

LUÍS CARLOS STOEBERL

**PRESENÇA DA PROTEÍNA p53 EM CARCINOMAS
EPIDERMÓIDES DE CABEÇA E PESCOÇO:
CORRELAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMPLICAÇÃO
PROGNÓSTICA EM 31 CASOS**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina, para a
obtenção de grau de Mestre no Curso de
Pós-graduação em Ciências Médicas.**

**Coordenador do Curso: Prof. Dr. Armando D'Acampora
Orientador: Prof. Dr. Jovino dos Santos Ferreira
Co-orientador: Dr. Antônio Carlos Scaramello**

**FLORIANÓPOLIS - SC
2002**

Stoeberl, Luís Carlos.

Presença da proteína p53 em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço: correlação histopatológica e implicação prognostica em 31 casos. Luís Carlos Stoeberl. - Florianópolis, 2002.

37p.

Orientador: Jovino dos Santos Ferreira

Co-Orientador: Antônio Carlos Scaramello

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina.

Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

1. Genes p53.
2. Neoplasias de cabeça e pescoço.
3. Prognóstico.
4. Imunohistoquímica;
5. Carcinomas Epidermóides.

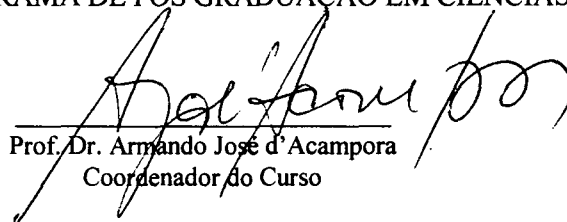


Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Mestrado em Ciências Médicas

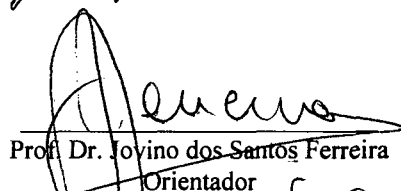

LUIS CARLOS STOEBERL

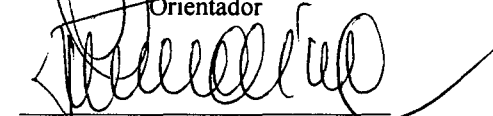
ESSA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS

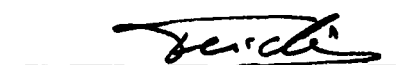
COM ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA E APROVADA EM SUA
FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

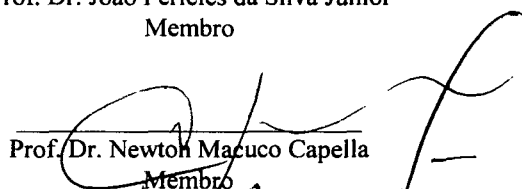

Prof. Dr. Armando José d'Acampora
Coordenador do Curso

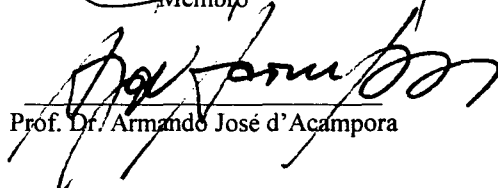
Banca Examinadora:


Prof. Dr. Jovino dos Santos Ferreira
Orientador


Prof. Dr. Fernando Medina da Cunha
Membro


Prof. Dr. João Pércles da Silva Júnior
Membro


Prof. Dr. Newton Macuco Capella
Membro


Prof. Dr. Armando José d'Acampora

Florianópolis, 24 de maio de 2002.



*“Não me deixe rezar por proteção
contra os perigos, mas pelo destemor em
enfrentá-los.*

*Não me deixe implorar pelo alívio da
dor, mas pela coragem em vencê-la.*

*Não me deixe procurar aliados na
batalha da vida, mas a minha própria
força.*

*Não me deixe suplicar com temor
aflito para ser salvo, mas esperar paciência
para merecer a liberdade.*

*Não me permita ser covarde, sentindo
sua clemência apenas no meu êxito, mas
me deixe sentir a força de sua mão quando
eu cair”.*

Rabindranath Tagore
Colhendo Frutos

AGRADECIMENTOS

A Leila Maciel da Costa, minha noiva, pela compreensão e cumplicidade de idéias que contribuíram em muito para a finalização deste trabalho.

Aos meus pais, que são os grandes incentivadores de minha carreira médica e eterna fonte de apoio.

Ao meu orientador, Dr. Jovino dos Santos Ferreira, pela disponibilidade, paciência, amizade e pela oportunidade proporcionada para a iniciação científica.

Ao Dr. Antônio Carlos Scaramello, co-orientador, amigo e conselheiro.

Ao meu colega de trabalho, oncologista Dr. Marcus Eduardo Müller, sempre disponível para orientar e tratar meus pacientes nos momentos de minha ausência.

Ao Dr. Carlos Bacchi e Dr. Hercílio Fronza pela sua importante participação na avaliação histopatológica dos casos estudados.

Ao Dr. Ricardo Polli, radioterapeuta do Hospital Municipal São José de Joinville, que criou as condições para obtenção do material de pesquisa do Serviço de Oncologia do referido hospital.

À equipe de funcionários da Oncoclínica Jaraguá, pelos momentos de amizade, incentivo e auxílio de pesquisa e digitação.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
SUMMARY	vii
INTRODUÇÃO	8
OBJETIVO.....	12
MÉTODO	13
RESULTADOS	17
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS	32
NORMAS ADOTADAS.....	36
APÊNDICE.....	37

RESUMO

Introdução: A mutação do gene p53 é a alteração genética mais freqüentemente detectada em tumores de cabeça e pescoço, sendo fundamental em sua carcinogênese. Porém, o significado clínico e a correlação histopatológica desta alteração ainda não foram elucidados.

Objetivo: Estudar a taxa de expressão da proteína p53 no serviço de Oncologia do Hospital Municipal São José de Joinville/SC e seu significado prognóstico e correlação histopatológica.

Método: Realizou-se, em 31 casos de tumores da região de cabeça e pescoço, um estudo tipo coorte retrospectivo, entre agosto de 1996 e agosto de 1997, do serviço de Oncologia do Hospital Municipal São José de Joinville/SC. A mutação do gene p53 foi pesquisada através da expressão da proteína p53 por imunohistoquímica em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.

Resultados: A expressão da proteína p53 foi encontrada em 74,2% dos casos. Utilizando-se o teste exato de Fisher não se detectou correlação entre a presença de p53 e a graduação histopatológica (WHO), com $p > 0,05$. Considerando-se os pacientes em estadio III e IV, a sobrevida global média do grupo p53 positivo foi de 11,87 meses, já nos pacientes p53 negativo foi de 30,28 meses, diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,005$. A sobrevida média em 02 anos também foi melhor em pacientes p53 negativos (57,1% vs 6,25%), com valor de $p = 0,006$.

Conclusão: a taxa da expressão de p53 neste estudo foi de 74,2%, sem estabelecer-se correlação entre a presença da proteína p53 e a graduação histopatológica. A expressão da proteína p53 em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço parece influenciar a sobrevida global, porém estudos com maior número de casos e controle de variáveis como graduação histopatológica e modalidades de tratamento são necessários.

Palavras-Chaves: Genes p53; Neoplasias de cabeça e pescoço; Prognóstico; Imunohistoquímica; Carcinomas epidermóides.

SUMMARY

Introduction: p53 gene mutation is the most frequent genetic disturb in head and neck cancer with an important role in carcinogenesis. However, the clinical relevance and histopathological correlation of this alteration is not clear.

Objective: To study the rate of p53 protein expression in the Oncology Unit of São José Hospital in Joinville/SC, its prognostic and histopathological correlation.

