



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Medicina de Botucatu

*Carcinoma de Nasofaringe: Análise da importância
prognóstica da imunexpressão da Galectina-3 e Proteínas
de Matriz.*

Victor Nakajima

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de
Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção
de título de Doutor.

Orientador: Prof. Adj. Jair Cortez Montovani
Co-Orientador: Prof.Dr. José Vicente Tagliarini
Co-Orientadora: Profa.Dra. Maria A. Custódio Domingues
Colaborador: Dr. Emanuel Celice Castilho

Botucatu – SP

2011

*Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu*

*Carcinoma de Nasofaringe: Análise da importância
prognóstica da imunexpressão da Galectina-3 e
Proteínas de Matriz.*

Victor Nakajima

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção de título de Doutor.

Orientador: Prof. Adj. Jair Cortez Montovani
Co-Orientador: Prof.Dr. José Vicente Tagliarini
Co-Orientadora: Profa.Dra. Maria A. Custódio Domingues
Colaborador: Dr. Emanuel Celice Castilho

Botucatu – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Nakajima, Victor.

Carcinoma de nasofaringe : análise da importância prognóstica da imunoexpressão da Galectina-3 e proteínas de matriz / Victor Nakajima. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Jair Cortez Montovani

Co-orientador: José Vicente Tagliarini

Co-orientador: Maria Aparecida Custódio Domingues

Capes: 40102025

1. Nariz - Câncer. 2. Faringe - Câncer. 3. Fibronectinas.

Palavras-chave: Carcinoma de nasofaringe; Fibronectina; Galectina 3; Laminina.



Sumário

Sumário

Agradecimentos e Dedicatória

Lista de Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	24
3. Casuística e Métodos.....	26
3.1. Aspectos Éticos.....	27
3.2. Análise Estatística.....	29
4. Resultados.....	30
4.1. Descrição da casuística.....	31
4.2. Associações entre variáveis epidemiológicas, características do tumor, tratamento e prognóstico.....	38
4.3. Resultados Principais.....	41
5. Discussão.....	45
6. Conclusões.....	50
7. Referências.....	52
Apêndices.....	61



Dedicatória

Agradecimentos

A Faculdade de Medicina de Botucatu que me acolheu na graduação e permitiu chegarmos até este momento.

Ao Dr. Zenshi Heshiki meu professor em otorrinolaringologia, eterno mestre, pois além da especialidade que nos ensinou, abriu o horizonte para a minha formação como ser humano para o atendimento dos pacientes.

Aos professores Dr. Onivaldo Bretan, Dra. Regina Helena Garcia Martins e Dra. Silke Anna Theresa Weber, pela amizade e companheirismo na labuta diária.

Ao Dr. Odair Michellin responsável pela quimioterapia na orientação e ajuda na obtenção de informações sobre os pacientes.

Ao Dr. Batista de Oliveira Junior responsável pela Radioterapia pela orientação e ajuda na obtenção de dados a respeito dos pacientes.

A Sra. Cinthia pela dedicação, presteza e gentileza e paciência no dia a dia e na digitação do trabalho.

A Sra. Nilse sempre presente e colaborando no que for solicitada

A todos amigos docentes, médicos e funcionários do departamento pela amizade ao longo dos anos.

Ao conjunto de pessoas, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho. Não vou citar nomes, pois poderia esquecer alguém, somente o local de trabalho: Aos Funcionários do Departamento de Patologia, Registro do HC, Arquivo Médico do HC, da Quimioterapia, da Radioterapia e do Registro do Câncer do HC, fui atendido em todos os locais com extrema competência, educação e gentileza. Muito Obrigado.

Aos queridos funcionários da pós graduação pela paciência, competência e amizade .

As Bibliotecárias Luciana Bizzani e Rosemary Cristina da Silva pela correção da Bibliografia e orientação na digitação.

Ao Hélio Rubens de Carvalho Nunes responsável pela análise estatística.

A FAMESP pela ajuda na obtenção de recursos financeiro para a realização deste trabalho.

A FUNDUNESP pelo apoio financeiro na aquisição de material laboratorial para realização deste trabalho.

Ao meu amigo Dr. Emanuel Celice Castilho que com seu trabalho árduo ao longo de anos foi a figura fundamental e primordial na consolidação da Cirurgia de Cabeça e Pescoço dentro da disciplina de Otorrinolaringologia na Faculdade de Medicina de Botucatu, o qual proporcionou a realização deste trabalho, fornecendo os dados relevantes dos pacientes, ajudando na coleta de dados e orientando nas dificuldades.

Dr. Jose Vicente Tagliarini companheiro do departamento e atual responsável pela Cirurgia de Cabeça e Pescoço na instituição, pelo incentivo, ajuda e orientação na execução e que sem o mesmo este não teria sido possível a realização deste trabalho.

A Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues do Departamento de Patologia que foi a responsável por todo o trabalho de leitura e reclassificação das lâminas e também pela reação de imunohistoquímica e posterior leitura das mesmas. Além disso ela foi a minha orientadora e companheira nas dúvidas.

Meu Orientador, Prof. Dr. Jair Cortez Montovani

... Ao meu amigo e companheiro de tantas jornadas, que sempre me apoiou e ajudou nas dificuldades, mais uma vez juntos, orientando, corrigindo, sugerindo e aquele algo mais nas horas mais difíceis e dando aquele algo mais na finalização deste trabalho, a minha eterna gratidão.

Dedicatória

A quem nos espelhamos e a quem esperamos algo deixar.

Aos meus pais Takashi Nakajima e Taka Nakajima

Meus irmãos Mikio e Koji

Minhas irmãs Miti, Kunie, Emília, Olga e Cecília

A Minha Esposa Kikuko Kamiyama

Aos Meus Filhos Vania Mayumi

Victor Tadashi

Rafael Takahiro

Cintia Hiromi



Lista Abreviaturas

Lista de Abreviaturas

CCP	Carcinoma de Cabeça e Pescoço
MMPs	Matrix Metaloproteinases
CNF	Carcinoma de Nasofaringe
WHO	World Health Organization
CENCI	Carcinoma Epidermóide Não Ceratinizante Indiferenciado
CENCD	Carcinoma Epidermóide Não Ceratinizante Diferenciado
CEC	Carcinoma Epidermóide Ceratinizante
CCECP	Câncer de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço
UNKSCC	Undifferentiated Nonkeratinized Squamous Cell Carcinoma
DNKSCC	Differentiated Nonkeratinized Squamous Cell Carcinoma
KCC	Keratinized Cell Carcinoma
p16	Proteína p16
CDKs	Quinases-Dependentes-de-ciclinas
p27	Proteínas p27
Tp53	Gene TP53
TIMP	Inibidores fisiológicos tissulares das MMPs
OMS	Organização Mundial da Saúde
EBV	Epstein-Barr Vírus
CD 54	Cluster of Differentiation 54
C-ERB	Receptores de Fatores de Crescimento
BCL-2	Genes Mediadores do Apoptose (inibidor)
BXA	Genes Mediadores do Apoptose (acelerador)
CGH	Comparative Genomic Hybridization
LPM	Latent Membrane Protein
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
TNF	Tumor Necrosis Factor



Resumo

Resumo

Objetivo: Estudar a expressão da Galectina-3 e a distribuição das proteínas de matriz, laminina, fibronectina e colágeno IV, em 30 amostras teciduais de carcinoma de nasofaringe (CNF) e correlacionar com as características clinicopatológicas, agressividade tumoral e sobrevida dos indivíduos. **Forma de estudo:** clínico retrospectivo. **Casuística e Material:** Foram estudadas por método imunohistoquímico 30 amostras teciduais de 26 pacientes com diagnóstico de Carcinoma de Nasofaringe (CNF), cujos blocos parafinados estavam arquivados no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. As lâminas foram revisadas e reclassificadas de acordo com a classificação de 2005 da WHO. As proteínas de matriz e a galectina-3 foram analisadas por método imunohistoquímico. **Resultado:** A análise mostrou que a média etária foi de 48anos, com o pico de prevalência entre 60 a 69 anos, e predominância do sexo masculino de 2:1. O Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Indiferenciado (CENCI) foi mais comuns em 23 amostras (76,7%), o Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Diferenciado (CENCD) em 4 amostras (13,3%) e Carcinoma Escamoso Ceratinizante (CEC) em 3 amostras (10,0%). A expressão da laminina que normalmente é restrita à parede dos vasos e na lâmina própria, estava muito aumentada na matriz das células neoplásicas em 23 amostras (76,7%); a fibronectina foi positiva em 13 amostras (43%) e a galectina-3 foi positiva em 21 amostras (70%). Tivemos correlação positiva da laminina, fibronectina e galectina-3 em 7 amostras (23,3%) e entre laminina e galectina-3 em 11 amostras (36,6%). Tivemos um caso de CEC na recidiva de um CENCD. **Conclusão:** A expressão positiva da Galectina-3 e da laminina não apresentaram significância estatística quanto a agressividade tumoral e a sobrevida dos pacientes. A presença da fibronectina parece reduzir a chance de recidiva do tumor e também sobrevida maior, ao contrário da laminina e da galectina-3.

Abstract

Objectives: Analyze the expression of galectin-3 and distribution of matrix proteins, laminin, fibronectin and collagen IV, in 30 paraffinated samples of nasopharynx carcinoma(NFC); and correlate the to clinicopathological characteristics, as tumor aggressiveness and survival of individuals. **Study design:** retrospective clinical study. **Methods:** The analyses were performed by immunohistochemistry in 30 tissue samples of 26 patients diagnosed with NPC were archived in the Pathology Department of Botucatu of Medical School, São Paulo State University, UNESP, Brazil. The slides were reviewed and reclassified according to the WHO classification of 2005. The matrix proteins and galectin-3 analyses were performed by immunohistochemistry. **Results:** The analysis showed that the patients mean age was 48 years-old, with the age peak prevalence was from 60 to 69 years-old, with male predominance of 2:1. The undifferentiated non-keratinized squamous cell carcinoma (UNKSCC) was predominant in 23 samples (79%), differentiated non-keratinized squamous cell carcinoma (DNKCC) was found in 4 samples (13.3%) and keratinized squamous cell carcinoma (KCC) was found in 3 samples (10%). The laminin expression, which is normally restricted to the vessel walls and lamina propria, was increased in the neoplastic cell matrix in 23 samples (76.7%). Fibronectin was positive in 23 samples (43%). Galectin-3 was observed in 21 samples (70%). Seven cases showed positive correlation between all three proteins. Eleven cases presented positive correlation of laminin and galectin-3 immunoexpression. There was one case of KCC in recurrence of DNKCC. **Conclusions:** The statistical analysis was not conclusive, maybe because of the sample size. Nevertheless, fibronectin presence seems to reduce the chance of tumor recurrence and also, increase the survival rate, differently from laminin and galectin-3.



Introdução

1. Introdução

As neoplasias de cabeça e pescoço compreendem os carcinomas originários do epitélio da cavidade oral, faringe, laringe, nariz e cavidades paranasais. O câncer de cabeça e pescoço está entre os cinco mais frequentes no sexo masculino e os oito mais comuns entre as mulheres^{1,2}. Sua epidemiologia é complexa devido à natureza multigênica da doença e também ao número potencial de agentes ambientais envolvidos nesse tipo de câncer^{3,4}.

O índice de mortalidade é alto em CCECP visto que de 40.000 casos novos ocorrem aproximadamente 12.300 mortes ao ano^{5,6,7}. A proporção entre homens e mulheres é de 1,5:1, embora ela esteja diminuindo ao longo dos anos⁸.

O que é pouco compreendido são casos de CCECP em indivíduos jovens com pouca ou nenhuma exposição a carcinógenos. Uma das possibilidades seria, na maioria das vezes, a ocorrência de um padrão de herança mendeliana por um gene defeituoso e não por mutações enzimáticas. Até há 02 décadas nenhum gene tinha sido identificado com esse tipo de transmissão genética, mas o relato feito por Yarbrough et al., (1996)⁹, em uma família com uma mutação no gene supressor p16 associado à CCECP, sem exposição ao tabaco e álcool, corroboraram esse conceito.

