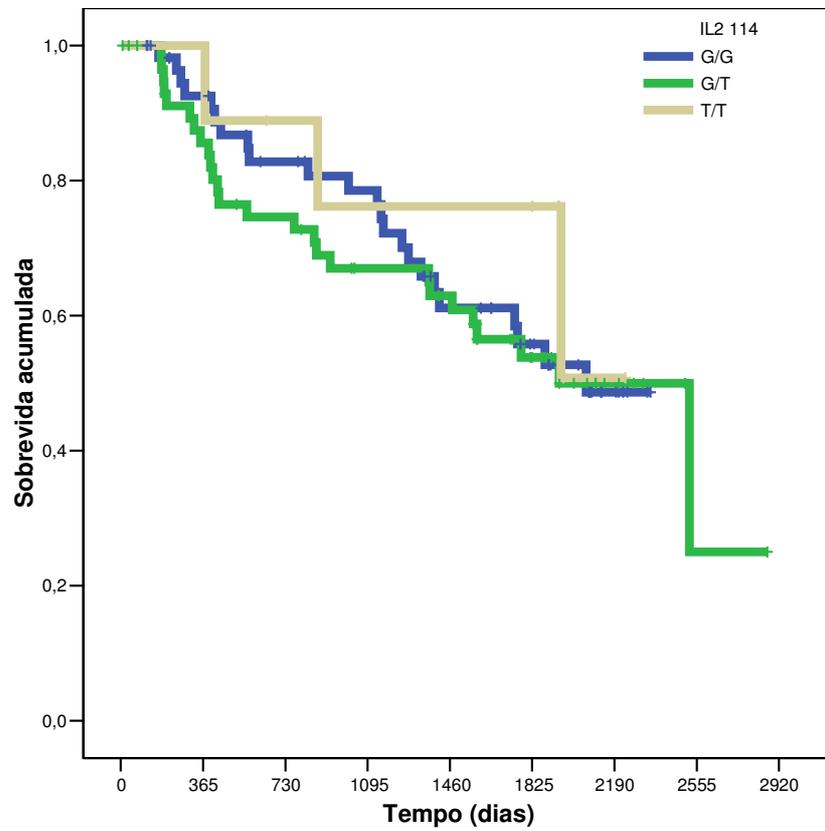


Figura 5.15 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético IL6 -174 G>C.

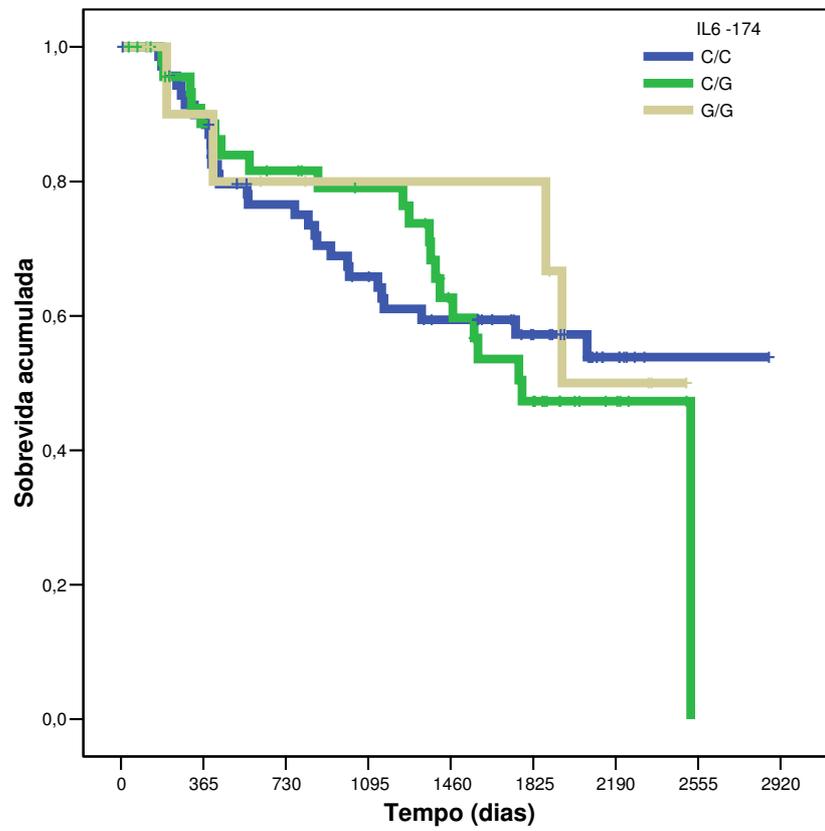


Figura 5.16 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético LTA 252 A>G (Intron I).

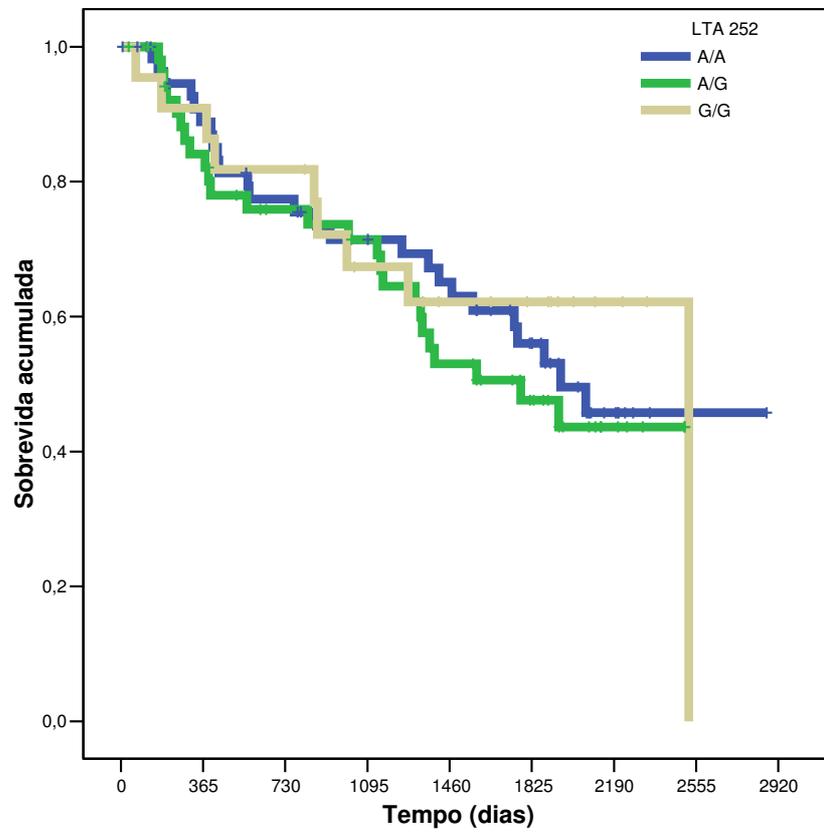
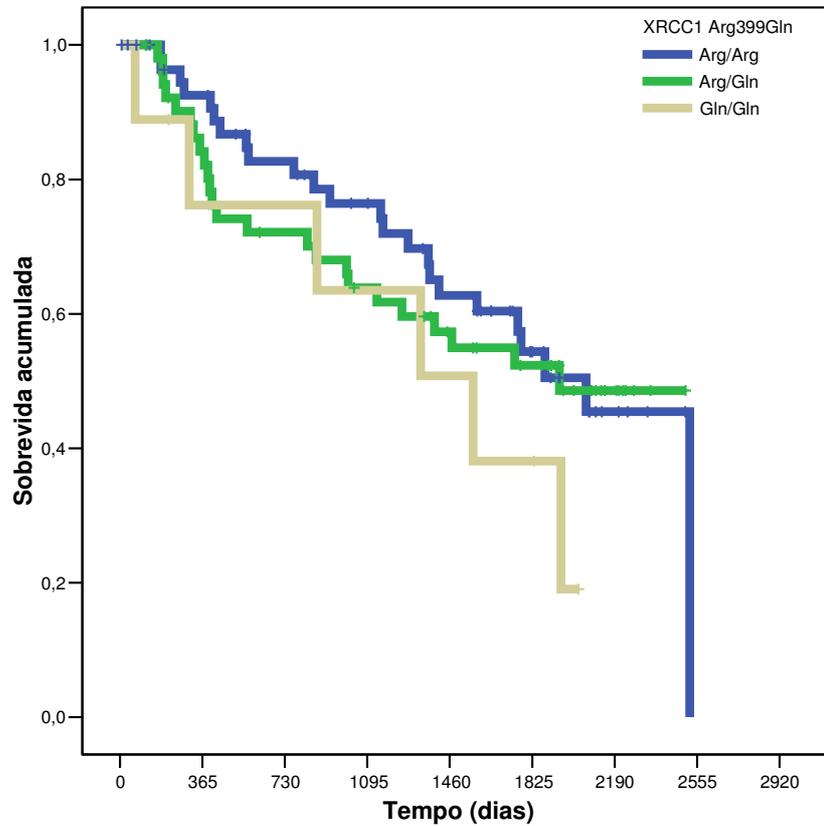


Figura 5.17 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global segundo a presença do polimorfismo genético XRCC1 Arg399Gln.



5.2.1.1 Regressão de Cox Univariada

A análise univariada permitiu o cálculo dos *hazard ratios* (razão de riscos) para cada uma das variáveis de interesse, considerando a sobrevida global. Nas **Tabelas 5.13, 5.14 e 5.15** são apresentados os valores dos *hazard ratios*, os intervalos com 95% de confiança e os valores de p segundo o teste log-rank (p de tendência no caso da variável ser ordenável).

Tabela 5.13 - Modelo de regressão de Cox univariada para a sobrevida global segundo as características demográficas e consumo de tabaco e álcool.

Variável	Hazard ratio (HR)	Intervalo com 95% de confiança	Valor p
Faixa etária (anos)			
≤ 50	1,0		0,34 [§]
51-60	0,4	0,22-0,88	
61-70	0,8	0,42-1,50	
> 70	1,1	0,56-2,23	
Sexo			
Feminino	1,0		0,01 [¥]
Masculino	3,4	1,26-9,46	
Escolaridade (anos)			
Nenhuma	1,0		0,26 [§]
1-4	0,7	0,38-1,14	
5-8	0,6	0,30-1,25	
> 8	0,8	0,26-2,30	
Consumo de tabaco (maços-ano)			
Não fumantes	1,0		0,03 [§]
≤ 20	1,1	0,24-4,68	
21-40	2,5	0,60-10,54	
41-59	1,7	0,37-7,52	
60 e mais	1,2	0,26-5,09	
Consumo de álcool (g/L/dia)			
Não bebe	1,0		<0,01 [§]
≤ 39	2,4	0,70-8,13	
40-79	2,9	0,75-11,25	
80-119	4,0	1,10-14,53	
120 e mais	5,6	1,71-18,24	

¥ Valor p do teste log-rank

§ Valor p de tendência

A força de mortalidade foi 3,4 vezes maior nos homens comparada com as pacientes de sexo feminino. O consumo de álcool e consumo de tabaco também aumentaram o risco de morte em pacientes com tumores de laringe.

As demais variáveis demográficas (idade e escolaridade) não mostraram efeito significativo no risco de morte dos pacientes da coorte (**Tabela 5.13**).