Method: It was a retrospective coorte study, where we analysed 31 cases of head and neck tumors from August 1996 to August 1997. The cases were treated at São José Hospital in Joinville/SC. p53 mutation was indirectly searched through the hiperexpression of p53 protein with immunohistochemical analysis in head and neck squamous cell carcinomas.

Results: The rate of p53 hiperexpression was 74,2%. We could not detect any correlation between p53 protein expression and histopathological grading (WHO) using Fishers' exact test ($p>0,05$). In the group of patients with clinical stage III and IV, the overall survival was 11,87 months in p53 positive cases and 30,28 months in the p53 negative ones ($p<0,005$). The 2 years survival was also better in the p53 negative patients (57,1% vs 6,25%), with p value of 0,006.

Conclusion: The rate of p53 hiperexpression in head and neck carcinomas was 74,2% without any established correlation between this alteration and histopathological grading. The presence of p53 protein in head and neck squamous cell carcinomas may be a factor that influences the overall survival, but others studies with a larger number of patients and control of histopathological grading and treatments modalities are warranted.

Key Words: p53 genes; Head and neck neoplasm; Prognostic; Immuno-histochemistry; Squamous cell carcinomas.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço, segundo DeVita et al.¹, inclui os tumores de cavidade nasal, seios paranasais, nasofaringe, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, laringe e glândulas salivares.

Este conjunto de tumores constituiu-se na quarta causa mais freqüente de câncer, tendo como base o percentual de pacientes em atendimento oncológico ambulatorial no Brasil no ano de 2000. Quando se considerou somente o sexo masculino, foi a segunda neoplasia em freqüência, superada apenas pelos atendimentos por câncer de próstata. Este quadro estatístico permaneceu semelhante na região Sul do país. Quando considerado especificamente o Estado de Santa Catarina, esta forma de tumor passou a ser o terceiro em freqüência de atendimentos ambulatoriais, passando para o segundo lugar quando se analisou somente o sexo masculino².

A mutação do gene p53 foi a alteração genética mais freqüentemente detectada nos tumores de cabeça e pescoço, contribuindo ativamente para o processo de carcinogênese em associação com o tabagismo³. Assim, estabeleceu-se o papel do gene supressor de tumores p53 na oncogênese dos cânceres de cabeça e pescoço, porém o significado clínico e a correlação histopatológica desta alteração não foram ainda elucidados⁴.

O gene p53 é um gene de supressão tumoral localizado no braço curto do cromossoma 17, constituindo-se de 11 exons, 10 introns e 393 codons. Sua mutação foi relacionada à carcinogênese de vários tipos de câncer incluindo as linhagens epitelial, mesenquimal, hematopoiética, bem como tumores do sistema nervoso central. A proporção desta mutação foi variável dentre as neoplasias, porém nunca atingiu 100%. Portanto, não parece ser uma etapa obrigatória na oncogênese⁵.

A maioria das mutações somáticas do gene p53 constitui-se de substituições de uma base nucleotídica (mutação em ponto), resultando na alteração de um aminoácido na proteína p53 (mutação *missense*). Podem ainda ocorrer anormalidades na formação do RNAm, término prematuro da transcrição nuclear (mutação *nonsense*) e deleções intragênicas (*frameshifts*). Estas mutações estão distribuídas através dos numerosos

codons, porém a maioria está confinada a quatro regiões do gene conservadas durante a evolução, localizadas nos exons 5 a 8. Dentro destas regiões há quatro codons *hot spots* que correspondem juntos a aproximadamente 30% das mutações do gene. O resultado funcional destas mutações é a inativação do gene⁵.

A proteína p53, composta por 393 aminoácidos, tem quatro regiões de diferentes funções. Na porção N-terminal há o domínio de transativação, importante na ativação de certos genes específicos, como o mdm2. Na região central da proteína existe o domínio de ligação com o DNA. Já na porção C-terminal há o domínio de tetramerização responsável pela formação de tetrâmeros da proteína p53, que é sua forma ativa. E ainda na porção C-terminal há um domínio regulatório que influencia negativamente o domínio central de ligação ao DNA¹².

Em células normais o nível de proteína p53 é baixo, com meia vida de aproximadamente 20 minutos, e usualmente indetectável por imunohistoquímica. Porém, a proteína p53 com substituição de um aminoácido tem meia vida muito mais longa, fazendo-se presente em altos níveis na célula e, conseqüentemente, permitindo sua detecção pela imunohistoquímica. Assim, esta técnica demonstra uma evidência indireta da mutação do gene p53⁵. Além da mutação, defeitos na via de degradação e ligação a outras proteínas podem aumentar a meia vida da proteína p53¹².

Em pacientes com a Síndrome de Li-Fraumeni há uma predisposição ao início precoce de algumas formas de câncer devido ao fato de um alelo do gene p53 ser inativado já na linhagem germinativa. Assim, somente um alelo necessita de mutação somática para que a célula escape da atividade supressora de tumor da proteína p53. Em indivíduos normais desenvolvendo um tumor esporádico ambos os alelos p53 devem ser inativados na mesma célula por mutação somática⁵. Estudos em câncer de cabeça e pescoço e suas linhagens celulares têm sugerido que após a mutação de um alelo do gene p53, o alelo primitivo restante é excluído resultando no fenótipo mutante¹².

A proteína p53 também pode ser inativada pela ligação com as proteínas denominadas E1B de adenovírus e E6 de papilomavírus, mimetizando o efeito de uma mutação gênica^{5,6}. A função normal de gene p53 também pode ser alterada pela amplificação do gene MDM2 localizado no cromossoma 12q ocorrendo freqüentemente em sarcomas⁵.

A proteína p53 normal liga-se a seqüências específicas do DNA e regula a transcrição nuclear de genes da proximidade, como o p21/WAF1/CIP1. A proteína p21, por sua vez, inibe quinases dependentes de ciclina que são proteínas que controlam a entrada no ciclo celular. Assim, o funcionamento normal da proteína p53 permite a expressão de p21 que freia a progressão do ciclo celular, mecanismo esse totalmente perdido quando ocorre a mutação do gene p53, levando a uma divisão celular permanente e descontrolada, característica das células neoplásicas. A proteína conhecida como p21 também inibe a função de uma proteína conhecida como antígeno de proliferação nuclear celular (PCNA) que estimula a replicação e o reparo de DNA. Portanto, em vez de constituir apenas um componente de uma via da proliferação celular, o p53 ocupa um papel central neste mecanismo complexo de interações ⁵.

A morte celular programada (apoptose) pode ser induzida pela proteína p53 normal que também impede a transição da fase G1 para S no ciclo celular. O descanso na fase G1 otimiza o tempo para reparo do DNA, reduzindo o dano que é convertido em mutações fixas. Assim, o p53 não mutado previne a aquisição de mutações sendo denominado de guardião do genoma. Uma via alternativa para prevenir mutações é permitir que células com dano de DNA entrem em apoptose ⁵.

O gene p53 primitivo pode ser ativado pelo gene p14, radiação ultravioleta e outras radiações ionizantes, hipóxia e fatores de crescimento. Esta ativação pode ocorrer por fosforilação, acetilação ou retardo na degradação da proteína ¹².

Sabe-se que o tipo de mutação do gene p53 é influenciado por carcinógenos exógenos, como o benzopireno do tabaco. Mesmo baixos níveis de exposição induzem mutações no gene p53 ¹².