Atualmente admite-se que em neoplasias epiteliais, estima-se a ocorrência de três a seis mutações em genes críticos. Mutações em genes adicionais resultariam no aumento da proliferação e desorganização celular, na progressão tumoral, invasão e metástase¹⁰.

Embora o risco de desenvolver CCECP seja potencializado, principalmente entre os tabagistas e etilistas, indivíduos com CNF não tem esses fatores de risco ambientais tão presentes, devendo então, estarem presentes genes de susceptibilidade ou de predisposição para que ele ocorra^{11,12}.

Para Geisler et al., (2001)¹³, não só a presença de fatores de risco ambientais associados a determinadas regiões como o Sudeste Asiáticos e ou etnias podem mostrar uma predisposição para o CNF, mas que também nesses indivíduos podem ser observadas variações como um polimorfismo mutacional, metabolização de enzimas, como a glutathione S-transferase, que interferem no ciclo celular e na duplicação do DNA.

Assim, conceitualmente Carcinoma de Nasofaringe (CNF) é uma neoplasia epitelial maligna, com evidências, à microscopia óptica e eletrônica, de diferenciação escamosa¹⁴. O CNF possui uma distribuição geográfica e racial distinta e uma etiologia multifatorial⁶⁻¹⁵. É raro nos EUA e em europeus de origem caucasiana⁷⁻¹⁶. Nos EUA a incidência é de 1 a 7 casos para 100.000 indivíduos, com distribuição por sexo de 2.4:1 em relação sexo masculino e feminino. Entretanto, em países Asiáticos como China, Tailândia, Filipinas, Vietnã e outros do norte da África (Argélia e Marrocos), Canadá e Alaska a incidência é alta, de cerca de 150 a 500 casos por 01 milhão de habitantes/ano^{17,18,19}. Em alguns lugares há maior incidência, como em Hong Kong, onde 01 a cada 40 homens desenvolvem CNF antes dos 75 anos de idade¹⁸. Outros autores notaram que o pico de maior incidência ocorre após os 30 anos, sendo maior entre os 40-60 anos, e com declínio após esta idade⁶.

No Brasil é uma neoplasia rara, mesmo em descendentes de indivíduos oriundos de regiões de alta incidência de CNF^{20,21}. Uma das hipóteses para esta distribuição geográfica e demográfica tão específica do CNF, exceto o Brasil, seria uma suscetibilidade genética dessas populações a infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e a fatores ambientais (dietéticos e não dietéticos)^{5,17,19}. A constante associação do EBV com o CNF independente da etnia, indica a importância deste vírus como um oncogene relacionada a essa neoplasia²². Outros fatores envolvidos são: exposição ocupacional ao cigarro, fumaças e poeiras químicas, exposição ao formoldeído e a irradiação¹⁵⁻²³. O CNF é classificado, segundo OMS, nos subtipos: Carcinoma Escamoso Ceratinizante (CEC), Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante

Indiferenciado (CENCI), Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Diferenciado (CENCD) e o sub tipo Basalóide que perfaz menos de 0,2% dos casos. O sub-tipo mais comum é o Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Indiferenciado, que perfaz cerca de 92% dos casos. Nestes a associação com EBV é de 100%¹⁵⁻²². O CNF, principalmente em indivíduos jovens, se caracteriza por sua notória agressividade, com infiltração extensiva loco regional, metástase para os linfonodos, principalmente do pescoço e disseminação hematogênica. Os sítios mais comuns da disseminação à distância são: ossos, pulmão e fígado²⁴. O estadiamento, segundo o sistema TNM específico para o CNF não consegue predizer, com acurácia adequada, a disseminação e o prognóstico desta neoplasia^{25,26}.

Considerações sobre biologia molecular aplicada em câncer

O ciclo celular é classicamente dividido em 4 fases: DNA synthesis (S), mitose (M), e os dois intervalos entre as fases durante os quais as células preparam o DNA para replicação (G1) ou condensação e separação cromossômica (G2). As fases G1 e G2 são críticas, pois erros podem provocar mutagênese ou separação inadequada de cromossomos, o que induz a morte celular (apoptose) e predispõe a perda de controle do crescimento celular. A fase G2 do ciclo celular é a mais importante porque, na ausência de danos ao DNA, à progressão dentro da fase S assegura que o ciclo pode ser completado. É a ativação das citoquinas (CDKY e CDKG) o primeiro sinal que permite as células progredirem para a fase G1, iniciada na fase S^{27,28}.

As citoquinas têm ação reguladora da fosforilação e ligação, por exemplo, da família p16, com as CDKs inibidoras²⁷. Mutações somáticas da p16 são frequentemente associadas com vários tumores incluindo os pulmonares, da cabeça e pescoço, do esôfago, da bexiga e hematológicos²⁸.

Em câncer a pesquisa de marcadores biológicos teriam ação de preditores de comportamento tumoral como os receptores de fator de crescimento (C-ERB), os fatores de

crescimento endotelial, fatores que controlam o ciclo celular como o p27 e talvez o fator mais estudado em câncer de cabeça e pescoço, o gene supressor tumoral TP53. Este gene codifica uma proteína, a p53, responsável pela regulação da síntese do DNA, reparação e apoptose²⁹. Aproximadamente 50% dos CCECP contêm uma mutação no gene TP53. Também genes mediadores do apoptose como o BCL-2 (inibidor) e BAX (acelerador) podem ser considerados como marcadores neoplásicos. A proporção BCL-2/BAX é indicativo de bom prognóstico em indivíduos com CCECP³⁰.

Outros marcadores bastante estudados são as alterações citogenéticas. Ganhos e perdas cromossômicas têm sido identificados por citogenética molecular, sugerindo o envolvimento de oncogenes e genes supressores tumorais³¹.

As alterações mais conhecidas em CCECP são as que envolvem perdas nos cromossomos 3p, 5q, 7q, 8p, 9p, 11q, 13p, 14p, 15p e 18q, enquanto os ganhos envolvem os cromossomos 1q, 3q, 8q, 15q e a região 11q13³². As alterações estruturais recorrentes descritas são: isocromossomos 8q, deleções 3p e região homogeneante coradas 11q13^{17,33}.

Bockmühl et al. (1998)³⁴ mostraram em indivíduos com CCECP perdas e ou deleções envolvendo 2q (19 alterações em 50 casos) e 2q 22 (4 alterações em 3 casos).

Também classes de biomoléculas foram estudadas devido a sua importância na progressão de adesão célula-matriz extracelular e célula-célula. Por exemplo, modificações no nível de expressão de matriz nuclear e na organização na membrana basal têm sido correlacionadas com a progressão e prognóstico de indivíduos com CCECP^{35,36}. Conhecendo o potencial de atividade molecular dessas biomoléculas, constituídas por oligossacarídeos, atenção precisa ser dada para as interações proteínas-proteínas como unidades codificadoras e receptoras formando o que se denominam de “epítopes”, ou seja, proteína marcada por um anticorpo específico, como as lectinas endógenas, regulando as interações e atividades celulares³⁷.

Esses “epítopes”, como a expressão da lectina marcada por anticorpos exógenos, pode ser um método promissor de analisar a atividade tumoral. Outro tipo de proteína, as galectinas, devido a seu envolvimento em várias atividades incluindo a junções, apoptose e interação matriz-célula, podem influenciar vários dos aspectos de comportamento tumoral, como a invasão de tecidos adjacentes e metástases locorregionalmente³⁷⁻⁴⁰.

Uma das principais características clínicas do CCECP, inclusive o CNF, é a sua capacidade de invadir tecidos adjacentes e dar metástases locorregionais. Invasão de células cancerosas, metástases e angiogêneses é um processo complexo envolvendo a cooperação de inúmeras enzimas proteolíticas secretadas pelo tumor ou pelas células do hospedeiro e cujos substratos incluem componentes extracelulares da matriz⁴¹. Evidências sugerem que essas “metaloproteinases matrix (MMPs)” e seus inibidores fisiológicos tissulares (TIMPs) podem ter um importante papel na progressão dos CCECP⁴²⁻⁴⁵.

As MMPs são uma família de endopeptases, dependentes do zinco e cálcio extracelulares, com ação enzimática contra quase todos os componentes protéicos da matriz extracelular. Baseando-se nas propriedades e estruturas protéicas e substratos específicos, as MMPs podem ser divididas em 4 subclasses⁴¹. A primeira subclasse, com tipos I, II e III de colágeno fibrilar, é composta de MMP1 (colágeno intersticial), MMP-13 (colagenase-3) e MMP-18 (colágeno neutrofílico). A segunda subclasse, lisinas estromáticas, incluem 4 membros: MMP-7 (Matrilysin) contendo um pequeno número de propriedades, como de atividades catalíticas, MMP-3 (Stromelysin-1) MMP-10 (Stromelysin-2), e MMP-11 (Stromelysin-3), que contém propriedades adicionais de carboxy-terminal hemopex. Estas lisinas têm uma grande especificidade no substrato e são capazes de degradar muitos componentes extracelulares como as lamininas, fibronectinas e proteoglicinas⁴⁶. Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase-A) e MMP-9 (gelatinase-B) são agrupadas em uma classe separada baseada na presença de propriedades semelhantes à fibronectina. Galectinas são

capazes de clivar tanto as formas desnaturadas de colágenos como do colágeno tipo IV encontrados na membrana basal. Matrix metalloproteinase 2 e MMP9 também contém receptores para gelatinases. O último grupo de MMPs contém receptores de membranas (MT-MMPs), os quais são compostos de MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMPs), MMP-16 (MT3-MMP), MMP-17 (MT4-MMP) e MMP-24 (MT5-MMP). Essas MMPs tem como propriedades clínica processar a sequência hidrofóbica no C-terminal, o qual permite a inserção de proteínas dentro da membrana celular.

Expressão das atividades das MMPs podem ser controladas ao nível da transcrição gênica, pela ativação das proenzimas e por um número grande de inibidores específicos. As células tumorais induzem as células dos hospedeiros do estroma adjacente a secretarem essas enzimas ou vice-versa. A maioria dos MMPs são secretoras com proenzimas latentes que sofrem uma clivagem proteolítica de propriedades aminoterminal durante a ativação. As atividades de MMPs é determinada pela quantidade de proenzimas expressadas, tempo que demora a ativação e pela concentração de inibidores das MMPs, isto é, TIMPs.

Inibidores tissulares de MMPs compreendem no mínimo 4 membros, e, juntos, eles fornecem um mecanismo forte de regulação da função e ativação das MMPs. Estes inibidores de MMP-1 e TIMP-2 tem peso molecular de 28.5 e 21.0 Kd. Eles podem inibir as collagenases, MMP-3 e as gelatinases. Inibidores tissulares de MMP-2 ligam-se preferencialmente as MMP-2, mas também inibem as atividades de MMP-1, MMP-3, MMP-7 e MMP-9 (Umenish et al., 1991)⁴⁷. A expressão dessas enzimas e inibidores tissulares parece ter um papel importante na invasão tumoral e nas metástases.

Muitas destas proteínas estão localizadas em áreas especializadas denominadas microdomínio. Alterações nos microdomínios e seus componentes estão relacionados ao processo de transformação maligna, a que foi observada em melanomas, câncer de mama, colon e pulmão^{48,49}.

A galectina-3 previamente descrita como proteína de ligação IgE, CBP35, Mac-8, L-29, L3 1, L-34. Na ligação com a B-galactoside, une-se a porção de carboidratos das glicoproteínas e ou de glicolipídios da superfície celular. A galectina-3 não está presente no microdomínio transmembrana, mas sim na superfície celular e nos componentes extracelulares em 3 domínios: NH₂-terminal, COOH-terminal e uma sequência de colágeno rica em glicina, prolina e tirosina.