Tabela 5.14 - Modelo de regressão de Cox univariada para a sobrevida global segundo o estadiamento clínico e tratamento para tumor primário.

Variável	Hazard ratio (HR)	Intervalo com 95% de confiança	Valor p
Estadiamento Clínico (EC)			
EC I – II	1,0		0,01 [¥]
EC III	1,3	0,63-2,53	
EC IV	2,2	1,24-3,94	
Tratamento para tumor primário			
Cirurgia, Cirurgia mais Radioterapia	1,0		0,03 [¥]
Radioterapia, Radioterapia mais Quimioterapia	2,0	1,15-3,61	
Outro tratamento	1,7	0,85-3,38	

[¥] Valor p do teste log-rank

Da Tabela 5.14 desprende-se que pacientes com estadiamento clínico IV têm um risco incrementado em 120% de morrer comparado com aqueles com estadiamento clínico I e II.

A aplicação de radioterapia ou radioterapia combinada com quimioterapia aumenta duas vezes o risco de morrer comparada com pacientes que foram submetidos a cirurgia ou à combinação de cirurgia e radioterapia. Pacientes submetidos a outros tratamentos têm 1,7 vezes mais chance de morrer comparado com o grupo de referência.

Os diferentes polimorfismos genéticos estudados não revelaram *hazard ratios* estatisticamente significativos na análise univariada para a sobrevida global (**Tabela 5.15**).

Tabela 5.15 - Modelo de regressão de Cox univariada para a sobrevida global segundo os polimorfismos genéticos.

Polimorfismos genéticos		Hazard ratio (HR)	Intervalo com 95% de confiança	Valor p [§]
MMP1 1607 1G/2G	1G/1G	1,0		
	1G/2G	1,2	0,56-2,47	0,92
	2G/2G	1,2	0,47-2,80	
	1G/2G ou 2G/2G	1,2	0,57-2,41	0,68
MMP1 -519 A>G⁷²	A/A	1,0		
	A/G	0,9	0,51-1,50	0,84
	G/G	0,8	0,31-2,11	
	A/G ou G/G	0,9	0,51-1,45	0,57
MMP3 -1171 (5A/6A)	5A/5A	1,0		
	5A/6A	0,9	0,39-1,87	0,25
	6A/6A	1,4	0,64-2,97	
	5A/6A ou 6A/6A	1,1	0,52-2,20	0,85
IL2 -384	G/G	1,0		
	G/T	1,1	0,49-2,53	0,96
	T/T	1,0	0,46-2,33	
	G/T ou T/T	1,1	0,50-2,28	0,86
IL2 114	G/G	1,0		
	G/T	1,1	0,63-1,96	0,73
	T/T	0,7	0,21-2,32	
	G/T ou T/T	1,1	0,60-1,82	0,88
IL6 -174 G>C	C/C	1,0		
	C/G	1,1	0,63-1,93	0,90
	G/G	0,9	0,31-2,53	
	C/G ou G/G	1,1	0,62-1,81	0,83
LTA 252 A>G (intron 1)	A/A	1,0		
	A/G	1,2	0,69-2,11	0,68
	G/G	0,9	0,42-1,92	
	A/G ou G/G	1,1	0,66-1,85	0,70
XRCC1 Arg399Gln	Arg/Arg	1,0		
	Arg/Gln	1,1	0,64-2,02	0,25
	Gln/Gln	1,9	0,75-4,56	
	Arg/Gln ou Gln/Gln	1,2	0,72-2,13	0,44

[§] Valor p do teste log-rank

5.2.1.2 Regressão de Cox Múltipla

O modelo de regressão de Cox foi construído pelo método *stepwise forward*; assim, as variáveis que resultaram com nível descritivo $p \leq 0,20$ na análise univariada foram introduzidas uma a uma no modelo até obtenção do modelo final. Polimorfismos genéticos foram sempre considerados na construção do modelo final de regressão de Cox, dado o objetivo principal desta pesquisa.

O consumo de álcool resultou um fator prognóstico independente na sobrevida global. Pacientes cujo consumo de álcool é superior ou igual a 80 g/L/dia e menor que 119 g/L/dia têm 4,9 vezes mais risco de morrer que pacientes que não bebem. Para os pacientes que consomem mais de 119 g/L/dia de álcool a chance de morrer é 6,3 vezes maior comparada com os pacientes que não consomem álcool. O polimorfismo genético que resultou como uma variável de ajuste no modelo foi o MMP3 -1171 (Tabela 5.16).

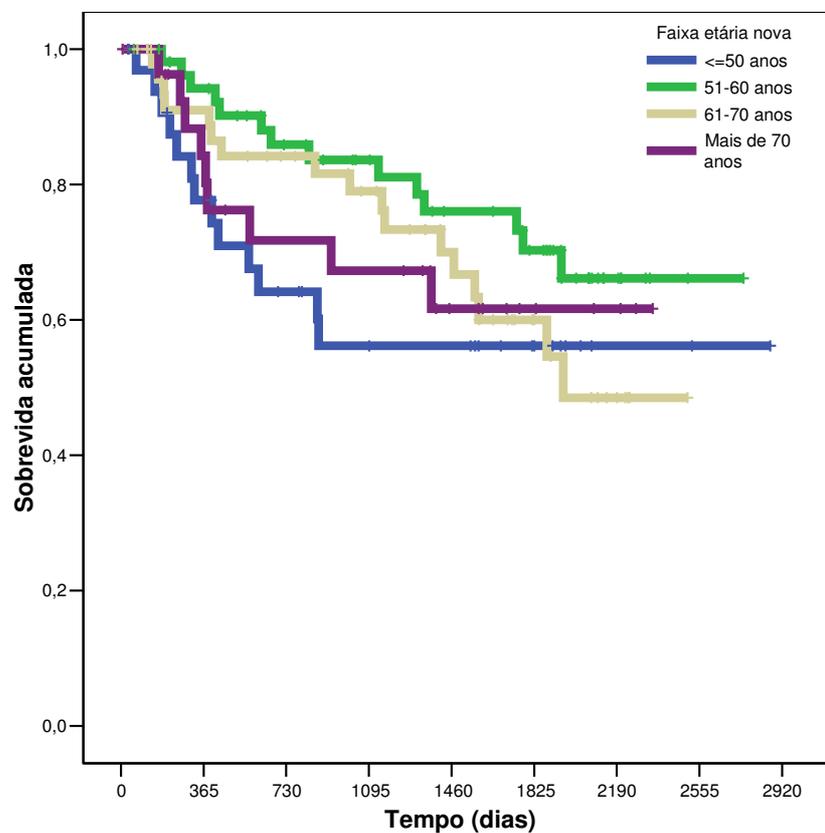
Tabela 5.16 - Modelo de regressão de Cox final para a sobrevida global.

Variável	Hazard ratio bruto (HR_{bruto})	Hazard ratio ajustado (HR_{aj})	Intervalo com 95% de confiança
Consumo de álcool (g/L/dia)			
Não bebe	1,0		
≤ 39	2,4	2,7	0,61-12,02
40-79	2,9	3,8	0,79-18,29
80-119	4,0	4,9	1,07-22,91
120 e mais	5,6	6,3	1,49-26,84
MMP3 -1171			
5A/5A	1,0		
5A/6A	0,9	0,8	0,36-1,72
6A/6A	1,4	1,3	0,61-2,88

5.2.2 Sobrevida Específica pela Doença

As curvas de sobrevida acumulada pelo método de Kaplan-Meier são apresentadas nas figuras 5.18 a 5.32 segundo as características demográficas, consumo de tabaco e álcool, e polimorfismos genéticos.

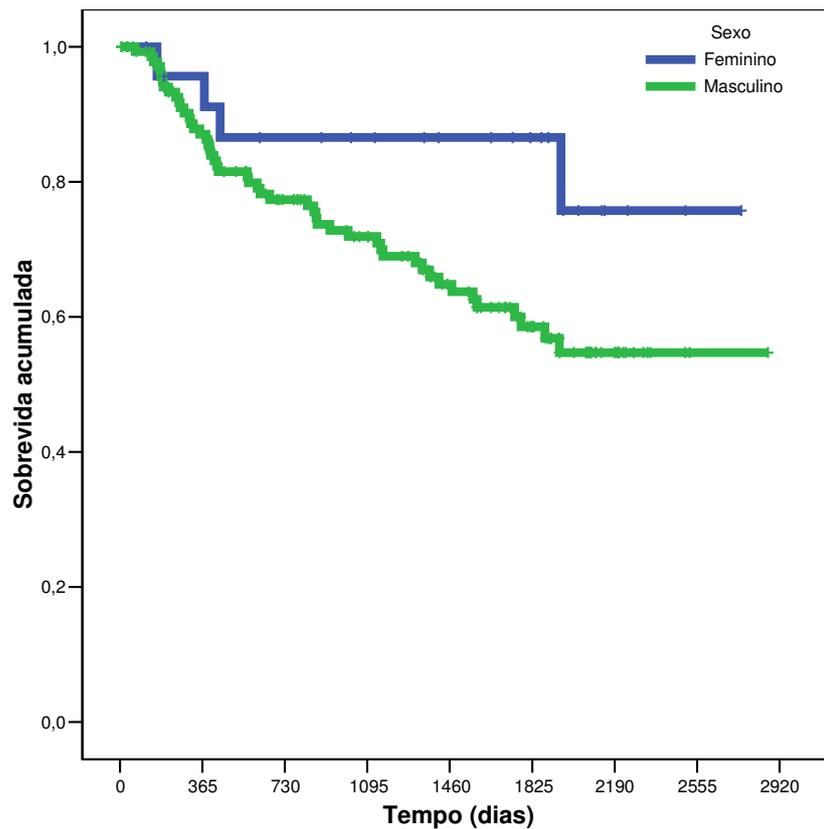
Figura 5.18 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo faixa etária.



A curva de sobrevida para o grupo de pacientes com menos de 50 anos apresenta um rápido declínio de probabilidade de sobrevida acumulada. As outras

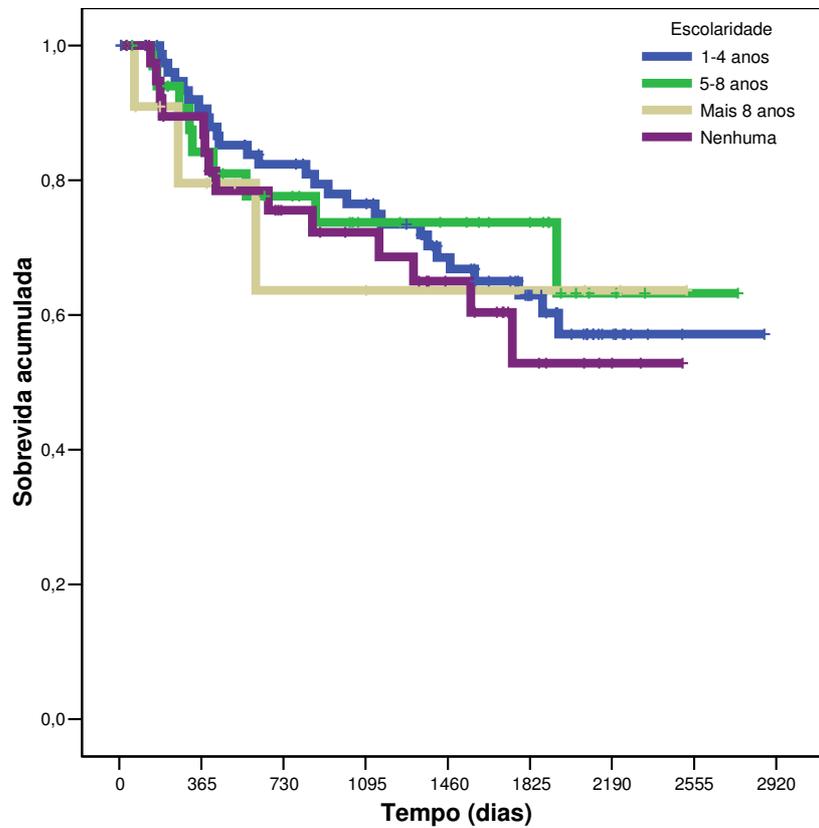
faixas etárias apresentam um declínio da sobrevida acumulada de acordo com o aumento da faixa etária (**Figura 5.18**).