Tornou-se claro que uma das vias pela qual a radioterapia e quimioterapia exercem seu efeito anti-neoplásico é através da indução de dano ao DNA, iniciando em seguida a apoptose. As células com mutação p53 tornam-se, portanto, menos responsivas a estes agentes terapêuticos. Já tumores quimiossensíveis como neoplasias testiculares, tem uma proporção muito baixa de mutação do p53 ⁵. Isto constitui uma base teórica para futura transposição da quimiorresistência induzida por p53 mutante ⁹.

O p53 regula a expressão da trombospondina-1, uma proteína que serve como um sinal para suprimir a angiogênese. Quando o p53 é inativado, a expressão da trombospondina-1 é reduzida, o que leva ao desenvolvimento de novos vasos sanguíneos⁵.

Há uma verdadeira explosão de informações relacionadas às funções do gene p53. Os estudos deste gene e de sua proteína levaram a avanços na compreensão da carcinogênese, do ciclo celular, da morte celular programada, da resposta ao dano do DNA, da quimiorresistência e da angiogênese⁵.

Em análises de séries de neoplasias de cabeça e pescoço, o gene p53 mutante ocorre em uma frequência de 42-60%. Esta mutação pode ser detectada indiretamente por técnica de estudo imunohistoquímico usando-se anticorpos monoclonais anti-proteína p53 em amostras teciduais da neoplasia. A análise direta da mutação no DNA das células pode ser realizada mediante a técnica de PCR-SSCP (*single-stranded conformational polymorphism*) que detecta mutações em áreas definidas do DNA como variantes de mobilidade eletroforética ou seqüenciamento do DNA^{3,4,5,6,10}.

Este trabalho focaliza-se na taxa de expressão da proteína p53 através de técnica de imunohistoquímica em 31 casos de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.

2 OBJETIVO

Analisar a taxa de expressão da proteína p53 nos 31 casos de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço no serviço de Oncologia do Hospital Municipal São José de Joinville/SC em relação à sobrevida, em particular no estadio clínico III e IV.

3 MÉTODO

Tratou-se de um estudo tipo coorte retrospectivo, onde foram analisados todos os 82 pacientes registrados como casos novos de tumores (malignos ou não) de cabeça e pescoço do Serviço de Oncologia do Hospital Municipal São José de Joinville/SC, no período de agosto de 1996 a agosto de 1997. A coleta de dados a respeito da sobrevida global foi realizada através da análise dos prontuários dos pacientes e informações obtidas dos próprios pacientes ou familiares, com aprovação do Comitê de Ética da UFSC.

Estabeleceram-se como critérios de inclusão para o estudo da expressão da proteína p53:

- a) diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermóide;
- b) localização dos tumores conforme Classificação Internacional de Doenças (CID-10, décima revisão)¹²:
 - cavidade oral: base de língua C01, outras partes da língua C02, gengiva C03, assoalho de boca C04, palato C05, outras partes da boca C06.
 - faringe: amígdala C09, orofaringe C10, nasofaringe C11, seio piriforme C12, hipofaringe C13.
 - laringe C32.
 - glândula parótida C07.
- c) data do diagnóstico histopatológico entre 01 de agosto de 1996 e 31 de agosto de 1997.
- d) presença de prontuário para coleta dos dados.
- e) casos com blocos de parafina disponíveis nos Laboratórios de Patologia.

Os tumores foram estadiados conforme American Joint Committee on Câncer (AJCC) que designou o estadiamento baseado na classificação TNM (T-tumor, N-linfonodos, M-metástases a distância)¹. Os casos foram registrados em protocolo denominado CCP (CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO) 2001 (Apêndice 1).

Foram adotados como critérios de exclusão:

- a) entidades patológicas da região de cabeça e pescoço que não carcinomas epidermóides.
- b) localização do carcinoma epidermóide nos lábios ou na pele da região de cabeça e pescoço.
- c) carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço com diagnóstico histopatológico anterior ou posterior ao período entre 01 de agosto de 1996 e 31 de agosto de 1997.
- d) casos sem prontuários disponíveis para análise.
- e) ausência de neoplasia no bloco histopatológico examinado.
- f) casos com impossibilidade de localização dos blocos de parafina nos Laboratórios de Patologia.

Uma amostra de tecido neoplásico fixado em formol e embebido em parafina obtido através de biópsia ou intervenção cirúrgica terapêutica foi fornecido pelos laboratórios de anatomia patológica da cidade de Joinville/SC. Essa amostra tecidual foi analisada quanto ao grau de diferenciação tumoral obedecendo à graduação da World Health Organization (WHO) em graus I a III ¹³, pela coloração hematoxilina-eosina. O diagnóstico histopatológico foi relatado por dois patologistas independentes (Dr. Antônio Carlos Scaramello – Jaraguá do Sul/SC e Dr. Hercílio Fronza – Joinville/SC) e os casos divergentes foram avaliados por um terceiro em serviço referencial (Dr. Carlos Bacchi – Botucatu/SP).

A pesquisa da proteína nuclear p53 foi detectada através da técnica de imunohistoquímica utilizando o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) com modificações¹⁴. Os tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina foram cortados em 3 micras de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com o adesivo poli-D-lisina ® (Sigma Chemical Corporation, P-7886, Saint Louis, MO, EUA) para evitar o descolamento dos cortes durante a imunocoloração. Em seguida, os cortes foram desparafinizados em xilol por 5 minutos (3 banhos), hidratados em álcool etílico absoluto (4 banhos) e lavados com solução salina tamponada (SST) por 5 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena. A seguir foi utilizado o método de recuperação de

epítomos pelo calor (Solução Salina Tamponada de citrato com pH 6,4 por 15 minutos em forno de microondas caseiro SHARP ®, modelo Interactive Touch On a 900W). No próximo passo, os cortes foram incubados com o anticorpo monoclonal primário DO-7 anti-proteína p53 (Dako Corporation, Carpinteria, Califórnia, EUA) na diluição de 1:300 em média por 16 horas, incluindo o período noturno. No dia seguinte, após lavagem em Solução Salina Tamponada, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotínico anti-IgG de camundongo na diluição de 1:300 ® (Vector Corporation, Burlingame, Califórnia, EUA). A seguir, realizou-se incubação por 45 minutos com complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Corporation, Burlingame, Califórnia, EUA) na proporção de uma gota do reagente A (avidina) e uma gota do reagente B (biotina ligada à peroxidase) na diluição de TRIS. Para identificação da reação, os cortes foram tratados com solução de DAB (3-3)-tetrahidrocloreto de diaminabenzidina na concentração de 1mg/ml de solução tampão de TRIS e solução de peróxido de hidrogênio por 5 minutos. Os cortes foram então contra-corados com verde metila por 5 minutos com posterior desidratação em banhos de álcool etílico absoluto (5 banhos) e xilol (3 banhos). Todos os passos da reação imuno-histoquímica foram realizados à temperatura ambiente, com exceção da incubação no forno de microondas. Entre cada passo da reação as lâminas foram lavadas várias vezes com Solução Salina Tamponada (pH=7,4). Como controle positivo foi utilizado carcinoma epidermóide previamente testado para expressão da proteína p53. Esta técnica histopatológica foi realizada no Centro de Consultoria em Patologia e Imuno-histoquímica Dr. Carlos Bacchi em Botucatu/SP. A porcentagem de células positivas para a coloração empregada foi reportada, e se menor que 5%, o caso foi considerado negativo para presença de proteína p53¹¹. Assim estabeleceram-se dois grupos de pacientes:

- a) grupo 1: presença da proteína p53.
- b) grupo 2: ausência de proteína p53.

A variável de interesse no estudo foi a verificação da expressão da proteína p53 em células de amostras de tecido neoplásico através da técnica de imunohistoquímica utilizando-se como escala de medida a porcentagem de células coradas pela referida técnica.