Estudos recentes mostraram que as galectinas-3 e as proteínas de matriz são expressas largamente em células normais e neoplásicas, e regulam o crescimento celular, a adesão celular, a diferenciação e morte celular. Está bem demonstrado que a expressão da galectina-3 correlaciona-se com a transformação neoplásica em alguns tipos de células.

Takenaka et al., em 2004⁵⁰, demonstraram, por exemplo, que a expressão da galectina-3, correlaciona-se com o potencial metastático de algumas proteínas. Para esses autores a detecção da galectina-3 pode ter valor diagnóstico e prognóstico.

A laminina, uma proteína de matriz, que é a principal glicoproteína da membrana basal e regula várias funções celulares por meio de suas ligações com integrinas e não-integrinas lamininas ligadas a proteínas, galectina-3 e outras laminina não integrinas ligada a proteínas. Elas estão presentes na superfície celular e faltam na modulação da adesão das células de cânceres como melanoma.

Outra possibilidade seria a adesão dos neutrófilos a laminina pela galectina-3 exógena. No entanto esta adesão pode ser resultante também da ação da lecitina induzindo ativação dos neutrófilos⁵¹. Em resumo, a galectina-3 pode inibir melanoma, câncer de mama, fibrossarcoma e câncer de próstata, inibindo a adesão as lamininas⁵².

Outras proteínas, expressas em todas células como as integrinas, estão associadas a embriogênese, cicatrização das feridas, inflamação, apoptose, proliferação celular, crescimento tumoral e metástases. Essas integrinas atuam como receptores para

fibronectinas, lamininas, vitronectinas, colágenos e outras proteínas das membranas celulares e teriam papel de não só ligar-se as proteínas da matriz celular mas também participar da transdução com regulação da proliferação celular, da diferenciação, da motilidade e da morte celular⁵³.

Wu et al., em 2006⁵⁴, observaram que a fibronectina, uma das principais proteínas de matriz, estava em quantidade aumentada no sangue periférico de animais com CNF induzidos experimentalmente. Já as galectinas, que são proteínas intra e extra celulares, estariam envolvidas nos processos de diferenciação, proliferação e migração celular. Autores, como Keryer-Bibbens et al., em 2006⁵⁵, estudaram a galectina 9 no CNF, sugerem que esta modularia a resposta dos linfócitos T induzindo a maior eficiência da infecção pelo EBV localizado nas células epiteliais tumorais.

Enfim, mesmo com todas essas informações, ainda hoje, a compreensão exata sobre os mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese ainda não é totalmente conhecida. Sabemos que os eventos iniciais estão relacionados com a inativação de genes supressores tumorais e ativação de protooncogenes. Alterações específicas genéticas ocorrem em ordem generalizada de progressão, mas a ordem temporal não é a mesma para diferentes tumores. Como citamos anteriormente o acúmulo de eventos genéticos é crítico para determinar a progressão tumoral.

Instigante para a ciência é a transferência desses conhecimentos para a prática clínica. Atualmente a classificação TNM para neoplasias de cabeça e pescoço, embora muito útil, não é suficiente para estabelecer marcadores prognósticos clínicos. Por isso, o estudo de marcadores genéticos moleculares é relevante no sentido de melhorar e complementar os métodos de estadiamento tumoral⁵⁶.

Finalmente na prática clínica diária a utilização de outros marcadores, não genéticos, como as proteínas de matriz poderiam ser úteis^{29,37-41}. Assim o objetivo de nossa

pesquisa é correlacionar se a expressão da galectina-3 e outras proteínas de matriz poderiam ter valor para entender a agressividade tumoral, bem como o prognóstico em indivíduos com Carcinoma de Nasofaringe.



Objetivos

2. Objetivos

1. Estudar a presença e a distribuição das proteínas de matriz, laminina, fibronectina e a galectina-3.
2. Estudar a associação das proteínas de matriz, galectina-3, laminina e a fibronectina com as variáveis invasão e metástase locoregional.
3. Relacionar, se a expressão dessas proteínas podem ser caracterizadas como fator de prognóstico em indivíduos com CNF.



Casuística e Métodos

3. Casuística e Métodos

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

Estudo retrospectivo, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob numero 482/2007 (anexo 1).

Como se trata de estudo retrospectivo sem interferências sobre as condutas terapêuticas e não necessidades de novos procedimentos diagnósticos não houve necessidade de novo termo de consentimento livre e esclarecido dos indivíduos estudados. No entanto, durante a coleta de dados foram mantidos o sigilo dos indivíduos, identificados apenas pelas suas iniciais e o registro hospitalar arquivados em arquivo próprio do pesquisador principal.

Os dados obtidos ficarão disponíveis no prontuário medico dos indivíduos e no arquivo do pesquisador principal.

1) Caracterização da amostra:

Foram selecionadas 30 lâminas e blocos parafinados, do período de 1990 a 2008, arquivados no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, São Paulo, Brasil, cujos laudos anátomopatológico foram de Carcinoma de Nasofaringe. As lâminas foram revisadas por um único patologista e reclassificadas segundo Classificação da WHO-2005. Os prontuários médicos contidos no Arquivo Médico Central, Arquivo da Quimioterapia e da Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu foram revisados em busca de dados clínicos relevantes como: sexo, idade, naturalidade, profissão, classificação TNM, linfonodos, tratamento, recidiva e sobrevida (Tabela 1). Todos os casos incluídos eram pré-tratamento e as biópsias analisadas correspondiam a do diagnóstico inicial. Como controle utilizou-se 25 amostras retiradas de nasofaringe sem alterações macroscópicas

provindas de necropsias realizadas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil.

2) Estudo Imunohistoquímico:

A reação de imunohistoquímica foi realizada pelo método de Avidina Biotina Peroxidase⁵⁷ utilizando-se anticorpos anti-laminina (monoclonal-DAKO clone M7262), anti-fibronectina beta (policlonal-DAKO clone AO245), anti-colágeno IV (monoclonal-DAKO clone MO785), anti-galectina-3 (monoclonal-RDI clone 9C4), em lâminas separadas e devidamente marcadas, na concentração de 1:800, 1:50, 1:50, 1:50 diluídos em tampão específico (DAKO-S3022). A reativação antigênica foi realizada pelo calor, utilizando-se forno de microondas (SHARP 900 W) em tampão citrato pH 6.00/0,01mM (MERCK,1.00244) por 15 minutos.

As lâminas foram incubadas por 18 horas em câmara úmida a 8°C. Utilizou-se o anticorpo secundário associado ao KIT-EnVision (DAKO K4003 e 4001), com tempo de incubação de 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi revelada pelo cromógeno e pelo substrato 3,3-diaminobenzidina (KIT DAKO-K3468) e contra corada com hematoxilina de Mayer (MERCK 1.09249).

3) Leitura da reação de Imunohistoquímica:

A leitura do estudo imunohistoquímico foi realizada por um único patologista, Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues, que averiguou a distribuição das proteínas de matriz laminina, fibronectina beta, colágeno IV e galectina-3. As lâminas foram lidas em microscopia óptica, considerando-se a positividade e negatividade de cada marcador bem como sua distribuição, comparando ao tecido controle. A positividade foi dividida em graus

semiquantitativos, conforme a intensidade da imunoexpressão: grau I intensidade fraca, grau II moderada e grau III forte. A distribuição foi descrita como estromal e/ou citoplasmática e/ou nuclear. Porém para a análise estatística, devido ao tamanho da casuística, optou-se por considerar resultado positivo ou negativo, independente da distribuição.

3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente a casuística foi descrita segundo sexo, idade, características do tumor, presença de proteínas de matriz, tempo de sobrevida e recidiva.

Em seguida, as associações entre sexo, características do tumor, presença de proteínas de matriz e tempo de sobrevida e recidiva foram estimados pelo teste exato de Fisher com o objetivo de identificar possíveis variáveis/fatores confundimento.

A terceira etapa da análise foi a estimativa do efeito da presença das proteínas de matriz sobre a recidiva até os 5 primeiros anos após início do tratamento pela estimativa pontual e intervalar do *Odds-Ratio* e o estudo do efeito das combinações de proteína de matriz pelo teste exato de Fisher.



Resultados

4. Resultados

4.1. DESCRIÇÃO DA CASUÍSTICA

Tabela 1 – Caracterização da casuística.

Variável	Freq. absoluta	% Relativo ⁽²⁾
Sexo masculino (♂) e feminino (♀)	20(♂)/10(♀)	66,7/33,3
Idade⁽¹⁾	9/77 47,9±18,1	51,5 (36,5 ; 61,0)
Características do tumor		
Tipo histopatológico		
CEC	3	10,0
CENCI	23	76,7
CENCID	4	13,3
Presença de linfonodo	21	77,8
Extensão do linfonodo		
Unilateral	14	66,7
Bilateral	7	33,3
Estadiamento TNM		
2	2	7,7
3	14	53,8
4	10	38,5
Tipo de tratamento		
Somente quimioterapia	1	3,8
Somente radioterapia	4	15,4
Ambos	21	80,8
Proteínas de matriz		
Presença de laminina	23	76,7
Presença de fibronectina	13	43,3
Presença de galectina-3	21	70,0
Presença de colágeno IV	0	0,0
Prognóstico		
Tempo de acompanhamento		
Acompanhados por um período menor que 5 anos	16	64,0
Informação sobre recidiva	11	42,3
Recidiva durante o período de acompanhamento	8	72,7%
Acompanhados por um período maior que 5 anos	9	36,0
Informação sobre recidiva	9	
Recidiva antes de 5 anos	0	0,0%
Recidiva após 5 anos	2	100,0%

(1) Resumo descritivo em mínimo/máximo, média, desvio-padrão e quartís

(2) Ao total de unidades observacionais com a informação

A idade média dos pacientes avaliados foi de 48 anos, com uma variação entre 9 a 74 anos. Cerca de 50% dos casos tinham menos de 51 anos e 25% tinham mais de 61 anos. Houve predomínio do sexo masculino em relação ao sexo feminino na proporção de 2:1. Em quatro casos obtivemos apenas os dados idade, sexo e o diagnóstico anátomo patológico. As características clínicas e variáveis dos outros 26 pacientes estão resumidas na tabela 1.

Exame Anatomopatológico

Dentre os 30 casos estudados, 76,7% eram do subtipo Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Indiferenciado (CENCI) (Figura 1). Os subtipos Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Diferenciado (CENCD) (Figura 2) e o Carcinoma Escamoso Ceratinizante (CEC) foram encontrados em percentuais semelhantes e em menor frequência (Tabela 1).

Quanto ao sexo e a idade dos 23 casos de subtipo CENCI, 69,6% eram homens e a idade média, independentemente do sexo, foi de 48 anos com um desvio-padrão de 20,15, o que indica uma alta variabilidade da idade no momento da classificação histopatológica. O caso mais jovem tinha 9 anos enquanto que o caso mais velho, 77 anos. Cerca de 25% dos casos do subtipo CENCI tinham idade abaixo 35 anos e 25% dos casos mais velhos apresentaram idade acima dos 64 anos.

