

**IMPACTO DA EXPRESSÃO DE EGFRVIII, EGFR,
PTEN, CD44, CD44V6, EM CARCINOMAS
ESPINOCELULARES DE CABEÇA E PESCOÇO, NÃO-
CUTÂNEOS, METASTÁTICOS OU LOCALMENTE
AVANÇADOS, TRATADOS COM CETUXIMABE**

ALEXANDRE ANDRÉ BALIEIRO ANASTÁCIO DA COSTA

**Dissertação de Mestrado apresentada à Fundação
Antônio Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima

Co-Orientador: Dr. Clóvis Antonio Lopes Pinto

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Costa, Alexandre André Balieiro Anastácio da

Impacto da expressão de EGFRVIII, EGFR, PTEN, CD44, CD44V6, em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, não-cutâneos, metastáticos ou localmente avançados, tratados com cetuximabe /

Alexandre André Balieiro Anastácio da Costa – São Paulo, 2013.

88p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:

Oncologia.

Orientador: Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima

Descritores: 1. NEOPLASIAS DE CABEÇA E PESCOÇO. 2. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS. 3. METÁSTASE NEOPLÁSICA. 4. RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO. 5. PTEN FOSFO-HIDROLASE.

DEDICATÓRIA

À Nossa Senhora Imaculada, que através da sua imagem, quase por acaso “Aparecida” no centro da nossa pós graduação, me ajudou a não perder a perspectiva do infinitamente grande dentro do meu objeto de estudo infinitamente pequeno.

AGRADECIMENTOS

Aos nossos pacientes, que generosamente assinam o termo de consentimento para utilizarmos os seus dados em pesquisa, antes ainda de conhecerem o duro caminho que alguns têm pela frente.

Ao meu orientador, Dr Vladimir, que dividiu comigo nesses anos um dos bens mais preciosos que um homem carrega: a curiosidade e a paixão pelo que faz.

Ao departamento de patologia pela colaboração neste trabalho, em especial Dr Clóvis e Sueli pela atenção e paciência nas minhas várias idas e vindas. Mas também aos caros Dr Felipe, Severino, Carlos e Ivan que colaboraram com este trabalho.

Aos meus amigos e colegas da oncologia clínica em especial Dra Andréa, primeira a me propor este trabalho, Dra Adriana pela ajuda na coleta de dados, Dra Ludimila pela ajuda inicial nas análises estatísticas e estímulo para seguir a pesquisa. E a todos que se dispuseram a flexibilizar os horários para que eu pudesse cumprir todas as obrigações do mestrado.

À Dra Karina, parecerista, que foi além do seu trabalho, ajudando a aprofundar a análise estatística.

Ao Dr Darrel Bigner que prontamente nos doou o anticorpo anti-EGFRvIII e ao Dr Rui de Barretos que nos doou as amostras para controle positivo deste anticorpo

Aos professores dos cursos da pós graduação, em especial Dr José Humberto Fregnani pela didática e incentivo.

Aos funcionários administrativos da oncologia clínica, pela compreensão com o cansaço que algumas vezes apareceu durante o caminho.

Aos funcionários da pós graduação, especialmente à Vanusa, pela paciência em ajudar a arrumar algumas confusões.

Aos funcionários da biblioteca pela solicitude com que me responderam a todos os vários emails em busca de artigos, e pela ajuda final na organização desta dissertação.

Aos meus pais, meus irmãos e todos os meus familiares e amigos que dividem a vida inteira comigo, por terem dividido comigo também essa pequena mas importante parte do caminho.

Muito obrigado.

RESUMO

da Costa AABA. **Impacto da expressão de EGFRvIII, EGFR, PTEN, CD44 e CD44V6, em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, não-cutâneos, metastáticos ou localmente avançados, tratados com cetuximabe.** São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O cetuximabe é um anticorpo monoclonal utilizado no tratamento do carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (CECCP) no cenário de doença localmente avançada (DLA) em associação com radioterapia (RT) ou no cenário de doença metastática (DM) em combinação com quimioterapia (QT). Não há biomarcadores de eficácia do cetuximabe em CECCP. Potenciais biomarcadores de resistência ao cetuximabe podem estar relacionados a alterações do próprio EGFR; a componentes inferiores da via de sinalização do EGFR e à ativação de vias de sinalização paralelas. **Métodos:** Analizamos a expressão EGFR, EGFRvIII, PTEN, p16, CD44 e CD44v6 em amostras de CECCP de pacientes tratados com cetuximabe no Hospital AC Camargo de 2007 a 2010. A expressão dos marcadores foi avaliada por imunohistoquímica em lâminas de *tissue microarray*. Testamos a associação dos biomarcadores com características clínicas e patológicas e o impacto dos marcadores na taxa de resposta objetiva (TRO), sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG). **Resultados:** Houve expressão de EGFRvIII em 17 amostras (27,0%), hiperexpressão de EGFR em 31 (50,8%), perda de expressão de PTEN em 24 (37,5%), expressão de p16 em 7 amostras (10,9%), expressão de CD44 em 23 (38,3%) e de CD44v6 em 48 (76,2%). Sessenta e um pacientes foram tratados com RT associada a cetuximabe, com SG mediana de 23,2 meses e SLP mediana de 7,9 meses. Quarenta e quatro pacientes foram tratados com QT e cetuximabe, com SG mediana de 12,6 meses e SLP mediana de 7,4 meses, e TRO de 53,7%. Hiperexpressão do EGFR foi associada a menor TRO nos pacientes tratados com RT associada ao cetuximabe e a perda de expressão de PTEN foi associada a pior SG nos pacientes tratados com QT associada ao cetuximabe. Os demais marcadores não apresentaram associação com os desfechos avaliados. **Conclusões:** Hiperexpressão de EGFR e perda de expressão de PTEN se mostraram potenciais biomarcadores de resistência ao tratamento com cetuximabe.

SUMMARY

da Costa, AABA [Impact of EGFRvIII, EGFR, PTEN, CD44 and CD44v6 expression in metastatic or locally advanced, non cutaneous, head and neck squamous cell carcinoma, treated with cetuximab]. São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Cetuximab is a monoclonal antibody used in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in combination with radiotherapy (RT) for locally advanced disease (LAD) and in combination with chemotherapy (CT) in the metastatic setting. There are no biomarkers of cetuximab efficacy in HNSCC. Potential biomarkers of cetuximab resistance are mutations of EGFR, alterations in downstream components of EGFR pathway and activation of parallel pathways.

Methods: We investigated the expression of EGFR, EGFRvIII, PTEN, p16, CD44 and CD44v6 in HNSCC samples from patients treated with cetuximab at AC Camargo Hospital from 2007 to 2010. Biomarkers expression was analyzed by immunoistochemistry in tissue microarray slides. We tested the association of biomarkers with clinical and pathological characteristics and their impact on overall response rate (ORR), progression free survival (PFS) and overall survival (OS).

Results: EGFRvIII was expressed in 17 tumors (50,8%), EGFR overexpression was detected in 31 (50,8%), PTEN expression was lost in 24 (37,5%), p16 was positive in 7 patients (10,9%), CD44 as positive in 23 (38,3%), and CD44v6 was positive in 48 (76,2%). Sixty one patients were treated with RT plus cetuximab with median OS of 23,2 months (mo) and median PFS of 7,9 mo. Forty four patients were treated with CT plus cetuximab, median OS was 12,6 mo, median PFS was 7,4 mo, and the ORR was 53,7%. EGFR overexpression was associated to a smaller ORR in the RT plus cetuximab group, and PTEN loss of expression was related to worse OS in patients treated with CT plus cetuximab. The remaining biomarkers were not associated with any clinical outcome. **Conclusions:** EGFR overexpression and PTEN loss of expression emerged as potential biomarkers of cetuximab resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Proposta de um modelo integrado da carcinogênese molecular do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.....	4
Figura 2	Via de sinalização do EGFR e ilustração de alguns dos mecanismos de resistência ao tratamento anti-EGFR como as mutações do EGFR e perda da expressão de PTEN.....	10
Figura 3	Figura esquemática mostrando domínios do EGFR.....	11
Figura 4	Diagrama do fluxo de avaliação dos pacientes no estudo	28
Figura 5	Microfotografias representativas das imunoistoquímicas em amostras de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço avaliados em <i>tissue microarray</i>	29
Figura 6	Microfotografias representativas das imunoistoquímicas em amostras de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço avaliados em <i>tissue microarray</i>	30
Figura 7	Microfotografias representativas das imunoistoquímicas em amostras de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço avaliados no estudo atual em <i>tissue microarray</i>	31
Figura 8	Curva de sobrevida global (SG) do grupo RT.....	40
Figura 9	Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) do grupo RT.....	40
Figura 10	Curvas de sobrevida global (SG) do grupo RT de acordo com o ECOG.....	41

Figura 11	Curvas de sobrevida livre de progressão (SLP) do grupo RT de acordo com ECOG (a) e sexo (b).....	41
Figura 12	Curvas de sobrevida global (SG) do grupo RT de acordo com a expressão de cada marcador molecular.....	42
Figura 13	Curvas de sobrevida livre de progressão (SLP) do grupo RT de acordo com a expressão de cada marcador molecular.....	43
Figura 14	Curva de sobrevida global (SG) do grupo QT.....	58
Figura 15	Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) do grupo QT	58
Figura 16	a) Curva de sobrevida global (SG) do grupo QT de acordo com a expressão de PTEN. b) Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) do grupo QT de acordo com o ECOG.....	59
Figura 17	Curvas de sobrevida global (SG) do grupo QT de acordo com a expressão de cada marcador molecular.....	60
Figura 18	Curvas de sobrevida global (SG) do grupo QT de acordo com a expressão de cada marcador molecular.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados técnicos do anticorpos primários utilizados para as reações de imunoistoquímica.....	24
Tabela 2	Expressão dos marcadores moleculares avaliados por imunoistoquímica em todos os pacientes do estudo (105 pacientes) e, separadamente, nos grupos RT (61 pacientes) e QT (44 pacientes).....	32
Tabela 3	Resultado dos testes de associação entre os marcadores moleculares EGFR, e os demais marcadores moleculares avaliados no estudo.....	33
Tabela 4	Resultado dos testes de associação entre os marcadores moleculares EGFRvIII e os demais marcadores moleculares avaliados no estudo.....	33
Tabela 5	Resultado dos testes de associação entre os marcadores moleculares PTEN e os demais marcadores moleculares avaliados no estudo.....	34
Tabela 6	Resultado dos testes de associação entre os marcadores moleculares CD44 e os demais marcadores moleculares avaliados no estudo.....	34
Tabela 7	Resultado dos testes de associação entre os marcadores moleculares CD44v6 e os demais marcadores moleculares avaliados no estudo....	35
Tabela 8	Resultado dos testes de associação entre os marcadores moleculares EGFR e sítios primários e estadiamento.....	36
Tabela 9	Resultado dos testes de associação entre os marcadores moleculares EGFRvIII e sítios primários e estadiamento.....	36

Tabela 10	Resultado dos testes de associação entre os marcadores moleculares PTEN e sítios primários e estadiamento.....	36
Tabela 11	Resultado dos testes de associação entre os marcadores moleculares CD44 e sítios primários e estadiamento.....	37
Tabela 12	Resultado dos testes de associação entre os marcadores moleculares CD44v6 e sítios primários e estadiamento.....	37
Tabela 13	Características clínicas e patológicas dos 61 pacientes do grupo tratado com RT associada a cetuximabe.....	38
Tabela 14	Sobrevida global em 1 ano e 3 anos no grupo RT de acordo com cada variável.....	44
Tabela 15	Sobrevida livre de progressão em 1 ano e 3 anos no grupo RT de acordo com cada variável.....	45
Tabela 16	Análise univariada de fatores prognósticos para sobrevida global no grupo RT.....	46
Tabela 17	Análise univariada de fatores prognósticos para sobrevida livre de progressão no grupo RT.....	47
Tabela 18	Análise multivariada de fatores prognósticos para sobrevida global no grupo RT.....	49
Tabela 19	Características clínicas dos 35 pacientes que formaram o modelo final da análise multivariada de fatores prognósticos para sobrevida global no grupo RT.....	49
Tabela 20	Análise multivariada de fatores prognósticos para sobrevida livre de progressão no grupo RT.....	50

Tabela 21	Resultado dos testes de associação entre as variáveis clínicas e patológicas e resposta ao tratamento no grupo tratado com RT associada ao cetuximabe.....	51
Tabela 22	Resultado dos testes de associação entre as variáveis clínicas e patológicas e resposta ao tratamento no grupo tratado com RT associada ao cetuximabe.....	52
Tabela 23	Análise multivariada de fatores prognósticos para taxa de resposta objetiva no grupo RT.....	53
Tabela 24	Resultado dos testes de associação entre as variáveis clínicas e patológicas e resposta completa ao tratamento no grupo tratado com RT associada ao cetuximabe.....	54
Tabela 25	Resultado dos testes de associação entre as variáveis clínicas e patológicas e resposta completa ao tratamento no grupo tratado com RT associada ao cetuximabe.....	55
Tabela 26	Análise multivariada de fatores prognósticos para taxa de resposta completa no grupo RT.....	55
Tabela 27	Características clínicas e patológicas dos 44 pacientes do grupo tratado com QT associada ao cetuximabe.....	56
Tabela 28	Sobrevida Global em 1 ano e 2 anos no grupo QT de acordo com cada variável.....	62
Tabela 29	Sobrevida livre de progressão em 1 ano e 2 anos no grupo QT de acordo com cada variável.....	63

Tabela 30	Análise univariada de fatores prognósticos para sobrevida global no grupo QT.....	64
Tabela 31	Análise univariada de fatores prognósticos para sobrevida livre de progressão no grupo QT.....	65
Tabela 32	Análise multivariada de fatores prognósticos para sobrevida global no grupo QT.....	67
Tabela 33	Análise multivariada de fatores prognósticos para sobrevida livre de progressão no grupo QT.....	67
Tabela 34	Características clínicas dos 26 pacientes que formaram o modelo final da análise multivariada de fatores prognósticos para sobrevida global no grupo QT.....	68
Tabela 35	Resultado dos testes de associação entre as variáveis clínicas e patológicas e resposta ao tratamento no grupo tratado com QT associada ao cetuximabe.....	69
Tabela 36	Resultado dos testes de associação entre s marcadores moleculares e resposta ao tratamento no grupo tratado com QT associada ao cetuximabe.....	70
Tabela 37	Comparação entre características da população do estudo atual e do estudo de Bonner et al. 2007	72
Tabela 38	Comparação entre os estudos sobre a variante 3 do EGFR em CECCP	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AA-CCI	Age Adjusted Charlson Comorbidity Index
AQUA	Automated Quantitative Analysis
CDKN2A	Cyclin dependent kinase 2A
CEC	Carcinoma espinocelular
CECCP	Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
CID	Código internacional de doenças
ClCr	Clearance de creatinina
CTT	Células tronco tumorais
DE	Doença estável
DNA	Desoxirribonucleic acid
EBV	Epstein Barr Virus
EC	Estágio clínico
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGFRvIII	Epidermal growth factor receptor variant 3
EGFRwt	Epidermal growth factor receptor wild type
EXTREME trial	Erbitux in First-Line Treatment of Recurrent or Metastatic Head and Neck. Cancer Trial
FISH	Fluorescence in situ hybridization
Freq.	Frequencia
HE	Hematoxilina eosina
HER2	Epidermal growth factor receptor 2
HER3	Epidermal growth factor receptor 3
HER4	Epidermal growth factor receptor 4
HPV	Human Papiloma virus
HR	Hazard ratio
IARC	International Agency for Resarch on Cancer
IC95	Intervalo de confiança de 95%

IGFR1	Insulin-like growth factor receptor 1
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JAK2	Janus kinase 2
MAPK	Mitogen activated protein kinase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NA	Não alcançada
Neg	Negativo
NFKB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OR	Odds ratio
PBS	Phosphate buffer saline
PD	Progressão de doença
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP₂	Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate
PIP₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PLC	Phospholipase C
Pos	Positivo
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
qRT-PCR	Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction
QT	Quimioterapia
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
RB	Retinoblastoma
RC	Resposta completa
RP	Resposta parcial
RT	Radioterapia
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RTQT	Radioterapia e quimioterapia concomitantes
SAME	Serviço de arquivo médico
SG	Sobrevida global

SLP	Sobrevida livre de progressão
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TGFB	Transforming growth factor beta
TMA	Tissue-microarray
TPF	Taxano, platina, fluorouracil
TR	Taxa de resposta
TRO	Taxa de resposta objetiva
VEGF	Vascular endothelial growth factor

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Carcinogênese em CECCP	1
1.2	Tratamento de CECCP Localmente Avançado, Metastático ou Recidivado.....	5
1.3	Papel do EGFR e do Cetuximabe em CECCP	6
1.4	Resistência a Tratamento com Ceruximabe em CECCP	9
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo principal	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Desenho do estudo	19
3.2	Casuística	19
3.2.1	Crítérios de Inclusão	20
3.2.2	Crítérios de Exclusão	20
3.3	Análise Patológica.....	20
3.3.1	<i>Tissue-microarray</i>	21
3.3.2	Imunoistoquímica.....	22
3.4	Análise Estatística	24
4	RESULTADOS	27
4.1	Associação da expressão imunoistoquímica dos marcadores estudados com características clínico-patológicas.....	27
4.2	Grupo Radioterapia + Cetuximabe	37
4.2.1	Características clínico-demográficas e patológicas	37
4.2.2	Sobrevida global e livre de progressão	39
4.2.3	Taxa de resposta objetiva e completa	50
4.3	Grupo Quimioterapia + Cetuximabe.....	56
4.3.1	Características clínico-demográficas e patológicas	56

4.3.2	Sobrevida global e livre de progressão	57
4.3.3	Taxa de resposta objetiva	68
5	DISCUSSÃO	71
5.1	Grupo RT + Cetuximabe	71
5.2	Grupo QT + Cetuximabe	73
5.3	Marcadores Moleculares	74
6	CONCLUSÃO	85
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

ANEXOS

Anexo 1	Ficha de Coleta de Dados
Anexo 2	Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa
Anexo 3	Resumos e apresentações em congressos
Anexo 4	Submissão do artigo e cópia do manuscrito

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECCP), incluindo câncer de cavidade oral, orofaringe, laringe e hipofaringe é o sexto câncer em incidência no mundo com aproximadamente 600.000 novos casos ao ano (International Agency for Research on Cancer-IARC 2013) e o sétimo câncer com maior incidência nos EUA, com 39 mil novos casos ao ano (SIEGEL et al. 2013). No Brasil, o câncer de cavidade oral e laringe juntos têm uma incidência de, aproximadamente, 16.000 novos casos ao ano, sendo a terceira neoplasia mais incidente nos homens (Ministério da Saúde 2011).

Apesar dos avanços terapêuticos, a taxa de sobrevida em 5 anos após o diagnóstico continua baixa, sendo de aproximadamente 50%. Isso se deve, em parte, ao fato da maioria dos pacientes se apresentar com doença localmente avançada ao diagnóstico (MOLINOLO et al. 2009; SHIN e KHURI 2013). Além disso, o surgimento de metástases à distância ao longo da evolução não é incomum. Nesse grupo o prognóstico é ainda pior com uma sobrevida mediana entre 6 e 8 meses com quimioterapia convencional (LANGER 2008; SHIN et al. 2013).

1.1 CARCINOGENESE EM CECCP

A carcinogênese do CECCP está na maioria dos casos associada a efeitos carcinogênicos do tabaco e do álcool. Na última década, porém, descobriu-se que parte dos tumores, especialmente de orofaringe, são relacionados à infecção por

HPV. Há ainda uma minoria que parece não estar associada nem ao tabagismo e etilismo, ou à infecção por HPV.

A alteração mais comum na carcinogênese dos tumores relacionados ao tabagismo e etilismo é a presença de mutações do gene *TP53*, presente em 60 a 80% dos casos de CECCP e em muitas lesões pré-malignas, sugerindo que seja uma alteração precoce na carcinogênese dos tumores epiteliais de cabeça e pescoço. O gene *TP53* tem as funções de regulação do ciclo celular, reparo do DNA e indução de apoptose em resposta ao dano genético. A perda de sua função favorece um potencial replicativo ilimitado para a célula tumoral.

Outra alteração que contribui para o potencial de replicação ilimitado nos tumores HPV negativo é a perda da função da proteína p16. A proteína p16 age como um regulador positivo da proteína RB, que é uma proteína envolvida no controle do ciclo celular que impede a passagem da fase G1 para S. Com a perda da função da p16, a proteína RB fica inibida e a célula prossegue no ciclo celular para entrar em divisão. Mutações do gene *CDKN2A*, que codifica a proteína p16, estão presentes em aproximadamente 10% dos casos, e, incluindo as alterações epigenéticas e genéticas, a perda de função de p16 ocorre em, aproximadamente, 80% dos CECCP HPV negativos.

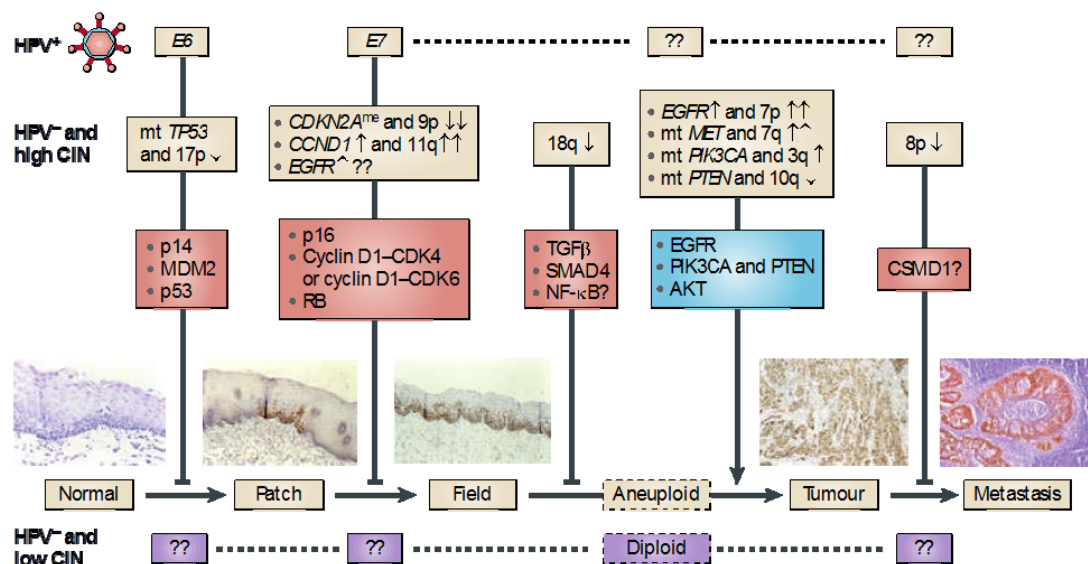
O terceiro gene comumente alterado nos tumores HPV negativos é o *CCND1*, que codifica a proteína ciclina-D1. Este gene encontra-se amplificado em cerca de 80% dos tumores HPV negativos e contribui para o potencial ilimitado de replicação celular (LEEMANS et al. 2011; RAUTAVA e SYRJÄNEN 2012; LOYO et al. 2012).

Os tumores relacionados ao HPV, por sua vez, incomumente apresentam mutações do gene *TP53* ou perda de função da p16, e possuem poucos genes com alterações do número de cópias, mostrando uma menor instabilidade genética quando comparados aos tumores HPV negativos. A carcinogênese dos tumores relacionados ao HPV está associada à ação das oncoproteínas virais E6 e E7 que interagem com as proteínas p53 e RB respectivamente. A proteína E6 marca a p53 para ubiquitinação e posterior proteólise, enquanto a oncoproteína E7 se liga ao complexo culina 2 – ubiquitina ligase causando a destruição da proteína RB. Nesses casos não há supressão da expressão de p16, que ao contrário, se apresenta hiperexpresso por um mecanismo de retroalimentação positiva causado pela perda da função da RB (LEEMANS et al. 2011; RAUTAVA e SYRJÄNEN 2012; LOYO et al. 2012).

Deste modo, seja por alterações relacionadas às oncoproteínas virais ou por mutações do *TP53* e *CDKN2A*, alterações na via de p53 e de RB conferem potencial de replicação ilimitado, contribuindo para carcinogênese nos tumores epiteliais de cabeça e pescoço (Figura 1).

A desregulação das vias de sinalização ligadas aos fatores do crescimento: EGFR, RAS/RAF/MAPK, JAK2/STAT3 e PI3K/AKT/mTOR, e as vias de NFkB, WNT/ β -catenina e TGFB foram identificadas como contribuintes para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia. Dentre estas alterações a hiperexpressão de EGFR é a mais comum ocorrendo em até 80-90% dos casos. Apesar da alta prevalência de hiperexpressão de EGFR, o exato mecanismo pelo qual ela leva à carcinogênese não é completamente entendido. De acordo com o sítio de fosforilação do EGFR, ele pode desencadear um determinado padrão de interação e ativação de

outras proteínas intracelulares, ativando preferencialmente uma ou outra via inferior (LEEMANS et al. 2011).



Fonte: LEEMANS et al. (2011)

Figura 1 - Proposta de um modelo integrado da carcinogênese molecular do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Tumores HPV negativos apresentam na sua maioria mutações no *TP53* perda de expressão de p16 e aumento de expressão de ciclina D1, levando a um potencial replicativo ilimitado, além de alterações nas vias de transdução de sinais de fatores de crescimento, sendo a alteração mais comum a hiperexpressão de EGFR. Nos tumores HPV+ as proteínas E6 e E7 aumentam a degradação de p53 e Rb, respectivamente, favorecendo proliferação celular ilimitada. A interação entre o HPV e as vias de sinalização de fatores de crescimento ainda não está bem estabelecida.

Evasão da apoptose ocorre por ativação da via PI3K-PTEN-AKT. Nesta via as mutações do gene *PI3KA*, que codifica a subunidade catalítica da enzima PI3K, ocorrem em 10 a 20% dos casos, enquanto a perda de função de PTEN acontece em 30% dos casos, sendo 10% dos casos por mutações do gene. As alterações de PI3K e de PTEN são mutuamente exclusivas reforçando o papel desta via na carcinogênese.

A associação entre a presença de alterações do EGFR e das alterações da via da PI3K-PTEN-AKT ainda não foi esclarecida (Figura 1) (LEEMANS et al. 2011).

O potencial de invasão e metastatização não foi ligado ainda a uma alteração específica, apesar de dados iniciais sugerirem um papel central para as metaloproteinases em CECCP, este papel não se confirmou posteriormente. Sabe-se porém que este processo está associado a uma gama de alterações que estão relacionadas à transição epitélio-mesênquima.