3.1 - Análise Estatística

Para a análise da sobrevida global média dos grupos 1 e 2 (com e sem expressão da proteína p53, respectivamente), foi utilizada a comparação de médias independentes com teste de significância baseando-se em distribuição de t e no teste não paramétrico de Mann-Whitney. A significância estatística foi indicada para valores de p menores que 0,05.

No estudo de associação histopatológica com a mutação do gene p53, foi realizado o teste exato de Fisher considerando-se diferença estatística para valor de p menor que 0,05.

Foram calculadas as proporções de mortalidade em 02 anos nos grupos com e sem a mutação p53 e como medida de efeito foi utilizado o risco relativo (RR). Foi utilizado ainda o teste de diferença entre duas proporções independentes baseado na curva normal e indicado o nível de significância.

4 RESULTADOS

Foram identificados 31 casos de carcinomas epidermóides da região de cabeça e pescoço a partir do registro de pacientes oncológicos do Serviço de Oncologia do Hospital Municipal São José de Joinville/SC, no período de agosto de 1996 a agosto de 1997.

Destes 31 casos, 27 foram do sexo masculino e 04 feminino (6,7:1).



Figura 1- Distribuição dos casos de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço elegíveis segundo o sexo.

A idade média foi de 57,9 anos, variando de 21 a 87 anos.

Conforme a topografia da lesão primária, os tumores foram classificados segundo a tabela 1. A topografia da faringe incluiu tumores de orofaringe, hipofaringe e nasofaringe.

Tabela 1 - Distribuição topográfica dos 31 tumores primários de órgãos da cabeça e pescoço analisáveis.

Cavidade oral	09	29%
Faringe	14	45%
Laringe	07	23%
Parótida	01	03%
Total	31	100%

Os tumores foram estadiados conforme American Join Committee on Cancer (AJCC) que designou o estadiamento baseado na classificação TNM.

Tabela 2 – Classificação TNM (AJCC) dos 31 pacientes com carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço elegíveis.

I	0	0%
II	08	26%
III	13	42%
IV	10	32%
Total	31	100%

A tabela 3 mostra as modalidades terapêuticas a que os pacientes foram submetidos.

Tabela 3 - Abordagem terapêutica instituída nos 31 casos analisados de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.

Radioterapia exclusiva	10
Cirurgia + Radioterapia	09
Radioterapia + Quimioterapia	08
Quimioterapia exclusiva	03
Suporte	01
Total	31

O tabagismo foi demonstrado em 73,7% dos casos. O tabagismo associado ao etilismo foi encontrado em 57,9% dos casos.

A sobrevida global dos 31 pacientes analisados foi calculada a partir da data do diagnóstico anátomo-patológico até a data do óbito ou último contato com o paciente e/ou familiar realizado por telefone em janeiro de 2002. A sobrevida global média foi de 25,7 meses, variando entre 01 a 64 meses.

A sobrevida global (%) em 1, 2, 3 e 5 anos é mostrada na figura 2.

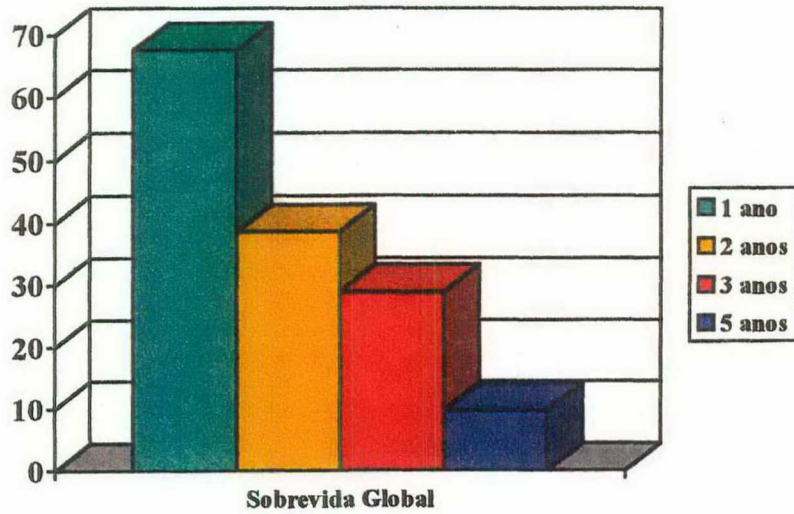


Figura 2 - Evolução da sobrevida global dos 31 casos analisados de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço analisados por períodos de tempo.

Considerando o grau de diferenciação histopatológica, os tumores foram classificados em graus I, II e III segundo World Health Organization (WHO), sendo grau I os tumores bem diferenciados, grau II os moderadamente diferenciados e grau III os pouco diferenciados e indiferenciados. Os resultados (%) são mostrados na figura 3.

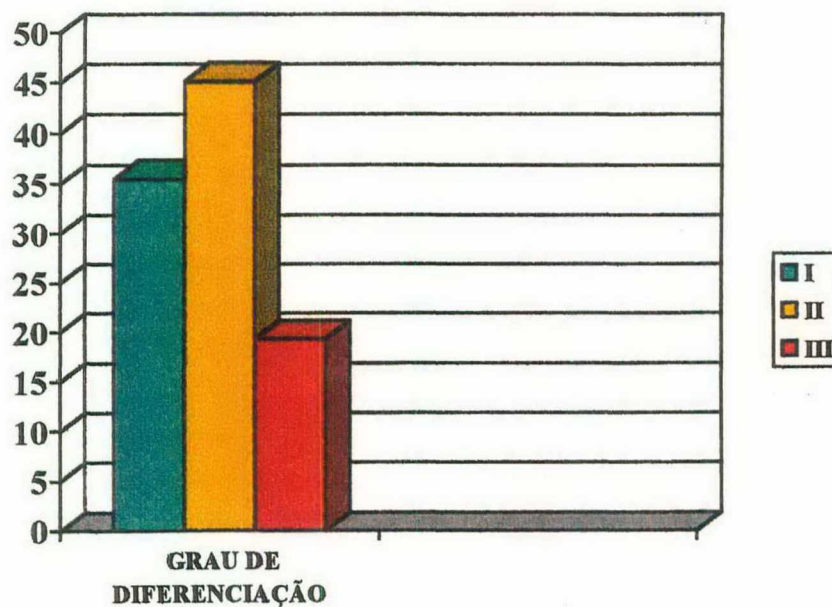


Figura 3 - Classificação dos 31 tumores de cabeça e pescoço quanto à graduação histopatológica da World Health Organization (WHO).

Dos 31 casos analisados, em 23 (74,2%) foi detectada a presença da fosfoproteína nuclear p53 por técnica de imunohistoquímica. Assim:

- a) grupo 1: p53 positivo – 23 casos - 74,2%
- b) grupo 2: p53 negativo – 08 casos – 25,8%

A tabela 4 mostra a relação dos casos analisados e os resultados correspondentes ao grau de diferenciação histopatológica, expressão da proteína p53 e a sobrevida global.

Tabela 4 – Relação dos 31 casos quanto ao grau histopatológico, presença ou ausência da proteína p53 e sobrevida global (SG) em meses

Caso	Grau	p53	SG(meses)
01	II	-	23
02	I	-	46
03	II	+	04
04	III	+	13
05	II	-	28
06	I	+	09
07	II	+	12
08	I	-	14
09	II	+	60
10	II	+	06
11	II	+	10
12	II	+	28
13	II	+	58
14	I	+	22
15	II	-	51
16	I	+	02
17	II	+	22
18	I	-	01
19	II	+	10
20	III	+	62
21	III	+	18
22	II	+	46
23	I	-	49
24	I	+	15
25	III	+	07
26	I	-	55
27	III	+	64
28	III	+	22
29	II	+	11
30	I	+	24
31	I	+	05

A sobrevida global média dos pacientes em todos os estádios clínicos com p53 positivo (grupo 1) foi de 23,04 meses enquanto nos casos p53 negativo (grupo 2) esta taxa foi de 33,37 meses. A diferença de 10,33 meses entre os grupos não atingiu diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,25$ ($p = 0,22$ pelo teste de Mann-Whitney).