Caracterização das proteínas de matriz

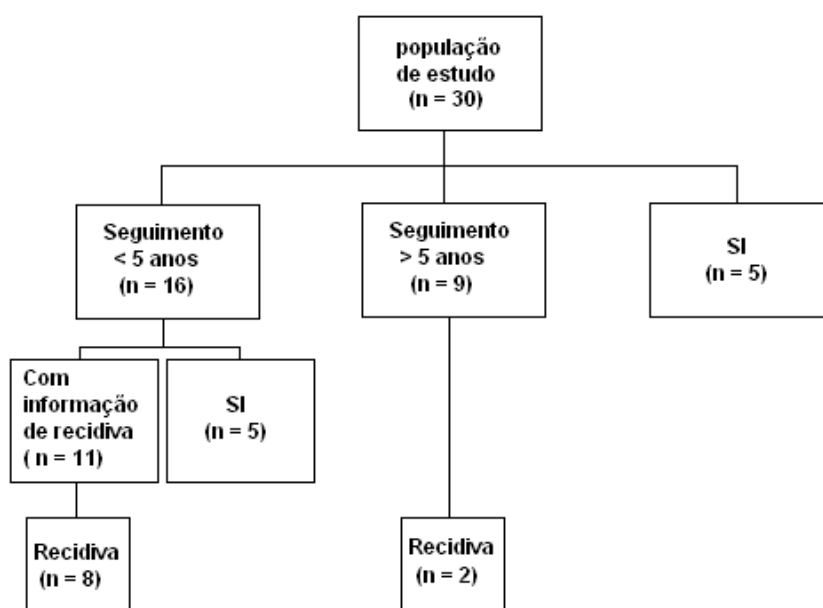
Dentre as amostras analisadas a laminina foi a proteína de matriz mais presente (76,7% de amostras positivas), seguida da galectina-3 (70%) e da fibronectina em 43,3% das amostras positivas. O colágeno IV não foi positivo em nenhuma das amostras analisadas (Figura 3, 5, 6 e 4 respectivamente).

Das 18 amostras com a presença simultânea da laminina e da galectina-3, 15 eram de subtipo morfológico CENCI, 2 eram de subtipo CENCD e 1 era de subtipo CEC. Em

9 amostras foram observadas a presença simultânea das proteínas fibronectina e galectina-3 sendo que 7 destas 9 amostras eram de subtipo CENCI .

A imunoexpressão revelou variações de grau I ao grau III localizadas ao redor da célula neoplásica para as proteínas laminina e da fibronectina (Figura 3 e 4) e a mesma variação da galectina-3 porém, esta localizada no núcleo e no citoplasma (Figura 5 e 6). Apesar das imunoexpressão terem sido analisadas conforme descrito, devido a pequena amostragem, a análise estatística foi realizada desconsiderando o grau e levando-se em consideração apenas o resultado positivo e negativo da mesma.

Prognóstico



Quadro 1. Distribuição das recidivas seguindo tempo de acompanhamento. SI (sem informação).

Das 30 lâminas analisadas, 16 eram de pacientes seguidos por, no máximo, 5 anos sendo que, destes, 8 recidivaram dentre os 11 que possuíam tal informação e, dentre os 9 que foram acompanhados por mais 5 anos, 2 recidivaram (Quadro 1).

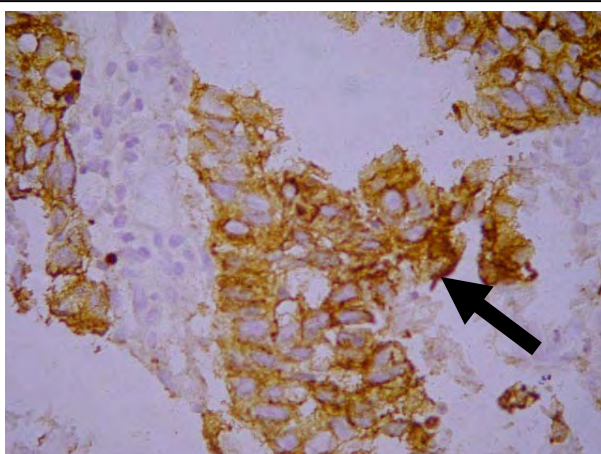
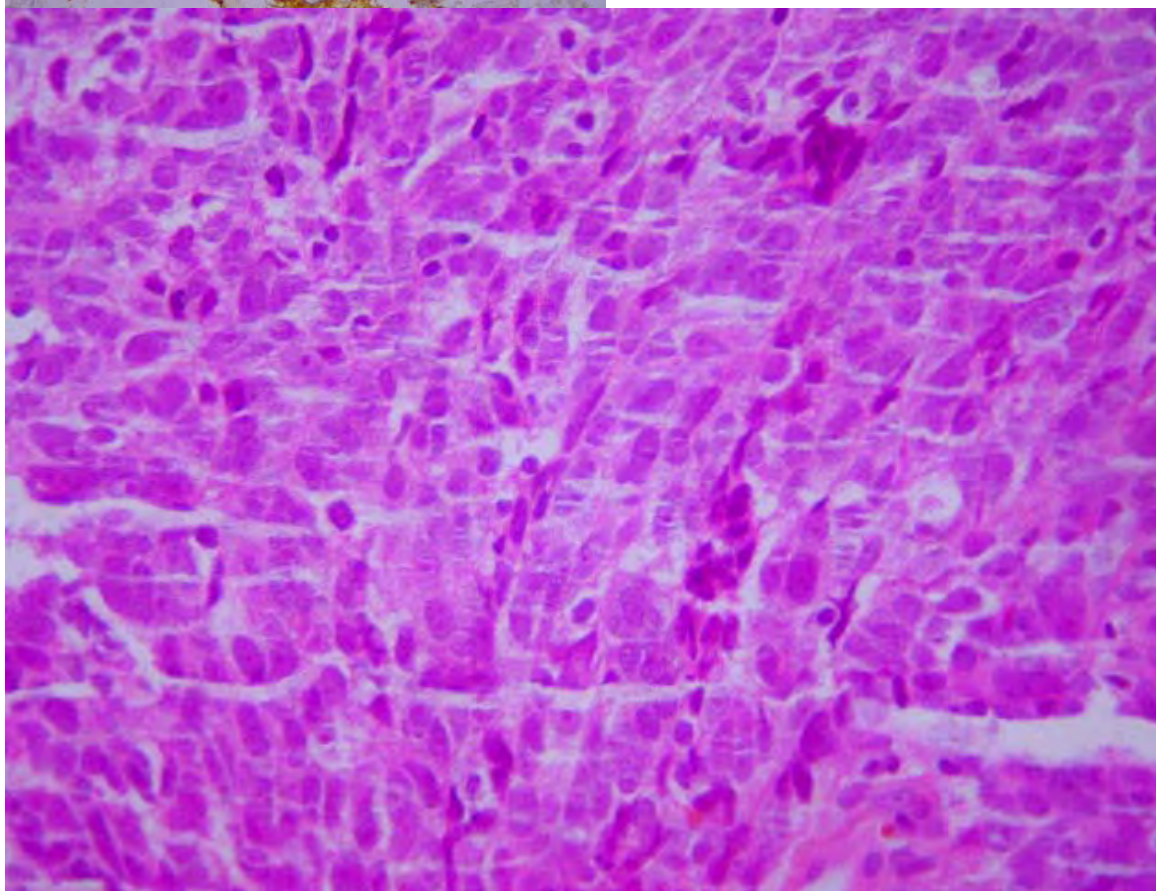


Figura 1. Morfologia do Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Indiferenciado (CENCI) Citoqueratinas positivas nas células neoplásicas IMH 40X (seta).



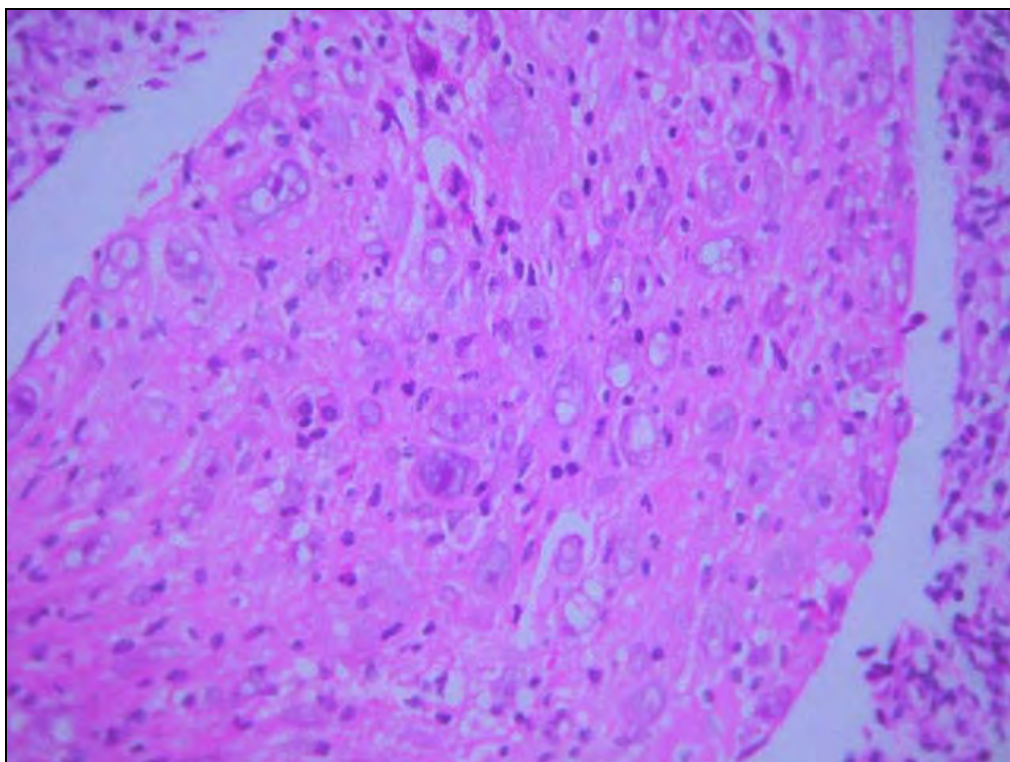


Figura 2. Morfologia do subtipo Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Diferenciado (CENCD), HE 40X.

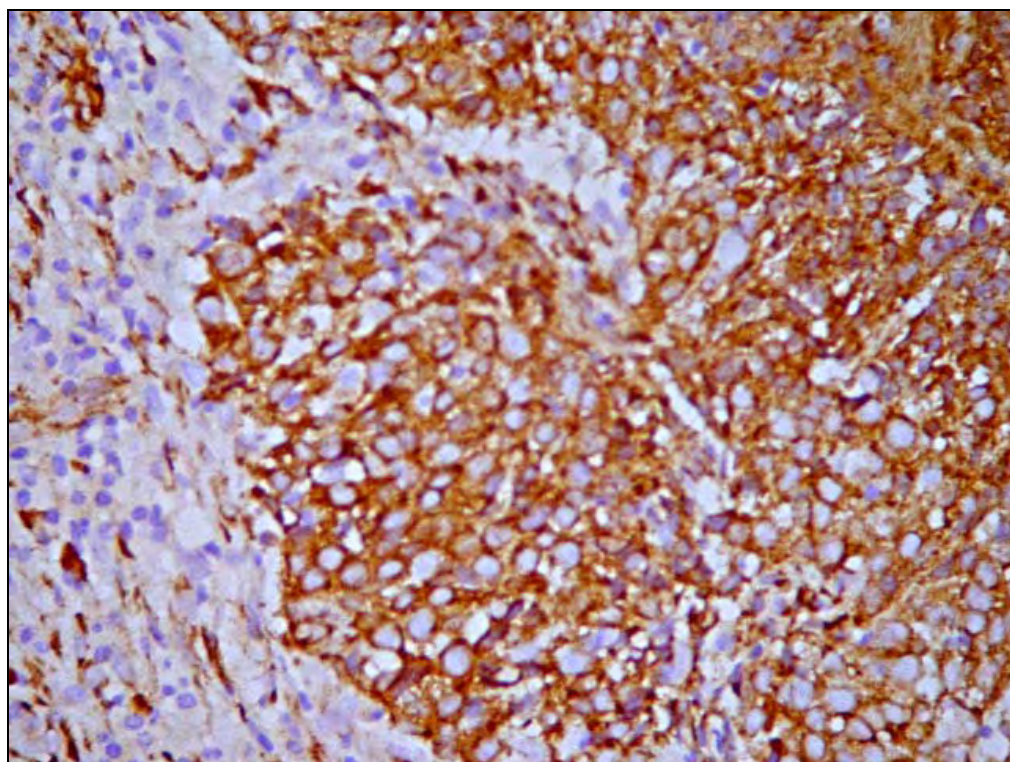


Figura 3. Laminina – Imunomarcção positiva nas células neoplásicas 40X.