Por fim, a neoangiogênese tem seu papel na carcinogênese dos CECCP como em todos os tumores de órgãos sólidos, não sendo ainda bem estabelecido o papel dos fatores de crescimento endotelial nesse contexto. Uma meta-análise mostrou um pior prognóstico de acordo com os níveis de expressão de VEGF, porém essa análise não fez ajustes para outros fatores prognósticos (MOLINOLO et al. 2009; LEEMANS et al. 2011).

1.2 TRATAMENTO DE CECCP LOCALMENTE AVANÇADO, METASTÁTICO OU RECIDIVADO

O tratamento da doença localmente avançada é baseado numa abordagem multidisciplinar que engloba cirurgia, radioterapia (RT) e quimioterapia (QT). Essa combinação de tratamentos pode ser feita de três formas principais: cirurgia seguida de RT combinada à QT adjuvante nos casos de maior risco de recidiva (BERNIER et al. 2004; COOPER et al. 2004; BERNIER et al. 2005); QT combinada à RT como tratamento definitivo, em pacientes com doença ressecável, com intuito de preservação de órgão (FORASTIERE et al. 2003), ou em paciente com doença

irressecável (ADELSTEIN et al. 2003); e QT de indução seguida por radioquimioterapia (RTQT) concomitante definitiva (HITT et al. 2005; POSNER et al. 2007; POINTREAU et al. 2009; SHIN e KHURI 2013). O benefício em SG do acréscimo da quimioterapia sistêmica ao tratamento locorregional foi confirmado em uma metanálise que avaliou a adição da quimioterapia nessas três formas de tratamento descritas acima e mostrou um ganho maior no cenário concomitante à radioterapia (PIGNON et al. 2009).

A doença recidivada localmente irressecável ou com metástase à distância é tratada com quimioterapia paliativa. Neste cenário, a combinação de quimioterápicos quando comparada à monoquimioterapia, bem como a incorporação de novos agentes quimioterápicos, como os taxanos, antes da era das terapias-alvo, demonstrou maior taxa de resposta, porém sem ganho de sobrevida global (FORASTIERE 1992; JACOBS et al. 1992; GIBSON et al. 2005).

1.3 PAPEL DO EGFR E DO CETUXIMABE EM CECCP

O receptor EGFR é constituído por um domínio extracelular, onde ocorre a ligação com ligantes específicos, um domínio transmembrana e um domínio intracelular que tem atividade de tirosina-quinase. Ele faz parte da família dos receptores ERBB, juntamente com o ERBB2/HER2/Neu, HER3 e HER4. Estes receptores formam homodímeros ou heterodímeros entre si após se ligarem a seus ligantes extracelulares, ativando o domínio quinase intracelular, o que leva à transfosforilação das moléculas de receptor envolvidas na formação do dímero, fosforilação de substratos intracelulares e ativação de diversas cascatas de

sinalização (MORGILLO et al. 2007; MOLINOLO et al. 2009; SPECENIER e VERMORKEN 2012). A atividade deste receptor encontra-se alterada em 80 a 90% dos CECCP (GRANDIS e TWEARDY 1993), e a sua hiperexpressão foi identificada como fator prognóstico relacionado ao tamanho da neoplasia, diminuição da sensibilidade à radioterapia e menor sobrevida global no contexto metastático (MOLINOLO et al. 2009; LICITRA et al. 2009; SPECENIER e VERMORKEN 2012).

O cetuximabe é um anticorpo humanizado anti-EGFR que se liga com alta afinidade ao domínio extracelular do EGFR competindo com seus ligantes endógenos. Dessa forma, ele impede a dimerização e ativação da função tirosina-quinase intracelular (MENDELSON e BASELGA 2000). É indicado atualmente no tratamento do CECCP localmente avançado, em combinação com a radioterapia, e em combinação com quimioterapia paliativa na doença metastática.

Na doença localmente avançada, sua eficácia foi demonstrada em um estudo fase III onde foi feita a comparação entre RT isolada e RT combinada ao cetuximabe 400mg/m² na primeira dose, seguida por aplicações semanais com a dose de 250mg/m² durante a RT. Neste estudo a expressão de EGFR não foi um critério de elegibilidade, e 75% dos pacientes apresentavam estágio clínico IV, sem metástases à distância, e 25%, estágio clínico III. O objetivo primário do estudo foi avaliar a duração do controle locorregional, e os secundários, sobrevida global (SG), sobrevida livre de progressão (SLP), taxa de resposta (TR) e segurança. O controle locorregional mediano foi de 24,4 meses no grupo com cetuximabe e 14,9 meses no grupo de RT isolada (HR 0,68; p = 0,005), e a SG mediana foi de 49,0 meses no grupo com cetuximabe e 29,3 meses no grupo da RT isolada (HR 0,74; p = 0,03). A

toxicidade foi semelhante nos dois grupos exceto pelo *rash* acneiforme grau 3 e 4, que foi mais incidente no grupo de RT com cetuximabe. Estes benefícios foram confirmadas na atualização do estudo publicada em 2010 (BONNER et al. 2006 BONNER et al. 2010).

Não há estudos fase III publicados comparando a combinação da RT com cetuximabe versus RTQT. Um estudo de fase II fez esta comparação com randomização dos pacientes em tratamento para preservação de laringe após indução com docetaxel, cisplatina e fluorouracil (TPF). O objetivo primário de preservação de laringe em 3 meses se mostrou igual entre os braços do estudo com 95% vs 93%, e o braço que utilizou cetuximabe apresentou menos efeitos adversos (LEFEBVRE et al. 2013). Alguns estudos de fase II já mostraram a segurança da associação do cetuximabe com RTQT, e estudos fase III estão em andamento para confirmar o benefício da associação do cetuximabe a estes esquemas (LANGER 2008).

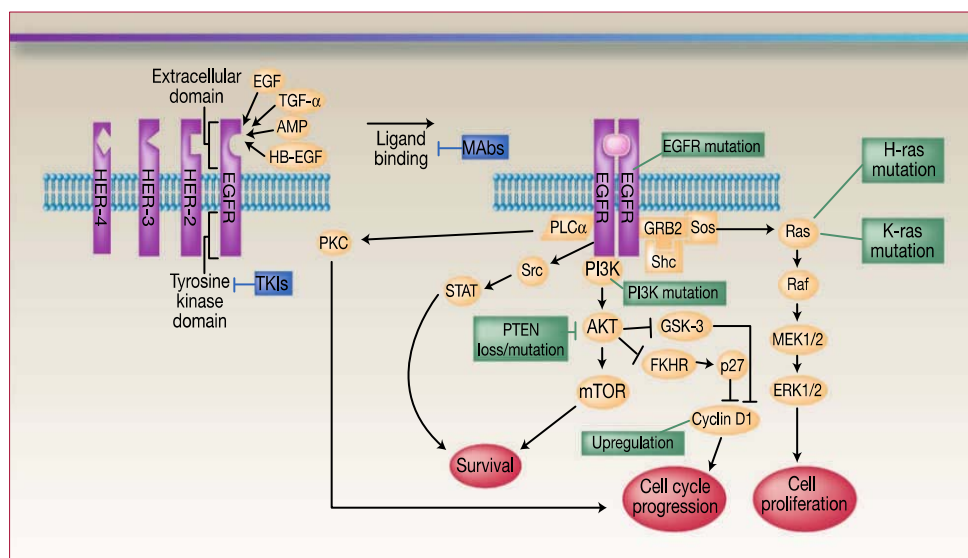
Na doença metastática, um estudo inicial fase II com cetuximabe monoterapia em pacientes tratados previamente com platina, mostrou atividade da droga com taxa de resposta em torno de 10% (VERMOKEN et al. 2007). Já a associação do cetuximabe à quimioterapia como primeira linha de tratamento foi a primeira estratégia a mostrar ganho de sobrevida global após outras tentativas de associações de quimioterápicos. O estudo de fase III, EXTREME, randomizou pacientes com doença recidivada locorregionalmente ou com doença metastática para um braço controle, de tratamento com cisplatina ou carboplatina em combinação com 5-fluorouracil a cada 3 semanas por 6 ciclos, ou um braço experimental, com o mesmo esquema de QT associado ao cetuximabe na dose de 400mg/m² na primeira dose seguida por aplicações semanais na dose de 250mg/m², sendo a QT realizada por até

6 ciclos, e o cetuximabe até progressão de doença ou toxicidade limitante. A expressão de EGFR não foi critério de elegibilidade e o objetivo primário foi a SG. Esta se mostrou maior no braço com cetuximabe, com SG mediana de 10,1 x 7,4 meses (HR 0,80; $p = 0,04$) (VERMOKEN et al. 2008). Numa análise posterior da amplificação do gene *EGFR* por FISH, não se demonstrou relação entre amplificação do *EGFR* e eficácia do tratamento com cetuximabe (LICITRA et al. 2013).

1.4 RESISTÊNCIA A TRATAMENTO COM CETUXIMABE EM CECCP

A resistência ao tratamento anti-EGFR (cetuximabe ou inibidores de tirosina-quinase) pode estar relacionada a diversos fatores (Figura 2):

- mutações tanto do domínio intracelular quanto extracelular de EGFR;
- ativação dos segmentos inferiores ao EGFR nas vias PI3K/AKT, RAS/RAF/MAPK, PLC- γ /PKC, SRC e STAT;
- ativação de vias alternativas como as relacionadas a IGF1R, CD44, HER2, cMET (MORGILLO et al. 2007; MATTA e RALHAN 2008; MEHRA et al. 2011; RABINOWITS e HADDAD 2012).

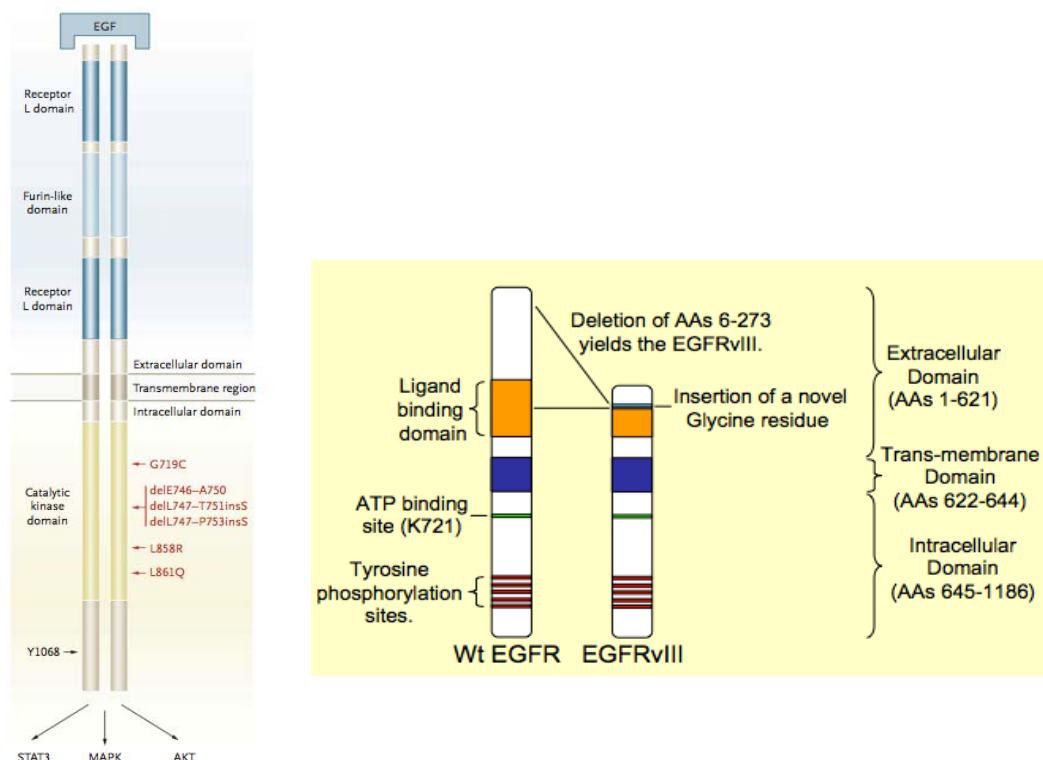


Fonte: CHEN et al. (2010)

Figura 2 - Via de sinalização do EGFR e ilustração de alguns dos mecanismos de resistência ao tratamento anti-EGFR. As 2 principais vias inferiores do EGFR são a PI3K-Akt-mTOR, e Ras-Raf-MAPK, onde alterações como as mutações ativadoras de PI3K e KRAS e perda de expressão de PTEN poderiam levar a ativações destas vias de forma independente da ativação do EGFR pelos fatores de crescimento.

As mutações no domínio intracelular do EGFR foram associadas a maior sensibilidade ao tratamento com inibidores de tirosina-quinase no câncer de pulmão (ROSELL et al. 2009; MOK et al. 2009; LEE et al. 2009), entretanto esse tipo de mutação é muito menos comum nos CECCP, estando presente em 1% num estudo com pacientes caucasianos (LOEFFLER-RAGG et al. 2006), e em 1 a 7% entre pacientes asiáticos (LEE et al. 2005; HUANG et al. 2009).

Dentre as mutações do domínio extracelular, a variante EGFRvIII é a mais estudada. Ela resulta da deleção dos éxons 2 a 7, conferindo ativação constitutiva do domínio tirosina-quinase da proteína (PEDERSEN et al. 2001) (Figura 3).



Fonte: Adaptado de LYNCH et al. (2004) e GAN et al. (2009)

Figura 3 - Figura esquemática mostrando domínios do EGFR. a) em vermelho os pontos das mutações ativadoras do EGFR nos domínios de tirosina-quinase intracelulares comuns em cânceres de pulmão; b) formação da variante III do EGFR pela deleção dos éxons 2 a 7 do domínio extracelular do receptor.

Em pacientes com glioblastoma multiforme essa variante foi encontrada em 40% dos tumores, e em um estudo *in vitro* se verificou que o cetuximabe tem a capacidade de se ligar ao EGFRvIII, atenuando sua expressão e reduzindo sua atividade de fosforilação; porém, apesar disso, não é capaz de inibir a atividade dos segmentos inferiores da via, AKT e MAPK, e não inibe o crescimento das células que hiperexpressam o EGFRvIII (FUKAI et al. 2008; BAX et al. 2009).

Em CECCP, o primeiro estudo que avaliou a prevalência dessa variante por imunistoquímica, confirmando-a por RT-PCR, encontrou sua expressão em 42% dos tumores e sempre concomitantemente à expressão do *EGFR* selvagem

(*EGFRwt*), o que fez com que os autores levantassem a hipótese de que a mutação do *EGFR* fosse um evento avançado durante a evolução tumoral. Este estudo mostrou também relação entre a expressão da forma variante e o aumento da proliferação das células *in vitro*, tumores maiores obtidos de xenoenxertos, atenuação da apoptose induzida pela cisplatina e pelo cetuximabe *in vitro*, e menor atividade do tratamento com cetuximabe nos xenoenxertos, com crescimento três vezes maior dos tumores que expressavam *EGFRvIII* (SOK et al. 2006). Este mesmo grupo, posteriormente, mostrou a associação da expressão do *EGFRvIII* com o aumento da expressão de *STAT3*, e que a resistência *in vitro* ao cetuximabe poderia estar ligada à ativação desta proteína (SUZUKI et al. 2010).

Em 2010, um estudo grego avaliou a expressão da *EGFRvIII* em 102 tumores primários de CECCP pelo método AQUA, que utiliza imunofluorescência, e detectou esta proteína em 48% dos casos. A sua expressão estava mais associada a CEC de laringe quando comparado a CEC de orofaringe e cavidade oral, porém não se correlacionou com prognóstico ou estágio clínico da doença (PECTASIDES et al. 2010).

A confirmação da expressão de *EGFRvIII* em CECCP veio ainda com um estudo canadense, que empregou RT-PCR, encontrando a variante em 42% dos tumores de pacientes com CECCP que participaram em 4 ensaios clínicos, sendo que dois destes ensaios utilizaram inibidores de tirosina-quinase anti-EGFR e outros dois não empregaram drogas anti-EGFR. Curiosamente, neste estudo houve uma associação da presença de *EGFRvIII* com uma maior probabilidade de controle de doença, sem impacto na sobrevida, e sem diferença entre os pacientes tratados com terapia anti EGFR ou não (CHAU et al. 2011).

Outros dois estudos mostraram a existência da forma variante EGFRvIII em CECCP e tentaram avaliar seu impacto no tratamento com cetuximabe. TINHOFFER et al. (2011) avaliaram tumores de pacientes tratados em um estudo de fase II com docetaxel e cetuximabe para doença recidivada ou metastática. A expressão do EGFRvIII foi associada a um pior controle de doença e uma pior SLP, sem impacto na SG (TINHOFFER et al. 2011). SMILEK et al. (2012) avaliaram 29 pacientes com doença localmente avançada tratados com RT associada ao cetuximabe e não encontraram associação entre a expressão de *EGFRvIII* e nenhum desfecho clínico (SMILEK et al. 2012).

Apenas dois estudos não conseguiram mostrar a presença de *EGFRvIII* em CECCP. Em uma coorte prospectiva japonesa em que foram avaliados 82 pacientes tratados com terapia anti-EGFR quanto à presença de mutações no gene *EGFR* por sequenciamento e avaliada a fosforilação e expressão da proteína EGFR, não se encontrou nenhuma mutação no domínio extracelular, apenas no domínio intracelular e que não mostrou correlação com recidiva. Neste estudo, apenas o estado de fosforilação da proteína foi identificada como marcador prognóstico (HAMA et al. 2009). Em outro estudo mais recente, que avaliou apenas tumores de cavidade oral, a mutação foi encontrada em apenas 1 tumor entre os 50 tumores avaliados (MCINTYRE et al. 2012).

Outro mecanismo de resistência ao cetuximabe envolve a ativação constitutiva das vias inferiores ao EGFR, que ficam ativas de forma independente do sinal mediado pelo EGFR. Em carcinomas colorretais a presença de mutações em *KRAS*, nos códons 12 e 13 do éxon 2, foram identificadas como preditores de ausência de resposta ao tratamento com cetuximabe, porém em CECCP estas

mutações estão presentes em menos de 5% dos casos (JIMEMO et al. 2009; MOLINOLO et al. 2009).

Uma das vias principais envolvidas na sinalização pelo EGFR é a da PI3K/AKT. A PI3K é uma proteína que ao ser ativada pelos receptores de membrana tirosina-quinase se dirige para uma localização próxima à membrana celular onde por fosforilação transforma o seu substrato fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). O PIP₃ ativa, diretamente e através da PDK1, a proteína AKT que propaga o sinal intracelular pela ativação de diversas vias inferiores (COURTNEY et al. 2010).

A proteína homóloga de fosfatase e tensina (PTEN) tem uma função inibitória desta via através da desfosforilação de PIP₃, transformando-o novamente em PIP₂. A ausência de expressão de PTEN levaria então a um efeito final de ativação da via. O *PTEN* encontra-se mutado em uma série de neoplasias malignas como endométrio, gliomas, câncer de próstata, cólon e pulmão (LAI et al. 2012). Em pacientes com câncer de mama, a ausência de PTEN está relacionada à resistência ao trastuzumabe, um anticorpo monoclonal direcionado contra o HER2. (LAI et al. 2012) Em pacientes com câncer de cólon metastático a ausência de expressão de PTEN está associada à diminuição da resposta e à menor sobrevida global nos pacientes tratados com cetuximabe (BARDELLI e SIENA 2009; LAURENT-PUIG et al. 2009b). Em pacientes com câncer de próstata metastático a persistência de expressão de PTEN se correlacionou a uma maior sobrevida livre de progressão em pacientes tratados com cetuximabe (CATHOMAS et al. 2012).

O gene *PTEN* encontra-se alterado em torno de 10% dos CECCP, e mais ainda, 30% dos CECCP apresentam ausência da expressão de PTEN, o que é um

indicador independente de mau prognóstico (LAURENT-PUIG et al. 2009b). Os dados sobre o impacto da expressão da proteína PTEN em CECCP são controversos. Dois estudos mostram a baixa expressão de PTEN como um indicativo de mau prognóstico em pacientes com doença localizada tratados com cirurgia seguida ou não por RT, enquanto um terceiro atribui um valor de mau prognóstico para pacientes com hiperexpressão da PTEN (PATTJE et al. 2010; LEE et al. 2001; SNIETURA et al. 2012). Não é do nosso conhecimento dados que associem a expressão da PTEN à resposta ao tratamento com cetuximabe ou mesmo o valor prognóstico da expressão de PTEN no cenário de doença metastática em pacientes com CECCP.

Outra molécula que parece estar envolvida na resistência ao cetuximabe é o CD44, uma molécula de adesão presente na membrana. O CD44 é uma glicoproteína de membrana que promove uma troca de sinais entre a matriz extracelular e o citoplasma. A sua expressão e de suas isoformas foi relacionada nos CECCP a um estágio T mais avançado, invasão tumoral regional, metástases à distância, invasão perineural, resistência à radioterapia e menor SLP. Na interação com a matriz extracelular, o hialuronan se liga ao CD44, desencadeando suas atividades intracelulares que levam a alterações do funcionamento do citoesqueleto, alteração da adesão celular, degradação da matriz extracelular e estimulação da proliferação celular (WANG et al. 2009). Essas ações são mediadas pela formação de um complexo entre o CD44 e o EGFR que leva à ativação das vias da PI3K-AKT-mTOR e RAS-RAF-MAPK (WANG e BOURGUIGNON 2011; PEREZ et al. 2013), bem como pela ativação da fosfolipase C (PLC- γ) pelo CD44, uma via relacionada ao

EGFR, levando a liberação de cálcio dos compartimentos citoplasmáticos (WANG e BOURGUIGNON 2006).

Em um estudo pré-clínico foram analisadas amostras de tumores de CECCP implantados em camundongos antes do tratamento com cetuximabe e na recidiva tumoral após o tratamento e verificou-se uma expressão de CD44 em uma pequena quantidade de células no tumor antes do tratamento e uma expressão aumentada nos tumores recidivados após o tratamento, sugerindo que as células que expressavam CD44 foram aquelas que resistiram ao cetuximabe (DIAS et al. 2010). Outro estudo pré-clínico mostrou que linhagens de células com expressão elevada de CD44 e baixa de EGFR apresentam fenótipo de transição epitélio-mesênquima e são mais resistentes ao tratamento quando comparadas às células com baixa expressão de CD44 (LA FLEUR et al. 2012).

Além da interação com as vias relacionadas aos fatores de crescimento, o CD44 é uma molécula usada para identificar as células-tronco tumorais (CTT), células que mantêm o potencial de auto-renovação, proliferação e de formar novos tumores. Este tipo de célula já foi caracterizado em diversos tipos de neoplasias, inicialmente nas hematológicas, e mais recentemente nos tumores sólidos como no câncer de mama e gliomas (MASSARD et al. 2006). Células com características de CTT também foram identificadas nos CECCP e mostraram uma expressão aumentada do CD44 em relação às outras células neoplásicas (OKAMOTO et al. 2009). No entanto, outros marcadores como o CD24 utilizado em câncer de mama não se mostraram úteis na identificação das CTT em CECCP e o grupo de células CD44+ ainda é um grupo com um potencial de formação de novos tumores menor que o de outros grupos de CTT já identificados em outros tumores, o que somado à

alta taxa de expressão de CD44 e suas variantes em CECCP leva à hipótese de que este não seja um grupo de células-tronco “puro” (PRINCE e AILLES 2008).

Dentre as isoformas de CD44, a isoforma CD44v6 está associada em CECCP a estágios T mais avançados, invasão perineural e menor SLP. Há também evidências pré-clínicas de que a expressão aumentada desta variante está relacionada a maiores níveis de expressão de MAPK e maior ativação de RAS (WANG et al 2009, WANG e BOURGUIGNON 2011). Há ao menos um estudo clínico de fase I com um anticorpo anti-CD44v6 em pacientes com CECCP, mostrando uma taxa de resposta de 10% com seu uso em monoterapia. (ORIAN-ROUSSEAU et al. 2010).

Desta forma, potenciais mecanismos de ativação das vias relacionadas ao EGFR independentes do estímulo pelo EGF sobre seu receptor e interações entre as vias de sinalização dos fatores de crescimento com as vias características das CTT poderiam contribuir para resistência ao cetuximabe.

Sendo assim, acreditamos que a expressão de EGFR, EGFRvIII, PTEN, CD44 e CD44v6 pode estar associada com a resposta ao tratamento com cetuximabe.

Tais moléculas podem constituir-se em potenciais marcadores de resistência ou resposta ao cetuximabe e auxiliar na identificação de indivíduos nos quais se espera uma maior eficácia do tratamento com esta droga associado à radioterapia ou à quimioterapia sistêmica em pacientes com CECCP.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar a frequência da expressão de EGFRvIII, EGFR, PTEN, CD44, e CD44v6 por imunoistoquímica em amostras de tumor de portadores de CECCP metastático ou localmente avançado tratados com quimioterapia ou radioterapia associados ao cetuximabe.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar a associação entre a expressão dos marcadores moleculares entre si e com as características clínico-patológicas dos pacientes.
- 2 Avaliar o impacto da expressão de EGFRvIII, EGFR, PTEN, CD44, e CD44v6 na taxa de resposta objetiva, sobrevida livre de progressão e sobrevida global de portadores de CECCP metastático ou localmente avançado tratados com quimioterapia ou radioterapia associados ao cetuximabe.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo de coorte retrospectiva.

3.2 CASUÍSTICA

Foram avaliados retrospectivamente os dados de cento e cinco (105) pacientes com diagnóstico de CEC de cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, laringe e linfonodo cervical sem primário identificado, tratados no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2010. Os pacientes foram identificados no banco de dados eletrônico da central de quimioterapia do Hospital AC Camargo através de uma busca pelo código internacional da doença (CID10: C01-C02-C03-C04-C05-C06-C07-C08-C09-C10-C12-C14-C32-C76) associado ao tratamento com cetuximabe. Os dados clínicos foram coletados dos registros em prontuário médico arquivados no SAME, empregando ficha de coleta de dados elaborada especificamente para este estudo (Anexo 1).

Foram considerados com história positiva de tabagismo ou etilismo todos os pacientes com qualquer nível de consumo de álcool ou tabaco descrito no prontuário.

O projeto foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital A. C. Camargo sob número 1439/10 (Anexo 2).

3.2.1 Critérios de Inclusão

Pacientes com diagnóstico de CEC de cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, laringe e linfonodo cervical sem primário identificado tratados no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2010 no AC Camargo Cancer Center com as seguintes características:

- Pacientes com recidiva local ou doença sistêmica tratados com cetuximabe em combinação com quimioterapia;
- Pacientes com doença localizada (sem metástase à distância) tratados com cetuximabe em combinação com radioterapia.

3.2.2 Critérios de Exclusão

- Pacientes do grupo com doença localmente avançada avaliados em relação ao tratamento definitivo que receberam tratamento com cisplatina concomitante à radioterapia.

3.3 ANÁLISE PATOLÓGICA

Foram confeccionadas blocos e lâminas de *tissue-microarray* (TMA) com as amostras dos tumores dos pacientes diagnosticadas com CECCP e tratados com cetuximabe, que foram submetidos à reação de imunoistoquímica para detecção da expressão de EGFR, EGFRvIII, PTEN, CD44 e CD44v6.