Já nos pacientes com estadio clínico III e IV com presença da proteína p53, a sobrevida média foi de 11,87 meses, enquanto no grupo p53 negativo esta taxa foi de 30,28 meses, diferença estatisticamente significativa, com p menor que 0,005.

A sobrevida de 02 anos para todos os estádios clínicos foi de 30,4% para o grupo com p53 positivo e de 62,5% para os pacientes com ausência de expressão da proteína p53, com RR de 2,05 (0,91 - 4,66). O valor de p para a diferença entre estas proporções foi de 0,10. Analisando-se somente os casos com estadio clínico III e IV, encontrou-se sobrevida de 02 anos de 57,1% no grupo p53 negativo e 6,25% nos pacientes com presença de proteína p53, diferença estatisticamente significativa com valor de $p = 0,006$.

Utilizando-se o teste exato de Fisher, não se detectou correlação entre a presença de p53 e a graduação histopatológica, encontrando-se valores de $p > 0,05$.

A tabela 5 mostra o grau de diferenciação tumoral (WHO) conforme a presença da proteína p53 por imunohistoquímica.

Tabela 5 – Classificação dos 31 casos de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço conforme grau de diferenciação histopatológica (WHO) e presença da proteína p53.

	Grau I (%)	Grau II (%)	Grau III (%)	Total (%)
p53 (+) : grupo 1	06 (26)	11 (48)	06 (26)	23 (100)
p53 (-) : grupo 2	05 (62)	03 (38)	00	08 (100)

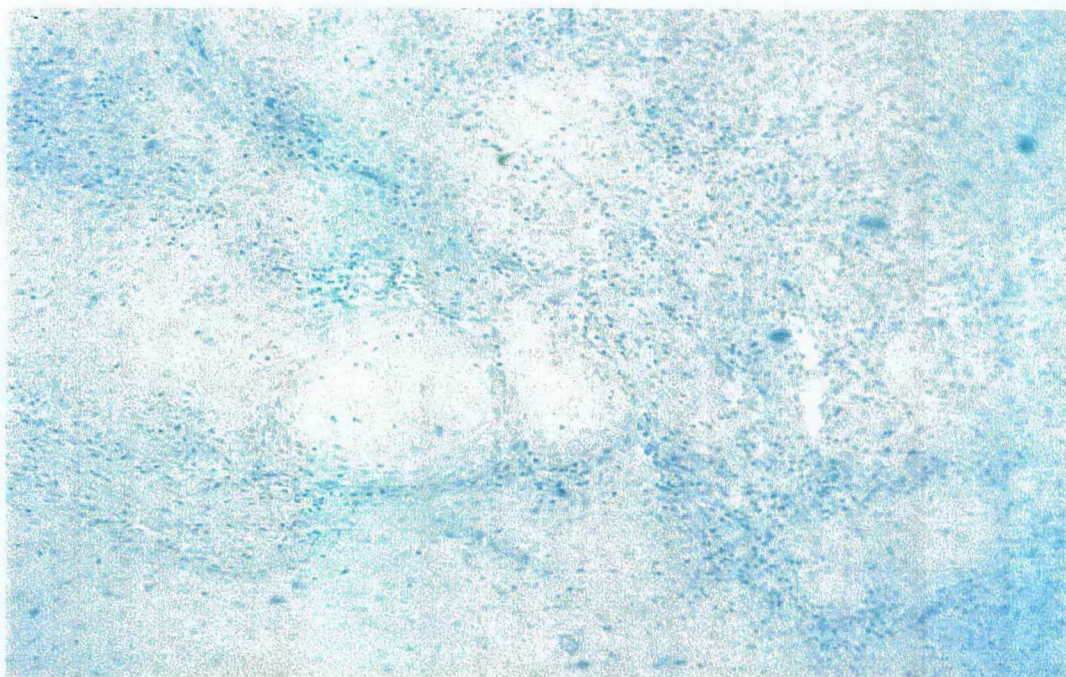


Figura 5 – Corte histopatológico de carcinoma de cabeça e pescoço com coloração imunohistoquímica para pesquisa da proteína p53: caso negativo.

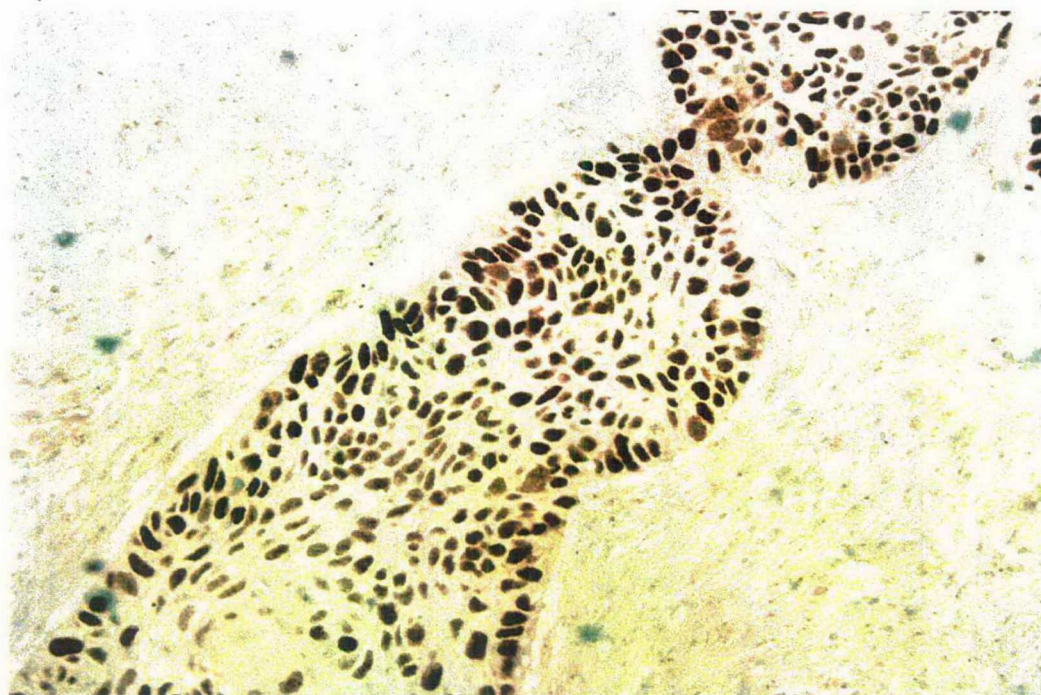


Figura 6 – Corte histopatológico de carcinoma de cabeça e pescoço com coloração imunohistoquímica para pesquisa da proteína p53: caso positivo.

5 DISCUSSÃO

Os carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço são uma das formas mais comuns de câncer no homem, com uma incidência global de 500.000 casos por ano¹⁶. Apesar das várias intervenções terapêuticas, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia, a sobrevida em 5 anos para esta enfermidade teve uma melhora apenas marginal nas duas últimas décadas¹⁶.