Figura 5.19 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo sexo.



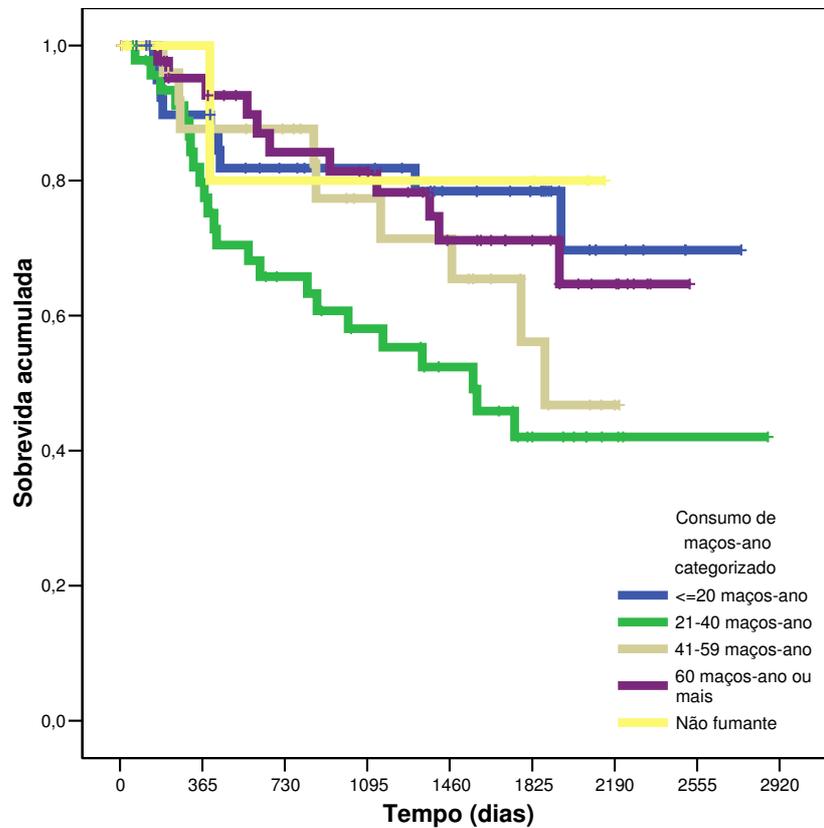
Os homens apresentam uma pior curva de sobrevida que as mulheres em todos os períodos de tempo no seguimento (**Figura 5.19**).

Figura 5.20 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo anos de escolaridade.



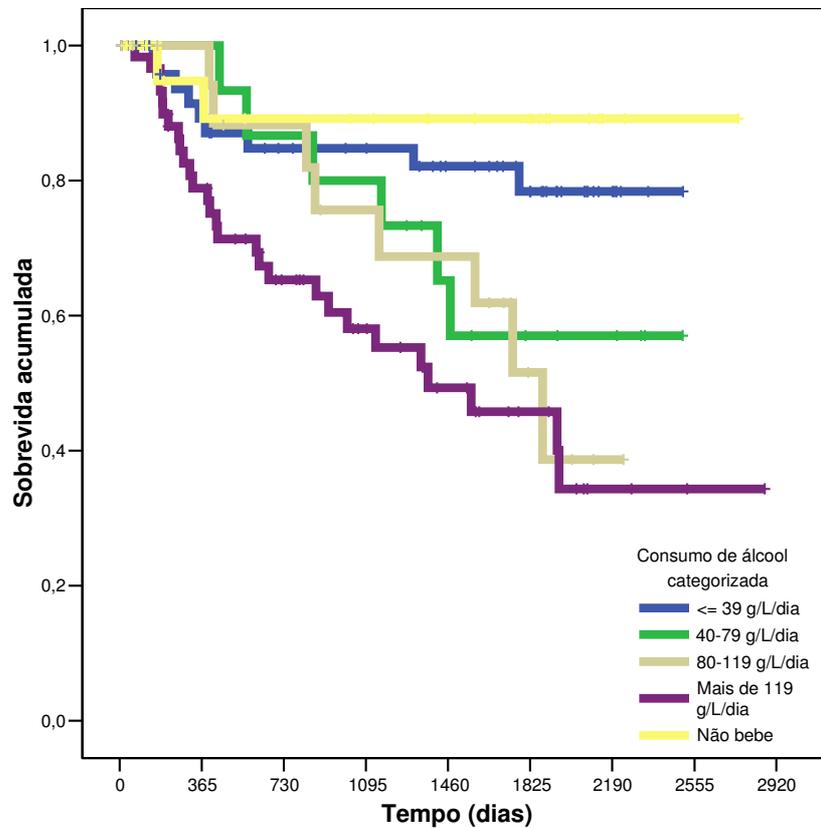
As curvas de sobrevida segundo os anos de escolaridade dos pacientes não apresentam comportamento diferenciado entre elas (**Figura 5.20**).

Figura 5.21 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo hábito de fumar (maços-ano).



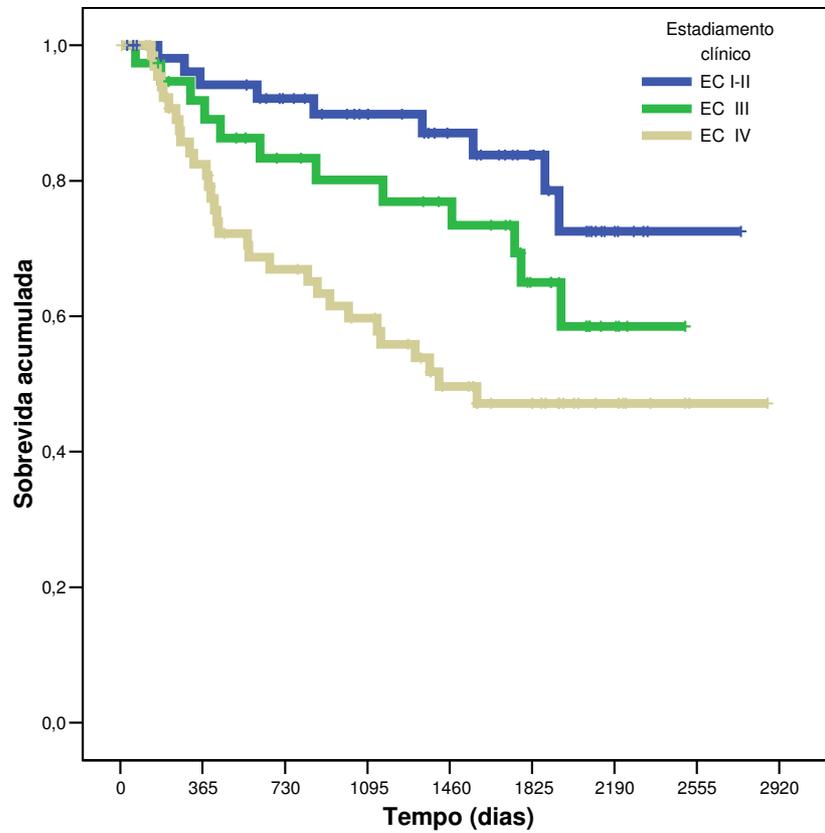
Pacientes que fumaram entre 21 e 40 maços-ano apresentam uma probabilidade de sobrevida pior que os outros grupos como se observa na **Figura 5.21**.

Figura 5.22 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo consumo de bebida alcoólica (g/L/dia).



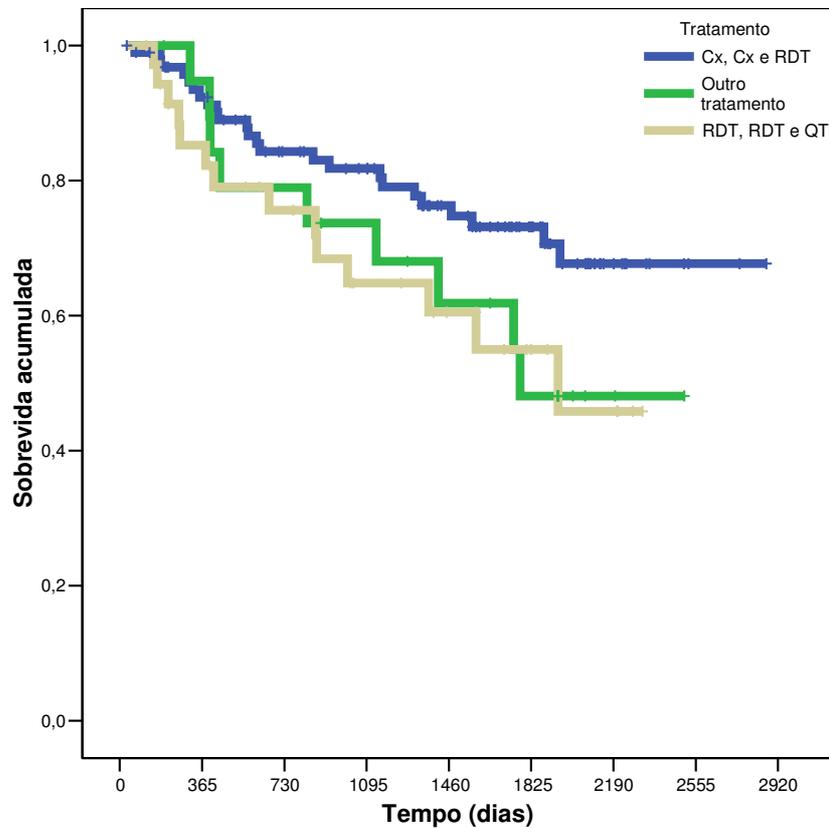
Pacientes que não bebem segundo as curvas apresentadas, podem ter uma sobrevida acumulada melhor que aqueles pacientes que consomem bebidas alcoólicas. Aquelos pacientes que bebem mais de 119 g/L/dia têm uma curva de sobrevida ainda pior que as outras categorias de pacientes (**Figura 5.22**)

Figura 5.23 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo estadiamento clínico.