Levando em consideração o melhor prognóstico já bem estabelecido dos tumores HPV positivos, realizamos também a imunoistoquímica para p16 como um marcador indireto da infecção por HPV. (EL-NAGGAR AK e WESTRA WH 2012)

3.3.1 *Tissue-microarray*

A análise da expressão das moléculas EGFR, EGFRvIII, PTEN, p16, CD44 e CD44v6 foi feita em TMA. Os casos foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica e os blocos representativos do tumor foram separados. Após coloração das lâminas pela técnica de hematoxilina-eosina, as áreas mais representativas do tumor foram identificadas por meio de exame microscópico. As áreas de interesse, definidas como aquelas que apresentassem maior porcentagem de células tumorais em relação ao estroma e às células não neoplásicas, foram marcadas com caneta permanente e identificadas nos blocos de parafina correspondentes (blocos doadores). Usando o *tissue microarrayer* (Beecher Instrument, Silver Spring, MD, USA), cilindros das áreas de interesse previamente identificadas nos blocos doadores foram retirados e transferidos para novos blocos de parafina (blocos receptores).

Para cada caso, foram retirados dois cilindros de 0,6mm de duas áreas distintas do tumor, que foram distribuídos no bloco de parafina receptor de forma que cada amostra de um bloco doador ocupou uma determinada linha e uma determinada coluna no bloco receptor. Foram obtidos cortes histológicos em duplicata destes blocos de TMA e dispostos em lâminas com adesivos Microsystems Inc[®]. As lâminas foram coradas com HE e para os estudo imunoistoquímico foram empregados anticorpos específicos.

O registro da leitura dos resultados da imunoistoquímica nos blocos receptores foi feito no formato de uma tabela de Excel onde se identifica uma determinada amostra pela coluna e linha correspondente àquela que ocupa no bloco de parafina (BEGNAMI 2007).

Nos casos em que as amostras emblocadas foram inadequadas para confecção de TMA devido ao tamanho, as reações de imunoistoquímica foram realizadas em cortes inteiros.

3.3.2 Imunoistoquímica

A reação imunoistoquímica para detectar a expressão do EGFR, EGFRvIII, PTEN, CD44 e CD44v6 foi realizada através das seguintes etapas: **desparafinização e hidratação** dos cortes histológicos em 3 banhos em xilol (5 minutos cada), 4 banhos de álcool seguidos por lavagem por 5 minutos em água corrente; **recuperação antigênica** em câmara de pressão (Pascal) em solução de citrato com pH 6,0 à 125° C (30 segundos após atingir 125°C e pressão entre 20 e 25 psi) seguidos por lavagem em água corrente por 5 minutos; **bloqueio da peroxidase endógena** com 3 banhos de 5 minutos cada com peróxido de hidrogênio 10 volumes seguido por lavagem em PBS; **bloqueio de proteínas** com banho de 20 minutos com bloqueador de proteínas (DAKO); **incubação dos anticorpos primários** por 2 horas à temperatura ambiente em câmara úmida seguido por lavagem em PBS; **incubação com anticorpo secundário** (Advance HRP Link - DAKO) por 30 minutos em temperatura ambiente seguido por lavagem em PBS; **incubação com polímero** (Advance HRP enzyme - DAKO) por 30 minutos em temperatura ambiente seguido por lavagem em PBS; **revelação da reação com cromógeno** 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos (Kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System; DakoCytomation, Carpinteria, California) seguida por lavagem em água corrente; **contracoloração com Hematoxilina** de Harris por 2 minutos seguida por lavagem

em água corrente por 5 minutos; **desidratação** em álcool, passagem em xilol, e montagem em meio permanente.

Os anticorpos primários utilizados foram: anti-EGFR (NCL-EGFR-384 clone EGFR25 [Novacastra]; diluição 1:50), anti-PTEN (AMB2052 clone amb 2052 [Cascade]; diluição 1:500), anti-CD44 (NCL-CD44 clone F10-44-2 [Novacastra]; diluição 1:25), anti-CD44v6 (NCL-CD44V6 clone VFF-7 [Novacastra]; diluição 1:200). O anticorpo anti-EGFRvIII L8A4 foi gentilmente doado pelo Dr. Darell D. Bigner, pesquisador da Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, e utilizado na diluição 1:400.

Os controles positivos foram: EGFR, placenta; PTEN, câncer de endométrio; CD44, tonsila; CD44v6, tonsila. Para controle do EGFRvIII, utilizamos amostra de glioblastoma multiforme, doadas pelo Dr. Rui Manoel Reis do Hospital de Câncer de Barretos, em que previamente havia sido demonstrada a presença de EGFRvIII por RT-PCR (Tabela 1).

A imunoistoquímica para p16 foi realizada de forma automatizada no equipamento BenchMark ULTRA – VENTANA, com anticorpo anti p16 CINTec p16 Histology – VENTANA – clone E6H4. Foi utilizado o protocolo 36CC1m cin 36 minutos de recuperação por calor em solução CC1 e incubação do anticorpo primário por 32 minutos.

Tabela 1 - Dados técnicos do anticorpos primários utilizados para as reações de imunoistoquímica.

Anticorpo	Clone	Diluição	Padrão Avaliado	Controle Positivo
anti-EGFR	NCL-EGFR-384 clone EGFR25[Novacastra]	1:50	Membrana	Placenta
anti-EGFRvIII	L8A4	1:400	Citoplasmático	Glioblastoma
anti-PTEN	AMB2052 clone amb 2052 [Cascade]	1:500	Citoplasmático	Câncer de endométrio
anti-CD44	NCL-CD44 clone F10-44-2 [Novacastra]	1:25	Membrana	Tonsila
anti-CD44v6	NCL-CD44V6 clone VFF-7 [Novacastra]	1:200	Membrana	Tonsila
anti-p16	clone E6H4 {Ventana}	-	Citoplasmático e Nuclear	-

As lâminas de TMA foram lidas por um patologista com experiência na análise de tumores de cabeça e pescoço e graduadas quanto à intensidade de coloração de forma semiquantativa de 0+ a 3+. A porcentagem de células não foi considerada na leitura das lâminas uma vez que no campo restrito avaliado no TMA aquelas amostras que foram positivas foram positivas de forma difusa. Por conta disto, consideramos que o acréscimo da porcentagem para forma um escore acrescentaria pouca informação ao dado já oferecido pela intensidade de coloração através de uma padronização mais simples.

A leitura das lâminas coradas com p16 foi feita de forma dicotômica considerando-se positivas aquelas em que houve marcação citoplasmática e nuclear difusas.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada estatística descritiva para caracterização das amostras com determinação de frequências, médias, medianas e medidas de dispersão central.

A marcação imunoistoquímica foi dicotomizada com os seguintes pontos de corte: EGFR foi considerado hiperexpresso caso 3+ e normal caso 0+, 1+ ou 2+; EGFRvIII e PTEN foram avaliados como não expressos se 0+ e expressos se 1+, 2+ ou 3+. CD44 e CD44v6 foram considerados negativos caso 0+ ou 1+, e positivos, caso 2+ ou 3+.

Taxa de resposta objetiva foi considerada a porcentagem de pacientes com resposta parcial ou resposta completa de acordo com o dado registrado no prontuário pelo médico assistente.

Taxa de resposta completa foi considerada a porcentagem de pacientes com resposta completa de acordo com o dado registrado no prontuário pelo médico assistente.

Teste de qui-quadrado ou exato de Fischer foi utilizado para análise de associação entre variáveis categóricas e o teste de Mann-Whitney para comparação entre variáveis categóricas e contínuas. Análise multivariada para associação entre variáveis categóricas com a taxa de resposta objetiva e taxa de resposta completa foi realizada por regressão logística.

Curvas de Kaplan-Meier foram geradas para análise de sobrevida e o impacto das diversas variáveis avaliadas através de teste de log-rank. Sobrevida livre de progressão, no grupo de pacientes com doença localmente avançada tratados com radioterapia e cetuximabe, foi definida como o tempo entre a o início da administração de cetuximabe e a ocorrência de recorrência locorregional ou à distância ou morte. Sobrevida livre de progressão, no grupo de pacientes com doença metastática tratados com quimioterapia e cetuximabe, foi definida como o tempo entre a administração de cetuximabe e a ocorrência de progressão tumoral conforme

registrada pelo médico assistente no prontuário ou morte. Sobrevida global foi definida como o tempo decorrido entre o início da administração de cetuximabe e a morte por qualquer causa.

Os dados de seguimento dos pacientes foram atualizados até o dia 26 de junho de 2013. Foram considerados como perda de seguimento os pacientes sem dado de seguimento nos últimos 6 meses da última data de coleta dos dados. Os pacientes com perda de seguimento e aqueles vivos na última data de seguimento foram considerados como censura nas curvas de sobrevida global, e aqueles com perda de seguimento sem progressão e aqueles com seguimento completo porém sem progressão ou morte na última avaliação foram considerados como censura nas curvas de sobrevida livre de progressão.

Análise multivariada foi empregada para predição do impacto combinado de variáveis independentes na sobrevida usando-se o modelo de regressão de Cox com riscos proporcionais. Foram selecionadas para análise multivariada as variáveis com $p < 0,25$ na análise univariada. A modelagem foi feita através do procedimento *stepwise forward*, com pontos de corte do valor de $p < 0,5$ para inclusão da variável no modelo e $p > 0,10$ para exclusão.

Consideramos estatisticamente significativas as análises cujos valores de p foram menor que 0,05. Empregamos o pacote estatístico SPSS v21.0 para Macintosh.

4 RESULTADOS

4.1 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DOS MARCADORES ESTUDADOS COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Dos 105 pacientes, amostras de tumor estavam disponíveis para 65 pacientes. A avaliação pela imunoistoquímica pôde ser realizada e foi conclusiva em 63 pacientes para EGFRvIII (60,0%), 60 pacientes para EGFR (57,1%), 64 pacientes para PTEN (60,9%), 60 pacientes para CD44 (57,1%), 63 pacientes para CD44v6 (60%) e 64 pacientes para p16 (61%).

Nos pacientes com material disponível, a expressão de EGFRvIII foi positiva em 17 amostras (27,0%), o EGFR foi hiperexpresso em 30 amostras (50%), a expressão de PTEN foi negativa em 24 pacientes (37,5%), o CD44 foi positivo em 23 amostras (38,3%), e o CD44v6 foi positivo em 48 amostras (76,2%) (Figuras 4 a 7 e Tabela 2).

p16 foi positivo em apenas 7 casos (10,9%), 2 pacientes com tumor de orofaringe, 2 de hipofaringe, 1 de cavidade oral, 1 laringe e 1 primário não identificado.

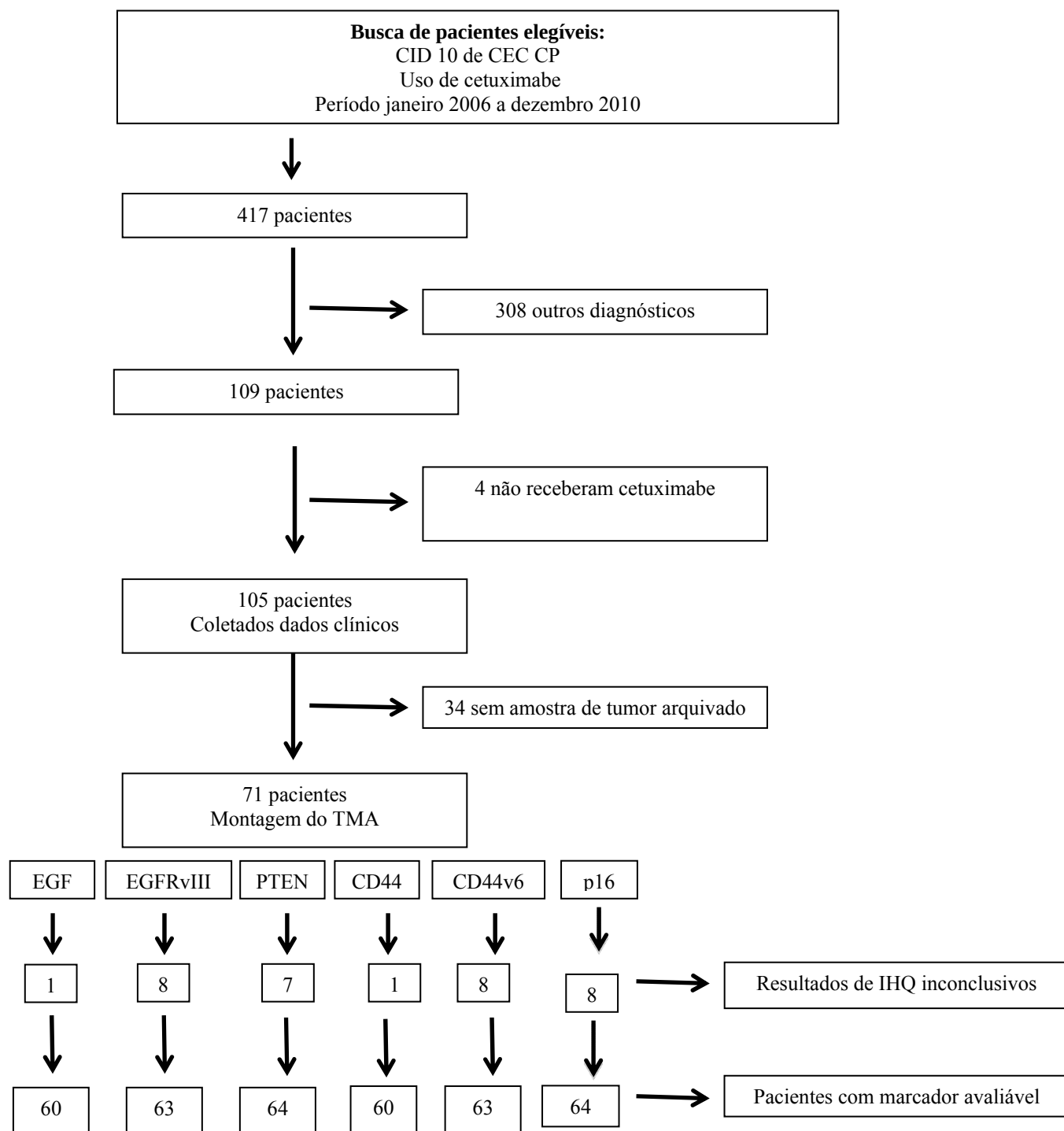


Figura 4– Fluxo de avaliação e seleção dos pacientes no estudo.

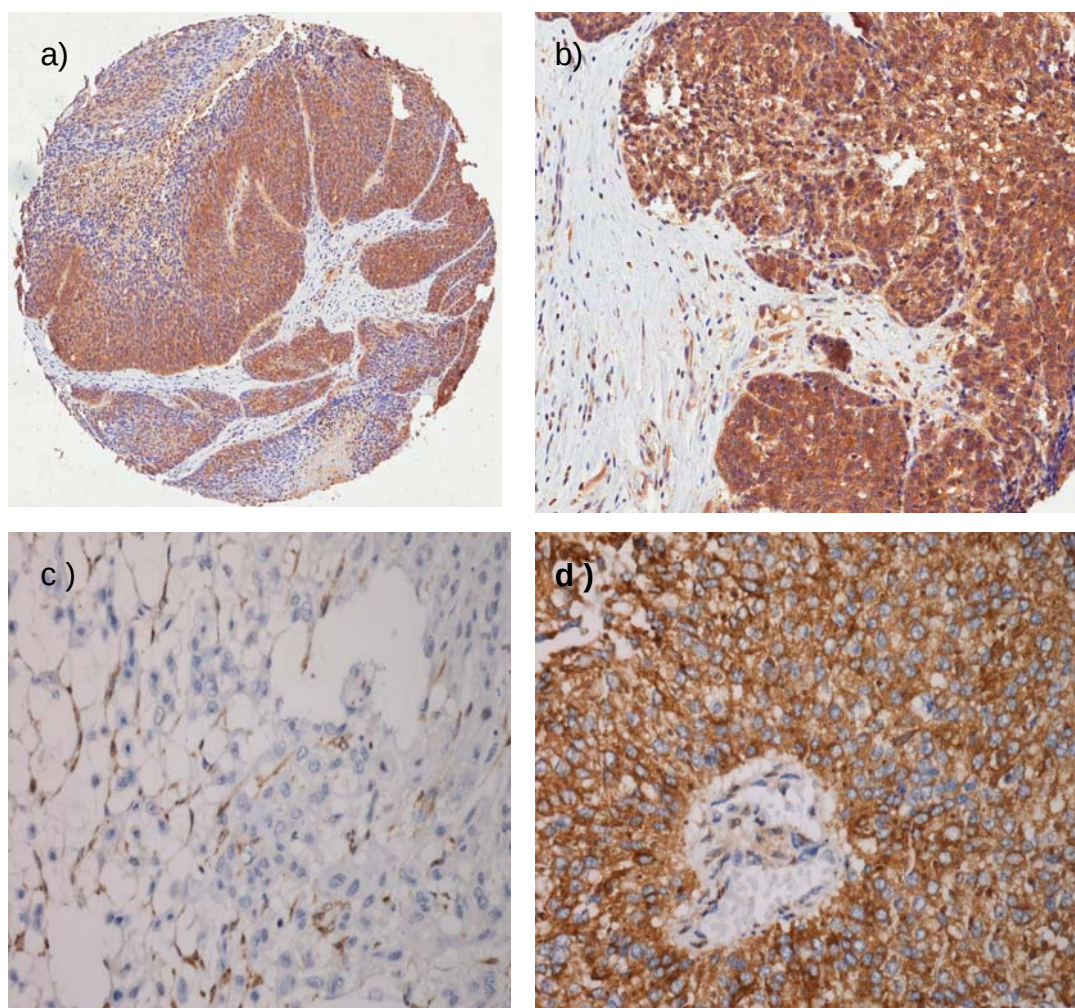


Figura 5 - Microfotografias representativas das imunoistoquímicas em amostras de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço avaliados em *tissue microarray*. a) Marcação para EGFRvIII. Aumento de 10x. Representação de um caso positivo forte (3+). b) Marcação para EGFRvIII. Aumento de 20x, mostrando positividade citoplasmática. c) Marcação para PTEN. Aumento de 40x. Representação de um caso negativo (0+). d) Marcação para PTEN. Aumento de 40x. Representação de um caso com positividade citoplasmática de forte intensidade (3+).

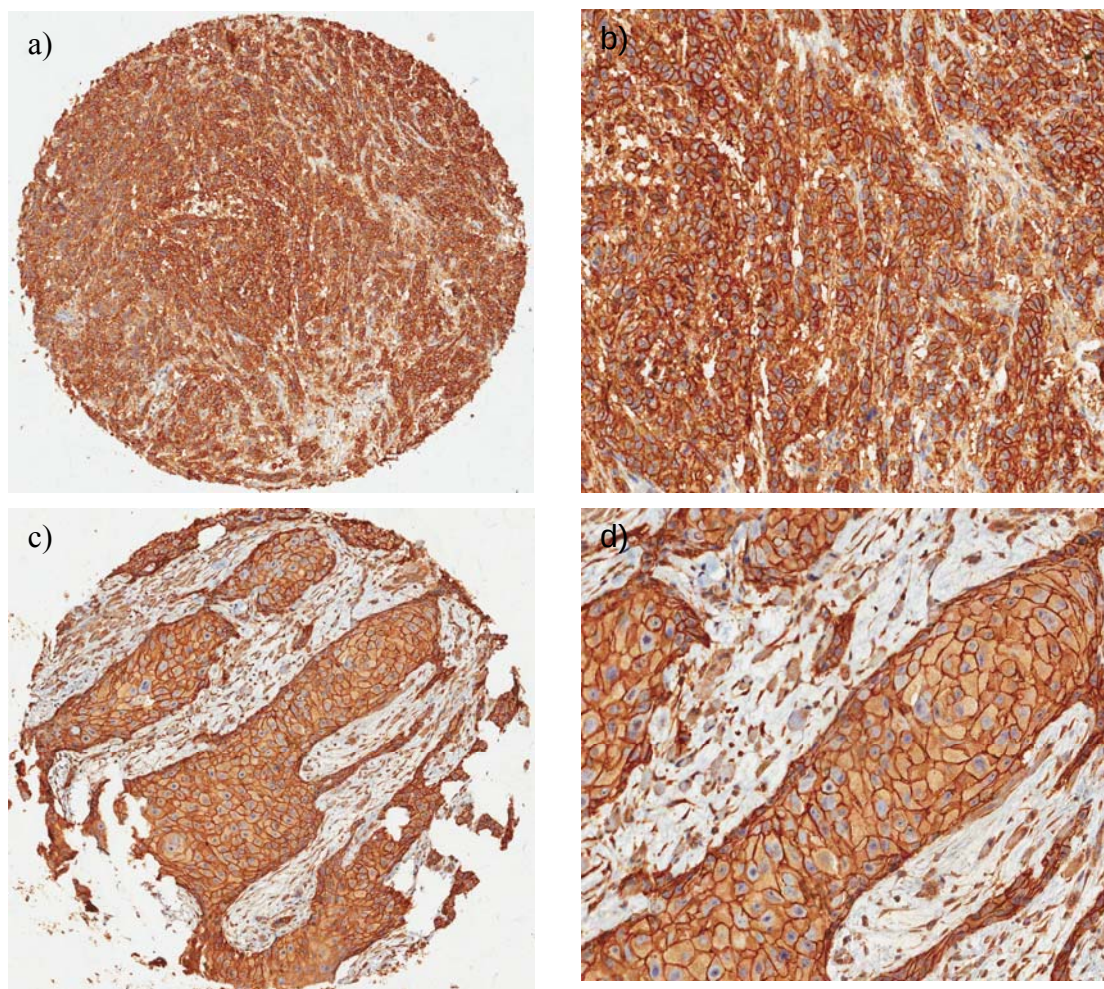


Figura 6 - Microfotografias representativas das imunoistoquímicas em amostras de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço avaliados em *tissue microarray*. a) Marcação para CD44. Aumento de 10x. Representação de um caso positivo forte (3+). b) Marcação para CD44. Aumento de 20x mostrando positividade de membrana. c) Marcação para CD44v6. Aumento de 10x. Representação de um caso positivo forte (3+). d) Marcação para CD44v6. Aumento de 20x mostrando positividade de membrana.

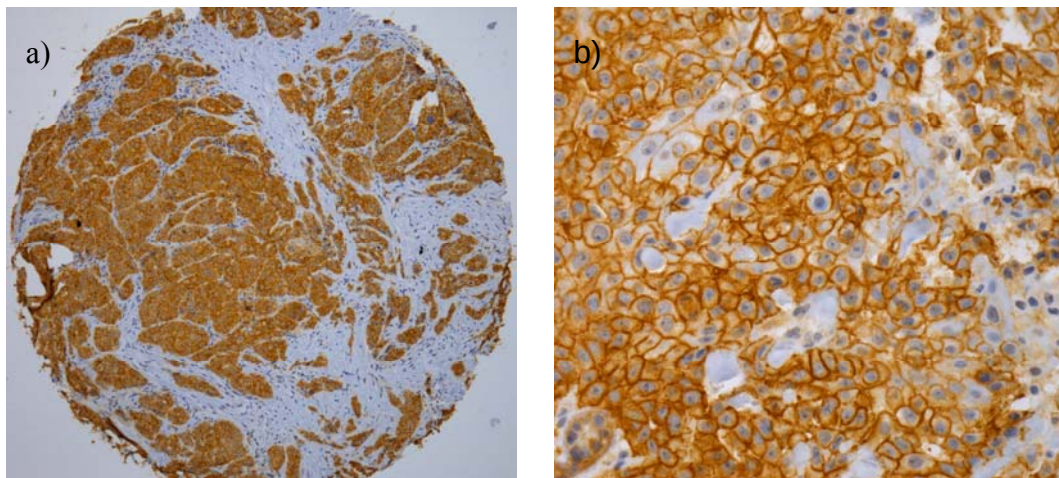


Figura 7 - Microfotografias representativas das imunoistoquímicas em amostras de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço avaliados no estudo atual em *tissue microarray*. a) Marcação para EGFR. Aumento de 10x. Representação de um caso positivo forte (3+). b) Marcação para EGFR. Aumento de 40x mostrando positividade de membrana

Tabela 2 - Expressão dos marcadores moleculares avaliados por imunohistoquímica em todos os pacientes do estudo (105 pacientes) e, separadamente, nos grupos RT (61 pacientes) e QT (44 pacientes).

Grupo	Todos N=105	RT N=61	QT N=44
Marcador	Freq. (%)	Freq. (%)	Freq. (%)
EGFR			
Não hiperexpresso	30 (49,2)	18 (51,4)	12 (46,2)
Hiperexpresso	31 (50,8)	17 (48,6)	14 (53,8)
Indisponível	44	26	18
EGFRvIII			
Negativo	46 (73,0)	25 (71,4)	21 (75,0)
Positivo	17 (27,0)	10 (28,6)	7 (25,0)
Indisponível	42	26	16
PTEN			
Negativo	24 (37,5)	17 (47,2)	7 (25,0)
Positivo	40 (62,5)	19 (52,8)	21 (75,0)
Indisponível	41	25	16
CD44			
Negativo	37 (61,7)	22 (64,7)	15 (57,7)
Positivo	23 (38,3)	12 (35,3)	11 (42,3)
Indisponível	45	27	18
CD44 v6			
Negativo	15 (23,8)	7 (19,4)	8 (29,6)
Positivo	48 (76,2)	29 (80,6)	19 (70,4)
Indisponível	42	25	17
p16			
Negativo	57 (89,1)	29 (85,3)	25 (92,6)
Positivo	7 (10,9)	5 (14,7)	2 (7,4)
Indisponível	41	27	44

Houve associação entre a expressão do EGFRvIII e a hiperexpressão de EGFR, 70,6% dos tumores que expressaram EGFRvIII também apresentavam hiperexpressão do EGFR ($p=0,043$); e entre a expressão de CD44 e CD44v6, com todos os tumores positivos para CD44 também expressando CD44v6 ($p<0,001$). Não houve associação entre a expressão dos outros marcadores entre si (Tabelas 3 a 7).

Tabela 3 - Resultado dos testes de associação entre EGFR e os demais marcadores moleculares avaliados no estudo. Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado.

Grupos comparados		Hiperexpressão de EGFR		
		Sim – n (%)	Não – n (%)	p
Expressão EGFRvIII	Sim	12 (70,6)	5 (29,4)	0,043
	Não	17 (41,5)	24 (58,5)	
Perda de PTEN	Sim	8 (36,4)	14 (63,6)	0,086
	Não	22 (59,5)	15 (40,5)	
Expressão CD44	Sim	13 (59,1)	9 (40,9)	0,152
	Não	13 (39,4)	20 (60,6)	
Expressão CD44v6	Sim	25 (55,6)	20 (40,4)	0,078
	Não	4 (28,6)	10 (71,4)	

Tabela 4 - Resultado dos testes de associação entre EGFRvIII e os demais marcadores moleculares avaliados no estudo. Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado.