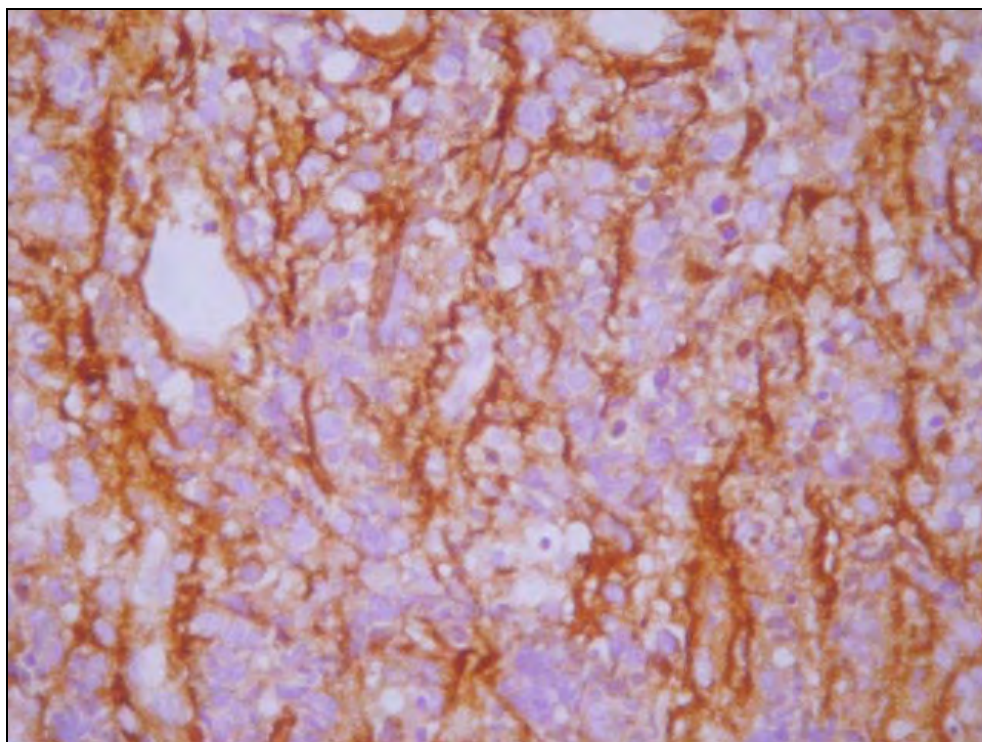


Figura 4. Fibronectina: Imunomarcção positiva na matriz ao redor das células neoplásicas 40X.

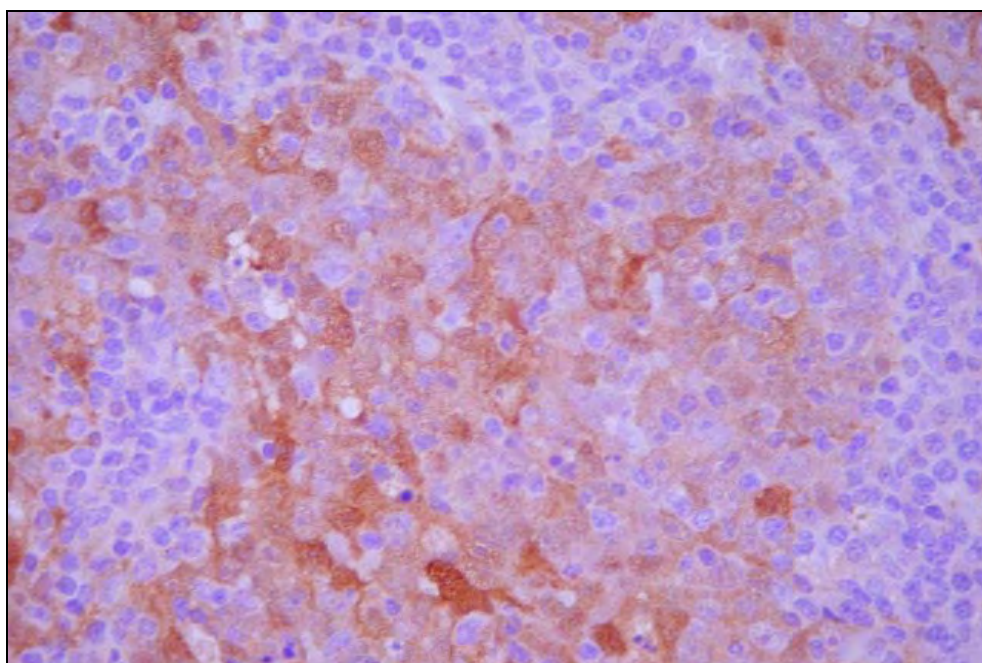


Figura 5. Imunomarcção positiva da Galectina 3 na matriz.

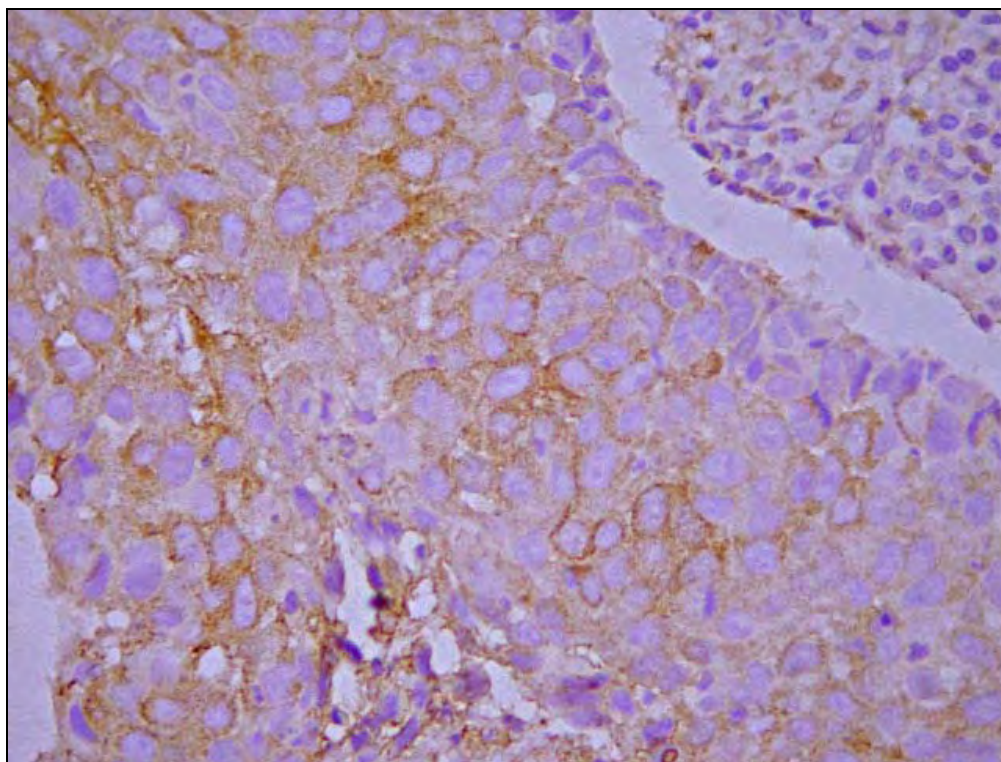


Figura 6. Imunomarcacão positiva da Galectina-3 nas células neoplásicas.

4.2. ASSOCIAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS, CARACTERÍSTICAS DO TUMOR, TRATAMENTO E PROGNÓSTICO.

A informação sobre a recidiva foi encontrada nos prontuários de 20 sujeitos do estudo. Destes, 10 recidivaram, sendo 8 recidivas ocorridas antes dos 5 anos após o tratamento e 2 após 5 anos. As estimativas das associações entre sexo, características do tumor, tratamento e recidiva são apresentadas nas tabelas a seguir.

Tabela 2. Associação entre sexo e prognóstico.

	<i>Sexo</i>		<i>p^(*)</i>
	<i>Feminino</i>	<i>Masculino</i>	
Recidiva antes dos 5 anos	2/3 (66,6%)	6/14 (42,9%)	0,576
Recidiva em geral	2/5 (40,0%)	8/15 (53,3%)	1,000

(*) Teste exato de Fisher.

Observou-se que, antes de 5 anos de acompanhamento, 66,6% das mulheres recidivaram contra 42,9% dos homens. Embora esta diferença seja de 23,7%, não houve evidência para concluir que esta diferença seja estatisticamente significativa. Em relação a recidiva independentemente do tempo de acompanhamento, a diferença em percentual entre os sexos foi menor (13,3%) e também sem significância estatística.

Quanto a relação entre idade e recidiva, antes dos 5 anos de acompanhamento o aumento da idade reduziu, porém, de forma não significativa, a chance de recidiva OR = 0,75 IC (OR;95%) = (0,32 – 1,78). Estudando esta relação independentemente do tempo de acompanhamento, o aumento da idade aumentou, mas também de forma não significativa, a chance de recidiva, OR = 1,05 IC (OR;95%) = (0,97 – 1,14).

Tabela 3. Associação entre linfonodo e prognóstico.

	<i>Linfonodo</i>		<i>p</i> ^(*)
	<i>Ausente</i>	<i>Presente</i>	
Recidiva antes dos 5 anos	0/5 (0,0%)	8/12 (66,7%)	0,029
Recidiva em geral	2/6 (33,3%)	8/14 (57,1%)	0,628

(*) Teste exato de Fisher

Observou-se associação significativa entre presença de linfonodo e recidiva antes dos 5 anos de acompanhamento sendo que 66,6% dos pacientes com linfonodo recidivaram antes dos 5 anos contra nenhum dos 5 pacientes sem linfonodo.

Tabela 4. Associação entre estágio e prognóstico.

	<i>Estadio (TNM)</i>			<i>p</i> ^(*)
	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	
Recidiva antes dos 5 anos	0/1 (0,0%)	6/12 (50,0%)	2/4 (50,0%)	1,000
Recidiva em geral	0/1 (0,0%)	8/14 (57,1%)	2/4 (50,0%)	1,000

(*) Teste exato de Fisher. Comparação feita entre os estadiamentos 3 e 4.

A associação entre estadiamento e recidiva foi estudada desconsiderando o estadiamento 2 por se tratar de apenas um caso. Na comparação entre os estadiamentos 3 e 4 em relação ao percentual de casos de recidiva, não houve diferença significativa entre tais estadiamentos.

Tabela 5. Associação entre tratamento e prognóstico.

	<i>Tratamento</i>		
	<i>Quimioterapia</i>	<i>Radioterapia</i>	<i>Quimio + radio</i>
Recidiva antes dos 5 anos	1/1 (100,0%)	0/2 (0,0%)	9/17 (52,9%)
Recidiva em geral	1/1 (100,0%)	0/2 (0,0%)	7/14 (50,0%)

A Tabela 5 apenas apresenta a distribuição das recidivas segundo tratamento sem análise estatística devido a pequena quantidade de casos submetidos somente a quimioterapia e a radioterapia.

4.3. RESULTADOS PRINCIPAIS

Tabela 6. Distribuição dos pacientes segundo recidiva geral e recidiva antes dos 5 anos.