Nota-se na **Figura 5.23** que pacientes com estadiamento clínico IV têm uma probabilidade de sobrevida menor que aqueles pacientes com estadiamento clínico III, e estes menor sobrevida que os pacientes com estadiamentos clínicos I e II.

Figura 5.24 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo tratamento para tumor primário em pacientes que receberam tratamento.



Pacientes que foram submetidos à cirurgia ou cirurgia combinada com radioterapia apresentaram uma melhor sobrevida comparada com aqueles pacientes que receberam exclusivamente radioterapia ou radioterapia combinada com quimioterapia ou ainda que fossem submetidos a outros tratamentos (**Figura 5.24**).

Para os polimorfismos genéticos relacionados com as metaloproteinases (MMP1 1607, MMP1 -519 e MMP3 -1171) não se observam diferenças entre as curvas de sobrevida das freqüências de genótipos (**Figuras 5.25, 5.26 e 5.27**).

Figura 5.25 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético MMP1 1607 1G/2G.

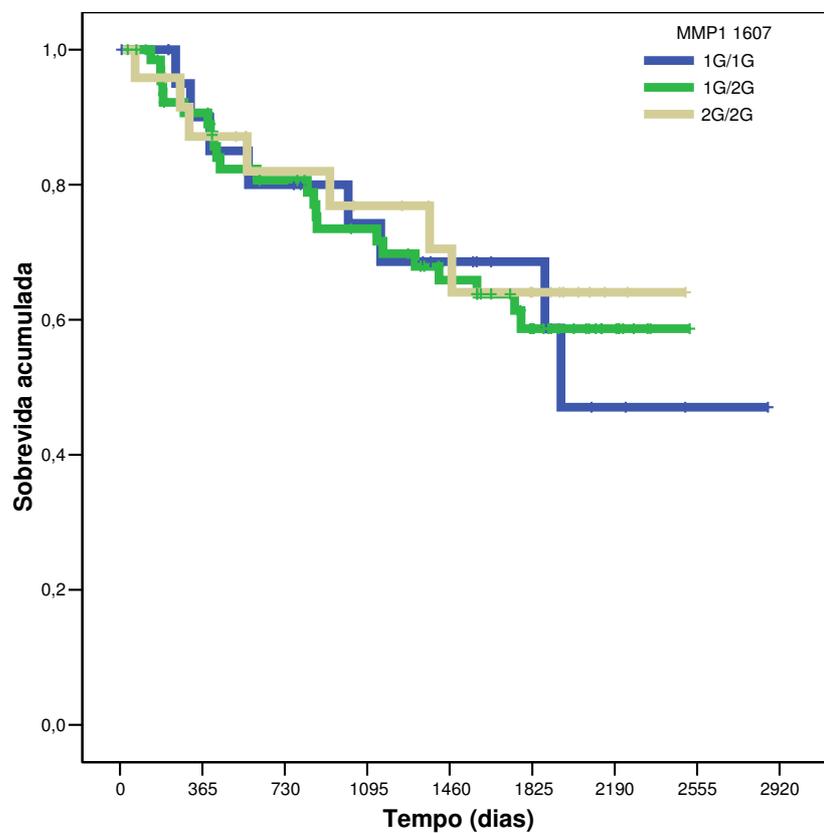


Figura 5.26 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético MMP1 -519 A/G⁷².

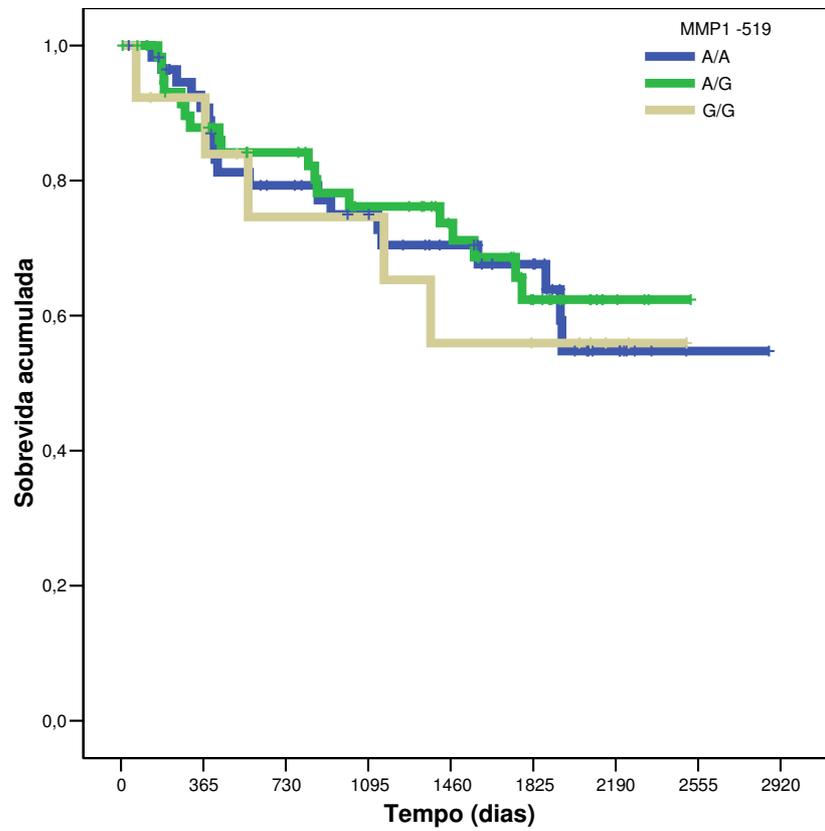
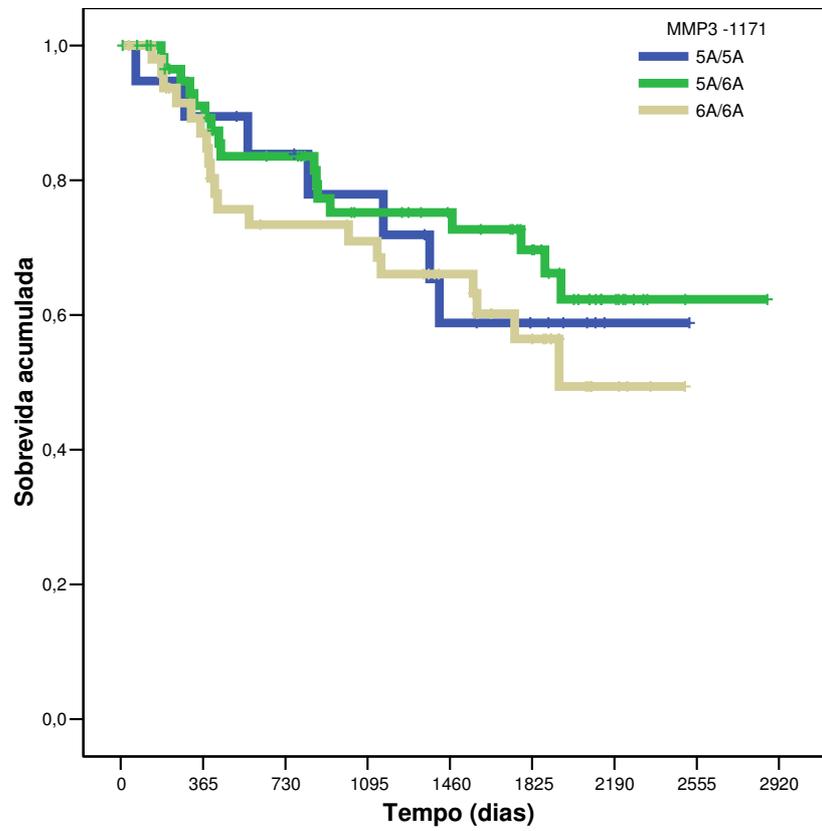


Figura 5.27 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético MMP3 -1171 (5A/6A).



As interleucinas também não apresentaram diferenças notáveis entre as curvas de sobrevida segundo as diferentes frequências de genótipos de cada gene (IL2 -384, IL2 114 e IL6 -174) (Figuras 5.28, 5.29 e 5.30).

Figura 5.28 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético IL2 -384.

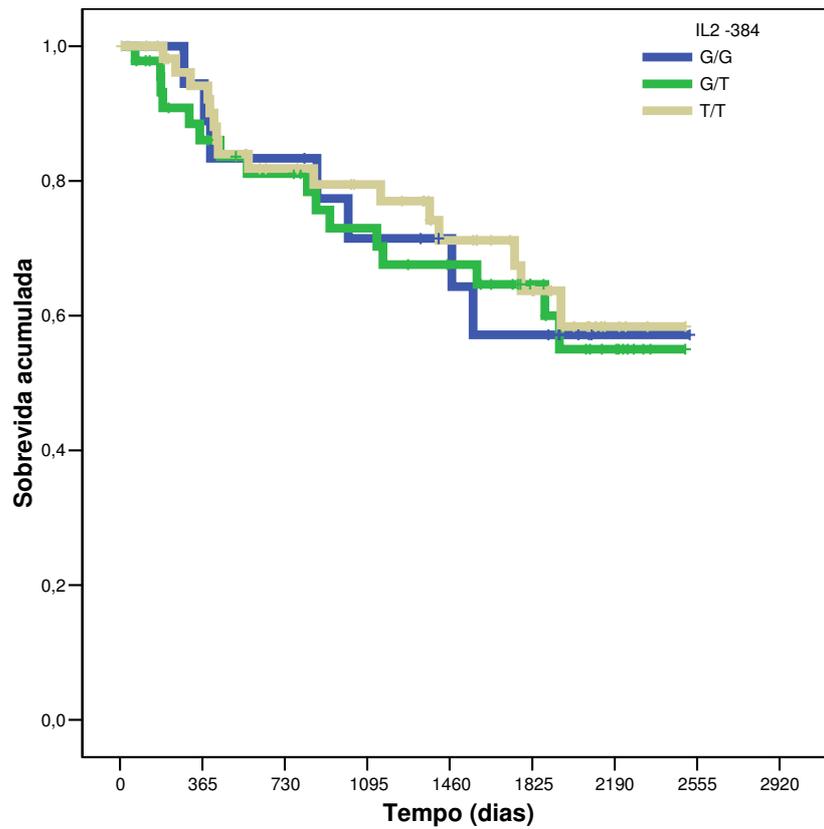


Figura 5.29 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético IL2 114.