Grupos comparados		Expressão de EGFRvIII		
		Sim – n (%)	Não – n (%)	p
Hiperexpressão EGFR	Sim	12 (41,4)	17 (58,6)	0,043
	Não	5 (17,2)	24 (82,9)	
Perda de PTEN	Sim	6 (26,1)	17 (73,9)	0,857
	Não	11 (28,2)	28 (71,8)	
Expressão CD44	Sim	9 (40,9)	13 (59,1)	0,087
	Não	7 (20,0)	28 (80,0)	
Expressão CD44v6 *	Sim	14 (29,8)	33 (70,2)	0,403
	Não	3 (21,4)	11 (78,6)	

Tabela 5 - Resultado dos testes de associação entre PTEN e os demais marcadores moleculares avaliados no estudo. Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado.

Grupos comparados		Perda de PTEN		
		Sim – n (%)	Não – n (%)	p
Hiperexpressão EGFR	Sim	8 (26,7)	22 (73,3)	0,086
	Não	14 (48,3)	15 (51,7)	
Expressão EGFRvIII	Sim	6 (35,3)	22 (64,7)	0,857
	Não	17 (37,8)	28 (62,2)	
Expressão CD44	Sim	8 (34,8)	15 (65,2)	0,539
	Não	15 (42,9)	20 (57,1)	
Expressão CD44v6	Sim	16 (34,0)	31 (66,0)	0,182
	Não	8 (53,3)	7 (46,7)	

Tabela 6 - Resultado dos testes de associação entre CD44 e os demais marcadores moleculares avaliados no estudo. Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado.

Grupos comparados		Expressão de CD44		
		Sim – n (%)	Não – n (%)	p
Hiperexpressão EGFR	Sim	13 (50,0)	13 (50,0)	0,152
	Não	9 (31,0)	20 (60,9)	
Expressão EGFRvIII	Sim	9 (56,3)	7 (43,8)	0,087
	Não	13 (31,7)	28 (68,3)	
Perda de PTEN	Sim	8 (34,8)	15 (65,2)	0,539
	Não	15 (42,9)	29 (57,1)	
Expressão CD44v6	Sim	23 (52,3)	21 (47,7)	< 0,001
	Não	0 (0)	15 (100)	

Tabela 7 - Resultado dos testes de associação entre CD44v6 e os demais marcadores moleculares avaliados no estudo. Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado.

Grupos comparados		Expressão de CD44v6		
		Sim – n (%)	Não – n (%)	p
Hiperexpressão EGFR	Sim	25 (86,2)	4 (13,8)	0,078
	Não	20 (66,7)	10 (33,3)	
Expressão EGFRvIII *	Sim	14 (82,4)	3 (17,6)	0,403
	Não	33 (75,0)	11 (25,0)	
Perda de PTEN	Sim	16 (66,7)	8 (33,3)	0,182
	Não	31 (81,6)	7 (18,4)	
Expressão CD44	Sim	23 (100,0)	0 (0)	< 0,001
	Não	21 (58,3)	15 (41,7)	

Ao testarmos a associação entre os marcadores moleculares e os sítios primários, avaliamos apenas os dois sítios primários com maior número de casos, cavidade oral e orofaringe, comparando a expressão dos marcadores entre eles. Houve associação entre a hiperexpressão de EGFR e primário de cavidade oral. Setenta por cento dos tumores de cavidade oral apresentaram hiperexpressão de EGFR, enquanto que 39,1% dos tumores de orofaringe apresentaram hiperexpressão de EGFR ($p=0,028$). Também observamos associação entre a ausência de expressão de PTEN e primário de orofaringe. Apenas 18,2% dos tumores de cavidade oral não expressavam PTEN, enquanto 58,3% dos tumores de orofaringe não expressavam PTEN ($p=0,005$). Nenhum dos marcadores se associou a estágios distintos da doença (Tabelas 8 a 12).

Tabela 8 - Resultado dos testes de associação entre EGFR e sítios primários, T, N e estadiamento. Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado.

Marcador Grupos Comparados		Hiperexpressão EGFR		
		Sim – n (%)	Não – n (%)	p
Sítio primário *	Cavidade oral	14 (70,0)	6 (30,0)	0,043
	Orofaringe	9 (39,1)	14 (60,9)	
T	T1-2	4 (33,3)	8 (66,7)	0,278
	T3-4	18 (51,4)	17 (48,6)	
N	N0	6 (46,2)	7 (53,8)	0,882
	N+	17 (48,6)	18 (51,4)	
EC	I-III	4 (36,4)	7 (63,6)	0,382
	IV	19 (51,4)	18 (48,6)	

Tabela 9 - Resultado dos testes de associação entre EGFRvIII e sítios primários, T, N e estadiamento. Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado.

Marcador Grupos Comparados		Expressão EGFRvIII		
		Sim – n (%)	Não – n (%)	p
Sítio primário	Cavidade oral	8 (38,1)	13 (61,9)	0,235
	Orofaringe	5 (21,7)	18 (78,3)	
T *	T1-2	2 (15,4)	11 (84,6)	0,393
	T3-4	13 (35,1)	13 (36,1)	
N *	N0	5 (33,3)	10 (66,7)	0,747
	N+	10 (28,6)	25 (71,4)	
EC *	I-III	3 (23,1)	10 (76,9)	0,728
	IV	12 (32,4)	25 (67,6)	

Tabela 10 - Resultado dos testes de associação entre PTEN e sítios primários, T, N e estadiamento. Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado.

Marcador Grupos Comparados		Perda de PTEN		
		Sim – n (%)	Não – n (%)	p
Sítio primário	Cavidade oral	4 (18,2)	18 (81,8)	0,005
	Orofaringe	14 (58,3)	10 (41,7)	
T *	T1-2	2 (16,7)	10 (83,3)	0,095
	T3-4	17 (45,9)	20 (54,1)	
N	N0	7 (50,0)	7 (50,0)	0,276
	N+	12 (33,3)	24 (66,7)	
EC *	I-III	5 (41,7)	7 (58,3)	0,510
	IV	14 (36,8)	24 (63,2)	

Tabela 11 - Resultado dos testes de associação entre CD44 e sítios primários, T, N e estadiamento. Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado.

Marcador		Expressão CD44		
		Sim – n (%)	Não – n (%)	p
Grupos Comparados				
Sítio primário	Cavidade oral	8 (40,0)	12 (60,0)	0,751
	Orofaringe	7 (33,3)	14 (66,7)	
T *	T1-2	3 (25,0)	9 (75,0)	0,498
	T3-4	13 (38,1)	21 (61,8)	
N *	N0	13 (23,1)	10 (76,9)	0,493
	N+	13 (39,4)	20 (60,6)	
EC	I-III	2 (16,7)	10 (83,3)	0,170
	IV	14 (41,2)	20 (58,8)	

Tabela 12 - Resultado dos testes de associação entre CD44v6 e sítios primários, T, N e estadiamento. Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado.

Marcador		Expressão CD44v6		
		Sim – n (%)	Não – n (%)	p
Grupos Comparados				
Sítio primário	Cavidade oral	15 (75,0)	5 (25,0)	1,000
	Orofaringe	18 (75,0)	6 (25,0)	
T *	T1-2	10 (83,3)	2 (16,7)	0,703
	T3-4	26 (72,2)	10 (27,8)	
N *	N0	9 (64,3)	5 (35,7)	0,285
	N+	28 (80,0)	7 (20,0)	
EC *	I-III	7 (58,3)	5 (41,7)	0,136
	IV	30 (81,1)	7 (18,9)	

4.2 GRUPO RADIOTERAPIA + CETUXIMABE

4.2.1 Características Clínico-Demográficas e Patológicas

O grupo de pacientes tratados com radioterapia associado ao cetuximabe (grupo RT) era composto por 61 pacientes, com mediana de idade de 67 anos, a maioria homens e com histórico de tabagismo. Em 23,3% dos casos, o *performance status* era 2 ou mais segundo o *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG), a mediana do Índice de Comorbidades de Charlson ajustado para idade (AA-CCI) foi de 4, disfunção renal moderada a grave foi registrada em 47,4% dos casos. O sítio primário mais comum foi orofaringe correspondendo a 49,2% dos pacientes (Tabela 13).

Tabela 13 - Características clínicas e patológicas dos 61 pacientes do grupo tratado com RT associada a cetuximabe

Variável	Categoria	Freq.	%
Idade ao tratamento	< 70	33	54,1
	≥ 70	28	45,9
Sexo	Masculino	48	78,7
	Feminino	13	21,3
Tabagismo	Sim	50	83,3
	Não	10	16,7
	Desconhecido	1	
Etilismo	Sim	33	55
	Não	27	45
	Desconhecido	1	
ECOG	< 2	46	76,7
	≥ 2	11	23,3
AA-CCI	≤ 4 (mediana)	36	59,0
	> 4 (mediana)	25	41,0
ClCr/Cr*	ClCr > 60 ou Cr < 1,2	30	53,6
	ClCr < 60 ou Cr > 1,2	26	47,4
	Desconhecido	5	
Sítio Primário	Cavidade oral	12	19,7
	Orofaringe	30	49,2
	Laringe	6	9,8
	Hipofaringe	12	19,7
	Primário desconhecido	1	1,7
T	T1	3	4,9
	T2	7	11,5
	T3	19	31,1
	T4	27	44,2
	Tx	5	8,2
N	N0	16	26,2
	N1	12	19,7
	N2	23	37,7
	N3	7	11,4
	Nx	3	4,9
EC	I	1	1,7
	III	14	24,1
	IVa	33	56,9
	IVb	10	17,2
	Desconhecido	3	

* ClCr- clearance de creatinina; Cr- creatinina sérica

Cont./ Tabela 13

Variável	Categoria	Freq.	%
EGFR	Não hiperexpresso	18	51,4
	Hiperexpresso	17	48,6
	Indisponíveis	26	
EGFRvIII	Neg	25	71,4
	Pos	10	28,6
	Indisponíveis	26	
CD44	Neg	22	64,7
	Pos	12	35,3
	Indisponível	27	
CD44 v6	Neg	7	19,4
	Pos	29	80,6
	Indisponível	25	
PTEN	Neg	16	47,2
	Pos	20	52,8
	Indisponível	25	
p16	Neg	29	85,3
	Pos	5	14,7
	Indisponível	27	

4.2.2 Sobrevida Global e Livre de Progressão

Com um seguimento mediano de 27,4 meses, 42 pacientes apresentaram progressão de doença, 34 pacientes morreram e 8 pacientes foram considerados como perda de seguimento. A sobrevida global (SG) mediana foi de 23,2 meses (IC95%; 15,3-31,0 meses) e a sobrevida livre de progressão (SLP) mediana foi de 7,9 meses (IC95%; 3,3 – 12,4 meses) (Figuras 8 e 9).

A avaliação dos fatores prognósticos clínicos com influência sobre as curvas de sobrevida mostrou que pacientes com ECOG ≥ 2 tem uma pior SG (SG 28,0 meses vs 7,1 meses; $p=0,003$), assim como os pacientes com maior índice de comorbidades (SG 28,7 meses vs 15,0 meses; $p=0,029$) (figura 10 e tabela 14). Pacientes com ECOG ≥ 2 também apresentaram uma menor SLP (SLP 11,3 meses vs

3,8 meses; $p=0,007$), bem como pacientes do sexo feminino (SLP 13,6 meses vs 3,6 meses; $p=0,001$) (Figura 11 e Tabela 15).

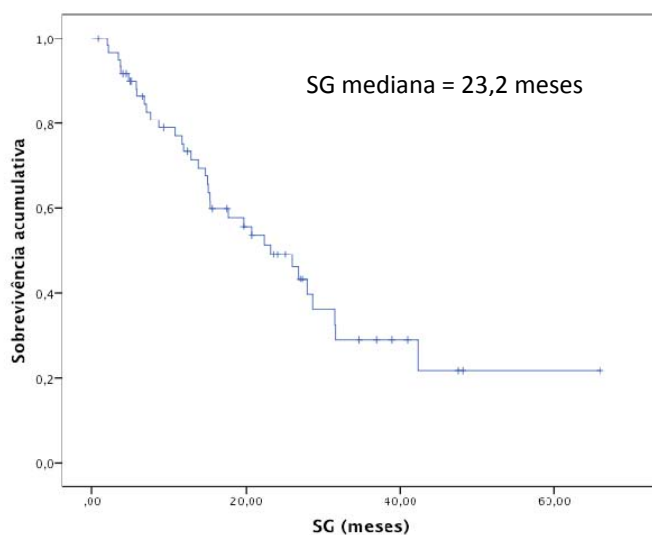


Figura 8 - Curva de sobrevida global (SG) do grupo RT. A curva foi calculada pelo método de Kaplan-Meier

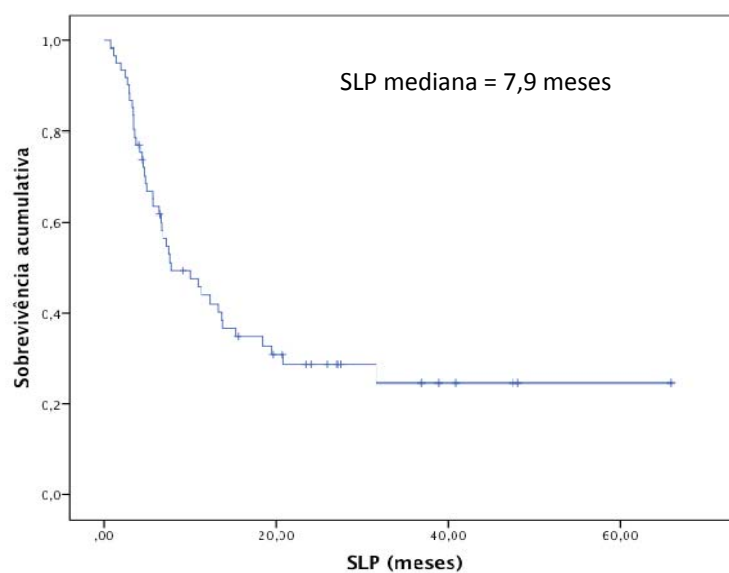


Figura 9 - Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) do grupo RT. A curva foi calculada pelo método de Kaplan-Meier.

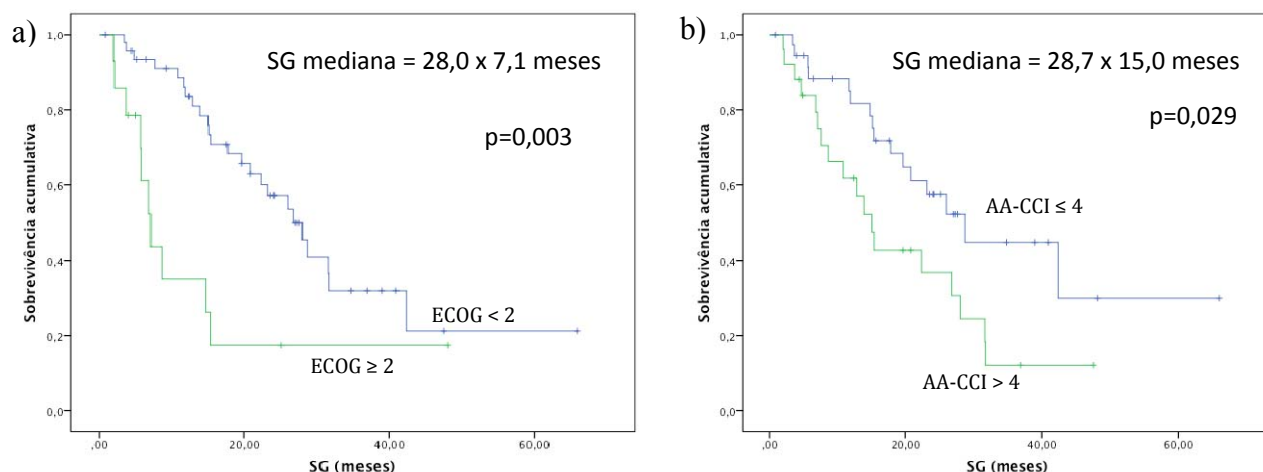


Figura 10 - Curvas de sobrevida global (SG) do grupo RT de acordo com o ECOG (a) e o índice de comorbidades ajustado pela idade (b). As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e as comparações entre os grupos foram realizadas empregando-se o teste de log-rank. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles com $p < 0,05$.

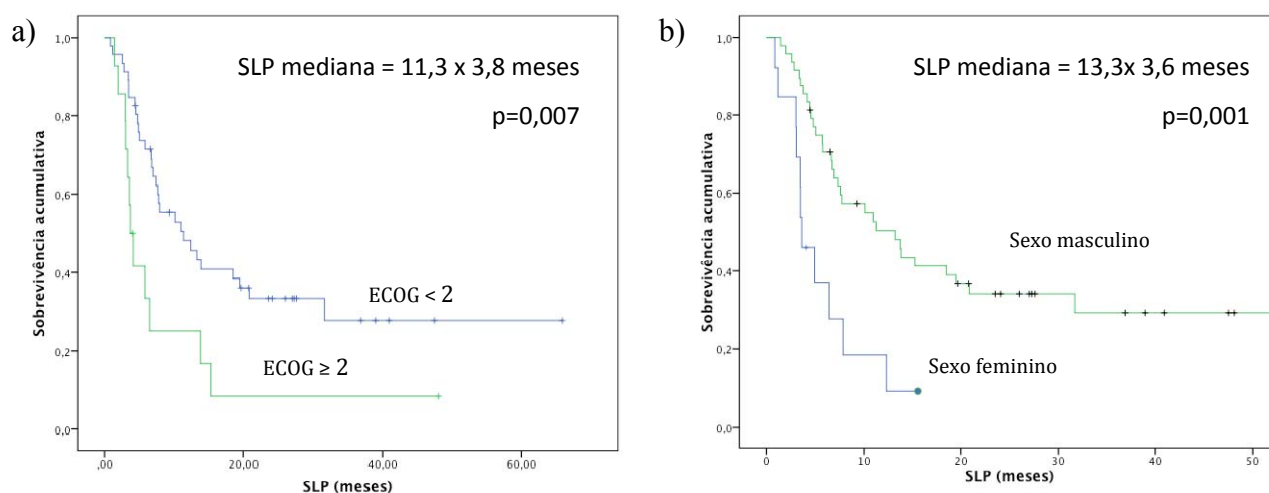


Figura 11 - Curvas de sobrevida livre de progressão (SLP) do grupo RT de acordo com ECOG (a) e sexo (b). As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e as comparações entre os grupos foram realizadas empregando-se o teste de log-rank. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles com $p < 0,05$.

Dentre os marcadores moleculares, apenas o CD44v6 esteve associado a uma pior SG, porém tendo em vista que apenas 7 pacientes foram CD44v6 negativo, com apenas 2 eventos entre eles, não consideramos esse resultado clinicamente

significativo. Nenhum dos marcadores moleculares teve impacto nas curvas de SG (Figura 12 e Tabela 14) ou SLP (Figura 13 e Tabela 15).

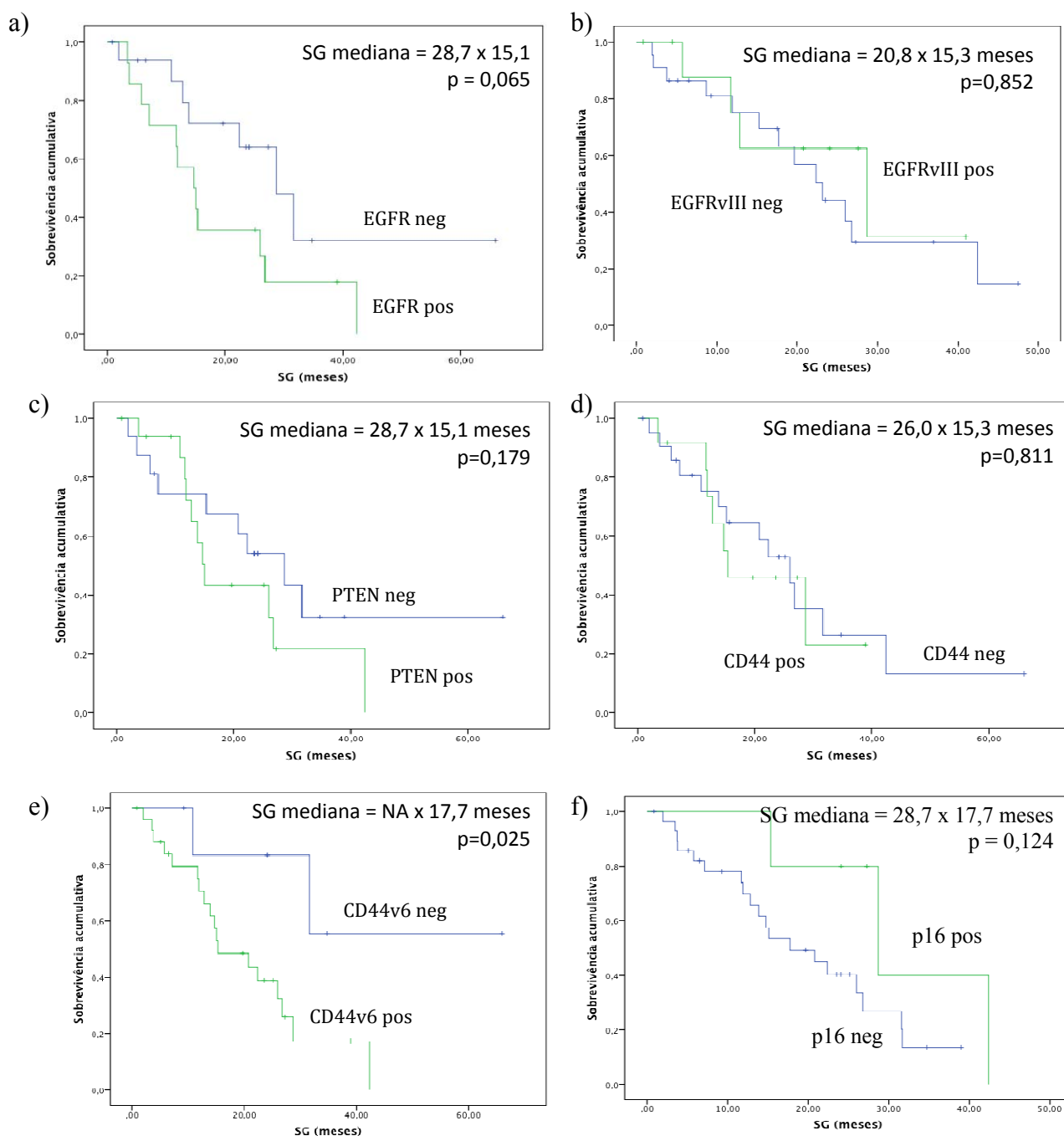


Figura 12 - Curvas de sobrevida global (SG) do grupo RT de acordo com a expressão de cada marcador molecular. (a) EGFR, (b) EGFRvIII, (c) PTEN, (d) CD44, (e) CD44v6, (f) p16. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e as comparações entre os grupos foram realizadas empregando-se o teste de log-rank. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles com $p < 0,05$.

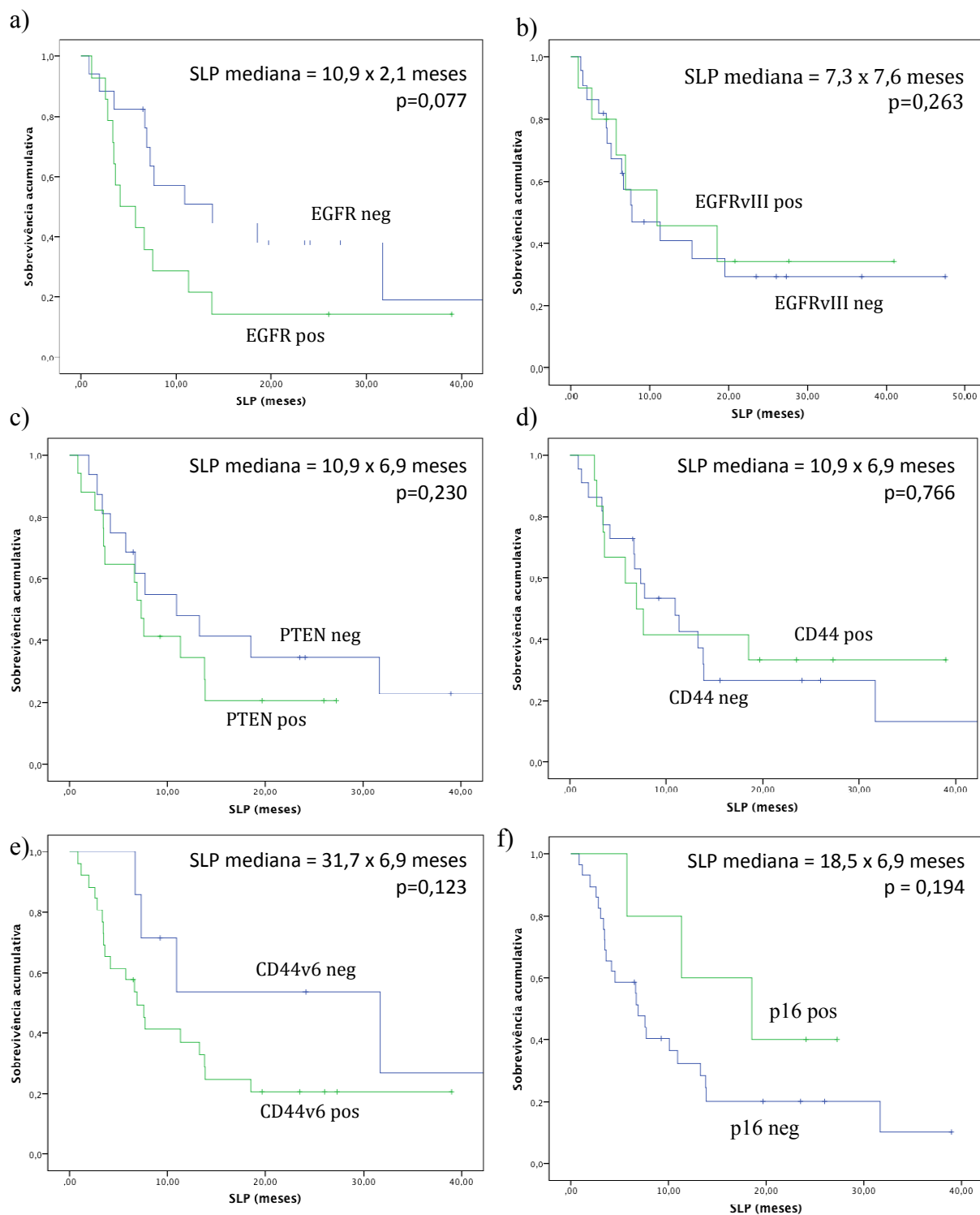


Figura 13 - Curvas de sobrevida livre de progressão (SLP) do grupo RT de acordo com a expressão de cada marcador molecular. (a) EGFR, (b) EGFRvIII, (c) PTEN, (d) CD44, (e) CD44v6, (f) p16. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e as comparações entre os grupos foram realizadas empregando-se o teste de log-rank. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles com $p<0,05$.

