

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Aloysio Enck Neto

**IMPORTÂNCIA PROGNÓSTICA DA PROTEÍNA P53: NOS
PACIENTES COM CÂNCER DE LARINGE TRATADOS COM
CIRURGIA**

Santa Maria, RS
2020

Aloysio Enck Neto

**IMPORTÂNCIA PROGNÓSTICA DA PROTEÍNA P53: NOS PACIENTES COM
CÂNCER DE LARINGE TRATADOS COM CIRURGIA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências da Saúde**.

Orientador: Tiango Aguiar Ribeiro
Coorientador: Marcelo Binato

Santa Maria, RS
2020

Enck Neto, Aloysio
Importância Prognóstica da Proteína P53: nos Pacientes
com Câncer de Laringe Tratados com Cirurgia / Aloysio
Enck Neto.- 2020.
92 p.; 30 cm

Orientador: Tiango Aguiar Ribeiro
Coorientador: Marcelo Binato
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências da Saúde, RS, 2020

1. Câncer de laringe 2. Expressão do p53 3. Prognóstico
4. Tratamento cirúrgico I. Aguiar Ribeiro, Tiango II.
Binato, Marcelo III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, ALOYSIO ENCK NETO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Aloysio Enck Neto

**IMPORTÂNCIA PROGNÓSTICA DA PROTEÍNA P53: NOS PACIENTES COM
CÂNCER DE LARINGE TRATADOS COM CIRURGIA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências da Saúde**.

Aprovado em 18 de agosto de 2020:

Tiango Aguiar Ribeiro, Prof. Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Marcelo Binato, Prof. Dr. (UFSM)
(Coorientador)

Maria da Graça Caminha Vidal, Prof.^a Dr.^a (UFSM)

Marcos André dos Santos, Prof. Dr. (Ulbra)

Santa Maria, RS
2020

Dedico este trabalho à Medicina, fonte de inspiração, dedicação e amor diário.
E a todos que compõem a trajetória do saber, que requer muita dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

A todos que tornaram possível este trabalho.

A meus pais, Irineo Enck e Marilene Rizzi Enck, que sempre incentivaram a cultura e a educação.

A meus mestres e professores do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Dr. Marcos André dos Santos e Dr. Cláudio Dellinghauser Silveira, os quais instigaram a curiosidade de saber mais. Aos colegas de residência, Dr. Fernando Cogo Manduca e Dr. Lucas Spina, pelo apoio e pela amizade.

Um agradecimento especial à Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Caminha Vidal, chefe do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Universitário de Santa Maria (Husm), por possibilitar a ampliação de sua pesquisa com este trabalho e pelo seu apoio e dedicação incansável a seus residentes.

À patologista Dr.^a Alessandra Bastianello, ao Prof. Dr. Tiango Aguiar Ribeiro e à Dr.^a Katia Foltz pela ajuda, confiança e determinação na produção deste trabalho.

Finalmente, ao amor pela medicina e aos pacientes, fruto de todo empenho e dedicação deste trabalho.

RESUMO

IMPORTÂNCIA PROGNÓSTICA DA PROTEÍNA p53 NOS PACIENTES TRATADOS CIRURGICAMENTE COM CÂNCER DE LARINGE

AUTOR: Aloysio Enck Neto
ORIENTADOR: Tiango Aguiar Ribeiro
COORIENTADOR: Marcelo Binato

Estudos mais atuais sobre a biologia molecular do câncer de laringe buscam avaliar a correlação entre a positividade de marcadores moleculares e a agressividade e a recorrência tumoral dessa doença. Objetivando analisar a expressão do marcador p53 nos pacientes com câncer de laringe tratados cirurgicamente, buscamos encontrar uma relação da expressão do gene com o prognóstico do câncer de laringe. Neste estudo, abordaremos a expressão imuno-histoquímica do p53 nas peças cirúrgicas com margens livres de pacientes com câncer de laringe submetidos à cirurgia entre janeiro de 2014 e janeiro de 2018 no Hospital Universitário de Santa Maria (Husm) pela equipe do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. A positividade e a expressão da proteína p53 foram investigadas nas amostras e correlacionadas a condições predisponentes (alcoolismo e tabagismo), localização anatômica, classificação (TNM), presença de linfonodo metastático, recorrência e sobrevivência. Foram analisados 39 pacientes tratados cirurgicamente, dos quais 53,8% apresentaram expressão do marcador p53. Houve diferença significativa na sobrevida dos pacientes com marcador p53 positivo em comparação àqueles com marcador p53 negativo ($p = 0,039$). Portanto, o marcador p53 também está intimamente relacionado à recorrência do câncer de laringe quando associado a outros fatores, mas o tabagismo e a superexpressão da proteína p53 são fatores de risco que, juntos, aumentam em 21 vezes a chance de recorrência do tumor na laringe. Dado o exposto, confirma-se a relevância do marcador p53 como importante aliado no acompanhamento pós-operatório.

Palavras-chave: Expressão do p53. Câncer de laringe. Tratamento cirúrgico. Prognóstico.