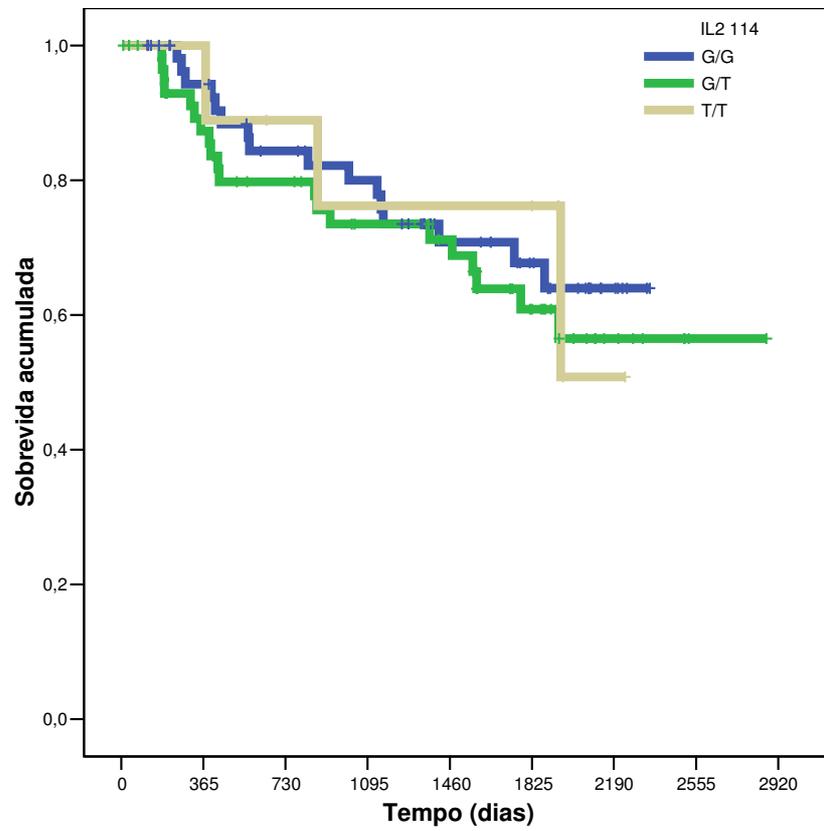
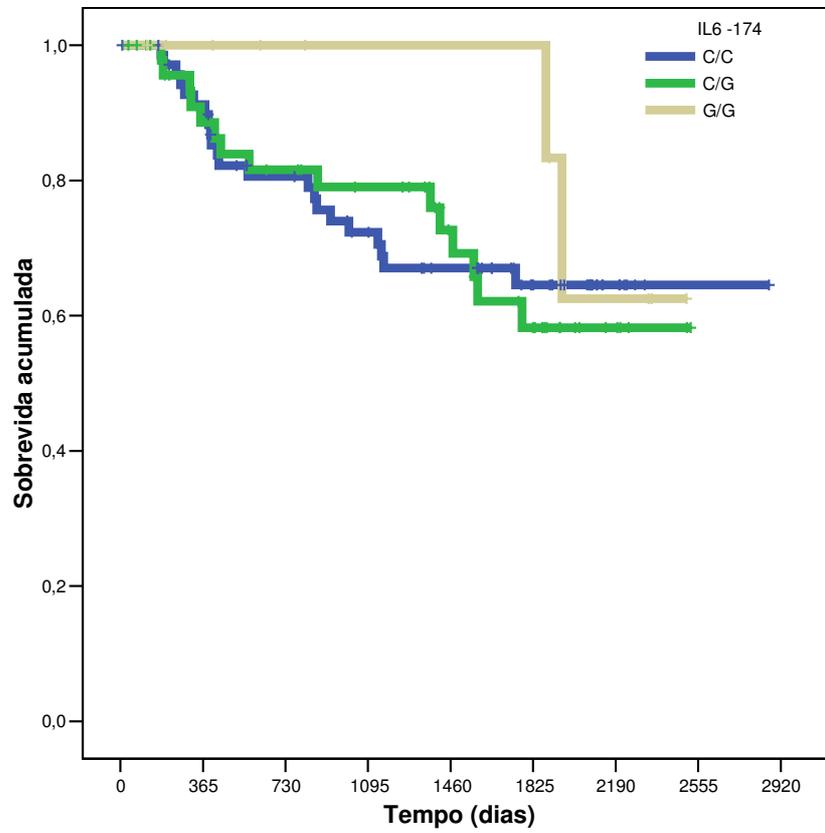
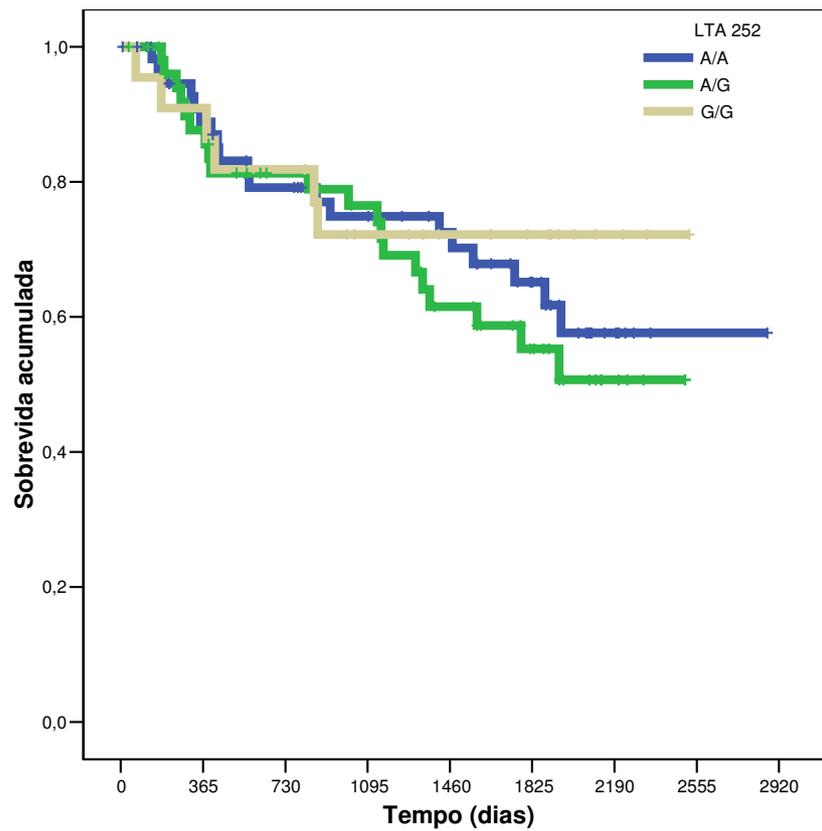


Figura 5.30 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético IL6 -174 G>C.



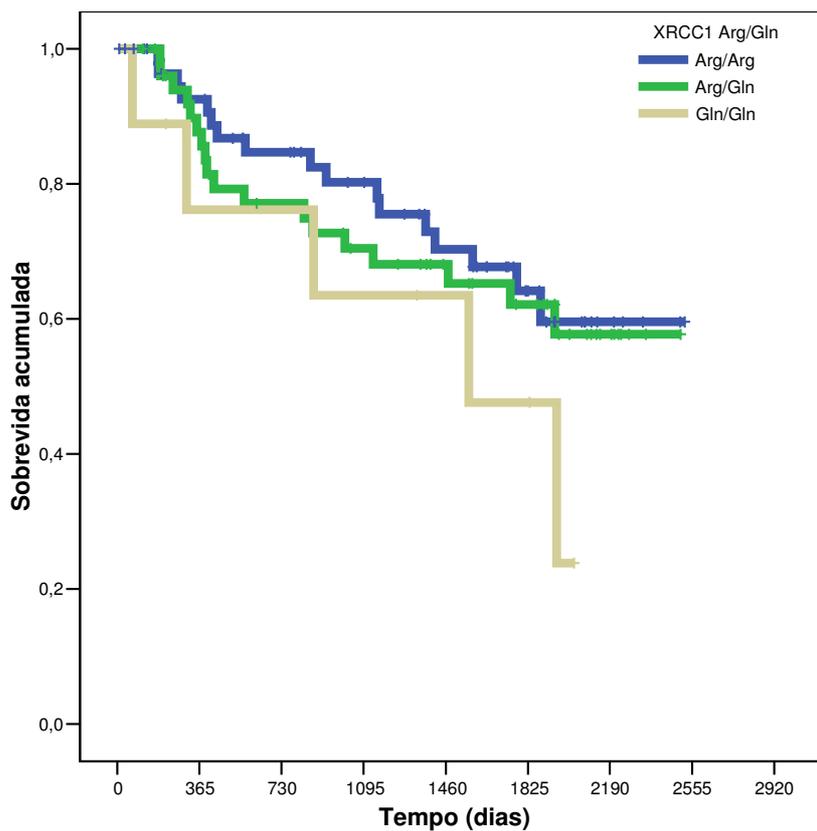
As frequências dos genótipos do gene LTA 252 não apresentam diferenças entre as curvas de sobrevida como se observa na **Figura 5.31**.

Figura 5.31 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético LTA 252 A>G (Intron 1).



As frequências dos genótipos do gene XRCC1 não apresentaram diferenças notáveis entre as curvas de sobrevida (**Figura 5.32**).

Figura 5.32 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida específica pela doença segundo a presença do polimorfismo genético XRCC1 Arg399Gln.



5.2.2.1 Regressão de Cox Univariada

A análise univariada revelou como variáveis estatisticamente significativas: sexo, consumo de álcool (g/L/dia), consumo de tabaco (maços-ano), estadiamento clínico e tratamento para tumor primário (tabelas **5.17** e **5.18**).

Tabela 5.17 - Modelo de regressão de Cox univariada para a sobrevida específica pela doença segundo as características demográficas e consumo de tabaco e álcool.

Variável	Hazard ratio (HR)	Intervalo com 95% de confiança	Valor p
Faixa etária (anos)			
≤50	1,0		0,93 [§]
51-60	0,5	0,23-1,06	
61-70	0,8	0,37-1,59	
>70	0,8	0,34-1,86	
Sexo			
Feminino	1,0		0,07 [¥]
Masculino	2,5	0,89-6,85	
Escolaridade (anos)			
Nenhuma	1,0		0,58 [§]
1-4	0,8	0,42-1,53	
5-8	0,7	0,31-1,64	
> 8	1,0	0,27-3,33	
Consumo de tabaco (maços/ano)			
Não fumante	1,0		0,03 [§]
≤ 20	1,5	0,19-11,65	
21-40	4,0	0,53-29,34	
41-59	2,5	0,32-19,78	
60 e mais	1,7	0,22-13,27	
Consumo de álcool (g/L/dia)			
Não consomem	1,0		<0,001 [§]
≤ 39	1,8	0,40-8,50	
40-79	3,6	0,73-17,99	
80-119	4,6	0,97-21,58	
120 e mais	6,7	1,60-28,28	

[¥] Valor p do teste log-rank

[§] Valor p de tendência

A chance de morrer por câncer de laringe é 2,5 vezes maior em homens comparado com o risco das mulheres. O consumo de álcool resultou significativa no teste de tendência, aqueles com consumo de álcool superior a 119 g/L/dia têm uma chance de morrer de quase sete vezes comparado com aqueles pacientes que não bebem (**Tabela 5.17**).

Tabela 5.18 - Modelo de regressão de Cox univariada para a sobrevida específica pela doença segundo estadiamento e tratamento para tumor primário.

Variável	Hazard ratio (HR)	Intervalo com 95% de confiança	Valor p
Estadiamento Clínico (EC)			
EC I – II	1,0		0,002 [‡]
EC III	1,9	0,79-4,47	
EC IV	3,5	1,64-7,28	
Tratamento para tumor primário			
Cirurgia, Cirurgia mais Radioterapia	1,0		0,09 [‡]
Radioterapia, Radioterapia mais Quimioterapia	1,9	0,99-3,72	
Outro tratamento	1,8	0,83-3,82	

[‡] Valor p do teste log-rank

Observa-se na **Tabela 5.18** que os pacientes com estadiamento clínico IV apresentaram pior sobrevida específica pela doença, com um risco de morrer de aproximadamente quatro vezes comparados com aqueles com estadiamento clínico I e II.