Tabela 14 - Sobrevida global em 1 ano e 3 anos no grupo RT de acordo com cada variável. O valor de p representado corresponde ao do teste de Kaplan-Meier.

Variáveis	Categoria	SG 1 ano (%)	SG 3 anos (%)	p
Todos		73,3	28,9	
Sexo	Feminino	74,1	33,7	0,058
	Masculino	71,4	0	
Idade	< 70 anos	64,2	36,3	0,961
	≥ 70 anos	83,2	11,4	
Tabagismo	Não	100	71,4	0,213
	Sim	70,4	27,2	
Etilismo	Não	78,6	34,9	0,917
	Sim	72,0	20,7	
AA-CCI	≤ 4 (mediana)	81,7	44,8	0,029
	> 4 (mediana)	61,8	12,2	
ECOG	< 2	86,0	31,8	0,003
	≥ 2	34,9	17,5	
ClCr	≥ 60	71,7	24,1	0,399
	< 60	73,9	29,9	
Primário	Cavidade Oral	75,9	31,8	
	Orofaringe	71,9	21,4	
	Laringe	74,3	34,5	
	Hipofaringe	69,5	24,2	
T	T1-T2	66,7	0	
	T3-T4	74,1	33,2	
N	N0	80,0	41,1	
	N+	71,7	13,7	
EC	I-III	77,1	30,0	
	IV	75,0	27,2	
Indução	Não	65,1	13,5	0,293
	Sim	60,0	45,0	
Nº aplicações cetuximabe	≥ 8	83,5	25,8	0,928
	< 8	66,1	33,9	
Rash	Grau 0-1	76,5	28,3	0,898
	Grau 2-4	65,9	28,5	
EGFR	Não hiperexpresso	87,4	29,9	0,065
	Hiperexpresso	58,8	14,1	
EGFRvIII	Negativo	73,6	0	0,852
	Positivo	70,0	16,7	
PTEN	Negativo	74,5	32,5	0,179
	Positivo	71,6	12,5	
CD44	Negativo	75,3	13,2	0,811
	Positivo	73,3	22,9	
CD44v6	Negativo	83,3	55,6	0,025
	Positivo	70,3	13,7	
p16	Negativo	70,0	13,4	0,124
	Positivo	100,0	40,0	

Tabela 15 - Sobrevida livre de progressão em 1 ano e 3 anos no grupo RT de acordo com cada variável. O valor de p representado corresponde ao teste de Kaplan-Meier.

Variáveis	Categoria	SLP 1 ano (%)	SLP 3 anos (%)	p
Todos		43,9	24,6	
Sexo	Feminino	50,4	9,2	0,001
	Masculino	18,5	29,2	
Idade	< 70 anos	38,4	24,9	0,427
	≥ 70 anos	50,6	33,7	
Tabagismo	Não	75,0	56,3	0,057
	Sim	39,7	25,1	
Etilismo	Não	39,2	27,4	0,769
	Sim	45,5	25,3	
AA-CCI	≤ 4 (mediana)	53,9	34,1	0,105
	> 4 (mediana)	29,6	14,1	
ECOG	< 2	48,1	27,7	0,007
	≥ 2	25,0	8,3	
ClCr	≥ 60	40,3	27,7	0,814
	< 60	40,5	18,2	
Primário	Cavidade Oral	31,3	10,4	
	Orofaringe	49,1	27,8	
	Laringe	33,3	0	
	Hipofaringe	50,5	40,4	
T	T1-T2	36,0	18,0	
	T3-T4	47,0	26,2	
N	N0	43,8	25,0	
	N+	45,5	26,5	
EC	I-III	77,1	30,0	
	IV	75,0	27,2	
Indução	Não	31,3	13,9	0,883
	Sim	25,0	25,0	
Nº aplicações cetuximabe	≥ 8	35,2	21,2	0,711
	< 8	50,9	28,0	
Rash	Grau 0-1	43,3	22,2	0,633
	Grau 2-4	45,6	30,4	
EGFR	Não hiperexpresso	47,9	17,9	0,077
	Hiperexpresso	23,5	11,8	
EGFRvIII	Negativo	28,4	14,2	0,263
	Positivo	50,0	20,0	
PTEN	Negativo	48,1	22,9	0,230
	Positivo	28,6	17,1	
CD44	Negativo	42,7	13,3	0,766
	Positivo	41,7	33,3	
CD44v6	Negativo	53,6	26,8	0,123
	Positivo	33,1	18,4	
p16	Negativo	32,2	10,1	0,194
	Positivo	60,0	40,0	

Na análise univariada pelo modelo de Cox para SG, ECOG < 2 e AA-CCI $\geq$ 4 foram associados a uma maior SG. Para SLP, ECOG < 2, sexo masculino e sítio primário em orofaringe ou hipofaringe foram associados a uma maior SLP. Nenhum dos marcadores moleculares se mostrou associado à SLP ou SG neste grupo (Tabelas 16 e 17).

Tabela 16 - Análise univariada de fatores prognósticos para sobrevida global no grupo RT. Foi utilizado modelo de riscos proporcionais de Cox. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$

Variáveis	Categoria	HR	IC 95,0%		p
			Inferior	Superior	
Sexo	Feminino	1	-	-	-
	Masculino	0,441	0,185	1,052	0,065
Idade	< 70 anos	1	-	-	-
	$\geq$ 70 anos	0,983	0,494	1,956	0,961
Tabagismo	Não	1	-	-	-
	Sim	2,427	0,575	10,247	0,228
Etilismo	Não	1	-	-	-
	Sim	1,04	0,497	2,176	0,917
AA-CCI	$\leq$ 4 (mediana)	1	-	-	-
	> 4 (mediana)	2,087	1,061	4,108	0,033
ECOG	< 2	1	-	-	-
	$\geq$ 2	3,035	1,425	6,464	0,004
ClCr	$\geq$ 60	1	-	-	-
	< 60	0,736	0,359	1,506	0,401
Primário	Cavidade Oral	1	-	-	-
	Orofaringe	0,388	0,151	1,001	0,050
	Laringe	0,800	0,247	2,596	0,711
	Hipofaringe	0,341	0,109	1,070	0,065
T	T1-T2	1	-	-	-
	T3-T4	0,52	0,22	1,22	0,133
N	N0	1	-	-	-
	N+	1,486	0,610	3,621	0,383
EC	I-III	1	-	-	-
	IV	1,208	0,573	2,547	0,620
Indução	Não	1	-	-	-
	Sim	0,567	0,195	1,653	0,299
Nº aplicações cetuximabe	$\geq$ 8	1	-	-	-
	< 8	1,032	0,524	2,031	0,928
Rash	Grau 0-1	1	-	-	-
	Grau 2-4	1,048	0,51	2,154	0,898

Cont./ Tabela 16

Variáveis	Categoria	HR	IC 95,0%		p
			Inferior	Superior	
EGFR	Não hiperexpresso	1	-	-	-
	Hiperexpresso	2,315	0,908	5,902	0,079
EGFRvIII	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	0,702	0,226	2,181	0,541
PTEN	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	1,655	0,67	4,09	0,275
CD44	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	1,121	0,439	2,863	0,811
CD44v6	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	4,315	0,98	19,012	0,053
p16	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	0,334	0,077	1,445	0,142

Tabela 17 - Análise univariada de fatores prognósticos para sobrevida livre de progressão no grupo RT. Utilizado modelo de riscos proporcionais de Cox. Foram considerados estatisticamente significativos comparações com valores de $p < 0,05$

Variáveis	Categoria	HR	IC 95,0%		p
			Inferior	Superior	
Sexo	Feminino	1	-	-	-
	Masculino	0,33	0,161	0,675	0,002
Idade	< 70 anos	1	-	-	-
	≥ 70 anos	0,78	0,423	1,441	0,428
Tabagismo	Não	1	-	-	-
	Sim	2,975	0,916	9,66	0,070
Etilismo	Não	1	-	-	-
	Sim	0,911	0,487	1,701	0,769
AA-CCI	≤ 4 (mediana)	1	-	-	-
	> 4 (mediana)	1,649	0,895	3,036	0,108
ECOG	< 2	1	-	-	-
	≥ 2	2,479	1,254	4,9	0,009
ClCr	≥ 60	1	-	-	-
	< 60	1,077	0,579	2,006	0,814
Primário	Cavidade Oral	1	-	-	-
	Orofaringe	0,365	0,167	0,796	0,011
	Laringe	0,702	0,238	2,070	0,522
	Hipofaringe	0,269	0,096	0,754	0,012

Cont./ Tabela 17

Variáveis	Categoria	HR	IC 95,0%		p
			Inferior	Superior	
T	T1-T2	1	-	-	-
	T3-T4	0,62	0,270	1,410	0,252
N	N0	1	-	-	-
	N+	0,970	0,484	1,945	0,932
EC	I-III	1	-	-	-
	IV	1,038	0,464	2,318	0,928
Indução	Não				
	Sim	1,069	0,441	2,592	0,883
Nº aplicações cetuximabe	≥ 8	1	-	-	-
	< 8	0,891	0,484	1,641	0,711
Rash	Grau 0-1				
	Grau 2-4	0,85	0,434	1,662	0,634
EGFR	Não hiperexpresso	1	-	-	-
	Hiperexpresso	1,455	0,636	3,33	0,374
EGFRvIII	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	0,879	0,337	2,291	0,792
PTEN	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	1,44	0,521	3,977	0,482
CD44	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	1,465	0,36	5,959	0,594
CD44v6	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	2,145	0,719	6,401	0,171
p16	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	0,456	0,135	1,537	0,205

Foram selecionadas para análise multivariada da SG no grupo RT as variáveis: sexo, tabagismo, AA-CCI, ECOG, sítio primário, EGFR, CD44v6 e p16. O modelo final manteve apenas as variáveis AA-CCI, ECOG e CD44v6. AA-CCI > 4 e ECOG ≥ 2 se mostraram associados de maneira independente a uma menor SG (Tabela 18). As características clínicas dos pacientes que permaneceram na análise multivariada estão apresentadas na Tabela 19.

Tabela 18 - Análise multivariada de fatores prognósticos para sobrevida global no grupo RT. Foram incluídas variáveis com $p < 0,25$ na análise univariada, sendo avaliados 35 pacientes no modelo com 30 eventos entre estes pacientes. Foi empregado o modelo de riscos proporcionais Cox e considerados estatisticamente significativos comparações com valores de $p < 0,05$.

Varáveis	Categoria	HR	IC 95,0%		p
			Inferior	Superior	
AA-CCI	≤ 4 (mediana)	1	.	.	.
	> 4 (mediana)	2,759	1,133	6,719	0,025
ECOG	< 2	1	.	.	.
	≥ 2	4,525	1,449	14,130	0,009
CD44v6	Negativo	1	.	.	.
	Positivo	4,062	0,892	18,495	0,070

Tabela 19 – Características clínicas dos 35 pacientes que formaram o modelo final da análise multivariada de fatores prognósticos para sobrevida global no grupo RT.

Variável	Categoria	Freq.	%
Idade	< 70	21	60,0
	≥ 70	14	40,0
Sexo	Masculino	30	85,8
	Feminino	5	14,2
Tabagismo	Sim	30	88,3
	Não	4	11,7
	Desconhecido	1	
ECOG	< 2	30	85,8
	≥ 2	5	14,2
AA-CCI	≤ 4 (mediana)	23	65,7
	> 4 (mediana)	12	34,3
Sítio Primário	Cavidade oral	7	20,0
	Orofaringe	19	54,2
	Laringe	3	8,9
	Hipofaringe	5	14,2
	Primário desconhecido	1	2,7
EC	III	10	31,2
	IVa	16	50,0
	IVb	6	18,7
	Desconhecido	3	

Foram selecionadas para análise multivariada de SLP no grupo RT as variáveis sexo, tabagismo, AA-CCI, ECOG, sítio primário, CD44v6 e p16. O modelo final manteve as variáveis sexo, tabagismo e ECOG. Sexo feminino e ECOG ≥ 2 se mostraram associados de maneira independente a uma menor SLP (Tabela 20).

Tabela 20 - Análise multivariada de fatores prognósticos para sobrevida livre de progressão no grupo RT. Foram incluídas variáveis clínicas com $p < 0,25$ na análise univariada, sendo avaliados 59 pacientes no modelo, com 41 eventos entre estes pacientes. Foi empregado o modelo de riscos proporcionais Cox e considerados estatisticamente significativos comparações com valores de $p < 0,05$.

Variáveis	Categoria	HR	IC 95,0%		p
			Inferior	Superior	
ECOG	< 2	1	.	.	.
	≥ 2	2,061	1,023	4,149	0,043
Sexo	Feminino	1	.	.	.
	Masculino	0,245	0,111	0,541	0,001
Tabagismo	Não	1	.	.	.
	Sim	3,151	0,952	10,433	0,059

4.2.3 Taxa de Resposta Objetiva e Completa

A taxa de resposta objetiva ao tratamento de RT combinada ao cetuximabe foi de 73,8% e os fatores associados a menor taxa de resposta foram sexo feminino, ECOG ≥ 2 , estágio N mais avançado, sítio primário em cavidade oral e hiperexpressão de EGFR (Tabelas 21 e 22).

Tabela 21 - Resultado dos testes de associação entre as variáveis clínicas e patológicas e resposta ao tratamento no grupo tratado com RT associada ao cetuximabe. Taxa de resposta objetiva foi considerada como a porcentagem de pacientes com resposta parcial (RP) ou resposta completa (RC). Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado. Foram considerados estatisticamente significativos associações com valores de $p < 0,05$.

Variáveis Clínica	Categoria	RC + RP n (%)	DE + PD n (%)	p
Sexo *	Feminino	5 (45,5)	6 (54,5)	0,010
	Masculino	40 (85,1)	7 (14,9)	
Idade	< 70 anos	21 (67,7)	10 (32,3)	0,054
	≥ 70 anos	24 (88,9)	3 (11,1)	
ECOG*	< 2	38 (84,5)	7 (15,6)	0,020
	≥ 2	6 (50)	6 (50,0)	
Tabagismo *	não	7 (77,8)	2 (22,2)	0,614
	sim	38 (79,2)	10 (20,8)	
Etilismo	não	19 (73,1)	7 (26,9)	0,319
	sim	26 (83,9)	5 (16,1)	
AA-CCI	≤ 4 (mediana)	28 (82,4)	6 (17,6)	0,300
	> 4 (mediana)	17 (70,8)	7 (29,2)	
T	T1-T2	5 (62,5)	3 (37,5)	0,361
	T3-T4	36 (80,0)	9 (20,0)	
N *	N0	12 (80,0)	3 (20,0)	0,578
	N+	31 (77,5)	9 (22,5)	
EC	I-III	11 (91,7)	1 (8,3)	0,421
	IV	32 (76,2)	10 (23,8)	
Sítio Primário	Cavidade Oral	4 (40)	6 (60,0)	0,013
	Orofaringe	26 (89,7)	3 (10,3)	
	Laringe	5 (83,3)	1 (16,7)	
	Hipofaringe	9 (81,8)	2 (18,2)	
Rash	não	30 (76,9)	9 (23,1)	0,870
	sim	15 (78,9)	4 (21,1)	

Tabela 22 - Resultado dos testes de associação entre as variáveis clínicas e patológicas e resposta ao tratamento no grupo tratado com RT associada ao cetuximabe. Taxa de resposta objetiva (TRO) foi considerada como a porcentagem de pacientes com resposta parcial (RP) ou resposta completa (RC). Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado. Foram considerados estatisticamente significativos associações com valores de $p < 0,05$.

Variáveis Moleculares	Categoria	RC + RP n (%)	DE + PD n (%)	p
EGFR *	Não hiperexpresso	16 (94,1)	1 (5,9)	0,017
	Hiperexpresso	9 (56,3)	7 (43,8)	
EGFRvIII *	Negativo	18 (78,3)	5 (21,7)	0,673
	Positivo	7 (70,0)	3 (30,0)	
PTEN *	Negativo	12 (80,0)	3 (20,0)	0,494
	Positivo	14 (73,7)	5 (26,3)	
CD44 *	Negativo	16 (80)	4 (20,0)	0,535
	Positivo	9 (75)	3 (25,0)	
CD44v6 *	Negativo	7 (100)	0 (0,0)	0,160
	Positivo	19 (70,4)	8 (29,6)	
p16 *	Negativo	19 (70,4)	8 (29,6)	0,296
	Positivo	5 (100,0)	0 (0,0)	

A análise multivariada para taxa de resposta objetiva foi realizada através de regressão logística considerando a resposta objetiva (RC + RP) como evento. Foram selecionadas para análise multivariada da taxa de resposta objetiva no grupo RT as variáveis: sexo, idade, ECOG, sítio primário, EGFR e CD44v6. As variáveis EGFR e CD44v6 foram retiradas da modelagem pelo pequeno número de pacientes com informação disponível.

O modelo final manteve as variáveis sexo, idade, ECOG e sítio primário. Sexo masculino e tumores primários de orofaringe apresentaram maior probabilidade de resposta (Tabela 23).

Tabela 23 - Análise multivariada de fatores prognósticos para taxa de resposta objetiva no grupo RT. Foram incluídas variáveis clínicas com $p < 0,25$ na análise univariada, sendo avaliados 55 pacientes no modelo, com 43 eventos entre estes pacientes. Foi empregado o modelo de regressão logística e considerados estatisticamente significativos comparações com valores de $p < 0,05$.

Varáveis	Categoria	OR	IC 95,0%		p
			Inferior	Superior	
Sexo	Feminino	1	.	.	.
	Masculino	10,319	1,292	82,444	0,028
ECOG	< 2	1	.	.	.
	≥ 2	0,280	0,043	1,818	0,182
Idade	< 70 anos	1	.	.	.
	≥ 70 anos	5,022	0,658	38,360	0,120
Sítio Primário	Cavidade Oral	1	.	.	.
	Orofaringe	15,386	1,597	148,236	0,018
	Laringe	3,888	0,194	77,727	0,374
	Hipofaringe	3,477	0,315	38,337	0,309

A taxa de resposta completa (RC) foi de 47,5%. O único fator associado à taxa de resposta completa foi a positividade para p16 (Tabela 24 e 25).

A análise multivariada para taxa de resposta completa foi realizada através de regressão logística considerando a resposta completa (RC) como evento. Foram selecionadas para entrar na modelagem da análise univariada: sexo, ECOG, etilismo, estágio clínico, sítio primário e p16. No modelo final, permaneceram apenas o sítio primário e o estadiamento clínico. Nesta análise multivariada, nenhum fator esteve independentemente associado à taxa de resposta completa (Tabela 26).

Tabela 24 - Resultado dos testes de associação entre as variáveis clínicas e patológicas e resposta completa ao tratamento no grupo tratado com RT associada ao cetuximabe. Taxa de resposta completa (RC) foi considerada como a porcentagem de pacientes com ausência clínica ou radiológica de doença. Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado. Foram considerados estatisticamente significativos associações com valores de $p < 0,05$.

Variáveis clínicas	Categoria	RC n (%)	RP + DE + PD n (%)	p
Sexo	Feminino	(27,3)	8 (72,7)	0,094
	Masculino	(55,3)	21 (44,7)	
Idade *	< 70 anos	13 (41,9)	18 (58,1)	0,292
	≥ 70 anos	16 (59,3)	11 (40,7)	
ECOG	< 2	24 (53,3)	21 (46,7)	0,218
	≥ 2	4 (33,3)	8 (66,7)	
Tabagismo *	não	6 (66,7)	3 (33,3)	0,470
	sim	23 (47,9)	25 (52,1)	
Etilismo	não	10 (38,5)	16 (61,5)	0,086
	sim	19 (61,3)	12 (38,7)	
AA-CCI	≤ 4 (mediana)	18 (52,9)	16 (47,1)	0,594
	> 4 (mediana)	11 (45,8)	13 (54,2)	
T	T1-T2	1 (12,5)	7 (87,5)	0,050
	T3-T4	25 (55,6)	20 (44,4)	
N	N0	8 (53,3)	7 (46,7)	0,826
	N+	20 (50,0)	20 (50,0)	
EC	I-III	8 (66,7)	4 (33,3)	0,244
	IV	20 (47,6)	22 (52,4)	
Sítio Primário	Cavidade Oral	2 (20,0)	8 (80,0)	0,115
	Orofaringe	16 (55,2)	13 (44,8)	
	Laringe	2 (33,3)	4 (66,7)	
	Hipofaringe	8 (72,7)	3 (27,3)	
Rash	não	21 (53,9)	18 (46,2)	0,400
	sim	8 (42,1)	11 (57,9)	

Tabela 25 - Resultado dos testes de associação entre as variáveis clínicas e patológicas e resposta completa ao tratamento no grupo tratado com RT associada ao cetuximabe. Taxa de resposta completa (RC) foi considerada como a porcentagem de pacientes com ausência clínica ou radiológica de doença. Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado. Foram considerados estatisticamente significativos associações com valores de $p < 0,05$.

Variáveis Moleculares	Categoria	RC n (%)	RP + DE + PD n (%)	p
EGFR	Não hiperexpresso	9 (52,9)	8 (47,1)	0,373
	Hiperexpresso	6 (37,5)	10 (62,5)	
EGFRvIII *	Negativo	9 (39,1)	14 (60,9)	0,707
	Positivo	5 (50,0)	5 (50,0)	
PTEN	Negativo	8 (53,3)	7 (46,7)	0,336
	Positivo	7 (36,8)	12 (63,2)	
CD44	Negativo	9 (45,0)	11 (55,0)	0,784
	Positivo	6 (50,0)	6 (50,0)	
CD44v6	Negativo	4 (57,1)	3 (42,9)	0,436
	Positivo	11 (40,7)	16 (59,3)	
p16 *	Negativo	9 (33,3)	18 (66,7)	0,010
	Positivo	5 (100,0)	0 (0,0)	

Tabela 26 - Análise multivariada de fatores prognósticos para taxa de resposta completa no grupo RT. Foram incluídas variáveis clínicas com $p < 0,25$ na análise univariada, sendo avaliados 54 pacientes no modelo, com 28 eventos entre estes pacientes. Foi empregado o modelo de regressão logística e considerados estatisticamente significativos comparações com valores de $p < 0,05$.

Varáveis	Categoria	OR	IC 95,0%		p
			Inferior	Superior	
EC	I-III	1	.	.	.
	IV	0,499	0,116	2,138	0,349
Sítio Primário	Cavidade Oral	1	.	.	.
	Orofaringe	4,543	0,789	26,166	0,900
	Laringe	1,913	0,167	21,967	0,602
	Hipofaringe	6,930	0,843	56,975	0,072

4.3 GRUPO QUIMIOTERAPIA + CETUXIMABE

4.3.1 Características Clínico-Demográficas e Patológicas

O grupo de pacientes tratados com quimioterapia associado ao cetuximabe era composto por 44 pacientes, com mediana de idade de 58 anos, a maioria homens e com histórico de tabagismo. Em 16,3% dos casos o ECOG foi 2 ou mais, e a mediana de AA-CCI foi de 2. O sítio primário mais comum foi cavidade oral, correspondendo a 47,7% dos pacientes. O cetuximabe foi utilizado em combinação com a primeira linha de quimioterapia em 81,8% dos casos e, aproximadamente, metade dos pacientes utilizou como quimioterapia carboplatina e a outra metade cisplatina (Tabela 27).

Tabela 27 - Características clínicas e patológicas dos 44 pacientes do grupo tratado com QT associada ao cetuximabe.

Variável	Categoria	Freq.	%
Idade	< 65a	31	70,4
	≥65a	13	29,6
Sexo	Masculino	34	77,3
	Feminino	10	22,7
Tabagismo	Não	7	18
	Sim	32	82
	Desconhecido	5	
Etilismo	Não	20	52,6
	Sim	18	47,4
	Desconhecido	6	
ECOG	< 2	36	83,7
	≥ 2	7	16,3
AA-CCI	≤ 2 (mediana)	28	63,6
	> 2 (mediana)	16	36,4
Primário	Cavidade oral	21	47,7
	Orofaringe	8	18,2
	Laringe	4	9,1
	Hipofaringe	9	20,5
	Primário desconhecido	2	4,6

Cont./ Tabela 27

Variável	Categoria	Freq.	%
T	T1	6	24,0
	T2	3	12,0
	T3	6	24,0
	T4	10	40,0
N	N0	7	26,9
	N1	4	15,4
	N2	12	46,1
	N3	3	11,5
Sítio irressecável	Locorregional	16	36,4
	Distância	28	63,6
Linha de tto com cetux	1 ^a	36	81,8
	≥ 2 ^a	8	18,2
QT com cetuximabe	Cisplatina+ 5FU	22	51,2
	Carboplatina + 5FU	18	41,9
	Outras	3	7
EGFR	Não hiperexpresso	12	46,2
	Hiperexpresso	14	53,8
	Inconclusivo	18	
EGFRvIII	Negativo	21	75,0
	Positivo	7	25,0
	Inconclusivo	16	
PTEN	Negativo	7	25,0
	Positivo	21	75,0
	Inconclusivo	16	
CD44	Negativo	15	57,7
	Positivo	11	42,3
	Inconclusivo	18	
CD44 v6	Negativo	8	29,6
	Positivo	19	70,4
	Inconclusivo	18	
p16	Negativo	25	92,6
	Positivo	2	7,4
	Inconclusivo	27	

4.3.2 Sobrevida Global e Livre de Progressão

Com um seguimento mediano de 17,4 meses, 36 pacientes apresentaram progressão de doença, 36 pacientes morreram e 8 foram considerados como perda de seguimento. A sobrevida global mediana foi de 12,8 meses (IC95%, 10,5-15,1

meses) e a sobrevida livre de progressão mediana de 7,4 meses (IC95%, 5,8- 8,9 meses) (Figuras 14 e 15).