Situação	Recidiva	p ^(*)	Recidiva em 5 anos	p ^(*)
Presença de alguma proteína				
Não	2/4 (50,0%)	1,000	0/3 (0,0%)	0,206
Sim	8/16 (50,0%)		8/14 (57,1%)	
Apenas Laminina				
Não	9/19 (47,4%)	1,000	7/16 (43,8%)	0,471
Sim	1/1 (100,0%)		1/1 (100,0%)	
Apenas Laminina e Fibronectina				
Não	10/19 (52,6%)	1,000	8/16	1,000
Sim	0/1 (0,0%)		0/1	
Apenas Laminina e Galectina-3				
Não	5/13 (38,5%)	0,350	3/10 (30,0%)	0,153
Sim	5/7 (71,4%)		5/7 (71,4%)	
Apenas Fibronectina e Galectina-3				
Não	9/19 (47,4%)	1,000	7/16 (43,8%)	0,471
Sim	1/1 (100,0%)		1/1 (100,0%)	
Laminina, Fibronectina e Galectina-3				
Não	9/15 (60,0%)	0,303	7/13 (53,8%)	0,576
Sim	1/5 (20,0%)		1/4 (25,0%)	
Total de proteínas presentes				
0	2/4 (50,0%)		0/3 (0,0%)	
1	1/2 (50,0%)		1/1 (100,0%)	
2	6/9 (66,6%)		6/9 (66,6%)	
3	1/5 (20,0%)		1/4 (25,0%)	
4	0/0		0/0	

(*) Teste exato de Fisher.

Dentre as associações estudadas, merece destaque a comparação entre pacientes que apresentaram apenas as proteínas laminina e galectina-3 e os demais pacientes em relação ao percentual de casos de recidiva antes dos 5 anos ($p = 0,153$) e o estudo do efeito do total de proteínas sobre a chance de recidiva. Estudou mostrou que, uma proteína a mais aumentou, porém, não significativamente, a chance de recidiva em 5%, $OR = 1,05$ $IC(OR;95\%) = (0,99 - 1,13)$, $p = 0,083$.

Tabela 7. Estimativa do efeito das proteínas de matriz.

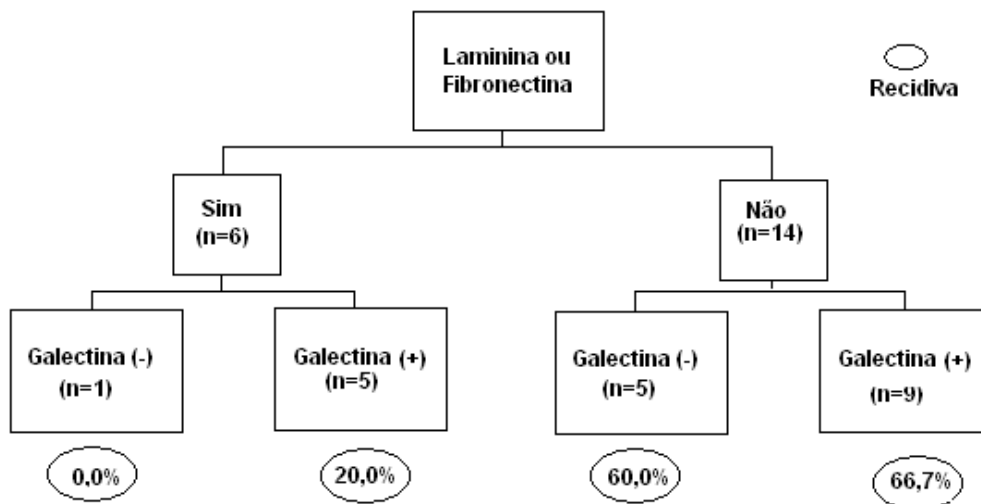
<i>Proteína</i>	<i>Prognóstico</i>	<i>p</i>	<i>OR</i>	<i>IC(OR;95%)</i>
Presença de Laminina	Recidiva	1,000	1,00	(0,14 – 6,77)
	Recidiva antes dos 5 anos	0,328	3,50	(0,28 – 43,16)
Presença de Fibronectina	Recidiva	0,171	0,25	(0,03 – 1,81)
	Recidiva antes dos 5 anos	0,407	0,41	(0,05 – 3,30)
Presença de Galectina-3	Recidiva	0,223	4,37	(0,40 – 47,01)
	Recidiva antes dos 5 anos	0,172	5,60	(0,47 – 66,44)

A Tabela 7 apresenta a estimativa da associação entre a presença de cada uma das proteínas de matriz, independentemente da presença das demais sobre a chance de recidiva geral e recidiva em 5 anos. Com base nas estimativas pontual de intervalar do odds-ratio, não houve evidência, sob ponto de vista estatístico, para concluir acerca de uma associação positiva entre presença de uma proteína de matriz e a chance de recidiva e recidiva no geral. Entretanto, observa-se que, embora não significativo, a presença de fibronectina reduziu a chance de recidiva geral e recidiva em 5 anos, ao contrário das demais proteínas.

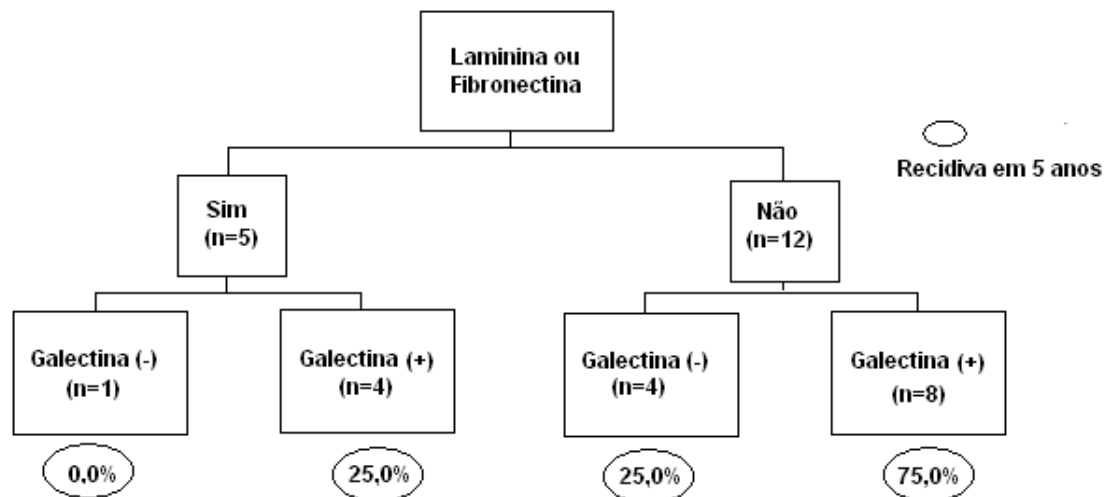
Tabela 8. Distribuição dos pacientes com Laminina e Fibronectina segundo presença de Galectina-3 e recidiva no geral e recidiva antes dos 5 anos após tratamento.

<i>Laminina ou Fibronectina presente</i>	<i>Prognóstico</i>	<i>Galectina-3 ausente</i>	<i>Galectina-3 presente</i>	<i>p^(*)</i>
Não	Recidiva	3/5 (60,0%)	6/9 (66,7%)	1,000
	Recidiva em 5 anos	1/4 (25,0%)	6/8 (75,0%)	0,222
Sim	Recidiva	0/1 (0,0%)	1/5 (20,0%)	1,000
	Recidiva em 5 anos	0/1 (0,0%)	1/4 (25,0%)	1,000

(*) Teste exato de Fisher



Quadro 2. Correlação da presença de proteína de matriz e galectina-3 com recidiva em geral.



Quadro 3. Correlação da presença de proteínas de matriz e galectina antes de 05 anos.

Tabela 9. Distribuição dos pacientes que apresentaram somente laminina e somente fibronectina segundo recidiva geral e recidiva antes dos 5 anos após tratamento entre pacientes com Galectina-3.

<i>Prognóstico</i>	Somente Laminina	Somente Fibronectina
Recidiva	5/7 (71,4%)	1/1 (100,0%)
Recidiva em 5 anos	5/7 (71,4%)	1/1 (100,0%)

Dentre os pacientes com galectina-3, 71,4% dos 7 pacientes que tinham laminina recidivaram antes dos 5 anos após o início do tratamento (Quadros 2 e 3). As baixas frequências absolutas impossibilitam a aplicação de técnica estatística para a comparação entre os grupos de pacientes que possuem apenas laminina em relação ao grupo de pacientes que possuem apenas fibronectina (Tabela 9).

A Tabela 10 apresenta a distribuição e o estudo da associação entre a ausência da Fibronectina em pacientes com as outras duas proteínas de matriz presentes. Na presença da Fibronectina, 25,0% dos pacientes recidivaram antes dos 5 anos após o início do tratamento enquanto que, dos 7 pacientes que possuíam a Laminina e Galectina-3 somente, cerca de 71,4% recidivaram. Apesar da diferença de quase 50% entre os dois grupos de pacientes, não foi detectada uma diferença significativa sob ponto de vista estatístico. Entretanto, simulação mostrou que em uma casuística 2 vezes maior, o mesmo teste estatístico apresentaria um p-valor igual a 0,036 desde que as proporções de recidiva fossem mantidas.

Tabela 10. Associação entre presença de Fibronectina e recidiva geral e recidiva antes dos 5 anos após tratamento.

<i>Prognóstico</i>	<i>Laminina e Fibronectina e Galectina-3</i>	<i>Laminina e Galectina-3</i>	<i>p^(*)</i>
Recidiva	1/5 (20,0%)	5/7 (71,4%)	0,242
Recidiva em 5 anos	1/4 (25,0%)	5/7 (71,4%)	0,242

(*) Teste exato de Fisher.



Discussão

5. Discussão

O CNF é uma neoplasia maligna que apresenta características distintas em relação as outras que ocorrem em cabeça e pescoço, devido a seus aspectos epidemiológicos, entre eles os fatores raciais, alimentares e a resposta terapêutica. É uma entidade rara na maioria das regiões do nosso planeta, correspondendo a 0,7% do câncer no mundo⁶¹. Nos EUA a incidência é de 07 casos diagnosticados a cada um milhão de pessoas. No entanto, no sudoeste da China, na região central da província de Guangdong, no sudoeste asiático, em nativos da região Ártica, em árabes do norte da África e em partes do Mediterrâneo a incidência é alta, chegando a 300 a 800 indivíduos por milhão de habitantes^{6,7,8}.

Essa heterogeneidade, tanto epidemiológica como histopatológica, requer uma visão diferenciada para o diagnóstico, tratamento e prognóstico. Os fatores mais descritos na literatura correlacionados com a etiologia do CNF são os ambientais como exposição a solventes, alguns tipos de tabagismo, hábitos alimentares, infecção pelo EBV e fatores genéticos. Entretanto acredita-se que o tabaco (cigarros, charutos) e o álcool tenham menor influência no CNF que nos demais carcinomas escamosos de cabeça e pescoço⁽¹⁷⁾. No Brasil as poucas séries de casos descritos de CNF, não observou-se diferenças quanto a etnias e algum fator predisponente^{2,4,20}. Em nossa casuística observamos apenas 01 descendente de oriental (japonês), embora o Estado de São Paulo seja um dos pólos de imigração oriental no Brasil.

Carvalho et al., em 2008²⁰, numa série de 16 pacientes avaliados no período de 15 anos (1991 a 2006), observaram oito casos de CNF dentre 16 tumores de nasofaringe. Nossa casuística de 26 pacientes, em um total de 30 lâminas analisadas, diagnosticados no período de 1990 a 2008, mostra características epidemiológicas semelhantes aos de outros autores^{20,21}. A idade média foi de 48 anos (9 a 77 anos) e predominância de sexo masculino

para o feminino. Somente quatro tinham menos de 18 anos de idade, e a maioria dos indivíduos, estavam entre a quinta e a sexta década de vida. Os casos de CNF na infância e adolescência, embora raros, são mais agressivos e quando diagnosticados, o foram em estádios avançados. Nosso estudo, mesmo com “n” pequeno, demonstra que os indivíduos de baixo risco para esta neoplasia mostram uma tendência de distribuição bimodal, com primeiro pico na adolescência e um segundo pico após os 65 anos. Quanto ao estágio da neoplasia, encontramos uma distribuição dos pacientes nos estádios Tx=3, T1=02, T2=09, T3=05 e T4=07. Dados descritos na Figura 01, e na Tabela 02, mostra que a análise estatística é significativa nos 26 pacientes quanto ao seu estágio e comprometimento dos linfonodos. Cinco deles com estágio NOM0, apenas 02 tiveram sobrevida maior que 05 anos, sem recidiva. Outro paciente foi a óbito por complicação cardiopulmonar após a quimioterapia e radioterapia. Dos outros 20 indivíduos, em 11 a presença de linfonodos era positiva, e tiveram recidiva e sobrevida menor que 05 anos. Outros 04 foram a óbito no primeiro ano após o diagnóstico, mostrando uma grande agressividade tumoral. Khanfir et al., 2007²⁴, relataram que a presença da metástase regional e com linfonodos positivo a distância, são importantes fatores prognóstico e de sobrevida dos pacientes.