Pacientes submetidos à radioterapia ou radioterapia combinada com quimioterapia têm quase duas vezes mais chance de morrer que aqueles que foram submetidos à cirurgia ou cirurgia combinada com radioterapia. Pacientes submetidos a outros tratamentos têm 1,8 vezes maior chance de morrer por câncer de laringe que aqueles submetidos ao tratamento de referência (**Tabela 5.18**).

Os polimorfismos genéticos estudados não apresentaram *hazard ratios* estatisticamente significativos na sobrevida específica pela doença (**Tabela 5.19**).

Tabela 5.19 - Modelo de regressão de Cox univariada para a sobrevida específica pela doença segundo os polimorfismos genéticos.

Polimorfismos genéticos		Hazard ratio (HR)	Intervalo com 95% de confiança	Valor p [§]
MMP1 1607 1G/2G	1G/1G	1,0		
	1G/2G	1,0	0,42-2,11	0,88
	2G/2G	0,8	0,28-2,16	
	1G/2G ou 2G/2G	0,9	0,41-1,97	0,80
MMP1 -519 A>G⁷²	A/A	1,0		
	A/G	0,9	0,47-1,71	0,89
	G/G	1,1	0,42-3,03	
	A/G ou G/G	0,9	0,51-1,73	0,84
MMP3 -1171 (5A/6A)	5A/5A	1,0		
	5A/6A	0,8	0,34-1,97	0,49
	6A/6A	1,2	0,51-2,89	
	5A/6A ou 6A/6A	1,0	0,44-2,22	0,97
IL2 -384	G/G	1,0		
	G/T	1,0	0,42-2,49	0,88
	T/T	0,9	0,35-2,09	
	G/T ou T/T	0,9	0,41-2,12	0,87
IL2 114	G/G	1,0		
	G/T	1,3	0,66-2,48	0,74
	T/T	1,0	0,29-3,40	
	G/T ou T/T	1,2	0,65-2,34	0,52
IL6 -174 G>C	C/C	1,0		
	C/G	1,1	0,55-2,03	0,72
	G/G	0,6	0,14-2,46	
	C/G ou G/G	1,0	0,51-1,81	0,90
LTA 252 A>G (intron 1)	A/A	1,0		
	A/G	1,2	0,66-2,32	0,60
	G/G	0,8	0,32-2,02	
	A/G ou G/G	1,1	0,61-1,99	0,75
XRCC1 Arg399Gln	Arg/Arg	1,0		
	Arg/Gln	1,2	0,60-2,25	0,35
	Gln/Gln	2,1	0,76-5,59	
	Arg/Gln ou Gln/Gln	1,3	0,68-2,40	0,44

[§] Valor p do teste log-rank

5.2.2.2 Regressão de Cox Múltipla

A variável que resultou como fator prognóstico independente na sobrevida específica pela doença foi o estadiamento clínico. Os polimorfismos genéticos considerados no modelo final como fatores de ajuste foram o IL6 -174 e MMP1 1607. Pacientes com estadiamento clínico IV têm quase cinco vezes mais chance de morrer por câncer de laringe que pacientes com estadiamento clínico I e II. O comportamento dos polimorfismos genéticos apresentados neste modelo tiveram somente a função de ajuste na estimação dos *hazard ratios* da variável estadiamento clínico (**Tabela 5.20**).

Tabela 5.20 - Modelo de regressão de Cox final para a sobrevida específica pela doença.

Variável	Hazard ratio bruto (HR_{bruto})	Hazard ratio ajustado (HR_{aj})	Intervalo com 95% de confiança
Estadiamento Clínico (EC)			
EC I – II	1,0		
EC III	1,9	3,1	0,83-11,48
EC IV	3,5	4,7	1,38-16,25
IL6 -174			
C/C	1,0		
C/G	1,1	1,2	0,55-2,38
G/G	0,6	0,9	0,19-3,88
MMP1 1607			
1G/1G	1,0		
1G/2G	1,0	1,0	0,40-2,33
2G/2G	0,8	0,8	0,24-2,29

6 DISCUSSÃO

A sobrevida global dos pacientes com tumores de laringe deste estudo após cinco anos de acompanhamento foi de 53,3% e a sobrevida específica pela doença em cinco anos 62,7%. A perda de acompanhamento dos casos limitou a análise de sobrevida devido à censura desses eventos (não foram localizados 25% dos pacientes da coorte).

As variáveis consumo de tabaco e álcool não resultaram relacionadas à mortalidade específica pela doença. Portanto, embora sejam variáveis importantes na etiologia dos tumores de laringe, não foram determinantes na sobrevida dos pacientes. Estudos que identificaram um papel prognóstico na sobrevida dos pacientes com tumores de laringe são encontrados na literatura (BOFFETTA et al., 1997; DIKSHIT et al., 2005). Todavia, outros estudos não observaram tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas como fatores prognósticos para tumores de laringe (LASSALETTA et al., 2001; THARIAT et al., 2004).

A escolha do tratamento para os pacientes com câncer de laringe é variada, incluindo tratamentos combinados de cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Quando comparados os pacientes que foram submetidos exclusivamente à cirurgia ou cirurgia combinada à radioterapia e aqueles submetidos a outros tratamentos, notou-se que os pacientes que receberam exclusivamente a radioterapia ou a radioterapia combinada com quimioterapia ou qualquer outro tratamento que não cirurgia apresentaram pior sobrevida por câncer de laringe. AYACHE et al. (2005) também observaram que a cirurgia resultou em melhor sobrevida em um grupo de 356 pacientes com tumores de laringe de Somme, França.

O estadiamento clínico IV foi um fator para a piora da sobrevida específica pela doença quando comparado aos pacientes com estadiamentos clínicos I e II. Esta observação está em paralelo ao identificado em outros estudos de que pacientes com estadiamento clínico mais avançado (presença de linfonodos e metástases à distância) têm um pior prognóstico (BOFFETTA et al., 1997; LASSALETTA et al., 2001 e SANABRIA et al., 2007).

Os polimorfismos genéticos analisados na regressão de Cox univariada não resultaram em efeitos estatisticamente significativos na sobrevida global e sobrevida específica de pacientes com tumores de laringe. Na análise conjunta dos polimorfismos genéticos, nenhum contribuiu de forma independente na sobrevida global ou na sobrevida específica pela doença.

A limitação da análise dos polimorfismos genéticos decorreu da falha de genotipagem para muitos pacientes da coorte, consequência de material biológico (DNA) inadequado. As frequências dos haplótipos, resultado das combinações dos polimorfismos, também foram apresentadas, mas o número reduzido de casos não permitiu a análise dos efeitos na sobrevida dos pacientes (**Tabelas 5.8 e 5.9**).

Estudos sobre o papel dos polimorfismos genéticos como fatores etiológicos para o câncer de laringe são encontrados na literatura, mas estudos sobre a relação dos polimorfismos genéticos com a sobrevida desses pacientes são raros.

Por exemplo, os polimorfismos de MMP1 e MMP3 têm sido estudados como fatores de risco para câncer de cabeça e pescoço. Em estudo caso-controle realizado no Japão, revelou-se que o MMP1 é fator de risco para câncer de cabeça e pescoço, mas com respeito ao polimorfismo MMP3 os autores não encontraram diferenças significativas (HASHIMOTO et al., 2004). O-CHAROENRAT et al. (2006), em

estudo caso-controle conduzido na Tailândia, também identificaram o polimorfismo genético do MMP1 como fator de risco para pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

Em relação a estudos prognósticos, a interleucina IL6 foi estudada por TARTOUR et al. (1997) como fator de risco para aparecimento de recidiva loco-regional em pacientes com tumores de cabeça e pescoço, mas não foi identificado nenhum efeito dos polimorfismos do IL6 em relação a recorrência do tumor. WANG et al. (2002) não identificaram os polimorfismos de IL6 como fatores de influência para a sobrevida dos pacientes com câncer oral.

Os polimorfismos genéticos relacionados à função reparadora do DNA, XRCC1, foram investigados por meio de estudos caso-controle por DEMOKAN et al. (2005) e HUANG et al. (2005) e ambos não encontraram os polimorfismos genéticos desse gene como fator de risco ou proteção para tumores de cabeça e pescoço.

Os resultados deste estudo revelaram que o polimorfismo genético do gene MMP3 -1171 modifica o *hazard ratio* do consumo excessivo de álcool na sobrevida global, diminuindo a sobrevida dos pacientes. Observou-se também que os polimorfismos genéticos IL6 -174 e MMP1 1607 alteram o efeito do estadiamento clínico IV, diminuindo a sobrevida específica pela doença.

Este estudo, embora exploratório, não conseguiu identificar o comportamento dos polimorfismos genéticos relacionados com a sobrevida dos pacientes com carcinoma epidermóide de laringe. Outros estudos com maiores amostras devem ser realizados para confirmar esses resultados.

7 CONCLUSÕES

- Os polimorfismos genéticos estudados (MMP1 1607 1G/2G, MMP1 -519 A>G⁷², MMP3 -1171 (5A/6A), IL2 -384, IL2 114, IL6 -174 G>C, LTA 252 A>G e XRCC1 Arg399Gln) não apresentaram efeitos com significância estatística na sobrevida global ou sobrevida específica nos tumores de laringe, quando analisados isoladamente.
- Na sobrevida global, o consumo excessivo de álcool resultou em piora da sobrevida dos pacientes. O valor do *hazard ratio* aumentou na presença do polimorfismo genético MMP3 -1171.
- Na sobrevida específica pela doença, o estadiamento clínico IV resultou em pior sobrevida na presença dos polimorfismos genéticos IL6 -174 e MMP1 1607 (1G/2G).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almadori G, Cadoni G, Cattani P, Posteraro P, Scarano E, Ottaviani F, Paludetti G, Maurizi M. Detection of Human Papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinoma by polymerase chain reaction. *European Journal of Cancer* 1996; 32A:783-788.

Ayache S. Therapeutic management of laryngeal cancer. Results of a study of 356 patients from the Cancer Registry of the Somme, France. *Acta Oto-Laryngologica* 2005; 125:1323-1326.

Berwick MA, Conlon MSC, Lafrenie RM. Polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and CCND1 and survival after treatment for metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24:5645-5651.

Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and Cancer. *The Lancet Oncology* 2006; 7:149-156.

Boffetta P, Merletti F, Faggiano F, Migliaretti G, Ferro G, Zanetti R, Terracini B. Prognostic factors and survival of laryngeal cancer patients from Turi, Italy: a population-based study. *American Journal of Epidemiology* 1997; 145: 1100-1105.

Brasil. Ministério de Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância – Conprev. Atlas de Mortalidade por Câncer no Brasil 1979-1999. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

Brown LM. Epidemiology of alcohol-associated cancers. *Alcohol* 2005; 35:161-168.

Cao Y, Miao XP, Huang MY, Deng L, Hu LF, Ernberg I, Zeng YX, Lin DX, Shau JY. Polymorphisms of XRCC1 genes and risk of nasopharyngeal carcinoma in the Cantonese population. *BMC Cancer* 2006; 6:167. Disponível em formato eletrônico em <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/6/167>.