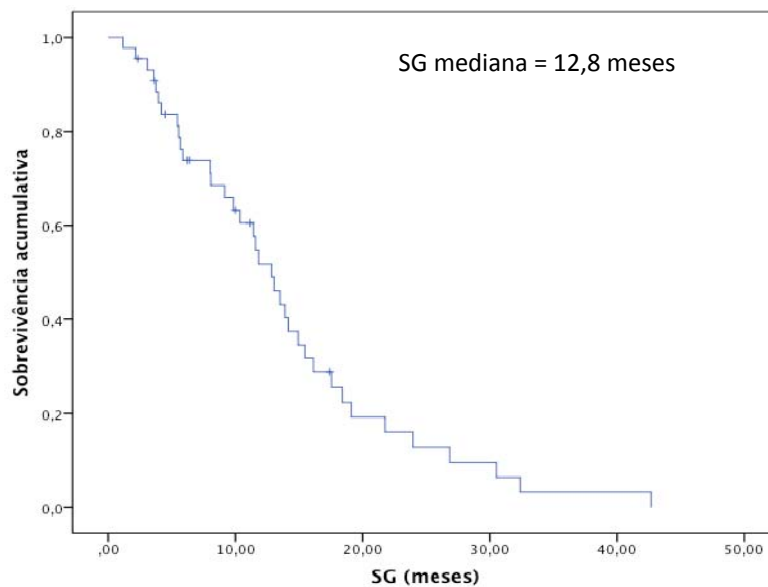


Figura 14 - Curva de sobrevida global (SG) do grupo QT. A curva foi calculada pelo método de Kaplan-Meier.

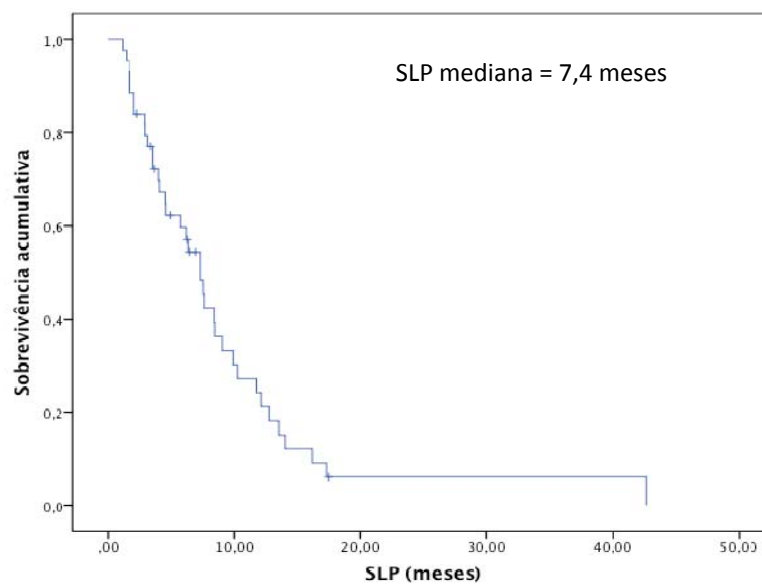


Figura 15 - Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) do grupo QT. A curva foi calculada pelo método de Kaplan-Meier.

A avaliação dos fatores prognósticos com influência sobre as curvas de sobrevida mostrou uma pior SG para pacientes com ausência de expressão de PTEN (SG 5,6 meses vs 13,5 meses; $p=0,008$) e uma pior SLP para pacientes com ECOG ≥ 2 (SLP 7,6 meses vs 3,6 meses; $p=0,036$) (Figura 16 e Tabela 28 e 29).

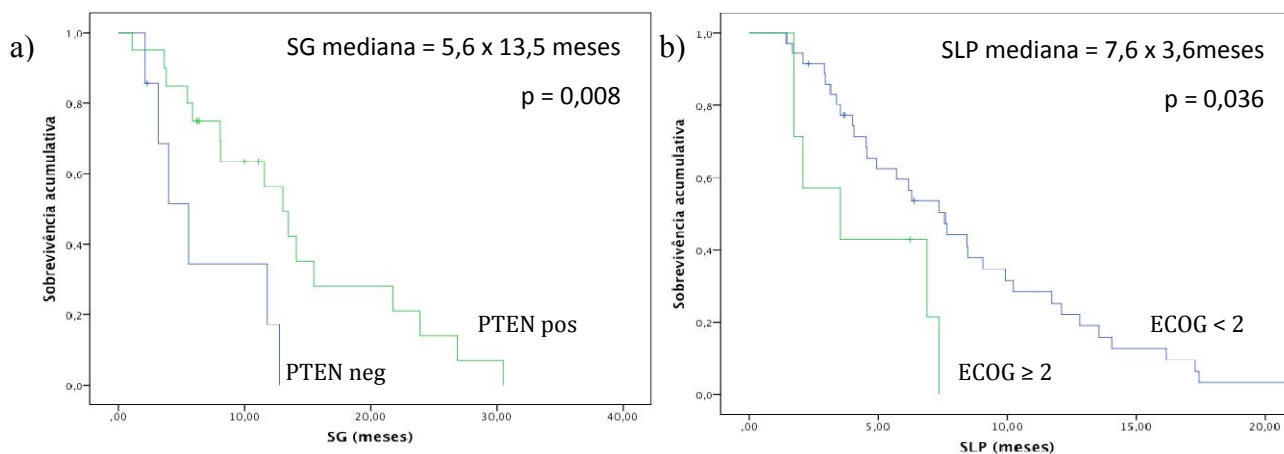


Figura 16 - a) Curva de sobrevida global (SG) do grupo QT de acordo com a expressão de PTEN. b) Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) do grupo QT de acordo com o ECOG. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e as comparações entre os grupos foram realizadas empregando-se o teste de log-rank. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles com $p < 0,05$.

Os demais marcadores moleculares analisados não apresentaram impacto na curva de SG (Figura 17 e Tabela 28) ou SLP (Figura 18 e Tabela 29). Devido a positividade de p16 em apenas 2 casos, não foi possível avaliar o seu valor prognóstico neste grupo de pacientes.

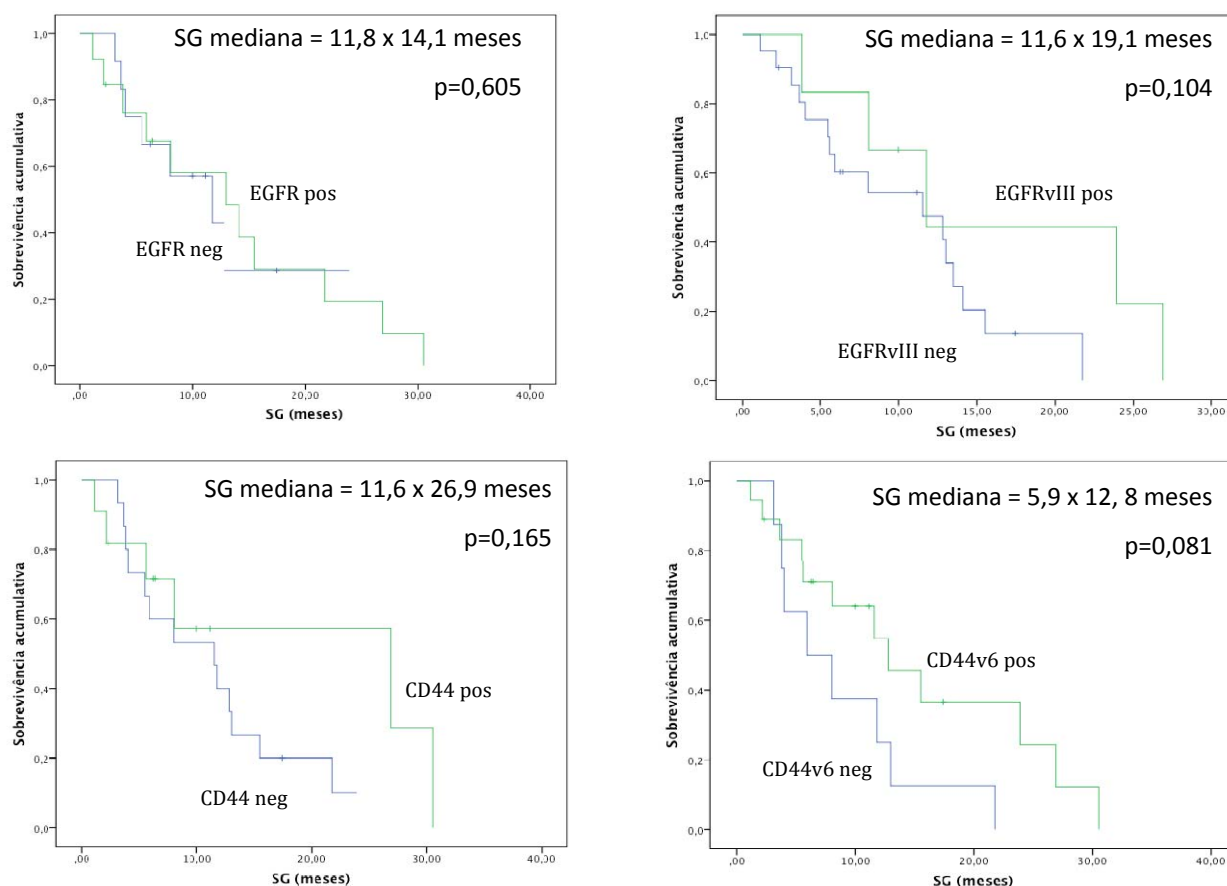


Figura 17 - Curvas de sobrevida global (SG) do grupo QT de acordo com a expressão de cada marcador molecular. (a) EGFR, (b) EGFRvIII, (c) CD44, (d) CD44v6.. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e as comparações entre os grupos foram realizadas empregando-se o teste de log-rank. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles com $p<0,05$.

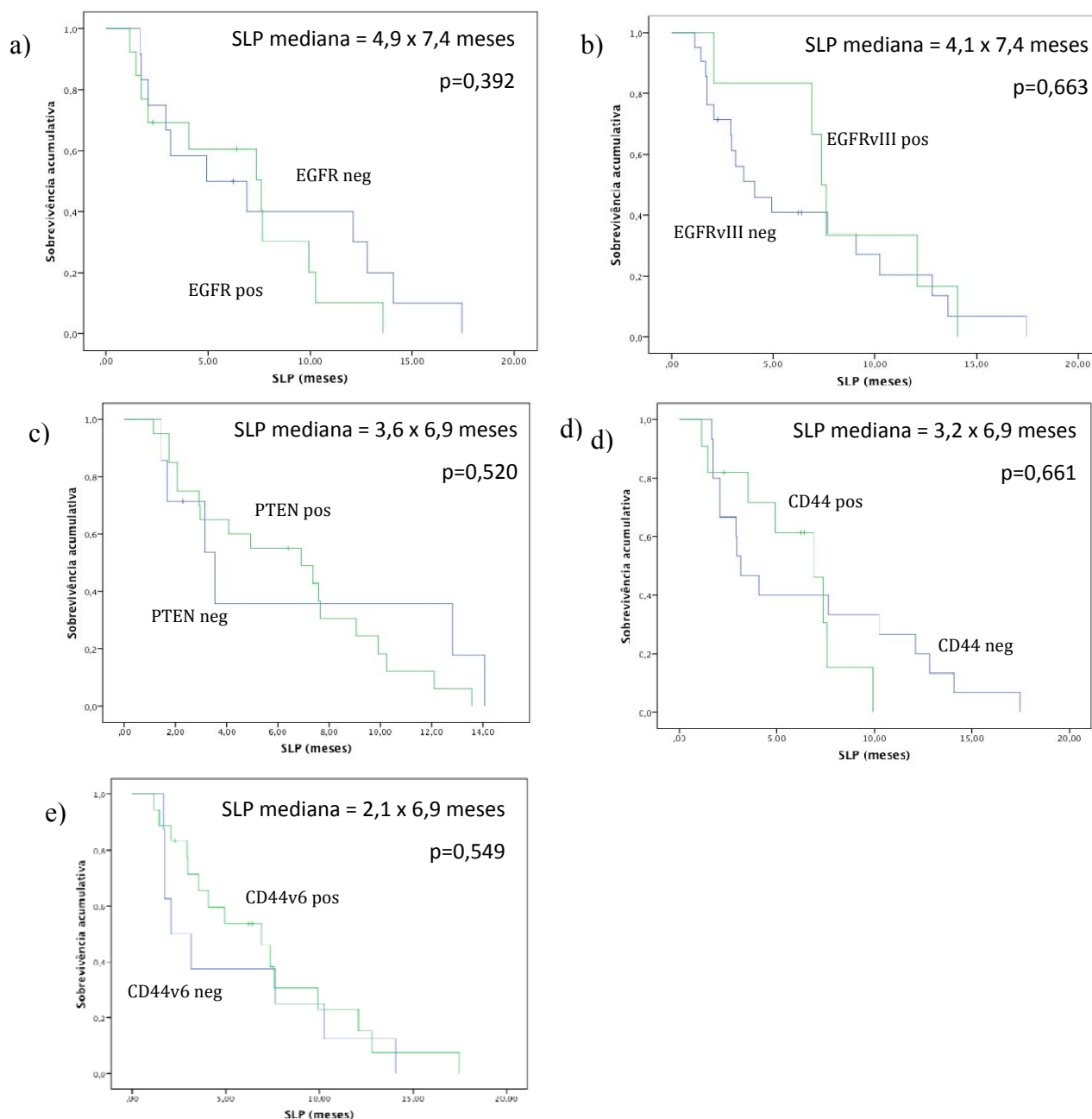


Figura 18 - Curvas de sobrevida livre de progressão (SLP) do grupo QT de acordo com a expressão de cada marcador molecular. (a) EGFR, (b) EGFRvIII, (c) PTEN, (d) CD44, (e) CD44v6. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e as comparações entre os grupos foram realizadas empregando-se o teste de log-rank. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles com $p < 0,05$.

Tabela 28 - Sobrevida Global em 1 ano e 2 anos no grupo QT de acordo com cada variável. O valor de p representado é referente ao teste de Kaplan-Meier.

Variáveis	Categoria	SG 1 ano (%)	SG 2 anos (%)	p
Todos		51,9	9,6	
Sexo	Feminino	54,7	12,5	0,440
	Masculino	39,4	13,1	
Idade	< 65	45,1	19,1	0,679
	≥ 65	67,3	0	
Tabagismo	Não	22,2	0	0,684
	Sim	59,5	9,1	
Etilismo	Não	56,3	16,1	0,833
	Sim	53,3	7,4	
AA-CCI	≤ 2 (mediana)	46,5	15,5	0,477
	> 2 (mediana)	54,9	13,7	
ECOG	< 2	56,8	14,8	0,068
	≥ 2	35,7	0	
Primário	Cavidade Oral	55,8	12,4	0,835
	Orofaringe	60,0	15,0	
	Laringe	50,0	0	
	Hipofaringe	44,4	16,7	
T	T1-T2	53,3	26,7	0,992
	T3-T4	49,9	8,3	
N	N0	42,9	14,3	0,124
	N+	56,5	14,1	
EC	I-III	60,0	30,0	0,654
	IV	54,2	14,8	
Rash	Grau 0-1	64,2	21,4	0,476
	Grau 2-4	47,7	6,0	
Cetuximabe com RT prévio	Não	49,0	14,9	0,872
	Sim	75,0	0	
Recidiva	Locorregional	49,6	16,5	0,894
	Sistêmica	53,0	17,7	
Linha de QT com cetuximabe	1 ^a	56,4	11,9	0,548
	≥ 2 ^a	30,0	15,0	
QT com cetuximabe	Cisplatina	56,5	15,4	0,196
	Carboplatina	41,6	0	
EGFR	Não hiperexpresso	42,9	0	0,605
	Hiperexpresso	61,4	17,5	
EGFRvIII	Negativo	50,3	0	0,104
	Positivo	44,4	0	
PTEN	Negativo	17,1	0	0,008
	Positivo	58,8	6,5	
CD44	Negativo	40,0	0	0,165
	Positivo	57,3	0	
CD44v6	Negativo	25,0	0	0,081
	Positivo	48,6	20,7	

Tabela 29 - Sobrevida livre de progressão em 6 meses e 1 ano no grupo QT de acordo com cada variável. O valor de p representado é referente ao teste de Kaplan-Meier

Variáveis	Categoria	SLP 6 meses (%)	SLP 1 ano (%)	p
Todos		59,7	24,2	
Sexo	Feminino	51,0	17,1	0,290
	Masculino	70,0	36,0	
Idade	< 65	53,0	18,9	0,920
	≥ 65	61,5	27,7	
Tabagismo	Não	68,6	0	0,509
	Sim	49,1	26,0	
Etilismo	Não	62,7	35,6	0,633
	Sim	44,4	11,1	
AA-CCI	≤ 2 (mediana)	53,6	20,1	0,991
	> 2 (mediana)	56,8	17,7	
ECOG	< 2	59,5	25,2	0,036
	≥ 2	42,9	0	
Primário	Cavidade Oral	59,9	30,3	0,431
	Orofaringe	25,0	0	
	Laringe	66,7	20,2	
	Hipofaringe	100	0	
T	T1-T2	66,7	13,3	0,925
	T3-T4	53,6	26,8	
N	N0	42,9	14,3	0,605
	N+	61,3	18,6	
EC	I-III	60,0	30,0	0,634
	IV	56,6	21,8	
Rash	Grau 0-1	64,7	22,0	0,329
	Grau 2-4	55,6	10,9	
Cetuximabe com RT prévio	Não	58,8	23,7	0,070
	Sim	25,0	0	
Recidiva	Locorregional	56,3	28,1	0,441
	Sistêmica	55,9	12,3	
Linha de QT com cetuximabe	1 ^a	56,7	25,3	
	≥ 2 ^a	50,0	0	
QT com cetuximabe	Cisplatina	62,4	19,2	0,609
	Carboplatina	44,4	23,3	
EGFR	Não hiperexpresso	50,0	30,0	0,392
	Hiperexpresso	55,6	9,3	
EGFRvIII	Negativo	38,8	12,9	0,663
	Positivo	83,3	33,3	
PTEN	Negativo	35,7	17,9	0,520
	Positivo	52,4	11,6	
CD44	Negativo	40,0	26,7	0,661
	Positivo	61,4	0	
CD44v6	Negativo	37,5	12,5	0,549
	Positivo	50,5	21,7	

Na análise univariada pelo modelo de Cox, o único fator relacionado à SG foi a ausência de expressão de PTEN, enquanto o único relacionado à SLP foi o ECOG (Tabelas 30 e 31).

Tabela 30 - Análise univariada de fatores prognósticos para sobrevida global no grupo QT. Utilizado modelo de riscos proporcionais de Cox. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$

Variáveis	Categoria	HR	IC 95,0%		p
			Inferior	Superior	
Sexo	Feminino	1	-	-	-
	Masculino	1,388	0,601	3,202	0,442
Idade	< 65	1	-	-	-
	≥ 65	1,169	0,557	2,452	0,679
Tabagismo	Não	1	-	-	-
	Sim	0,816	0,307	2,170	0,684
Etilismo	Não	1	-	-	-
	Sim	1,082	0,519	2,257	0,833
AA-CCI	≤ 2 (mediana)	1	-	-	-
	> 2 (mediana)	0,946	0,422	2,121	0,893
ECOG	< 2	1	-	-	-
	≥ 2	2,545	0,900	7,193	0,078
Primário	Cavidade Oral	1	-	-	-
	Orofaringe	1,211	0,494	2,967	0,676
	Laringe	1,988	0,558	7,081	0,289
	Hipofaringe	0,995	0,423	2,336	0,990
T	T1-T2	1	-	-	-
	T3-T4	1,005	0,394	2,564	0,992
N	N0	1	-	-	-
	N+	0,456	0,164	1,272	0,134
EC	I-III	1	-	-	-
	IV	0,753	0,217	2,615	0,656
Rash	Grau 0-1	1	-	-	-
	Grau 2-4	0,745	0,331	1,679	0,478
Cetuximabe com RT prévio	Não	1	-	-	-
	Sim	0,916	0,316	2,655	0,872
Recidiva	Locorregional	1	-	-	-
	Sistêmica	0,952	0,462	1,964	0,894
Linha de QT com cetuximabe	1 ^a	1	-	-	-
	≥ 2 ^a	1,297	0,554	3,034	0,549
QT com cetuximabe	Cisplatina	1	-	-	-
	Carboplatina	1,777	0,848	3,725	0,128

Cont./ Tabela 30

Variáveis	Categoria	HR	IC 95,0%		p
			Inferior	Superior	
EGFR	Não hiperexpresso	1	-	-	-
	Hiperexpresso	0,818	0,309	2,166	0,686
EGFRvIII	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	0,422	0,120	1,489	0,180
PTEN	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	0,279	0,095	0,813	0,019
CD44	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	0,456	0,147	1,416	0,174
CD44v6	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	0,447	0,171	1,165	0,100

Tabela 31 - Análise univariada de fatores prognósticos para sobrevida livre de progressão no grupo QT. Utilizado modelo de riscos proporcionais de Cox. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

Variáveis	Categoria	HR	IC 95,0%		p
			Inferior	Superior	
Sexo	Feminino				
	Masculino	1,521	0,694	3,336	0,295
Idade	< 65				
	≥ 65	1,036	0,521	2,060	0,920
Tabagismo	Não				
	Sim	0,717	0,265	1,940	0,513
Etilismo	Não				
	Sim	1,185	0,589	2,385	0,634
AA-CCI	≤ 2 (mediana)				
	> 2 (mediana)	1,307	0,589	2,899	0,510
ECOG	< 2				
	≥ 2	2,610	1,022	6,668	0,045
Primário	Cavidade Oral	1	-	-	-
	Orofaringe	1,776	0,750	4,203	0,191
	Laringe	2,381	0,768	7,377	0,133
	Hipofaringe	1,059	0,469	2,388	0,891
T	T1-T2	1	-	-	-
	T3-T4	1,043	0,433	2,510	0,925
N	N0	1	-	-	-
	N+	0,790	0,321	1,940	0,606

Cont/ Tabela 31

Variáveis	Categoria	HR	IC 95,0%		p
			Inferior	Superior	
EC	I-III	1	-	-	-
	IV	1,301	0,439	3,848	0,635
Rash	Grau 0-1	1	-	-	-
	Grau 2-4	1,459	0,678	3,137	0,334
Cetuximabe com RT prévio	Não	1	-	-	-
	Sim	2,631	0,882	7,847	0,083
Recidiva	Locorregional	1	-	-	-
	Sistêmica	1,308	0,658	2,603	0,444
Linha de QT com cetuximabe	Primeira	1	-	-	-
	≥ segunda	1,839	0,772	4,379	0,169
QT com cetuximabe	Cisplatina	1	-	-	-
	Carboplatina	1,302	0,665	2,548	0,442
EGFR	Não hiperexpresso	1	-	-	-
	Hiperexpresso	1,444	0,586	3,556	0,425
EGFRvIII	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	0,783	0,306	2,008	0,611
PTEN	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	1,397	0,499	3,915	0,525
CD44	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	1,237	0,475	3,217	0,663
CD44v6	Negativo	1	-	-	-
	Positivo	0,753	0,312	1,817	0,527

Para análise multivariada para SG pela regressão de Cox, foram selecionadas as variáveis: ECOG, tipo de quimioterapia associada ao cetuximabe, EGFRvIII, PTEN, CD44 e CD44v6 e categoria N do estadiamento clínico. O modelo final manteve apenas as variáveis ECOG, PTEN e EGFRvIII. Apenas expressão de PTEN se mostrou associada de maneira independente a uma maior SG (Tabelas 32 e 33).

Tabela 32 - Análise multivariada de fatores prognósticos para sobrevida global no grupo QT. Foram incluídas variáveis clínicas com $p < 0,25$ na análise univariada, sendo avaliados 26 pacientes no modelo com 21 eventos entre estes pacientes. Foi empregado o modelo de riscos proporcionais Cox e considerados estatisticamente significativos comparações com valores de $p < 0,05$.

Varáveis	Categoria	HR	IC 95,0%		p
			Inferior	Superior	
ECOG	< 2	1	.	.	.
	≥ 2	2,229	0,702	7,078	0,174
EGFRvIII	Negativo	1	.	.	.
	Positivo	0,382	0,120	1,213	0,382
PTEN	Negativo	1	.	.	.
	Positivo	0,212	0,069	0,655	0,007

Tabela 33 – Características clínicas dos 26 pacientes que formaram o modelo final da análise multivariada de fatores prognósticos para sobrevida global no grupo QT.

Variável	Categoria	Freq.	%
Idade	< 65	17	65,4
	≥ 65	9	34,6
Sexo	Masculino	19	73,1
	Feminino	7	26,9
Tabagismo	Sim	18	75,0
	Não	6	25,0
	Desconhecido	1	
ECOG	< 2	19	73,1
	≥ 2	7	26,9
AA-CCI	≤ 2 (mediana)	18	69,2
	> 2 (mediana)	8	30,8
Sítio Primário	Cavidade oral	12	46,2
	Orofaringe	5	19,2
	Laringe	3	11,5
	Hipofaringe	4	15,4
	Primário desconhecido	2	7,7
Sítio irresssecável	Locorregional	8	30,8
	Distância	18	69,2
Linha de tto com cetux	1 ^a	21	80,8
	$\geq 2^a$	5	19,2
QT com cetuximabe	Cisplatina+ 5FU	13	50,0
	Carboplatina + 5FU	12	46,2
	Outras	1	3,8

Foram selecionadas para análise multivariada de SLP no grupo QT as variáveis ECOG, sítio primário, tratamento prévio com RT associada ao cetuximabe e linha de tratamento em que o cetuximabe foi utilizado. O modelo final manteve as variáveis ECOG e tratamento prévio com RT associada ao cetuximabe. ECOG ≥ 2 e o tratamento prévio com RT e cetuximabe se mostraram associados de maneira independente a uma menor SLP (Tabela 34).

Tabela 34 - Análise multivariada de fatores prognósticos para sobrevida livre de progressão no grupo QT. Foram incluídas variáveis clínicas com $p < 0,25$ na análise univariada, sendo avaliados 43 pacientes no modelo com 39 eventos entre estes pacientes. Foi empregado o modelo de riscos proporcionais Cox e considerados estatisticamente significativos comparações com valores de $p < 0,05$.

Varáveis	Categoria	HR	IC 95,0%		p
			Inferior	Superior	
ECOG	< 2	1	.	.	.
	≥ 2	3,191	1,201	8,482	0,020
Cetuximabe com RT prévio	Não	1	.	.	.
	Sim	3,667	1,163	11,560	0,027

4.3.3 Taxa de Resposta Objetiva

A taxa de resposta objetiva ao tratamento de QT combinada ao cetuximabe foi de 53,7% e o único fator associado a menor taxa de resposta foi o uso de carboplatina ao invés de cisplatina com uma TR de 30,0 x 76,2% ($p=0,01$) (Tabela 35 e 36).

Tabela 35 - Resultado dos testes de associação entre as variáveis clínicas e patológicas e resposta ao tratamento no grupo tratado com QT associada ao cetuximabe. Taxa de resposta objetiva (TRO) foi considerada como a porcentagem de pacientes com resposta parcial ou resposta completa. Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado. Foram considerados estatisticamente significativos associações com valores de $p < 0,05$.