A classificação TNM para estes tumores, apesar de extensivamente utilizada na prática clínica, está associada a uma bem reconhecida dificuldade em prever a evolução clínica dos pacientes. Não raramente, tumores com similaridades no estadiamento baseado em seu tamanho e sítios metastáticos nodal e à distância, diferem dramaticamente no seu curso clínico e resposta à terapia instituída. Conseqüentemente, fatores biológicos desconhecidos devem contribuir na determinação da agressividade dos tumores em cada indivíduo. A identificação de tais determinantes celulares constituiria em grande vantagem no sentido de prever o comportamento biológico das neoplasias humanas. Recentemente, o interesse recaiu sobre a expressão de proto-oncogenes, genes supressores de tumores e outros marcadores como potenciais fatores prognósticos¹⁷.

Este trabalho analisou a expressão da proteína p53 em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, através de imunohistoquímica. Em nossa casuística foram analisados 31 casos que preencheram os critérios de inclusão. Nestes 31 casos, a prevalência foi maior em pacientes do sexo masculino (6,7:1) (Figura 1). Logullo et al, analisando 63 casos em São Paulo encontrou uma taxa de 4,6:1¹⁸. A diferença em incidência, favorecendo o sexo masculino, pode ser expressiva (17,6:1) como relatado por Lavieille et al na França¹⁹ ou de 2,2:1 em trabalho realizado por Mineta et al na Suécia²⁰.

A idade média dos pacientes ao diagnóstico foi de 57,9 anos, variando entre 21 a 87 anos. O paciente de 21 anos era portador de carcinoma de nasofaringe. Este perfil etário foi semelhante ao encontrado na literatura^{17,21,22, 23, 24 ,25 ,26 ,27}.

Com relação à topografia o tumor mais freqüente foi da faringe (45%) que incluiu lesões da orofaringe, nasofaringe e hipofaringe (Tabela 2). Este dado variou na literatura,

sendo que Lavieille et al encontrou 83% de tumores na faringe¹⁹, Ma et al 58% também na faringe²¹. Nagai et al, analisaram 90 casos de carcinomas epidermóides primários de cabeça e pescoço em São Paulo (Hospital AC Camargo) e encontraram 51% das lesões em cavidade oral²². Já Tamás et al verificaram que 76,5% dos seus 51 casos de tumores de cabeça e pescoço na Hungria encontravam-se na laringe²³.

O estadiamento clínico TNM (AJCC) era III ou IV em 74% dos casos e nenhum paciente analisado neste estudo esteve no estadio I (Tabela 2). Gapany da Universidade de Cincinnati¹⁷ encontrou, na sua casuística, 85,2% dos pacientes em estadio III ou IV. Em Freiburg, Alemanha, Ma et al verificaram que entre 48 casos de tumores de cabeça e pescoço, 87,5% foram diagnosticados em fase avançada de evolução²¹. O tabagismo e etilismo, carcinógenos sabidamente implicados na cancerização em campo do trato aerodigestivo alto²¹, são freqüentemente encontrados nestes pacientes. Em nosso estudo, 73,7% dos pacientes somente fumavam e 57,9% consumiam álcool e tabaco. Mesmo baixos níveis de exposição ao cigarro induzem mutações do gene p53²⁸. Portanto, o diagnóstico da doença em fases avançadas parece depender de determinantes biológicos, sociais e ambientais.

A sobrevida global dos 31 pacientes neste estudo, independente do status de p53, foi de 25,7 meses. Em um ano, 67,7% dos pacientes estavam vivos, sendo que esta taxa caiu para 38,7% em dois anos e somente 9,7% em 5 anos (Figura 2). Esta constatação de baixa sobrevida global em 5 anos, quando comparada à literatura, refletiu basicamente o estadio avançado em que foram diagnosticados os tumores em nossa casuística (Tabela 2).

A expressão do gene de supressão tumoral p53 tem sido extensivamente estudada em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. A proteína p53 tem demonstrado um importante papel da manutenção da integridade genômica, suprimindo a replicação celular após dano ao DNA, permitindo, assim, tempo para o reparo tecidual. A expressão da proteína p53 foi verificada em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço numa taxa variando entre 23% a 86%, com média aproximada de 50%. A mutação do gene p53 resulta em uma proteína alterada, com meia vida mais longa, permitindo a detecção indireta da mutação genética por coloração imunohistoquímica, que demonstra reatividade nuclear²⁹. Esta mutação também é encontrada em outros tipos de tumores como: pulmão (70%), estômago (45%), mama (30%), cólon (65%), linfoma (30%), esôfago (44%), bexiga (61%), leucemias (10%)¹⁷.

Em nosso estudo, a expressão da proteína p53 mutada foi considerada positiva em 23 de 31 casos, ou seja, 74,2%. Em um estudo brasileiro publicado por Logullo et al em 1997, foram analisados 63 espécimes de tumores de cabeça e pescoço, sendo encontrado positividade para p53 em 30 casos (48%) através de imunohistoquímica, utilizando o anticorpo monoclonal D07 – DAKO¹⁸. Nagai et al, também no Brasil, analisaram 90 casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço utilizando a técnica de PCR-SSCP(*protein chain reaction – single-stranded conformaitonal polymosphism*) e verificou mutação do gene p53 em 53% dos casos²². Na Europa, mais especificamente, Hungria, Tamás et al obtiveram a taxa de expressão de proteína mutada de 48,8% num estudo retrospectivo de 51 pacientes usando imunohistoquímica²³. Num estudo sobre a expressão de p53 e proteínas relacionadas ao *stress* (HSP27 e HSP70) em câncer de cabeça e pescoço, encontrou-se positividade de p53 em 60% dos casos por imunohistoquímica²⁹. Assim, o espectro de mutação do gene p53 pode variar entre as populações devido à susceptibilidade genética ou exposição ambiental ²².

A imunohistoquímica é um método laboratorial que identifica com eficácia a mutação do gene p53? Utilizamos este método no trabalho em discussão devido ao seu difundido uso na literatura, baixo custo, reprodutibilidade e fácil acesso. Geralmente uma associação entre a expressão protéica por imunohistoquímica e a mutação do p53 detectado por análise molecular é assumida²⁰. No entanto, em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço há evidências emergentes de uma discrepância nos resultados alcançados por estes diferentes métodos. Achados de falsos negativos na imunohistoquímica poderiam ser atribuídos a mutação em *splices*, *frameshifts* e mutações *nonsense*, que levariam a geração de proteínas truncadas não detectadas pelo método. Ainda pode haver falsos negativos devido a hiperfixação, fixação retardada ou processamento inadequado do tecido, o que pode levar a degradação da proteína p53, não permitindo sua conseqüente detecção. Por outro lado, os falsos positivos podem advir de aumento do nível de proteína p53 primitiva (normal) conseqüente ao dano celular provocado por quimioterapia ou radioterapia. Outras proteínas como o produto do oncogene MDM2, produtos do vírus SV40, EB1 de adenovírus, E6 do HPV, podem ligar-se a proteína p53 inativando sua habilidade de agir como fator de transcrição, resultando na estabilização de p53 ²⁰. No estudo de Mineta et al a imunohistoquímica e a análise molecular por PCR-SSCP discordaram em 43% dos

casos²⁰. Já Calzolari et al encontraram uma correlação entre imunohistoquímica e PCR-SSCP em 60 de 85 casos (71%) com valor de $p=0,0013$ ³⁰.

Vários estudos tem implicada a expressão da proteína p53 como um fator de prognóstico independente em carcinomas de mama, estômago, cólon/reto, bexiga e pulmão *oat cell*. No entanto, a relevância clínica da expressão de p53 em câncer de cabeça e pescoço é controversa²⁰.

De uma maneira geral tumores exibindo um acúmulo de p53 tendem a ser de alto grau histopatológico e mais agressivos¹⁹.