Carvalho MS, Andreozzi VL, Codeço CT. *Análise de Sobrevida: Teoria e aplicações em saúde*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2005.

Cattaruzza MS, Maisonneuve P, Boyle P. Epidemiology of laryngeal cancer. *European Journal of Cancer Part B Oral Oncology* 1996; 32B:293-305.

Clayman GL, Stewart MG, Weber RS, El-Naggar AK, Grimm EA. Human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. Relationship to survival. *Archives of Otolaryngology – Head & Neck Surgery* 1994; 120:743-748.

Dahlstrom KP, Adler-Storthz K, Etzel CJ, Liu Z, Dillon L, El-Naggar AK, Spitz MR, Schiller JT, Wei Q, Stugis EM. Human Papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: A matched pair analysis. *Clinical Cancer Research* 2003; 9:2620-2626.

Demokan S, Demir D, Suoglu Y, Kiyak E, Akar U, Dalay N. Polymorphisms of the XRCC1 DNA repair gene in head and neck cancer. *Pathology Oncology Research* 2005; 11:22-25.

Dikshit RP, Boffeta P, Bouchardy C, Merletti F, Crosignani P, Cuchi T, Andarraz E, Brennan P. Lifestyle habits as prognostic factors in survival of laryngeal and hypopharyngeal cancer: A multicentric European study. *International Journal of Cancer* 2005; 117:992-995.

Gabay C, Kushner I. Mechanisms of disease: acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England Journal of Medicine* 1999; 340:448-454.

Gajecka M, Rydzanicz M, Jaskula-Sztul R, Kujawski M, Szyfter W, Szyfter K. CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, NAT2, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms or their combinations are associated with the increased risk of the laryngeal squamous cell carcinoma. *Mutation Research* 2005; 574:112-123.

Geisler SA, Olshan AF, Cai J, Weissler M, Smith J, Bell D. Glutathione S-transferase polymorphisms and survival from head and neck cancer. *Head & Neck* 2005; 27:232-242.

Ghilardi G, Biondi ML, Caputo M, Leviti S, DeMonti M, Guagnellini E, Scorza R. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 promoter enhances breast cancer susceptibility. *Clinical Cancer Research* 2002; 8:3820-3823.

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, Berthiller J, Boffeta P. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Journal of the National Cancer Institute* 2007; 99:777-789.

Hashimoto T, Uchida K, Okayama N, Imate Y, Suchiro Y, Hamanaka Y, Ueyama Y, Shinozaki F, Yamashita H, Hinoda Y. Association of matrix metalloproteinase (MMP)-1 promoter polymorphism with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Letters* 2004; 211:19-24.

Hu Z, Ma H, Chen F, Wei Q, Shen H. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2005; 14:1810-1818.

Huang WY, Olshan AF, Schwartz SM, Berndt SI, Chen C, Llaca V, Chanock SJ, Fraumeni Jr JF, Hayes RB. Selected genetic polymorphisms in MGMT, XRCC1, XPD, and XRCC3 and risk of head and neck cancer: a pooled analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2005; 14: 1747-1753.

Impola U, Uitto VJ, Hietanen J, Hakkinen L, Zhang L, Larjava H, Isaka K, Saarialho-Kere U. Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *Journal of Pathology* 2004; 202:14-22.

Jahnke V, Matthias C, Fryer A, Strange R. Glutathione S-transferase and Cytochrome-P-450 polymorphism as risk factors for squamous cell carcinoma of the larynx. *American Journal of Surgery* 1996; 172:671-673.

Johansen LV, Grau C, Overgaard J. Laryngeal carcinoma: multivariate analysis of prognosis factors in 1252 consecutive patients treated with primary radiotherapy. *Acta Oncologica* 2003; 42:771-778.

Jourenkova-Mironova N, Voho A, Bouchardy C, Wikman H, Dayer P, Benhamou S, Hirnoven A. Glutathione S-transferase GSTM3 and GSTP1 genotypes and larynx cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1999; 8: 185-188.

Lassaletta L, García-Pallarés M, Morera E, Bernáldez R, Gavilan J. T3 glottic cancer: oncologic results and prognosis factors. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery* 2001; 124:556-560.

Manjarrez ME, Ocadiz R, Valle L, Pacheco C, Marroquin A, De la Torre C, Selman M, Gariglio P. Detection of Human Papillomavirus and relevant tumor suppressors and oncoproteins in laryngeal tumors. *Clinical Cancer Research* 2006; 12:6946-6951.

Monteiro E, Varzim G, Pires AM, Teixeira M, Lopes C. Cyclin D1 A870G polymorphism and amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: implications of tumor localization and tobacco exposure. *Cancer Detection and Prevention* 2004; 28: 237-243.

Morshed K, Korobowicz E, Szymanski M, Skomra D, Goabek W. Immunohistochemical demonstration of multiple HPV types in laryngeal squamous cell carcinoma. *European Archives of Otorhinolaryngologia* 2005; 262:917-920.

O-charoenrat P, Leksrisakul P, Sangruchi S. A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 gene promoter is associated with susceptibility and aggressiveness of head and neck cancer. *International Journal of Cancer* 2006; 118:2548-2553.

Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000; 9:185-191.

Organização Mundial de Saúde. CID-10 Tradução Centro Colaborador da OMS para a Classificação de Doenças em Português. 5ª Edição – São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1997.

Organização Mundial de Saúde. CID-O Tradução Fundação Oncocentro de São Paulo. 3ª Edição – São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1996.

Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer: an association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 1997; 79:595-604.

Pintos J, Franco EL, Black MJ, Bergeron J, Arella M. Human Papillomavirus and prognoses of patients with cancer of the upper aerodigestive tract. *Cancer* 1999; 85:1903-1909.

Quintela-Fandino M, Hitt R, Medina PP, Gamarra S, Manso L, Cortes-Funes H, Sanchez-Céspedes M. DNA repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome among patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based induction chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24:4333-4339.

Rodrigo JP, García LA, Ramos S, Lazo PS, Suárez C. EMS1 gene amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 3177-3182.

Rodrigo JP, González MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, Alvarez I, García LA, Suárez C. Genetic alterations in squamous cell carcinomas of the hypopharynx with correlations to clinicopathological features. *Oral Oncology* 2002; 38: 357-363.

Rodriguez Céspedes WA. Neoplasias malignas de cabeza y cuello. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Fondo Editorial, 2000.

Sajid M, Vijayan KV, Souza S, Bray PF. PIA polymorphism of integrin beta 3 differentially modulates cellular migration on extracellular matrix proteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2002; 22:1984-1989.

Sanabria A, Carvalho AL, Vartanian JG, Magrin J, Ikeda MK, Kowalski LP. Comorbidity is a prognostic factor in elderly patients with head and neck cancer. *Annals of Surgical Oncology* 2007; in press.

Sas-Korczynska B, Korzeniowski S, Skolyszewski J. Cancer of the larynx in females. *Cancer Radiothérapie* 2003; 7:380-385.

Smith GD, Ebrahim S. "Mendelian randomization": can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *International Journal of Epidemiology* 2003; 32:1-22.

Snijders PJF, Scholes AGM, Hart CA, Jones AS, Vaughan ED, Woolgar JA, Meijer CJLM, Walboomers JMM, Field JK. Prevalence of mucosotropic human papillomaviruses in squamous cell carcinomas of the head and neck. *International Journal of Cancer* 1996; 66:464-469.

Stewart BW, Kleihues P. (Eds): *World Cancer Report*. IARC Press. Lyon 2003.

Szládek G, Juhász A, Kardos G, Szoke K, Major T, Sziklai I, Tar I, Márton I, Kónya J, Gergely L, Szarka K. High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. *Journal of Clinical Pathology* 2005; 58:402-405.

Tartour E, Deneux L, Mosseri V, Jaulerry C, Brunin F, Point D, Validire P, Dubray B, Fridman WH, Rodriguez J. Soluble interleukin-2 receptor serum level as a predictor of locoregional control and survival for patients with head and neck carcinoma: results of a multivariate prospective study. *Cancer* 1997; 79:1401-1408.

Thariat J, Bruchon Y, Bonnetain F, Barillot I, Truc G, Peignaux K, Horiot JC, Maingon P. Conservative treatment of early glottic carcinomas with exclusive radiotherapy. *Cancer Radiothérapie* 2004; 8:288-296.

Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matriz metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncology* 1999; 35:227-233.

Tuma RS. Narrowing the field: identifying ways to improve SNP association studies. *Journal of the National Cancer Institute* 2004; 96:94-95.

Wang YF, Chang SY, Tai SK, Li WY, Wang LS. Clinical significance of interleukin-6 and interleukin-6 receptor expressions in oral squamous cell carcinoma. *Head & Neck* 2002; 24:850-858.

Wünsch Filho V. The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. *São Paulo Medical Journal* 2004; 122:188-194.

Wünsch Filho V, Zago MA. Modern cancer epidemiological research: genetic polymorphisms and environment. *Revista de Saúde Pública* 2005; 39:490-497.

Yang M, Kang MJ, Choi Y, Kim CS, Lee SM, Park CW, Lee HS, Tae K. Associations between XPC expression, genotype, and the risk of head and neck cancer. *Environmental and molecular mutagenesis* 2005; 45:374-379.

Yorioka CW, Coletta RD, Alves F, Nishimoto IN, Kowalski LP, Graner E. Matrix metalloproteinase-2 and 9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients. *International Journal of Oncology* 2002; 20:189-194.

Anexo 1

Hospitais e instituições participantes nos diferentes centros do Estudo Multicêntrico Latino-americano de Fatores Ambientais, Vírus e Câncer de Cavidade Oral e Laringe

1. Buenos Aires (Argentina)

Hospital de Oncologia Angel H. Roffo da Universidad de Buenos Aires (casos)

Hospital Municipal Maria Curie (casos)

Hospital Pirovano (casos e controles)

2. Havana (Cuba)

Hospital Calixto Garcia (controles)

Hospital Comandante Manuel Fajardo (controles)

Hospital Ortopédico Fructuoso Rodriguez (controles)

Instituto de Neurologia (controles)

Instituto Nacional de Oncologia e Radiobiologia (casos e controles)

3. Goiânia (Brasil)

Hospital Araújo Jorge (casos)

Hospital de Urgências de Goiânia (controles)

Hospital Geral de Goiânia (controles)

4. Pelotas (Brasil)

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (casos e controles)

Hospital da Beneficência Portuguesa (casos e controles)

Hospital Escola da Fundação Universitária de Rio Grande (casos e controles)

Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas (casos e controles)

Hospital Miguel Piltcher (casos e controles)

Santa Casa de Misericórdia de Pelotas (casos e controles)

5. Porto Alegre (Brasil)

Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (casos e controles)

Hospital Nossa Senhora da Conceição (casos e controles)

Hospital Santa Rita da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (casos e controles)

6. Rio de Janeiro (Brasil)

Hospital do Câncer (HC1) do Instituto Nacional do Câncer (casos)

Hospital Municipal Souza Aguiar (controles)

Instituto Nacional do Traumatismo-Ortopedia (controles)

7. São Paulo (Brasil)

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (casos e controles)

Hospital do Câncer ACCamargo (casos)

Hospital do Servidor Público Estadual (casos e controles)

Hospital Heliópolis (casos e controles)

Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo (casos e controles)

Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho (casos)

Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (casos e controles)

Anexo 2

**Questionário aplicado aos pacientes participantes do Estudo
Multicêntrico Latino-americano de Fatores Ambientais, Vírus e
Doenças da Cavidade Oral e Laringe**

Anexo 3**Termo de consentimento livre e esclarecido do Estudo Multicêntrico
Latino-americano de Fatores Ambientais, Vírus e Doenças da
Cavidade Oral e Laringe**

Anexo 4

Formulário Prontuário

FORMULÁRIO “PRONTUÁRIOQ1 N^o identificação: _____**Bloco I – Identificação e data do levantamento**

Q2 Data da coleta da informação:/...../.....