Variáveis Clínica	Categoria	RC + RP n (%)	DE + PD n (%)	p
Sexo*	Feminino	6 (60,0)	4 (40,0)	0,727
	Masculino	16 (51,6)	15 (48,4)	
Idade	< 65 anos	15 (53,6)	13 (46,4)	0,987
	≥ 65 anos	7 (53,8)	6 (46,2)	
ECOG *	<2	19 (57,6)	14 (42,4)	0,226
	> ou igual 2	2 (28,6)	5 (71,4)	
Tabagismo *	não	4 (66,7)	2 (33,3)	0,658
	sim	14 (46,7)	16 (53,3)	
Etilismo	não	10 (55,6)	8 (44,4)	0,615
	sim	8 (47,1)	9 (52,9)	
Sítio Primário	Cavidade Oral	12 (60,0)	8 (40,0)	0,672
	Orofaringe	2 (28,6)	5 (71,4)	
	Laringe	2 (50,0)	2 (50,0)	
	Hipofaringe	5 (62,5)	3 (37,5)	
Rash *	Graus 0-1	12 (54,5)	10 (45,5)	0,456
	Grau 2-4	8 (72,7)	3 (27,3)	
Sítio Recidiva	Locorregional	7 (50,0)	7 (50,0)	0,735
	Distância	15 (55,6)	12 (44,4)	
Linha de QT com cetuximabe *	1ª	19 (57,6)	14 (42,4)	0,436
	Outras	3 (37,5)	5 (62,5)	
Cetuximabe com RT prévio *	Não	21 (56,8)	16 (43,2)	0,321
	Sim	1 (25,0)	3 (75,0)	
QTs com cetux	CDDP	16 (76,2)	5 (23,8)	0,003
	Carbo	6 (30,0)	14 (70,0)	

Tabela 36 - Resultado dos testes de associação entre s marcadores moleculares e resposta ao tratamento no grupo tratado com QT associada ao cetuximabe. Taxa de resposta objetiva (TRO) foi considerada como a porcentagem de pacientes com resposta parcial (RP) ou resposta completa (RC). Empregou-se teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*) quando apropriado. Foram considerados estatisticamente significativos associações com valores de $p < 0,05$.

Variáveis moleculares	Categoria	RC + RP n (%)	DE + PD n (%)	p
EGFR	Não hiperexpresso	5 (45,5)	6 (54,5)	0,682
	Hiperexpresso	7 (53,3)	6 (46,2)	
EGFRvIII *	Negativo	7 (35,0)	13 (65,0)	0,348
	Positivo	4 (66,7)	2 (33,3)	
PTEN	Negativo	3 (42,9)	4 (57,1)	0,636
	Positivo	9 (45,0)	11 (55,0)	
CD44	Negativo	6 (42,8)	8 (51,7)	0,408
	Positivo	6 (60,0)	4 (40,0)	
CD44v6 *	Negativo	4 (50,0)	4 (50,0)	0,613
	Positivo	8 (47,1)	9 (52,9)	

5 DISCUSSÃO

5.1 GRUPO RT + CETUXIMABE

No grupo da RT, a SG e a SLP foram de 23,2 meses e 7,9 meses, respectivamente, ambas inferiores em relação aos 49,0 meses e 17,1 meses relatados no estudo clínico de fase III (BONNER et al. 2006). A diferença entre resultados observados no estudo atual e no estudo de fase III pode ser explicada pela diferença entre as populações (Tabela 37). A nossa coorte tem 23% dos pacientes com $ECOG \geq 2$, 47,5% com $ClCr < 60$ mg/mL/min e uma mediana de AA-CCI elevada, fatores que teriam excluído estes pacientes do estudo de fase III. A mediana de idade também é maior com 67 anos vs 58 anos, e incluímos na nossa coorte 20% de pacientes com tumores de cavidade oral, que não foram incluídos no estudo de fase III. Reforçam a hipótese de que essas diferenças podem explicar as diferenças nos desfechos avaliados três achados do nosso estudo: $ECOG \geq 2$ e $AA-CCI > 4$ foram os únicos fatores associados a uma pior SG, $ECOG \geq 2$ foi associado também a uma pior SLP, e sítio primário em cavidade oral associado a menor SLP e menor TRO. No estudo atual, não obtivemos dados sobre o status de ressecabilidade dos tumores, um outro fator que poderia caracterizar este grupo como de pior prognóstico caso a maioria dos casos fosse irressecável. No entanto a irressecabilidade não foi um critério de exclusão do estudo de BONNER et al. (2006).

Tabela 37 - Comparação entre características da população deste estudo e do estudo de BONNER et al. (2006).

Características	HACC	Bonner et al.
Idade Mediana	67 anos	58 anos
ECOG ≥ 2	23,0%	0
ClCr < 60 mg/mL/min	47,5%	0
AA-CCI mediana	4	?
Cavidade Oral	20%	0

Apesar dessas diferenças em relação ao estudo de fase III, o nosso estudo representa o cenário clínico típico no qual se indica o uso de cetuximabe em pacientes com CECCP localmente avançado na prática clínica diária, que é exatamente para os pacientes que possuem contraindicação ao tratamento padrão com cisplatina concomitante à RT.

A SG e SLP curtas observadas no nosso estudo levantam a dúvida sobre o real benefício da adição do cetuximabe à RT ao invés de tratamento apenas com RT neste grupo de pacientes com tais fatores de mau prognóstico.

A favor do uso de cetuximabe poderia se alegar que a excelente janela terapêutica (probabilidade de benefício em relação à probabilidade de efeitos adversos) justificaria o seu uso, já que no estudo fase III não houve mais toxicidade no grupo de tratamento com cetuximabe exceto por mais *rash* e reações infusionais (BONNER et al. 2006). Porém, depois da publicação do estudo fase III, alguns trabalhos sugeriram uma maior toxicidade do que a esperada em pacientes tratados com cetuximabe associado à RT (LORD et al. 2008; WALSH et al. 2011). WALSH et al. (2011) mostraram, num trabalho retrospectivo com 70 pacientes de um único centro na Irlanda, uma taxa maior de radiodermite e mucosite no grupo tratado com

cetuximabe associado à RT em relação ao grupo tratado com cisplatina associado à RT. A população deste estudo também era mais idosa e com mais comorbidades que a do estudo de BONNER et al. (2006) e WALSH et al. (2011).

No presente estudo, temos poucos dados referentes à toxicidade do tratamento, porém o cetuximabe precisou ser suspenso de forma definitiva em 16 dos 61 pacientes (26,2%), 3 deles por reação infusional grave, e os demais por outros efeitos adversos. No estudo fase III, apenas 6,1% dos pacientes necessitaram suspender o cetuximabe de forma definitiva. Esses dados sugerem uma maior toxicidade da associação do cetuximabe à RT numa população não selecionada, diferente da população dos estudos de fase III.

5.2 GRUPO QT + CETUXIMABE

No grupo tratado com cetuximabe e quimioterapia, com doença metastática ou com recidiva inoperável e impossibilidade de reirradiação, a SG e a SLP foram 12,8 meses e 7,4 meses, respectivamente, semelhantes aos 10,1 meses e 5,6 meses mostrados pelo estudo fase III EXTREME. Houve pequenas diferenças entre as duas populações, com algumas características de mau prognóstico mais comuns entre os pacientes do estudo atual, como idade ≥ 65 anos em 29% vs 18% no fase III, um predomínio de sítio primário de cavidade oral no estudo atual que corresponderam a 47% dos casos contra apenas 21%, o sítio de doença irresssecável foi metástase a distância em 63% vs 47% e cisplatina foi utilizada em 50% vs 61%. Apesar dessas diferenças os resultados encontrados foram semelhantes aos encontrados no fase III. Isto pode ter ocorrido por diferenças em outros fatores prognóstico como grau

histológico (grau 3 em 21% no fase III) e uso de radioterapia prévia (85% no fase III) para os quais não temos os dados da população do presente estudo.

Nenhuma variável clínica foi associada à SG, e pacientes tratados previamente com radioterapia e cetuximabe e aqueles com ECOG maior ou igual a 2 apresentaram uma menor SLP. Pacientes tratados com cisplatina em combinação ao cetuximabe apresentaram uma maior taxa de resposta em relação aos tratados com carboplatina. Estes achados estão de acordo com os dados da literatura que apontam uma pior prognóstico para os pacientes tratados com radioterapia previamente e maior taxa de resposta com cisplatina que com carboplatina (FORASTIERE et al. 1992).

5.3 MARCADORES MOLECULARES

Na coorte toda, o EGFRvIII foi expresso em 27% dos pacientes. A expressão do EGFRvIII foi associada à hiperexpressão de EGFR que estava presente em 70,6% dos tumores com expressão de EGFRvIII. Não houve diferença de expressão de acordo com sítio primário, tamanho do tumor primário, acometimento linfonodal ou estágio da doença. A expressão de EGFRvIII não esteve associada a nenhum dos desfechos clínicos avaliados (TRO, SLP ou SG), seja no grupo do cetuximabe associado à RT ou no grupo associado à QT.

Não há consenso na literatura sobre a real prevalência da expressão do EGFRvIII, bem como se ela está associada a algum sítio primário específico ou mesmo em relação ao seu valor prognóstico e preditivo (Tabela 38). A maioria dos estudos, utilizando diferentes métodos, mostrou uma expressão de EGFRvIII entre

15 a 48% dos tumores de CP (SOK et al. 2006; YANG et al. 2009; PECTASIDES et al. 2010; CHAU et al. 2011; TINHOFFER et al. 2011; SMILEK et al. 2012; WHEELER et al. 2012).

O primeiro relato avaliando a expressão de EGFRvIII em CECCP foi feito por SOK et al. em 2006. Neste estudo, 13 pacientes com CEC de cavidade oral, 6 de orofaringe, 7 de laringe e 6 de hipofaringe foram avaliados por IHQ utilizando o mesmo anticorpo L8A4 que nós utilizamos. O EGFRvIII foi expresso em 42% dos casos, e sua expressão foi confirmada por RT-PCR e sequenciamento direto (SOK et al. 2006).

Tabela 38 - Comparação entre os estudos que avaliaram a expressão da variante 3 do EGFR em CECCP.

Estudo	Metodologia	Expressão	Primário	Prognóstico
Sok 2006	IHQ / RT-PCR	42%	CP	-
Yang 2009	qRT-PCR	15,3%	Laringe	-
Pectasides 2010	AQUA	48%	CP	Não
Chau 2011	qRT-PCR	42%	CP	Maior controle / igual SLP e SG
Tinhofer 2011	IHQ / RT-PCR	17%	CP	Pior controle / pior SLP
Smilek 2012	qRT-PCR	20,7%	CP	Não
Wheeler 2012	qRT-PCR	18%	CP	-
Hama 2009	RT-PCR / Seq	0%	CP Japão	-
McIntyre 2012	qRT-PCR	0%	Cav. Oral	-
HACC 2013	IHQ	27%	CP	Não

YANG et al. (2009) analisaram, por qRT-PCR, 39 tumores, todos de laringe, e mostraram que 15,3% deles expressavam a forma variante do EGFR (YANG et al. 2009). PECTASIDES et al. (2010) relataram, no ASCO de 2010, terem observado expressão de EGFRvIII em 48% de 102 pacientes com CECCP de vários sítios primários, utilizando o método AQUA, método baseado em imunofluorescência que permite quantificar a expressão proteica em cada compartimento celular (PECTASIDES et al. 2010). CHAU et al. (2011) avaliaram a expressão de EGFRvIII em 53 pacientes com CEC CP tratados em 4 estudos de fase II. O EGFRvIII foi detectado em 42% dos pacientes por qRT-PCR. TINHOVER et al. (2011) avaliaram tumores de pacientes tratados em um estudo de fase II com docetaxel e cetuximabe para doença recidivada ou metastática. O EGFRvIII foi expresso em 17% dos pacientes segundo a avaliação por IHQ e validado por qRT-PCR em casos selecionados (TINHOVER et al. 2011). SMILEK et al. (2012) avaliaram 29 pacientes com doença localmente avançada tratados com RT associada ao cetuximabe. Houve expressão de EGFRvIII em 20,7% dos pacientes quando avaliado por qRT-PCR (SMILEK et al. 2012). Por fim, WHEELER et al. (2012) avaliaram a expressão de EGFRvIII por qRT-PCR em pacientes com CECCP de todos os sítios primários e encontraram-na em 18% dos casos (WHEELER et al. 2012).

Apenas dois estudos não encontraram a variante do EGFR em CECCP. HAMA et al. (2009), utilizando RT-PCR seguido por sequenciamento do produto amplificado, não encontraram nenhuma mutação no domínio extra-celular do EGFR em 88 pacientes japoneses com CECCP de todos os sítios incluindo nasofaringe. Outro estudo, avaliando apenas tumores de cavidade oral por qRT-PCR encontrou apenas 1 mutação em 50 tumores (MCINTYRE et al. 2012).

Nenhum dos estudos acima descritos avaliaram a relação entre expressão de EGFRvIII e hiperexpressão de EGFR ou amplificação de *EGFR*, porém em glioblastoma multiforme essa relação já foi estabelecida e fortalece a hipótese de que a formação da variante III ocorra por perda dos éxons de 2 a 7 durante o processo de amplificação gênica (GAN et al. 2009).

Desta forma a expressão de EGFRvIII em 27% dos pacientes na nossa coorte e sua associação com a hiperexpressão de EGFR reforçam os dados da maior parte da literatura mostrando a existência desta forma variante em CECCP.

Os dois estudos que não encontraram o EGFRvIII em CECCP utilizaram metodologia semelhante à maioria dos outros estudos, porém diferem dos demais em dois aspectos: HAMA et al. (2009) avaliaram uma população exclusivamente de japoneses o que poderia ser a causa da ausência de mutações, e MCINTYRE et al. (2012) avaliaram exclusivamente pacientes com CEC de cavidade oral o que levanta a hipótese de que o EGFRvIII possa ser diferentemente encontrado de acordo com o sítio primário (HAMA et al. 2009; MCINTYRE et al. 2012). Outra possibilidade é que estas mutações sejam menos comuns em tumores mais frequentemente associados com infecção por HPV ou EBV.

PECTASIDES et al. (2010) também mostraram uma expressão diferenciada de acordo com o sítio primário, com uma correlação entre maiores níveis de expressão do EGFRvIII e tumores de laringe em relação aos tumores de orofaringe. Esses dados sugeririam que a expressão de EGFRvIII possa ser menor ou mesmo ausente em pacientes com CEC de cavidade oral e orofaringe. No entanto, no presente estudo 35% dos tumores de cavidade oral e 25% dos tumores de orofaringe expressaram EGFRvIII, enquanto 16,7% dos tumores de laringe e 20% dos tumores

de hipofaringe expressaram EGFRvIII. A diferença entre os sítios primários não foi estatisticamente significativa ($p=0,874$).

Quanto ao valor prognóstico e preditivo do EGFRvIII, o primeiro estudo a testar a associação entre EGFRvIII e desfechos clínicos foi também o de PECTASIDES et al. em 2010, e não encontrou nenhuma associação com SLP ou SG nesta população.

CHAU et al. (2011) avaliaram pacientes de 4 estudos de fase II, dois deles utilizando erlotinibe e os outros duas drogas não anti-EGFR. EGFRvIII foi associado a um maior controle de doença, porém sem relação com SLP ou SG. Não houve associação com o benefício do tratamento com erlotinibe (CHAU et al. 2011).

Dois estudos avaliaram o impacto da expressão de EGFRvIII em pacientes tratados com cetuximabe. TINHOVER et al. (2011) avaliaram tumores de pacientes tratados em um estudo de fase II com docetaxel e cetuximabe para doença recidivada ou metastática. A expressão do EGFRvIII foi associada a um pior controle de doença e uma pior SLP, sem impacto na SG (TINHOVER et al. 2011). SMILEK et al. (2012) avaliaram 29 pacientes com doença localmente avançada tratados com RT associada ao cetuximabe e não encontraram associação entre a expressão de EGFRvIII e nenhum desfecho clínico.

Na coorte atual, também encontramos uma associação entre a hiperexpressão de EGFR e uma menor taxa de resposta objetiva ao tratamento de RT e cetuximabe. A hiperexpressão de EGFR já foi previamente demonstrada em outros trabalhos como um marcador de mau prognóstico (RUBIN GRANDIS 1998; CHUNG et al. 2011). Mais recentemente também foi demonstrada como fator preditivo para

radiorresistência e associada a uma maior recorrência locorregional após o tratamento com radioterapia (ANG et al. 2002; BENTZEN et al. 2005).

Tanto no estudo fase III de RT com cetuximabe (BONNER et al. 2006), como no estudo fase III de QT com cetuximabe (LICITRA et al. 2013), não houve diferença do benefício do cetuximabe naqueles que hiperexpressavam EGFR conforme avaliação por IHQ. O estudo atual não permite avaliar o papel do EGFR como preditor de resposta especificamente ao cetuximabe ou à RT tendo em vista não dispormos de informações sobre pacientes que não receberam cetuximabe, mas confirma ao menos o seu valor preditor de má resposta, pelo menos à radioterapia.

O PTEN foi associado a uma pior SG no grupo de pacientes com doença metastática tratados com QT e cetuximabe no nosso estudo. Estudos sobre a expressão do PTEN por IHQ em pacientes com CECCP em outros cenários chegaram a conclusões discrepantes.

Um dos motivos da diferença dos resultados entre os estudos poderia ser a metodologia de IHQ diferente entre eles, com a utilização de anticorpos diferentes. Apesar dessas diferenças todos os 3 estudos utilizaram, assim como nós, uma padronização da leitura das reações IHQ para PTEN baseada na intensidade da marcação citoplasmática.

PATTJE et al. (2010) mostraram que a hiperexpressão de PTEN é um fator de mau prognóstico em pacientes tratados com cirurgia e RT adjuvante. LEE et al. (2001) por outro lado mostraram que a ausência da expressão de PTEN em pacientes com CEC de cavidade oral operados e SNIETURA et al. (2012) confirmaram o significado de mau prognóstico para uma expressão baixa de PTEN em pacientes tratados com cirurgia e RT adjuvante (SNIETURA et al. 2012).

Não há na literatura informações sobre o valor prognóstico do PTEN em pacientes com CECCP com doença metastática ou do seu valor preditivo de benefício do uso de cetuximabe neste cenário. Há apenas um estudo pré-clínico em cultura de células que mostrou que o silenciamento do *PTEN* não implica em perda da atividade do cetuximabe (MRIOUAH et al. 2010). Porém em outros tipos de câncer, como câncer de mama, cólon e pulmão, a perda de expressão do PTEN já foi relacionado à resistência ao tratamento com drogas anti-HER2 e anti-EGFR (NAGATA et al. 2004; KOKUBO et al. 2005; FRATTINI et al. 2007; LOUPAKIS et al. 2009; ESTEVA et al. 2010).

EGFR e PTEN tiveram expressão diferente de acordo com o sítio primário. EGFR foi mais hiperexpresso em tumores de cavidade oral que orofaringe, enquanto a ausência de expressão de PTEN foi menos comum em tumores de cavidade oral que em tumores de orofaringe. Isto sugere uma importância maior da hiperexpressão de EGFR em tumores de cavidade oral, e um papel mais importante do PTEN na orofaringe que nos outros sítios. Isto estaria de acordo com a hipótese de diferentes etiopatogênias de acordo com o sítio primário, notadamente com a distinção dos tumores relacionados ao tabagismo, que ocorrem em todos os sítios primários, e dos tumores relacionados ao HPV, que ocorrem quase na sua totalidade na orofaringe. Quase todos os tumores relacionados ao tabagismo apresentam mutação do *TP53* e muitos apresentam hiperexpressão de EGFR e alterações na via do PI3K-Akt-mTOR, incluindo mutações do *PTEN* e perda de expressão da proteína PTEN, enquanto os tumores relacionados ao HPV tendem a apresentar um nível de expressão de EGFR mais baixo e, ao menos em modelo experimental, as proteínas E6 e E7 parecem ter um papel na supressão da expressão de PTEN (LEEMANS et al. 2011; RAMPIAS et

al. 2013). Desta forma, nossos dados vão de encontro aos dados da literatura no que se refere à hiperexpressão de EGFR ser menos comum nos tumores HPV positivos, e a perda de PTEN ser mais comum nos tumores HPV negativos. Entretanto, não realizamos avaliação para infecção por HPV, e desta forma, não podemos estabelecer esta interação. Realizamos apenas a avaliação da expressão de p16 que ocorreu em 7 casos dos 64 avaliados (10,9%). Apenas 2 destes casos eram tumores de orofaringe, não havendo associação da expressão de p16 com nenhum sítio primário. Da mesma forma não houve associação de positividade de p16 com expressão de nenhum outro marcador molecular.

A expressão de p16 esteve associada a uma maior taxa de resposta completa após o tratamento com RT e cetuximabe ($p=0,010$), e a SG e SLP foram maiores nos pacientes p16 positivos apesar da diferença não ser estatisticamente significativa. A baixa expressão de p16 no presente estudo no grupo com doença localizada pode ter ocorrido por ser uma população selecionada, como discutimos anteriormente, mais idosa e com mais comorbidades. Os tumores HPV positivos são caracteristicamente associados a uma idade mais jovem, e as comorbidades presentes nos pacientes deste estudo são muitas vezes relacionadas ao tabagismo, aumentando a probabilidade de que, nessa população, o agente carcinogênico seja o tabaco e não o HPV. Entre os pacientes tratados com QT, a baixa positividade do p16 não seria explicada por estes fatores, porém, considerando-se que os tumores HPV positivos têm um melhor prognóstico, esperaríamos encontrar uma menor prevalência de tumores HPV positivos entre os pacientes com doença metastática. No estudo fase III EXTREME, que testou a associação de cetuximabe com QT em pacientes com doença recidivada

ou metastática, apenas 12% dos tumores avaliados eram p16 positivos (PSYRRI et al. 2012).

Apesar de estudos pré-clínicos sugerirem um papel do CD44 na resistência ao cetuximabe, mostrando aumento da expressão deste marcador em xenoenxetos após o tratamento com cetuximabe, no presente estudo CD44 não foi associado a nenhum desfecho clínico. O teste de log-rank para SG no grupo RT mostrou para a expressão de CD44v6 uma diferença entre as curvas com $p < 0,05$, porém o grupo de pacientes com CD44v6 negativo era de apenas 7 pacientes e ocorreram apenas 3 eventos, o que limita qualquer conclusão desta análise.

Este estudo apresenta algumas limitações, principalmente relacionadas à sua natureza retrospectiva. Aproximadamente um terço dos pacientes não tinham amostra suficiente para análise conclusiva dos marcadores moleculares, limitando o poder do estudo. Esta limitação poderia interferir também nos resultados das análises multivariadas, uma vez que quando algum marcador permanece no modelo final, esse modelo corresponde apenas aos pacientes que possuem avaliação daquele marcador, reduzindo consideravelmente o número de pacientes avaliados, podendo representar uma população diferente da população do estudo, por exemplo, por não incluir pacientes com um determinado sítio primário no modelo. Apesar disso, na análise multivariada para fatores prognósticos relacionados à SG no grupo RT e também no grupo QT, que foram aquelas em que um marcador entrou no modelo, o grupo de pacientes incluído no modelo possuía características clínicas semelhantes às daquelas da população do estudo como mostram as tabelas 19 e 27.

Outras limitações foram: a realização da análise de IHQ em lâminas de TMA, o que pode acarretar amostragem de áreas do tumor com expressão dos

marcadores diferente do restante do tumor em vista da potencial heterogeneidade tumoral; os desfechos de TR e SLP são menos confiáveis que a SG por esta ser um desfecho mais objetivo na avaliação retrospectiva; a população é heterogênea com um grupo de pacientes com predominantemente doença localmente avançada tratados com cetuximabe em combinação com RT e outro de pacientes com doença metastática ou recidiva inoperável e sem indicação de novo tratamento de RT tratados com cetuximabe em combinação com QT, limitando a análise da relação dos marcadores com desfecho clínico; a inclusão de pacientes com diversos sítios primários de CECCP, o que limita o estudo por um lado, por formar uma população heterogênea, mas por outro permite avaliar a diferença da expressão dos marcadores entre os sítios primários. Este é um dado importante na avaliação inicial destes marcadores que ainda não têm suas características tão bem estabelecidas nestes tumores.

O critério de inclusão no grupo RT do estudo foi o tratamento com cetuximabe em combinação com a radioterapia, o estágio da doença não foi um critério de exclusão. Apesar disso, por ser um tratamento quase sempre indicado em pacientes com doença localmente avançada apenas 1 paciente com estágio I foi incluído no estudo no grupo RT. Ao refazermos as análises excluindo este paciente, os resultados mantiveram-se semelhantes: ECOG ≥ 2 (HR 4,25, IC95% 1,45-14,13, $p=0,009$) e AA-CCI > mediana (HR 2,76, IC95% 1,13-6,72, $p=0,025$) permaneceram associados a uma pior SG e sexo feminino associado a uma pior SLP (HR 0,23, IC95% 0,10-0,50, $p<0,001$). ECOG ≥ 2 , apesar de apresentar HR 1,91, deixou de ser estatisticamente significativo com IC95% 0,93-3,92 e $p=0,079$. Sexo masculino (HR 14,42, IC95% 1,58-131,43, $p=0,018$) e sítio primário em orofaringe (HR 15,25,

IC95% 1,60-145,87, $p=0,018$) se mantiveram como os fatores associados a uma maior chance de resposta, e a positividade de p16 se manteve como o único fator associado a maior taxa de resposta completa (100,0% x 33,3%, $p=0,010$).

A ausência de um grupo de pacientes não tratados com cetuximabe impede qualquer conclusão a respeito do valor preditivo de resposta dos marcadores, permitindo apenas conclusões quanto ao seu valor prognóstico.

Apesar disso se trata de uma coorte com número grande de pacientes com CECCP tratados com cetuximabe, com um perfil de acordo com o perfil dos pacientes que recebem esta medicação na prática clínica diária, fornecendo dados iniciais que tem o valor de gerar hipóteses a serem testadas de forma prospectiva.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo concluímos em relação aos objetivos propostos:

Nos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço avaliados neste estudo, a expressão de EGFRvIII foi de 27%, o EGFR foi hiperexpresso 50%, a expressão de PTEN foi negativa em 37,5%, o CD44 foi expresso em 38.3%, e o CD44v6 foi expresso em 76,2% dos casos.

Houve associação entre a expressão de EGFRvIII e hiperexpressão de EGFR e expressão de CD44 e CD44v6. Houve uma maior frequência de hiperexpressão de EGFR em tumores de sítio primário em cavidade oral comparados aos de orofaringe e maior frequência de ausência de expressão de PTEN em tumores de orofaringe comparados aos de cavidade oral.

EGFRvIII, CD44 e CD44v6 não mostraram associação a nenhum dos desfechos clínicos avaliados. Hiperexpressão de EGFR se associou a menor taxa de resposta ao tratamento de radioterapia com cetuximabe, e perda de expressão de PTEN a uma menor sobrevida global em pacientes tratados com quimioterapia e cetuximabe.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, et al. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. **J Clin Oncol** 2003; 21:92-8.