Mineta et al, analisando 77 casos de câncer de cabeça e pescoço verificaram que, em análise univariada, a mutação do p53 detectada por PCR-SSCP está associada à sobrevida global reduzida com valor de $p=0,001$, sendo que em análise multivariada a mutação do p53 ainda consistia num forte fator de risco para a sobrevida²⁰. Num estudo sobre angiogênese tumoral e mutação p53, esta mutação relacionou-se com menor sobrevida global ($p=0,003$) e menor sobrevida livre de doença ($p=0,02$). Shin et al, no estudo de 69 pacientes, verificaram que a expressão da proteína p53 por imunohistoquímica relacionou-se a menor sobrevida global com valor de $p=0,002$ ¹⁶. Por outro lado, vários autores^{22,23,25,29,31} não encontraram correlação entre a expressão de p53 ou mutação do mesmo gene por análise molecular com a sobrevida global.

No presente estudo, a sobrevida média global dos pacientes com expressão de p53 (grupo 1) foi de 23,04 meses, enquanto nos casos p53 negativos (grupo 2) esta taxa foi de 33,37 meses. A diferença entre os grupos foi de 10,33 meses, porém não atingiu valor estatisticamente significativo, com valor de p menor que 0,25. Quando se analisou a sobrevida em 02 anos, para os pacientes p53 positivos a taxa foi de 30,4%, e para os casos negativos, a taxa foi de 62,5%, com risco relativo de 2,05 (0,91-4,66 IC 95%), porém com valor de $p=0,10$.

Apesar de não estatisticamente significativo, o estudo revela uma tendência a melhor sobrevida em 02 anos para pacientes sem a expressão da proteína p53. Deve-se, no entanto, considerar o pequeno tamanho da amostra e o baixo número de casos p53 negativos (8 casos). Sabemos que a sobrevida dos carcinomas de cabeça e pescoço está intimamente relacionada ao estadiamento no diagnóstico e uma análise estatística desta sobrevida será necessariamente influenciada por esta variável. Entre os 31 casos

analisados, 08 pacientes encontravam-se no estadio clínico II, sendo 07 no grupo 1 (p53 positivo) e 01 no grupo 2 (p53 negativo). Esta variável não balanceada entre os grupos do estudo pode ter conferido aumento da sobrevida para o grupo com presença de p53 (grupo 1). Ao proceder-se a exclusão dos casos em estadio II, foi encontrada significativa diferença na sobrevida de 02 anos, favorecendo o grupo com p53 negativo (57,1% vs 6,25%), com valor de $p=0,006$. Já na análise da sobrevida global média, agora somente com os casos em estadio III e IV (doença locorreional avançada sem metástases à distância), os pacientes com p53 positivo sobreviveram em média 11,87 meses, enquanto o grupo p53 negativo 30,28 meses, diferença estatisticamente significativa, com p menor que 0,005. Assim, a presença da proteína nuclear p53 em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço pode constituir um fator influenciador na sobrevida destes pacientes, porém outras variáveis como grau de diferenciação tumoral¹³, método laboratorial de pesquisa da proteína p53 ou da mutação do gene p53 e modalidades terapêuticas instituídas são também importantes na análise da sobrevida global. Isto justifica a realização de estudos com maior número de pacientes, onde estas variáveis possam ser controladas e o real impacto da presença da proteína p53 possa ser determinado.

A expressão da proteína p53 também tem sido associada à graduação histopatológica com valor prognóstico²⁰. No entanto há estudos que deixam de mostrar esta correlação como demonstrado por Field et al²⁰.

Neste trabalho encontraram-se 35,5% de tumores grau I, 45,2% grau II e 19,3% grau III, segundo a classificação da World Health Organization (WHO) e independente do status de p53 (Figura 3). Esta distribuição varia segundo os autores^{19,29}, mas foi semelhante entre o estudo atual e os casos reportados por Mineta et al.²⁰.

Reithdorf et al evidenciaram um aumento da positividade da proteína p53 por imunohistoquímica entre grau I para grau III, sendo que no grau I a imunoreatividade foi mais restrita a camada basal e em grau III esta reação teve distribuição mais difusa²⁵. Maass et al analisaram a mutação de p53 por imunohistoquímica e pesquisa de anticorpos séricos pelo método ELISA e encontraram forte correlação com a graduação histopatológica: quanto mais indiferenciado o tumor maior a reatividade para p53³². O estudo brasileiro de Logullo et al também mostrou correlação positiva com o grau histopatológico com valor de $p=0,025$ ¹⁹. Também foi relatado um estudo em que uma associação inversa foi notada entre o p53 e o grau de diferenciação, marginalmente

significativa ($p=0,09$)²⁹. Vários autores, no entanto, deixaram de demonstrar esta correlação^{16,17,19,21,22,23,31,32}. Na análise dos 31 casos deste trabalho, não detectou-se correlação entre a expressão de p53 e graduação histopatológica, com valor de p maior de 0,05 no teste exato de Fisher. Verificou-se, no entanto, que todos os 06 casos de tumores grau III expressaram a proteína p53, parecendo haver uma tendência a pouca diferenciação em tumores p53 positivos(Tabela 5).

A contribuição de nosso estudo imunohistoquímico da proteína p53 nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço foi de demonstrar sua taxa de expressão em um Serviço de Oncologia de Referência para a Região Norte de Santa Catarina que possui o único Serviço de Radioterapia desta Região, importante parte do arsenal terapêutico desta patologia.

Apesar da alta prevalência da expressão de p53 em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, seu significado clínico ainda permanece controverso e incerto. Sabe-se, no entanto, que um fator importante na resistência a terapia em tumores recorrentes é a mutação do p53, pois ele desempenha um importante papel da indução da apoptose em resposta a agentes genotóxicos como a radioterapia e quimioterapia³⁴. Baseado neste conhecimento, Gayly et al, já em 1997 mostraram resultados promissores de estudos de fase I com o agente Onyx 015, um adenovírus que carrega o p53 primitivo e infectam seletivamente células com mutação p53. Os quimioterápicos do grupo dos taxanes, que induzem apoptose por uma via independente ao p53, têm tido bons resultados em tumores refratários a cisplatina³⁴. Portanto, a mutação do p53 gerando uma proteína estruturalmente alterada podem, entre outros, ter significativa implicação terapêutica e prognóstica.

6 CONCLUSÃO

A taxa de expressão da proteína p53 aferida por imunohistoquímica em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço no serviço de Oncologia do Hospital Municipal São José de Joinville/SC é de 74,2%.

A correlação entre a expressão da proteína p53 e o grau de diferenciação histopatológica (WHO) não é estabelecida.

A presença da proteína p53 em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço estadio III e IV pode ser um fator que influencia a sobrevida global, porém estudos com maior número de casos e controle de variáveis como graduação histopatológica e modalidades terapêuticas instituídas são necessários para avaliar o real impacto da expressão desta proteína na sobrevida dos pacientes com esta neoplasia.