Q3 Nome do pesquisador:

Bloco II – Informações gerais (banco de dados do projeto multicêntrico)Q4 N^o do prontuário:..... Q5 Hospital:

Q6 Nome:..... Q7 Data da admissão:/...../.....

Q8 Sexo: () M () F Q9 Data de nascimento:/...../.....

Q10 CID 10..... Q11 TNM.....

Bloco III – Informações sobre o prontuário e do serviço social do hospital

Q12 () Prontuário localizado e adequado para consulta

Q13 () Prontuário localizado e inadequado para consulta;

Q14 motivo:.....

Q15 () Prontuário inacessível temporariamente;

Q16 motivo:.....

Q17 () Prontuário inacessível definitivamente;

Q18 motivo:.....

Telefones e/ou endereços do pacienteQ19 1^o End.....

Q20 Tel.....

Q21 2^o End.....

Q22 Tel.....

Bloco IV – Informações gerais do paciente contidas no prontuário

Q23 Nome do paciente:

.....

Q24 Nome da mãe:

.....

Q25 Data de nascimento do paciente:/...../.....

Bloco V – Informações sobre o estado do paciente

Q26 () Sem evidência de doença (alta)	Q27 data...../...../.....
Q28 () Recidiva (ver bloco VII)	
Q29 () Metástase (ver bloco VIII)	
Q30 () 2º tumor primário (ver bloco IX)	
Q31 () Óbito (ver bloco X)	
Q32 () Tratamento paliativo	Q33 data...../...../.....
Q34 () Não compareceu	Q35 data da última informação...../...../.....

Bloco VI – Informações sobre o tumor principal e tratamento

Q36 CID 10.....		Q37 TNM.....	
Tratamento realizado			
Q38 <u>Cirurgia</u>	() sim	() não	Q39 Data...../...../.....
Q40 Tipo	() radical	() resgate	() paliativa () sem informação
Q41 <u>Radioterapia</u>	() sim	() não	
Q42 Data início	Q43 Data fim		
Q44 Tipo:	Q45 Dose:		
Q46 <u>Quimioterapia</u>	() sim	() não	
Q47 Tipo	() poliquimioterapia	() monoquimioterapia	() sem informação
Q48 Data início	Q49 Data fim		
Q50 Houve parada no tratamento?	() sim	() não	() sem informação
Q51 Por quanto tempo?			

Bloco VII – Recidiva**Especificar localização (topografia)**

Q52 () Recidiva local Q53 data...../...../.....

Q54 () Recidiva Reg (pescoço) **Q55 – CID 10**:..... Q56 data...../...../.....

Q57 Diagnóstico () anatomopatológico () imagem () critérios clínicos

Tratamento realizadoQ58 Cirurgia () sim () não Q59 Se sim, data...../...../.....

Q60 Tipo: () radical () resgate () paliativa () sem informação

Q61 Radioterapia () sim () não

Q62 Se sim, data início/...../..... Q63 data fim/...../.....

Q64 Tipo: Q65 Dose:

Q66 Quimioterapia () sim () não

Q67 Tipo: () poliquimioterapia () monoquimioterapia () sem informação

Q68 Se sim, data início/...../..... Q69 data fim/...../.....

Bloco VIII – Metástases**Especificar localização (topografia)**Q70 () SNC **Q71 CID 10**:..... Q72 - data:...../...../.....Q73 () Pulmão **Q74 CID 10**:..... Q75 - data:...../...../.....Q76 () Fígado **Q77 CID 10**:..... Q78 - data:...../...../.....Q79 () Ossos **Q80 CID 10**:..... Q81 - data:...../...../.....Q82 () Outro órgão:.....**Q83 CID 10**:..... Q84 data:/...../.....**Tratamento realizado**Q85 Cirurgia () sim () não Q86 Se sim, data...../...../.....Q87 Radioterapia () sim () não

Q88 Se sim, data início/...../..... Q89 data fim/...../.....

Q90 Se sim, tipo: Q91 Se sim, dose:

Q92 Quimioterapia () sim () não

Q93 Se sim, data início/...../..... Q94 data fim/...../.....

Bloco XI – Perda de acompanhamento/Transferência

Q145 Perda de acompanhamento: () Sim () Não

Q146 Transferência: () Sim () Não () Sem informação

Se sim,

Q147 Instituição:.....

Q148 Cidade:..... Q149 Estado:

.....

Bloco XII – Comorbidades associadas

Q150 Que outras doenças apresenta o paciente?

() Hipertensão arterial

() Diabete

() HIV

() Outros, Especificar:

.....

Observações gerais

Anexo 5

Polimorfismos genéticos seleccionados

Descrição dos Polimorfismos genéticos selecionados

Símbolo do gene	Polimorfismos	Fragmento (bp)	Significância da função do polimorfismo	Nº de polimorfismos a serem estudados
Atividade: Invasão e metástase				
MMP1	1607 1G/2G; -519A>G ⁷²	121 pb; 62 bp	É uma das colagenases intersticiais envolvidas na invasão e metástase. O polimorfismo afeta o promotor. Tem sido associado com a incidência de invasão em vários tipos de câncer. O alelo 2G tem maior atividade na transcrição.	2
MMP3	-1171 (5A/6A)	87 bp	Causa elevação do nível de transcrição e da expressão local do MMP3.	1
Atividade: Inflamação				
Interleucina 2	-384; 114	127bp; 105 bp	Alteração da resposta inflamatória.	2
Interleucina 6	-174G>C	92 bp	Alteração da resposta inflamatória.	1
LTA	252 ^A >G (intron 1)	73 bp	Alteração da resposta inflamatória. Promove a expressão enzimática. Alguns alelos inibem a tumorigênese em cânceres de mama e cabeça e pescoço.	1
Atividade: Reparo do DNA				
XRCC1	Arg399Gln	74 bp	Alteração na capacidade do DNA reparador. Associado com câncer de mama.	1
TOTAL				8

Anexo 6***Primers* do PCR usados para análise dos polimorfismos genéticos**

Primers do PCR usados para análise dos polimorfismos genéticos

Gene	Polimorfismo genético	Primer forward	Primer reverso (Fragmento)
MMP1	1607 1G/2G	5'-ACATGTTATGCCACTTAGATGAGGAAA-3'	5'-GCGTCAAGACTGATATCTTACTCATAAAACAATA-3' (121 bp)
MMP1	-519A>G ⁷²	5'-GGGAAGCCATGGTGCTATCG-3'	5'-AGGTTCCCTTCTGCCTTTGTTAAG-3' (62 bp)
MMP3	-1171 (5A/6A)	5'-TCAAATGTGGCCAAATATTTCCCTGTA-3'	5'-ATTCTATGGTTCCTCCATTCCTTTGATGG-3' (87 bp)
IL2	-384	5'-GCTCTTGTGCCACCACAATATGCTAT-3'	5'-GCCTTCTGTATGAAAACAGTTTTTCCCT-3' (127 bp)
IL2	114	5'-TGCACCTACTTCAAAGTTCTACAAAGAA-3'	5'-AAAGGAAATA TACTTACATTAATTCCATTCAAAATCATCTG-3' (105 bp)
IL6	-174G>C	5'-GACGACCTAAGCTGCACTTTTC-3'	5'-GGGCTGATTGGAACCTTATTAAGATTG-3'
LTA	252A>G	5'-CAGTCTCATTGTCTCTGTCCACACAT-3'	5'-AGAGAGAGACAGGAAAGGAAACAG-3'
XRCC1	Arg/399Gln	5'-GTGGGTGCTGGACTGTCA-3'	5'-GCAGGGTTGGCGGTGTGA-3'

Anexo 7

TNM AJC-UICC, revisão de 1997

Classificação Clínica

T	Tumor primário
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ

Supraglote

T1	Tumor limitado a uma sub-região da supraglote, com mobilidade normal da corda vocal.
T2	Tumor invade a mucosa de mais de um subsítio adjacente da supraglote ou glote ou região fora da supraglote (p.ex.: mucosa da base da língua, valécula, parede medial do seio piriforme) sem fixação da laringe (Tumor invade mais do que uma sub-região anatômica da supraglote ou glote, com mobilidade normal da corda vocal).
T3	Tumor limitado à laringe com fixação da corda vocal ou invasão de área pós-cricóide, pré-epiglóticos ou tecidos profundos da base de língua (Tumor limitado à laringe, com fixação da corda vocal e/ou invasão da área pós-cricóide, parede medial do seio piriforme ou tecidos pré-epiglóticos).
T4	Tumor invade a cartilagem tireóide e/ou se estende além nos tecidos vizinhos do pescoço, tireóide e/ou esôfago (Tumor invade a cartilagem tireóidea e/ou estende-se a outros tecidos além da laringe, por ex., orofaringe e partes moles do pescoço).

Glote

T1	Tumor limitado à(s) corda(s) vocal(is) (pode estender-se à comissura anterior). T1a Tumor limitado a uma corda vocal T1b Tumor comprometendo ambas cordas vocais
T2	Tumor estende-se à supraglote, e/ou com mobilidade diminuída da corda vocal.
T3	Tumor estende-se à supraglote e/ou subglote, e/ou com mobilidade diminuída da corda vocal.
T4	Tumor invade a cartilagem tireóide e/ou estende-se para os outros tecidos além da laringe (por ex.: para a orofaringe, partes moles do pescoço).

Subglote

- T1 Tumor limitado à subglote
 T2 Tumor estende-se à(s) corda(s) vocal(is) com mobilidade normal ou diminuída.
 T3 Tumor limitado à laringe com fixação de corda vocal.
 T4 Tumor invade a cartilagem cricóide ou tireóide e/ou estende-se para os outros tecidos além da laringe (por ex.: para a orofaringe, partes moles do pescoço).

- N Linfonodos regionais
 N0 Ausência de linfonodo clinicamente metastático
 N1 LN<3cm, único
 N2a LN, único ipsilateral, entre 3 e 6 cm
 N2b LN, múltiplos ipsilaterais, menores do que 6cm
 N2c LN contralaterais ou bilaterais, menores do que 6cm
 N3 LN>6cm

- M Metástase à distância
 M0 Ausência de metástase à distância
 M1 Presença de metástase à distância

Estadiamento clínico

Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1,T2,T3	N1	M0
Estadio IVa	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	Qualquer T	N2	M0
Estadio IVb	Qualquer T	N3	M0
Estadio IVc	Qualquer T	Qualquer N	M1

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)