Apesar de que em nossos casos não procuramos identificar a presença do EBV, quando presente em CENCI, ele tem papel importante nas organelas citoplasmáticas e nas proteínas das membranas celulares. Acredita-se que esse vírus infecte as células epiteliais, codificando proteínas de membrana tipo LMP1, 2A e 2B. A LMP1 tem capacidade transformadora, inibindo a diferenciação escamosa, diminuindo a síntese das citoqueratinas e aumentando as proteínas de adesão tipo ICAM 1 e o antígeno CD40. Ela ainda poderia ter uma função igual a do TNF, tendo a capacidade de transformar fibroblastos estromais. A expressão da LMP1 também está associada ao aumento da motilidade celular e capacidade de invasão⁵³. Porém, mesmo para esses autores, não está claro qual é o mecanismo que a LMP1

modificaria a célula epitelial. Estudos, *in vitro*, demonstraram a capacidade da LMP1 de induzir mudanças na expressão das proteínas de matriz⁵³. Em nosso estudo, observamos que as proteínas de matriz estudadas, laminina e fibronectina, estavam aumentadas no estroma ao redor das células tumorais. Esse aumento da expressão da laminina poderia estar ligada a LMP1/ LMP2A induzido pelo genoma viral, causando uma desregulação nas proteínas de adesão celular? Wang e Gao, 1998, que mostraram que laminina, fibronectina e colágeno IV estavam aumentadas junto as células tumorais, o que poderia influenciar a sobrevida dos pacientes. Nossa pesquisa com a proteína fibronectina, embora não significativo estatisticamente, reduziu a chance de recidiva neoplasica. Takenaka et al., 2004⁵⁰, ao estudarem proteomas secretados de duas linhagens de células de CNF por meio de biomarcadores celulares, encontraram a fibronectina, Mac-2 binding proteína (Mac-2 BP), ativador e inibidor 1 de plasminogênio (PAI-1) altamente expressas nas biópsias de CNF (n=46), mas fracamente ou não expressas no tecido normal da nasofaringe (n=47)⁵².

Em relação as galectinas cujos dados estão nas tabelas 07 a 10, observamos um aumento da expressão da galectina-3, positiva em 70% dos casos, o que revela uma positividade citoplasmática e nuclear focal comum em casos de CENCI. Isto nos induz a crer que esta proteína, principalmente quando associada a laminina, possa provocar alterações dos mecanismos de controle de replicação celular como as provocadas pelo EBV. Em 18 de nossos casos a laminina e a galectina-3 tiveram correlação positiva de imunoexpressão (tabela 07), demonstrando ações conjuntas que possam estar envolvidas na progressão do CENCI³⁶. Em outros 07 casos observou-se correlação positiva entre as três proteínas laminina, fibronectina e galectina-3, sendo que em somente 01 caso era CENCD, e os demais eram CENCI. Esses achados confirmaram que na patogenia do CNF, principalmente no subtipo CENCI, as proteínas de matriz tem importante papel, provavelmente modulado pelas proteínas virais de latência como a LMP1 e 2A.

Mesmo com esses conhecimentos, a caracterização dos padrões de expressão das proteínas de matriz em pacientes com CNF, ainda é controversa, diferente das descrições em outros sítios ou órgãos da cabeça e pescoco^{24,33,35,42,43,50}. Assim, quando analisamos a expressão dessas proteínas, principalmente da galectina-3, nas amostras dos pacientes com CNF, foi encontrado um aumento de sua expressão na maioria das amostras, correlacionando-a com a metástase nos linfonodos regionais e recidiva da neoplasia (Tabela 07).

Nossos dados da expressão da galectina-3 mostram que de fato há associação da galectina-3 com a recidiva da neoplasia e presença positiva de linfonodo. A análise estatística mostra valores de “p” decrescentes, embora não ainda significantes, para uma expressão maior da galectina-3 sugestivo de uma neoplasia mais agressiva do ponto de vista biológico, o que em tese teria valor como marcador biológico.

Porém essa agressividade biológica, a perda da diferenciação celular dos CNF e a progressão do estadio T1 para T4, aparentemente não refletiu a variação da expressão das proteínas estudadas por nós, quando isoladas, embora o pequeno número de casos dificulte alguma inferência estatística. Esse mesmo cuidado temos que observar quanto a progressão clínica dos pacientes com N negativo para N positivo, que foi acompanhada pelo aumento da expressão da galectina-3.

Enfim, é necessário ter cautela para tentar transferir os nossos achados para situações clínicas que envolvam prognóstico e sobrevida dos pacientes e a expressão das proteínas estudadas. Apesar de existir algumas evidências a favor de poderem ser utilizadas como biomarcadores para terapia e prognóstico em carcinoma de nasofaringe, principalmente com a expressão da galectina, outros trabalhos sugerem que essa correlação não existe³⁸.



Conclusões

6. Conclusões

A expressão das proteínas de matriz, laminina, fibronectina e a galectina-3 está aumentada nas 30 amostras.

Não houve evidências, sob o ponto de vista estatístico, para se concluir acerca de uma associação positiva entre a presença de determinada proteína e a chance de recidiva neoplásica.

Embora sem significância estatística, a expressão aumentada de fibronectina reduziu a chance de recidiva geral e recidiva em 05 anos, ao contrário das demais proteínas.

Dentre as associações estudadas laminina, fibronectina e galectina-3 a associação da laminina e galectina-3 aumentaria a chance de recidiva, embora não significante estatisticamente pelo pequeno número de casos.



Referências Bibliográficas

7. Referências

1. Volkers N. Women's work: occupational cancer risks investigated at international conference. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(23):1895-7.
2. Dedivitis RA, Castro MAF, Denardin OVP. Tumores primários múltiplos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço.* 2009;38(4):211-4.
3. Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD, Weidauer H. Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *Clin Invest.* 1992;70(3-4):320-7.
4. Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Raimundo NP, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil. A case control study. *Int J Cancer.* 1989;43(6):992-1000.
5. Papadimitrakopoulou VA. Carcinogenesis of head and neck cancer and the role of chemoprevention in its reversal. *Curr Opin Oncol.* 2000;12(3):240-5.
6. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GOBOCAN 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. Lyon: IARC Press; 2001. IARC Cancer Bases.
7. Davies L, Welch HG. Epidemiology of head and neck cancer in the United States. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;135(3):451-7.
8. Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF, Robinson RA, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;124(9):951-62.
9. Parkin DM, Pisani P, Ferldy J. Estimates of the world incidence of eighteen major cancer in 1985. *Int J Cancer.* 1993;54(4):594-606.

10. Yarbrough WG, Aprelikova O, Pei H, Olshan AF, Liu ET. Familial tumor syndrome associated with a germline nonfunctional p16INK4a allele. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(20):1489-91.
11. Papadimitrakopoulou VA. Carcinogenesis of head and neck cancer and the role of chemoprevention in its reversal. *Curr Opin Oncol.* 2000;12(3):240-5.
12. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993;9(4):138-41.
13. Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF, Robinson RA, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;124(9):951-62.
14. Egeli U, Ozkan L, Tunca B, Kahraman S, Cecener G, Ergül E, et al. The relationship between genetic susceptibility to head and neck cancer with the expression of common fragile sites. *Head Neck.* 2000;22(6):591-8.
15. Jefferies S, Foulkes WD. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2001;37(2):115-26.
16. Geisler SA, Olshan AF. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2001;154(2):95-105.
17. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and genetics the head and neck tumors. Lyon: IARC Press; 2005.
18. Chan JKC, Bray F, McCarron P, Foo W, Lee AWM, Yip T, et al. Nasopharyngeal carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology e genetics head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005. p.85-97.
19. Ou SH, Zell JÁ, Ziogas A, Anton-Culver H. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in the United States: improved survival of Chinese patients within the keratinizing squamous cell carcinoma histology. *Ann Oncol.* 2007;18(1):29-35.

20. Yu MC, Yuan JM. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(6):421-9.
21. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer incidence in five continents. Lyon: IARC Press; 2003. v. 8. (IARC Scientific Publication, 155).
22. Ayadi W, Khabir A, Hadhri-Guiga B, Fkil L, Toumi N, Siala W, et al. North African and Southeast Asian nasopharyngeal carcinomas : between the resemblance and the dissemblance. *Bull Câncer.* 2010;97(4):475-82.
23. Carvalho MA, Pinheiro SD, Freitas MR, Silva VC, Lima RC. Biópsia de nasofaringe em serviço de otorrinolaringologia: Correlação clínico histológico. *Arq Int Otorrinolaringol.* 2008;12(1):1-6.
24. Chedid HM, Frauzi AS, Dedivitis RA. Avaliação dos fatores clínicos e do tratamento em pacientes com Carcinoma Indiferenciado da Nasofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2008; 74(4):1-18.
25. Niedobitek G, Herbst H, Young LS. Epstein-Barr virus and carcinomas. *Int J Clin Lab Res.* 1993;23:17-24.
26. Hildesheim A, Dosemeci M, Chan CC, Chen CJ, Cheng YJ, Hsu MM, et al. Occupational exposure to wood, formaldehyde, and solvents and risk of nasopharyngeal carcinomas. *Cancer Biomarkers Prev.* 2001;10:1145-53.
27. Khanfir A, Frikha M, Ghorbeal A, Drira MM, Daoud J. Prognostic factors in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Radiother.* 2007;11(8):461-4.
28. Yang TS, Ng HT, Wang HM, Wang CH, Liaw CC, Lai GM. Prognostic factors of locoregionally recurrent nasopharyngeal carcinoma--a retrospective review of 182 cases. *Am J Clin Oncol.* 1996;19(4):337-43
29. Lee AWM, Poon YF, Foo W, Law SCK, Chan DKK, Tung SY, et al. Retrospective analyses of 5037 patients with nasopharyngeal carcinoma treated during 1976-1985

- overall survival and patterns of failure. *Int J Radiat Oncol Biol Physics*. 1992;23(2):261-70.
30. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993;366(6456):7044-7.
31. Kamb A. Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet*. 1995;11(4):136-40.
32. Almeida JRC, Pedrosa NL, Leite JB, Fleming TRP, Carvalho VH, Cardoso AAA. Marcadores tumorais: revisão de literatura. *Rev Bras Cancerol*. 2007;53(3):305-16.
33. Salesiotis AN, Cullen KJ. Molecular markers predictive of prognosis in the patient with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: evolution of a model beyond TNM staging. *Curr Opin Oncol*. 2000;12(3):229-39.
34. Gollin SM. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck*. 2001;23(3):238-53.
35. Mitelman F, Johansson B, Martins F. Database of chromosome aberration in cancer [Internet]. Lund: Faculty of Medicine, Lund University; 2009. Disponível em: <http://cgap.nci.nih.gov/chromosomes/Mitelman,2003>.
36. Jin C, Jin Y, Wennberg J, Akervall J, Victor M, Martins F. Karyotypic heterogeneity and clonal evolution in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Cytogenet*. 2002;132:85-96.
37. Bockmühl U, Wolf G, Schmidt S, Schwendel A, Jahnke V, Petersen I. Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. *Head Neck*. 1998;20(2):145-51.
38. Inki P, Joensuu H, Gränman R, Klemi P, Jalkanen M. Association between syndecan-1 expression and outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer*. 1994;70(2):319-23.