7 REFERÊNCIAS

1. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer Principles and Practice of Oncology. 6th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins; 2001.
2. Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. Projeto Câncer no Brasil. 2000.
3. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D. Association between cigarette smoking and mutation of p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995 Mar 16;332(11):712-7.
4. Ma L, Ronai A, Riede UM, Köehler G. Clinical implication of screening p53 gene mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;124(7):389-96.
5. Yarnold JR, Stratton M, Mcmillan TJ. Molecular biology for oncologists. 2nd ed. London UK:Chapman & Hall;1996.
6. Takano I, Tamura S, Yamanaka N. Detection of human papilloma virus DNA and expression of p53 in patients with head and neck cancer. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiko* 1997 May;110(5):524-33.
7. Clarke AR, Purdie CA, Harison DJ et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993;362:849-52.
8. Donehower LA, Harwey M, Slage BL et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 1992;356:215-21.
9. Ganani M, Lipari P, Dell J, Shi B, Nielsen LL. Adenovirus-mediated p53 gene therapy has greater efficacy when combined with chemotherapy against human head and neck, ovarian, prostate and breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;44(2):143-51.
10. Logullo AF, Kowalski LP, Nogogaki S, Miguel RE, Torloni H, Brentani RR. P53 overexpression in epidermoid carcinoma of head and neck. *Rev Paul Med* 1997 Jan-Fev;115(1):1349-55.
11. Fouret P, Dabit D, Sibony M et al. Expression of p53 protein related to the presence of human papillomavirus infectio in precancer lesion of the larynx. *Am J Pathol* 1995;146:599-604.

12. Palotti editors. CID-10 Classificação Internacional de Doenças (décima revisão). Porto Alegre: RGM do Brasil.
13. Fortin A, Couture C, Doucet R, Albert M, Allard J, Tetu B. Does histologic grade have a role in the management of head and neck cancers? *J Clin Oncol* 2001 Nov; 19(21):4107-116.
14. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29(4): 577-80.
15. Nylander N, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol* 2000;29:413-25.
16. Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, et al. P53 expression: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 1996 april17;88(8):519-29.
17. Gapany M, Pavelix ZP, Gapany SR, Pavelic L, YA-qin L, Craven JM, et al. Relationship between immunohistochemically detectable p53 protein and prognostic factors in head and neck tumors. *Cancer Detection Prevention* 1993;17(3):379-86.
18. Logullo AF, Kowalski LP, Nonogaki S, Miguel VER, Torloni H, Brentani RR. P53 overexpression in epidermoid carcinoma of the head and neck. *São Paulo Medical Journal/RPM* 1997; 115(1):1349-55.
19. Lavieille JP, Righini C, Reyt E, Brambilla C, Riva C. Implications of p53 alterations and anti-p53 antibody response in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral oncology* 1998;34:84-92.
20. Mineta H, Borg A, Dictor M, Wahlberg P, Wennerberg J. P53 mutation, but not p53 overexpression, correlates with survival in head and neck squamous cell carcinomas. *British Journal of Cancer* 1998;78(8):1084-90.
21. Ma L, Ronai A, Riede UM, Koeler G. Clinical implication of screening p53 gene mutations in head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;124:389-96.
22. Nagai MA, Miracca EC, Yamamoto L, Moura RP, Simpson AJG, Kowalski LP, Brentani RR. TP53 genetic alterations in head-and-neck carcinomas from Brazil. *Int J Cancer* 1998;76:13-18.
23. Tamás L, Kraxner H, Mechtler L, Repassy G, Ribári O, Hirschber A et al. Prognostic significance of p53 histochemistry and DNA histogram parameters in head and neck malignancies. *Anticancer Research* 2000;20:4031-38.
24. Nogueira CP, Dolan RW, Gooley J, Byahatti S, Vaughan CW, Fuleihan NS et al. Inactivation of p53 and amplification of cyclin D1 correlate with clinical outcome in head and neck cancer. *The Laryngoscope* 1998 March;108:345-50.

25. Reithdor S, Friedrich RE, Otwald C, Barten M, Gocacz P, Gundlach KKH et al. P53 gene mutations and HPV infection in primary head and neck squamous cell carcinomas do not correlate with overall survival: a long term follow-up study. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 1997;26:315-21.
26. Warnakulasuriya KAAS, Johnson NW. Expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med* 1992;21:404-08.
27. Werner JA, Gottschlich S, Folz BJ, Goeroegh T, Lippert BM, Maass JA et al. P53 serum antibodies as prognostic indicator in head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1997;44:112-16.
28. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 2000;29:413-25.
29. Edwards RG, Trock BJ, Gumeerlock P, Donald PJ. Heat shock protein and p53 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;118:610-05.
30. Calzolari A, Chiarella I, Bianchi S, Messerini L, Gallo O, Porfirio B, et al. Immunohistochemical vs molecular biology methods – complementary techniques for effective screening of p53 alterations in head and neck cancer. *Am J Clin Pathol* 1997;107:07-11.
31. Kapranos N, Staphopoulos GP, Manolopoulos L, Kokka E, Papadimitriou C, Bibas a, et al. P53, p21 and p27 protein expression in head and neck cancer and their prognostic value. *Anticancer Research* 2001;21:521-28.
32. Maas JD, Gottschlich S, Goeroegh T, Bruhn T, Lippert BM, Paulsen JI, et al. High rate of p53 overexpression in head and neck carcinomas detected with a refined ELISA. *Anticancer Research* 1997;17:473-78.
33. Hegde PU, Brenski AC, Caldarelli DD, Hutchinson J, Panje WR, Wood NB, et al. Tumor angiogenesis and p53 mutation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:80-85.
34. Ganly I, Soutar DS, Brown R, Kaye SB. P53 alterations in recurrent squamous cell cancer of the head and neck refractory to radiotherapy. *British Journal of Cancer* 2000;82(2):392-98.
35. Logullo AF, Moura RP, Nonogaki S, Kowalski LP, Nagai MA, Simpson JG. A proposal for the integration of immunohistochemical staining and DNA-based techniques for the determination of TP53 mutations in human carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 2000;9(1):35-40.
36. Pinheiro NA, Moura RP, Monteiro E, Villa LL. Detection of point mutations by non-isotopic single strand conformation polymorphism. *Braz J Med Biol Res* 1999;32(1):55-58.

37. Mirjolet JF, Heyob MB, Didelo C, Peyrat JP, Abecassis J, Millon R, et al. Bcl-2/Bax protein ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status. *British Journal of cancer* 2000;10(10):1380-86.
38. Heliwell T. Molecular markers of metastasis in squamous carcinomas. *J Pathol* 2001;194:289-93.
39. Papadimitrakopoulou VA, Hong WK. Biomolecular markers as intermediate end points in chemoprevention trials of upper aerodigestive tract cancer. *Int J Cancer* 2000;88:852-55.
40. Haffty BG, sasaki CT, smith BD. Molecular markers in head and neck squamous cell carcinoma: their biological function and prognostic significance. *Am Otol Rhinol Laryngol* 2001;110:221-28.

8 NORMAS ADOTADAS

Ficha catalográfica (descritores)

BIREME – Centro Latino-Americano e do Caribe de informações em Ciências da Saúde.

DeCs – Descritores em ciência da saúde: lista alfabética 2. ed. Rev. Amp. São Paulo: BIREME, 1992. 111p.

Relatório:

Normas para elaboração de Dissertação do Curso de Mestrado em Ciências Médicas. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Mestrado em Ciências Médicas. Florianópolis-SC, 2001.

Referências:

Normas do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (Vancouver)

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Inter Med* 1997; 126:36-47.

d'Acampora AJ. *Investigação Experimental – do planejamento à redação final*. 1a.ed. Florianópolis: Papa-Livro; 2001.

APÊNDICE

PROTOCOLO DE PESQUISA CCP (CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO)2001

- a) Número do prontuário:
- b) Número da lâmina/bloco:
- c) Idade ao diagnóstico:
- d) Sexo:
- e) Topografia do tumor:
- f) Data do diagnóstico patológico:
- g) Anátomo-patológico inicial:
- h) Estadiamento TNM:
- i) Tratamento:
- j) Data da recidiva:
- k) Data do óbito ou último "follow up":
- l) Diagnóstico patológico revisado:
 - patologista 1:
 - patologista 2:
 - patologista 3:
- m) Imunohistoquímica:
 - () Negativo
 - () Positivo