Ang KK, Berkey BA, Tu X, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. **Cancer Res** 2002; 62:7350-6.

Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:1254-61.

Bax DA, Gaspar N, Little SE, et al. EGFRvIII deletion mutations in pediatric high-grade glioma and response to targeted therapy in pediatric glioma cell lines. **Clin Cancer Res** 2009; 15:5753-61.

Begnami MD. **Classificação molecular dos carcinomas gástricos**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Bentzen SM, Atasoy BM, Daley FM, et al. Epidermal growth factor receptor expression in pretreatment biopsies from head and neck squamous cell carcinoma as a predictive factor for a benefit from accelerated radiation therapy in a randomized controlled trial. **J Clin Oncol** 2005; 23:5560-7.

Bernier J, Dommenege C, Ozsahin M, et al. Postoperative Irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. **N Engl J Med** 2004; 350:1945-52.

Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, et al. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). **Head Neck** 2005; 27:843-50.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med** 2006; 354:567-78.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. **Lancet Oncol** 2010; 11:21-8.

Cathomas R, Rothermundt C, Klingbiel D, et al. Efficacy of cetuximab in metastatic castration-resistant prostate cancer might depend on EGFR and PTEN expression: results from a phase II trial (SAKK 08/07). **Clin CancerRes** 2012; 18:6049-57.

Chau NG, Perez-Ordenez B, Zhang K, et al. The association between EGFR variant III, HPV, p16, c-MET, EGFR gene copy number and response to EGFR inhibitors in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head Neck Oncol** 2011; 3:11.

Chen LF, Cohen EE, Grandis JR. New strategies in head and neck cancer: understanding resistance to epidermal growth factor receptor inhibitors. **Clin CancerRes** 2010; 16:2489-95.

Chung CH, Zhang Q, Hammond EM, et al. Integrating epidermal growth factor receptor assay with clinical parameters improves risk classification for relapse and survival in head-and-neck squamous cell carcinoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2011; 81:331-8.

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med** 2004; 350:1937-44.

Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:1075-83.

Dias JD, Guse K, Nokisalmi P, et al. Multimodal approach using oncolytic adenovirus, cetuximab, chemotherapy and radiotherapy in HNSCC low passage tumour cell cultures. **Eur J Cancer** 2010; 46:625-35.

El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. **Head Neck** 2012; 34:459-61.

Esteva F J, Guo H, Zhang S, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. **Am J Pathol** 2010; 177:1647-56.

Forastiere AA, Metch B, Schuller DE, et al. Randomized comparison of cisplatin plus fluorouracil and carboplatin plus fluorouracil versus methotrexate in advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck: a Southwest Oncology Group study. **J Clin Oncol** 1992; 10:1245-51.

Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, et al. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. **N Engl J Med** 2003; 349:2091-8.

Frattini M, Saletti P, Romagnani E, et al. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. **Br J Cancer** 2007; 97:1139-45.

Fukai J, Nishio K, Itakura T, Koizumi F. Antitumor activity of cetuximab against malignant glioma cells overexpressing EGFR deletion mutant variant III. **Cancer Sci** 2008; 99:2062-9.

Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. **J Clin Neurosci** 2009; 16:748-54.

Gibson MK, Li Y, Murphy B, et al. Randomized phase III evaluation of cisplatin plus fluorouracil versus cisplatin plus paclitaxel in advanced head and neck cancer (E1395): an intergroup trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. **J Clin Oncol** 2005; 23:3562-7.

Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. **Cancer Res** 1993; 53:3579-84.

Hama T, Yuza Y, Saito Y, et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncologist** 2009; 14:900-8.

Hitt R, Lopez-Pousa A, Martinez-Trufero J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus fluorouracil to paclitaxel, cisplatin, and fluorouracil induction chemotherapy followed by chemoradiotherapy in locally advanced head and neck cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:8636-45.

Huang SF, Chuang WY, Chen IH et al. EGFR protein overexpression and mutation in areca quid-associated oral cavity squamous cell carcinoma in Taiwan. **Head Neck** 2009; 31:1068-77.

[IARC] Internacional agency for Research on Cancer. **The GLOBOCAN**. Available from: <URL:<http://globocan.iarc.fr>> [2013 fev 25].

Jacobs C, Lyman G, Velez-Garcia E, et al. A phase III randomized study comparing cisplatin and fluorouracil as single agents and in combination for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Oncol** 1992; 10:257-3.

Jimeno A, Messersmith WA, Hirsch FR, et al. KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection **J Clin Oncol** 2009; 27:1130-6.

Kokubo Y, Gemma A, Noro R, et al. Reduction of PTEN protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to gefitinib (IRESSA). **Br J Cancer** 2005; 92:1711-9.

La Fleur L, Johansson AC, Roberg K. A CD44^{high}/EGFR^{low} subpopulation within head and neck cancer cell lines shows an epithelial-mesenchymal transition phenotype and resistance to treatment. **PLoS One** 2012; 7:e44071.

Lai D, Visser-Grieve S, Yang X. Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. **Biosci Rep** 2012; 32:361-74.

Langer CJ. Target therapy in head and neck cancer, state of the art 2007 and review of clinical applications. **Cancer** 2008; 112:2635-45.

Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. **J Clin Oncol** 2009a; 27:5924-30.

Laurent-Puig P, Lievre A, Blons H. Mutations and response to epidermal growth factor receptor inhibitors. **Clin Cancer Res** 2009b; 15:1133-9.

Lee JI, Soria JC, Hassan KA, et al. Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2001; 127:1441-51.

Lee JW, Soung YH, Kim SY, et al. Somatic mutations of egfr gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Clin Cancer Res** 2005; 11:2879-82.

Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:9-22.

Lee JS, Park K, Kim SW, et al. A randomized phase III study of gefitinib (IRESSA) versus Standard Chemotherapy (Gemcitabine plus Cisplatin) as a firstline treatment for never-smokers with advanced or metastatic adenocarcinoma of the lung. In: **Proceedings of the 13th World Conference of Lung Cancer**; 2009 July 31 Aug 4, 2009; San Francisco, California.

Lefebvre JL, Pointreau Y, Rolland F, et al. Induction chemotherapy followed by either chemoradiotherapy or bioradiotherapy for larynx preservation: the TREMPIN randomized phase II study. **J Clin Oncol** 2013; 31:853-9.

Licitra L, Rolland F, Bokemeyer C, et al. Biomarker potential of EGFR gene copy number by FISH in the phase III EXTREME trial: Platinum-based CT + cetuximab in 1st line R/M SCCHN [abstract]. **J Clin Oncol** 2009; 27(suppl 15):A6005. [Presented at 2009 ASCO Annual Meeting, 2009 May 29-June 2, Orlando, Florida]

Licitra L, Störkel S, Kerr KM, et al. Predictive value of epidermal growth factor receptor expression for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with head and neck and colorectal cancer: analysis of data from the EXTREME and CRYSTAL studies. **Eur J Cancer** 2013; 49:1161-8.

Loeffler-Ragg J, Witsch-Baumgartner M, Tzankovet A, et al. Low incidence of mutations in EGFR kinase domain in Caucasian patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Eur J Cancer** 2006; 42:109-11.

Lord HK, Junor E, Ironside J. Cetuximab is effective, but more toxic than reported in the Bonner trial. **Clin Oncol** 2008; 20:96.

Loupakis F, Pollina L, Stasi I, et al. PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2009; 27:2622-9.

Loyo M, Li RJ, Bettegowda C, et al. Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. **Head Neck** 2013; 35:454-63.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. **N Engl J Med** 2004; 350:2129-39.

Massard C, Deutsch E, Soria JC. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. **Ann Oncol** 2006; 17:1620-4.

Matta A, Ralhan R. Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck Oncol** 2009; 1:6.

McIntyre JB, Bose P, Klimowicz AC, et al. Specific and sensitive hydrolysis probe-based real-time PCR detection of epidermal growth factor receptor variant iii in oral squamous cell carcinoma. **PLoS One** 2012; 7:e31723.

Mehra R, Serebriiskii IG, Dunbrack RL Jr, Robinson MK, Burtneess B, Golemis EA. Protein-intrinsic and signaling network-based sources of resistance to EGFR- and ErbB family-targeted therapies in head and neck cancer. **Drug Resist Updat** 2011; 14:260-79.

Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. **Oncogene** 2000; 19:6550-65.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Mok TS, Wu YL, Thongprasert S. et al. Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. **N Engl J Med** 2009; 361:947-57.

Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. **Oral Oncol** 2009; 45:324-34.

Morgillo F, Bareschino MA, Bianco R, Tortora G, Ciardiello F. Primary and acquired resistance to anti-EGFR target drugs in cancer therapy. **Differentiation** 2007; 75:788-99.

Mriouah J, Boura C, Pinel S, et al. Cellular response to cetuximab in PTEN-silenced head and neck squamous cell carcinoma cell line. **Int J Oncol**. 2010; 37:1555-63.

Nagata Y, Lan KH, Zhou X, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. **Cancer Cell** 2004; 6:117-27.

Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol** 2009; 45:633-9.

Orian-Rousseau V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. **Eur J Cancer** 2010, 46:1271–1277

Pattje WJ, Schuuring E, Mastik MF, et al. The phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 mediates radiosensitivity in head and neck cancer. **Br J Cancer** 2010; 102:1778-85.

Pectasides E, Fountzilas G, Kountourakis P, et al. Evaluation of the incidence and prognostic value of mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) protein expression in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) using AQUA. **J Clin Oncol** 2010; 28(15 suppl):5538.

Pedersen MW, Meltorn M, Damstrup L, Poulsen HS. The type III epidermal growth factor receptor mutation Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. **Ann Oncol** 2001; 12:745-60.

Perez A, Neskey DM, Wen J, et al. CD44 interacts with EGFR and promotes head and neck squamous cell carcinoma initiation and progression. **Oral Oncol** 2013; 49:306-13.

Pignon J.P, Maitre A., Maillard E et al. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17.346 patients. **Radiat Oncol** 2009;92: 4-14

Pointreau Y, Garaud P, Chapet S, et al. Randomized trial of induction chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil with or without docetaxel for larynx preservation. **J Natl Inst Oncol** 2009; 101:498-506.

Posner MR, Hershock D, Blajman CR, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. **N Engl J Med** 2007; 357:1705-15.

Prince ME, Ailles LE. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:2871-5.

Psyrrri A, Licitra L, De Blas B, Celik I, Vermorken JB. Safety and efficacy of cisplatin plus 5-FU and cetuximab in HPV-positive and HPV-negative recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (R/M SCCHN): analysis of the phase III EXTREME trial. **Ann Oncol** 2012; 23(suppl 9):A10180.

Rabinowits G, Haddad RI. Overcoming resistance to EGFR inhibitor in head and neck cancer: a review of the literature. **Oral Oncol** 2012; 48:1085-9.

Rampias T, Pectasides E, Prasad M, et al. Molecular profile of head and neck squamous cell carcinomas bearing p16 high phenotype. **Ann Oncol** 2013 Feb 13. [Epub ahead of print].

Rautava J, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. **Head Neck Pathol** 2012; 6 Suppl 1:S3-15.

Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. **N Engl J Med** 2009; 361:958-67.

Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, et al. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:824-32.

Shin DM, Khuri FR. Advances in the management of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head Neck** 2013; 35:443-53.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. **CA Cancer J Clin** 2013; 63:11-30.

Smilek P, Neuwirthova J, Jarkovsky J, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and mutations in the EGFR signaling pathway in correlation with anti-EGFR therapy in head and neck squamous cell carcinomas. **Neoplasma** 2012; 59:508-15.

Snietura M, Jaworska M, Mlynarczyk-Liszka J, et al. PTEN as a prognostic and predictive marker in postoperative radiotherapy for squamous cell cancer of the head and neck. **PLoS One** 2012; 7:e33396.

Sok JC, Coppelli FM, Thomas SF, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. **Clin Cancer Res** 2006; 12:5064-73.

Specenier P, Vermorken JB. Biologic therapy in head and neck cancer: a road with hurdles. **ISRN Oncol** 2012; 2012:163752.

Suzuki S, Morgan SE, Thomas SM, et al. Epidermal growth factor receptor variant III mediates head and neck cancer cell invasion via STAT3 activation. **Oncogene** 2010; 29: 5135-45.

Tinhofer I, Klinghammer K, Weichert W, et al. Expression of amphiregulin and EGFRvIII affect outcome of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. **Clin Cancer Res** 2011; 17:5197-204.

Vermoken JB, Trigo J, Hitt R, et al. Open-label, uncontrolled, multicenter phase ii study to evaluate the efficacy and toxicity of cetuximab as a single agent in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck who failed to respond to platinum-based therapy. **J Clin Oncol** 2007; 25: 2171-7.

Vermoken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. **N Engl J Med** 2008; 359:1116-27.

Walsh L, Gillham C, Dunne M, et al. Toxicity of cetuximab versus cisplatin concurrent with radiotherapy in locally advanced head and neck squamous cell cancer (LAHNSCC). **Radiother Oncol** 2011; 98:38-41.

Wang SJ, Bourguignon LYW. Hyaluronan-CD44 promotes phospholipase C-mediated Ca²⁺ signaling and cisplatin resistance in head and neck cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2006; 132:19-24.

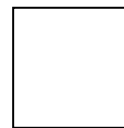
Wang SJ, Wong G, de Heer AM, Xia W, Bourguignon LY. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. **Laryngoscope** 2009; 119:1518-30.

Wang SJ, Bourguignon LY. Role of hyaluronan-mediated CD44 signaling in head and neck squamous cell carcinoma progression and chemoresistance. **Am J Pathol** 2011; 178:956-63.

Wheeler S, Siwak DR, Chai R, et al. Tumor epidermal growth factor receptor and EGFR PY1068 are independent prognostic indicators for head and neck squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2012; 18:2278-89.

Yang B, Chen J, Zhang X, Cao J. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor variant III in laryngeal carcinoma tissues. **Auris Nasus Larynx** 2009; 36:682-7.

Anexo 1 - Ficha de Coleta de Dados



(1) RT (2) QT

1-Identificação:

1.1 Nome: _____.

1.2 Data de nascimento ____/____/____.

1.3 RGH-HC: _____.

1.4 Sexo: (1) Masc (2) Fem. ----- I__I

1.5 Data da primeira consulta: ____/____/____.

1.6 1ª consulta na Oncologia: ____/____/____.

2- Fatores associados:

	(0) não (1) sim
Tabagismo	
Etilismo	
Outras CEC	
Hipoacusia	
ClCr	

(1) HAS	(5) DPOC	
(2) DM	(6) AVE	
(3) ICo		
(4) Hipotireoidismo		

Outras: Qual? _____

3- Apresentação Clínica:

Inicial:

3.1 Sítio primário: (1) cavidade oral (2) orofaringe (3) hipofaringe (4) laringe (5) nasofaringe

(6) Outros. Qual? _____. ----- I__I

3.2 Avaliação Inicial: (1) ressecável (2) irresssecável (99) ND ----- I__I

3.3 Estágio clínico TNM inicial: EC: (1) I (2) II (3) III (4) IVa (5) IVb----- I__I

T: (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4a (5) T4b (6) Tx ----- I__I

N: (0) N0 (1) N1 (2) N2a (3)N2b (4)N2c (5) N3 (6) Nx ----- I__I

M: (0) M0 (1) M1 (2) Mx ----- I__I

No momento do tratamento do estudo:

3.4 Performance status (ECOG): 0 a 4 ----- I__I

3.5 Idade: ----- I__I

4. Tratamento locorregional:

Linha de tratamento local com RTCetux ----- I ____ I

4.1- RT + cetuximabe:

RT: dose: _____ Local: _____

Início: ____/____/____. Fim ____/____/____

Tipo: (1) 3D conformacional (2) IMRT (3) 2D ----- I __ I

Cetuximabe:

Início: ____/____/____ Fim ____/____/____

Número de aplicações ----- I __ I

Rash acneiforme (1) sim (0) não Grau: (1) G1 (2) G2 (3) G3 (4) G4 ----- I __ I - I __ I

Mucosite (1) sim (0) não Grau: (1) G1 (2) G2 (3) G3 (4) G4 ----- I __ I - I __ I

Radiodermite (1) sim (0) não Grau: (1) G1 (2) G2 (3) G3 (4) G4 ----- I __ I - I __ I

Suspensão temporária cetux (1) sim (0) não ----- I __ I

Motivo: _____

Suspensão definitiva cetux (1) sim (0) não ----- I __ I

Motivo: _____

5. Avaliação após tratamento locorregional com RTCetux:

5.1 Tipos de resposta: (1) RC (2) RP (3) DE (4) PD local (5) PD distância

Data da avaliação: ____/____/____ tipo de resposta ----- | ____ |

5.2 Método de avaliação: (1) Ex Fis (2) TC (3) PET (4) AP ----- | ____ |

5.3 Data progressão de doença: ____/____/____

6. Tratamento doença sistêmica

6.1- Sítio de doença irresssecável/mtx: _____

6.2- Quimioterapia sistêmica:

Esquema:

(1ª linha) _____ Número de ciclos totais _____

Início: ____/____/____. Fim: ____/____/____.

Melhor resposta: (1) DE (2) RP (3) RC (4) PD . Após ____ ciclos. ----- I __ I

Data da PD: ____/____/____.

(2ª linha) _____ Número de ciclos totais _____

Incio: ____/____/____. Fim: ____/____/____.

Melhor resposta: (1) DE (2) RP (3) RC (4) PD . Após ____ ciclos. ----- I __ I

Data da PD: ____/____/____.

(3ª linha) _____ Número de ciclos totais _____

Incio: ____/____/____. Fim: ____/____/____.

Melhor resposta: (1) RC (2) RP (3) DE (4)PD (99) ND ----- I __ I

Data da PD: ____/____/____.

(4ª linha)_____.Número de ciclos totais_____

Inicio: ____/____/____. Fim: ____/____/____.

Melhor resposta: (1) RC (2) RP (3) DE (4)PD (99) ND ----- I__I

Data da PD: ____/____/____.

7. Informações sobre esquema com cetuximabe:

7.1- Quimioterápicos associados e dose(/m²):

Inicio: ____/____/____.

Fim QT: ____/____/____.

Fim Cetuximabe: ____/____/____.

(1) CDDP	(4) Taxano	
(2) Carbo	(5)Outros	
(3) 5FU		

7.2- Toxicidade:

Rash acneiforme	
Mucosite	
Neutropenia febril	

8. Última avaliação:

Data	(0) Vivo (1) Óbito	(0) SED (1) Recidivada	(0) aguarda retorno (1) perda de seguimento

Anexo 2 – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa



Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 31 de Maio de 2012.

Ao
Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima

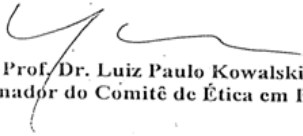
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1439/10

"Impacto da expressão de EGFRvIII, EGFR, EGFR fosforilado, CD44, IGFRI e marcadores de células tronco em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, não cutâneos, metastáticos ou localmente avançados, tratados com cetuximabe".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 29/05/2012, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 08/11/2011, tomaram conhecimento e consideraram aprovada a seguinte documentação:

- Solicitação de mudança do projeto que foi desenvolvido como monografia do curso de residência médica do aluno Alexandre André Balieiro Anastácio da Costa, para projeto de mestrado com o novo título: "Impacto da expressão de EGFRvIII, EGFR, EGFR fosforilado, CD44, IGFRI e marcadores de células tronco em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, não cutâneos, metastáticos ou localmente avançados, tratados com cetuximabe".
- Projeto alterado, datado de Maio de 2012;
- Orçamento Financeiro detalhado atualizado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Clínica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital do Câncer de Barretos – Fundação Pio XII.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 3 - Resumos e apresentações em congressos

Resumo 1:



CETUXIMAB IN THE TREATMENT OF LOCALLY ADVANCED HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN A NON SELECTED POPULATION. ARE PHASE III RESULTS IN ACCORDANCE WITH DAILY CLINICAL PRACTICE?

Presentation: S165
Topic: Clinical - Targeted Therapy and Immunomodulation
Type: Oral Presentation
Date: Monday, July 23, 2012
Session: 13:45 - 15:15 Risk Factors/Cancer
Authors: Alexandre A da Costa, MD, Adriana R Ribeiro, MD, Andréia P Guimarães, MD, Clóvis A Pinto, MD PhD, Vladmir C Lima, MD PhD
Institution(s): AC Camargo Hospital

Introduction: Cetuximab is a monoclonal antibody used in the treatment of locally advanced disease (LAD) head and neck squamous cell carcinoma (HNSC) in combination with radiotherapy or in the metastatic (MD) setting in combination with chemotherapy (CT). There is no comparison among cetuximab plus RT with the standard of care in this context that is radiotherapy plus cisplatin. The population treated with cetuximab in daily practice is frequently different from the selected population present in clinical trials, especially for patients with LAD. We evaluated the efficacy of cetuximab in a cohort of patients in our institution as well as the overexpression of EGFR, expression of PTEN and CD44v6 and their impact in the overall response rate (ORR), progression free survival (PFS) and overall survival (OS). Methods: Retrospective review of data extracted from charts of patients with HNSC treated with cetuximab at a single institution from 2007 to 2009. The expression of EGFR, PTEN and CD44v6 was analyzed by immunohistochemistry in tissue microarray. Results: Thirty five patients with LAD treated with radiotherapy and cetuximab had a median OS of 18 months (CI95%: 12,1m-27,1m), and a median PFS of 7 months (CI95%: 3,6m-12,5m). Twenty seven patients with MD had a median OS of 14,0 months (CI95%: 10,5m-16,4m) and a median PFS of 7,5 months (IC95%: 4,1m-8,6m), for an ORR of 48,1%. Among those with available tissue for immunohistochemistry the overexpression of EGFR, the expression of PTEN and CD44v6 were 61,3%, 75,0% e 85,3% respectively and there was no significantly

impact in the ORR, PFS or OS. Conclusions: In a non selected population with LAD the results of treatment with cetuximab in combination with radiotherapy is worse than expected by the phase III study, 18 months x 49 months, while for patients with MD the results were similar. In spite of the limitations of such a comparison, given the magnitude of the difference, the real benefit of adding cetuximab to radiotherapy in such a population, constituted mostly by patients with contraindications to combination of radiotherapy and cisplatin is questioned. Considering the good therapeutic window for the use of cetuximab, the authors believe it is still worthy to use it in LAD even in this subgroup.

Resumo 2:

EGFRv3 and PTEN as prognostic markers in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with cetuximab.

Subcategory:

Head and Neck Cancer

Session Type and Session Title:

This abstract will not be presented at the 2013 ASCO Annual Meeting but has been published in conjunction with the meeting.

Abstract Number:

e17032

Citation:

J Clin Oncol 31, 2013 (suppl; abstr e17032)

Author(s):

Alexandre Andre Balieiro Anastacio da Costa, Adriana Regina G. Ribeiro, Andrea Paiva Guimaraes, Ludmilla Thome Chinen, Clovis Pinto, Vladmir C. Lima; Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brazil; Clinical Oncology Department, Hospital A. C. Camargo, São Paulo, Brazil

Background: Cetuximab (CTx) is used in treatment of locally advanced (LAD) head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in combination with radiotherapy (RT) or in metastatic disease (MD). There is no comparison between CTx plus RT and cisplatin plus RT. Patients treated with CTx in daily clinical practice are frequently different from the selected population treated in clinical trials. There are no biomarkers for efficacy of CTx in HNSCC. EGFR variant 3 mutation (EGFRv3), an extracellular domain mutation of EGFR, has been reported in different frequencies in HNSCC in the last years and its association with prognosis and CTx efficacy is still unknown. **Methods:** Retrospective review of data from patients with HNSCC treated with CTx at a single institution from 2007 to 2010. We evaluated CTx efficacy and expression of EGFRv3, EGFR, PTEN, CD44 and CD44v6 and their impact in objective response rate (ORR), progression free survival (PFS) and overall survival

(OS). Biomarkers were analyzed by immunohistochemistry in tissue microarray. **Results:** For a median follow-up time of 13 months, 61 patients with LAD treated with RT plus CTx had a median OS of 22.7 months, and a median PFS of 8.0 months. Age adjusted Charlson Comorbidity Index (AA-CCI) and ECOG performance status were the most important predictors of poor prognosis in this population. For a median follow-up time of 10.9 months, 44 patients with MD had a median OS of 13.0 months and a median PFS of 7.0 months, for an ORR of 53.7%. EGFRv3 was expressed in 27.1% of tumor samples and was not associated with any clinical outcome. EGFR positivity was associated to higher ORR in LAD and PTEN negativity was associated with shorter OS in the MD setting. **Conclusions:** In a non selected population with LAD treatment results with CTx in combination with radiotherapy were worse than expected by the phase III study, median OS 22.7 months vs 49.0 months. This difference may be attributed to different population characteristics with higher ECOG and AA-CCI in our study and warrants an adequate proof of efficacy of CTx in this population. EGFRv3 is present in HNSCC but does not impact prognosis. PTEN and EGFR expression emerged as potential biomarkers in HNSCC patients treated with CTx.

Anexo 4 – Submissão do artigo e cópia do manuscrito

Medical Oncology

PTEN, but not EGFRvIII, is associated with improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with cetuximab.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MEDO-6395
Full Title:	PTEN, but not EGFRvIII, is associated with improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with cetuximab.
Article Type:	Original Research
Keywords:	Head and Neck Cancer; cetuximab; prognostic biomarker; PTEN; EGFRvIII; EGFR; cetuximab resistance
Corresponding Author:	Alexandre André Balieiro Anastácio da Costa, MD AC Camargo Cancer Center Sao Paulo, Sao Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	AC Camargo Cancer Center
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Alexandre André Balieiro Anastácio da Costa, MD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Alexandre André Balieiro Anastácio da Costa, MD
	Felipe D'Almeida Costa, MD
	Adriana Regina Ribeiro, MD
	Andrea Paiva Guimaraes, MD
	Ludimila Tomé Chinen, PhD
	Clóvis Antônio Pinto Lopes, PhD
	Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Background: Cetuximab is approved to treat head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in locally advanced disease (LAD) and metastatic disease (MD). There are still controversies on its use in both settings. There is no established biomarker for cetuximab efficacy in HNSCC. Methods: Retrospective analysis of data from 105 patients with HNSCC treated with cetuximab in LAD and MD. EGFRvIII, EGFR and PTEN were analyzed by immunohistochemistry and tested for association with clinical outcomes. Results: In LAD setting median overall survival (OS) was 22.7 months and median progression free survival (PFS) was 8.0 months. EGFRvIII was expressed in 27.1% of tumor samples and was not associated with any clinical outcome. EGFR positivity was associated to higher response rate in LAD and PTEN loss of expression was associated with shorter OS in the MD setting. Conclusions: In a non-selected population with LAD efficacy of cetuximab treatment is worse than expected by the phase 3 study. EGFR and PTEN emerged as prognostic biomarkers in cetuximab treated patients.