-
39. McCaffery JD, Gapany M, Faust RA, Davis AT, Adams GL, Ahmed K. Nuclear matrix proteins as malignant markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;123(3):283-8.
 40. Gabius HJ. Animal lectins. *Eur J Biochem.* 1997;243(3):543-76.
 41. Gillenwater A, Xu XC, El-Naggar AK, Clayman GL, Lotau R. Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 1996;18(5):422-32.
 42. Leffer H. Galectins structure and function-a synopsis. *Result Probl Cell Differ.* 2001;33:57-83.
 43. Danguy A, Camby I, Kiss R. Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1572(2-3):285-93.
 44. Mignatti P, Rifkin DB. Nonenzymatic interaction between proteinases and the cell surface: novel roles in normal and malignant cell physiology. *Adv Cancer Res.* 2000;78:103-57.
 45. Kusakawa J, Sasaguri Y, Morimatsu M, Kameyama T. Expression of matrix metalloproteinase-3 in stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995;53(5):530-4.
 46. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Hiraki A, Sasaki M, et al. Immunohistochemical study of sialyl Le(a) and sialyl Le(x) antigen in oral squamous cell carcinoma: the association of sialyl Le(a) expression with the metastatic potential. *Head Neck.* 1999;21(4):330-7.
 47. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, et al. Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck.* 1999;21(7):627-38.

-
48. O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;127:813-20.
 49. Keil-Dlouha V, Plauchenaault T, Imholff JM, Emod I, Blondeaux X, Lambert-Vidmar S. Proteolytic potential of fibronectin and degradation of extracellular matrix. *Pathol Biol (Paris).* 1990;38(10):993-8.
 50. Umenishi F, Umeda M, Miyazaki K. Efficient purification of TIMP-2 from culture médium conditioned by human hepatoma cell line, and its inhibitory effects on metalloproteinases and in vitro tumor invasion. *J Biochem.* 1991;110(2):189-95.
 51. Hakomori S. Glycosynapses : microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. *An Acad Bras Cienc.* 2004;76(3):553-72.
 52. Marques Filho MF, Walder F, Takahashi HK, Guimarães LL, Tanaka AK, Cervantes O, et al. Expressão de glicolipídeos no carcinoma espinocelular do trato digestivo superior . *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2006;72(1):25-31.
 53. Takenaka Y, Fukumori T, Raz A. Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J.* 2004;19(7-9):543-9.
 54. Kuwabara I, Liu FT. Promotion of neutrophil adhesion to laminin by galectin-3. *J Immunol.* 1996;156(6):3939-44.
 55. Ochieng J, Leite Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;246(3):788-91.
 56. Parise LV, Lee J, Juliano RL. New aspects of integrin signaling in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2000;10(6):407-14.

-
57. Wu CC, Chien KY, Tsang NM, Chang KP, Hao SP, Tsao CH, et al. Cancer cell-secreted proteomes as a basis for searching potential tumor markers: nasopharyngeal carcinoma as a model. *Proteomics*. 2005;5(12):3173-82.
58. Keryer-Bibens C, Pioche-Durieu C, Villemant C, Souquère S, Nishi N, Hirashima M, et al. Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer*. 2006;6:283-290.
59. Bockmühl U, Küchler I, Petersen I. Improved prognostic assessment of head-neck carcinomas by new genetic markers. *HNO*. 2000;48(6):451-6.
60. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in peroxidase techniques: a comparasion between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981;29(4):577-80.
61. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
62. Buell P. Race in place in the etiology of nasopharyngeal cancer: a study based on California death certificates. *Int J Cancer*. 1973;11(2):268-72.
63. INCA. Ministério da Saúde. Estimativa 2010: Incidencia de Câncer no Brasil. INCA 2011. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp>.
64. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Câncer Statistics 2010. *Cancer J Clin*. 2010;60(5):277-300.
65. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
66. Gabusi E, Lattes C, Fiorentino M, Derrico A, Grigionni WF. Expression of Epstein-Barr virus-encoded RNA and biological markers in Italian nasopharyngeal carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res*. 2001;20(3):371-6.

67. Rodrigues JO, Galbiatti ALS, Ruiz MT, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino-Bertelli EC, et al. Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and risk of head and neck squamous cell carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010;76(6):776-82.
68. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumor progression. *Nat Rev.* 2005;5(1):29-35.
69. Saussez S, Decaestecker C, Mahillon V, Cludts S, Capovillez A, Chevalier D, et al. Galectin-3 upregulation during tumor progression in head and neck cancer. *Laryngoscope.* 2008;118(19):1583-90.
70. Nasr HB, Mestiri S, Chahed K, Bouaouina N, Gabbouj S, Jalbout M, et al. Matrix metalloproteinase-1 (-1607) 1G/2G and -9 (-1562) C/T promoter polymorphisms: Susceptibility and prognostic implications in nasopharyngeal carcinomas. *Clin Chim Acta.* 2007;384(1-2):57-63



Apêndices

Apêndice 1

R G	sexo	idade	natural.	profissão	tamanho	Linfonodo	tratamento	Recidiva	sobrevida	biópsia		histologia
223339	M	59	Tejupá	lavrador	T1N2M0	Direita	Rxt,exclus	negativo	mais de 8	5044/90		CENCI
50797-0	M	50	Botucatu	secretário	T3N0M0	Ausente	Qxt+Rxt	negativo	mais de 7	5682/01		CENCD
444174-5	F	67	Bebedouro							4518/02	trat.fora	CENCI
369143	F	50	Peru	professora	T4N3M0	Direita	Qxt+Rxt	negativo	mais de 5	1757/03		CENCI
412493	F	15	Pernamb.		T3N3M0	Bilateral	Qxt+Rxt	negativo	03anos	8266/06		CENCI
525804	M	51	Avaré	vendedor	T4N1M0	Esquerda	Qxt+Rxt	positivo	02anos?	2481/07		CENCI
318131	M	37	Botucatu	lavrador	T4N1M0	Esquerda	Qxt+Rxt		menos 5	3886/08		CENCI
260088	F	77								513/99		CENCI
251401-0	M	64	VigoSpain	com/edit	T2N0M0	Ausente	Qxt+Rxt	negativo	mais de 7	1139/99		CENCI
415299-9	M	59	Itapetinin.	ferroviário	T4N3M0	Bilateral	Rxt	obito	03mes.?	302/02		CENCI
353179-1	M	66	Areiópolis		TxN3M0	Esquerda	Rxt(Jau)	obito	01ano	2186/03		CENCI
381354-1	M	37	Goio-Ere	lavrador	T2N2M0	Bilateral	Qxt+Rxt	negativo	mais de 9	988/99		CENCI
238974-6	M	67	Botucatu	açouqueir	T1N3M0	Esquerda	Qxt+Rxt			2635/99		CENCI
S/RG	F	60								7119/02		CEC
453883-8	M	54	Santos	engenheir	T2N2Mo	Bilateral	Qxt+Rxt	positivo	04anos	9134/02	refratário	CENCI
32321-7	F	52	Botucatu	do lar	TxN2M0	Bilateral	Qxt+Rxt	positivo	mais de 4	3920/03		CENCI
469684-0	M	14	Paraiba		T4N2M0	Ausente	Qxt+Rxt	negativo	mais de 5	9819/03		CENCI
453883-8	M	54	Santos	engenheir	T2N2M0	Bilateral	Qxt+Rxt	positivo	04anos	546/04	alta a pedi	CENCI
248895-7	M	74	São Manu	pedreiro	T4N0M0	Direita	Qxt+Rxt	positivo	02 anos	10049/04		CENCI
322457	M	35	São Manu	lavrador	T3N3M0	Direita	Qxt+Rxt	obito	01 ^a S	3125/05		CENCI
525804	M	51	Avaré	vendedor	T2N2M0	Esquerda	Qxt+Rxt	positivo	03 anos	6288/06		CENCD
106989-6	F	64	Lucianóp	do lar	T2N0Mo	Esquerda	Qxt+Rxt	obito	01 ^a	10506/07		CENCI
570710	M	29			T3N1M0			positivo	menos 5	8729/08		CENCI
32321-7	F	52	Botucatu	do lar	TxN2M0	Bilateral	Qxt+Rxt	positivo	mais de 4	8497/07		CENCI
196356	F	60	Laranjal P	do lar	T4N3M0	Direita				3585/08		CEC
557953	M	9						negativo	menos 5	1821/08		CENCI
19303-8	M	17	Botucatu	pedreiro	T2N2M0	Esquerda	Rxt	negativo	mais 20a	35/80	alcoolism	CENCI
392016-0	M	40	Goias	correios	T2N2Mo	Ausente	Qxt+Rxt	positivo	mais de5	5828/99		CENCD
392016-0	M	40	Goias	correios	T2N2M0	Ausente	Qxt+Rxt	positivo	mais de 5	2674/00		CEC
358749	F	35	Piaui		T3N0M0	Ausente	Qxt+Rxt	negativo	mais de 2	8932/07		CENCD

Apêndice 2

	SEXO	IDADE	histol	linfon	TNM	trat	Lam	Fibr	col IV	Gal 3	rec	sobr
1	1	59	2	1	3	1	1	1	0	1	0	0
2	1	50	3	0	3	2	1	1	0	1	0	0
3	0	67	2				1	1	0	1	10	10
4	0	50	2	1	4	2	1	1	0	1	0	0
5	0	15	2	2	3	2	1	1	0	1	0	1
6	1	51	2	1	4	2	1	1	0	1	1	1
7	1	37	2	1	4	2	1	1	0	1	10	1
8	0	77	2				1	1	0	0	10	10
9	1	64	2	0	2	2	1	1	0	0	0	0
10	1	59	2	2	4	1	1	1	0	0	obito	1
11	1	66	2	1	4	1	1	1	0	0	10	1
12	1	37	2	2	3	2	1	0	0	1	0	0
13	1	67	2	1	4	2	1	0	0	1	10	10
14	0	60	1				1	0	0	1	10	10
15	1	54	2	2	3	2	1	0	0	1	1	1
16	0	52	2	2	3	2	1	0	0	1	1	1
17	1	14	2	0	4	2	1	0	0	1	0	0
18	1	54	2	2	3	2	1	0	0	1	1	1
19	1	74	2	1	4	2	1	0	0	1	1	1
20	1	35	2	1	4	2	1	0	0	1	10	1
21	1	51	3	1	3	2	1	0	0	1	1	1
22	0	64	2	1	2	2	1	0	0	1	10	1
23	1	29	2	1	3	0	1	0	0	0	1	1
24	0	52	2	2	3	2	0	1	0	1	1	1
25	0	60	1	1	4		0	1	0	1	obito	obito
26	1	9	2	1		2	0	0	0	1	0	1
27	1	17	2	1	3	1	0	0	0	0	0	0
28	1	40	3	0	3	2	0	0	0	0	1	0
29	1	40	1	0	3	2	0	0	0	0	1	0
30	0	35	3	0	3	2	0	0	0	0	0	1

Sexo M-1
F-0

Histologia : CEC-----1
: CENCI 2
: CENCDC-3

Linfonodo : Positivo--1
: Negativo-0

Recidiva : Positiva-----1
: Negativa----2
: Sem dados-10

Sobrevida : Mais de 5 anos----0
: Menos de 5 anos--1
: Sem dados-----10

Tratamento : Rxt-----1
Rxt+Qxt----2

ESTADIAMENTO AJCC-2010*

1 T1N0M0

2 T1N1M0

 T2N0M0

 T2N1M0

3 T1N2M0

 T2N2M0

 T3N0M0

 T3N1M0

 T3N2M0

4 T4N0M0

 T4N1M0

 T4N2M0

 N3....

 M1..

*AJCC: American Jont Commitee Cancer