ABSTRACT

PROGNOSTIC IMPORTANCE OF THE p53 PROTEIN IN PATIENTS SURGERY TREATED WITH LARYNG CANCER

AUTHOR: Aloysio Enck Neto
MASTER'S SUPERVISOR: Tiango Aguiar Ribeiro
MASTER'S SUB-SUPERVISOR: Marcelo Binato

More current studies on the molecular biology of laryngeal cancer seek to assess the correlation between the positivity of molecular markers to the aggressiveness and tumor recurrence of this disease. In order to analyze the expression of the p53 marker in patients treated surgically with laryngeal cancer, we sought to find a relationship between protein expression and laryngeal cancer prognosis. In this study we will address the expression immunohistochemistry of p53 in surgical pieces with free margins of patients with laryngeal cancer who underwent surgery between January 2014 and January 2018 at Hospital Universitário de Santa Maria (Husm) by the Head and Neck Surgery Service team. The positivity and expressiveness of the p53 marker were investigated in the samples and correlated with predisposing conditions (alcoholism and smoking), anatomical location, classification (TNM), presence of metastatic lymph node, recurrence, and survival. 39 surgically treated patients were analyzed, of which 53.8% had expression of the p53 marker. There was a significant difference in survival of patients with a positive p53 marker compared to those with a negative p53 marker ($p = 0.039$). Therefore, the p53 marker is also closely related to the recurrence of laryngeal cancer when associated with other factors, but when linked to smoking and the overexpression of the p53 protein, both are risk factors that, together, increase the chance of recurrence of the laryngeal tumor. Given the above, the importance of the p53 marker as an important ally in postoperative follow-up is confirmed.

Keywords: p53 expression. Laryngeal tumor. Surgery treatment. Prognosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

METODOLOGIA

Figura 1 – Imagens microscópicas das lâminas com análise imuno-histoquímica do p53.27

ARTIGO EM PORTUGUÊS

eFigura 1 – Distribuição etária entre os níveis de expressão da proteína p53..... 35

Figura 1 – Recorrência do tumor da laringe versus expressão da proteína p53.....36

Figura 2 – Sobrevida livre de doença e risco de recidiva entre pacientes do marcador p53....37

Figura 3 – Sobrevida livre de tumor e localização anatômica do câncer.38

ARTIGO EM INGLÊS

eFigure 1 – Age distribution among p53 protein expression levels.51

Figure 1: Recurrence of laryngeal tumor versus expression of the p53 protein.....53

Figure 2: Disease-free survival and risk function between p53 marker patients.53

Figure 3: Tumor survival and risk function between anatomical cancer localization.....55

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – NCCN Guidelines Version 2.2011 Staging Head and Neck Cancers. American Joint Committee of Cancer (AJCC) TNM Staging System for the Larynx (7th ed., 2010).	21
--	----

ARTIGO EM PORTUGUÊS

eTabela 1 – TNM e expressão da proteína p53.	35
Tabela 1 – Características da população.....	34
Tabela 2 – Fatores de risco para recorrência tumoral.....	40

ARTIGO EM INGLÊS

eTable 1: TNM and p53 protein expression.	52
Table 1 – Population characteristics.....	50
Table 2 – Tumor recurrence risk factors.	56

LISTA DE SIGLAS

AGHU	Aplicativo de Gestão para Hospitais Universitários
Bcl-XI B-	<i>Cell lymphoma extra-large</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CCS	Centro de Ciências da Saúde
Cdc2	Proteína da célula de divisão cíclica 2
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CI	Intervalo de confiança (do inglês, <i>confidence interval</i>)
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
GEP/UFSM	Gerência de Ensino, Pesquisa e Extensão do Husm
HPV	Papilomavírus humano
Husm	Hospital Universitário de Santa Maria
IC	Intervalo de confiança
Inca	Instituto Nacional do Câncer
IQ	Interquartil
IQR	Intervalo interquartil (do inglês, <i>interquartile range</i>)
Ki-67	Proteína expressa em núcleo de células em proliferação
LS	Linfonodo sentinela
MLN	<i>Metastatic lymph node</i>
N+/N-	Linfonodos positivos (metástase linfonodal)/Linfonodo negativo (ausência de metástase linfonodal)
NFL	Nasofibrolaringoscopia
p21	Proteína 21
p53	Proteína tumoral p53
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
RS	Rio Grande do Sul
SD	Desvio-padrão (do inglês, <i>standard deviation</i>)
SPSS	Pacote estatístico para Ciências Sociais (do inglês, <i>Statistical Package for The Social Sciences</i>)
TNM	Classificação da <i>American Joint Committee on Cancer</i> para Tumor/Nódulos/Metástases
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
χ^2	Qui-quadrado (do inglês, <i>chi-square</i>)
TP53	Proteína tumoral p53 (do inglês, <i>tumor protein 53</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	JUSTIFICATIVA	12
1.2	OBJETIVOS	12
1.2.1	Objetivo geral	12
1.2.2	Objetivos específicos	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	CÂNCER: UM BREVE RESUMO.....	14
2.2	CONTROLE DO CÂNCER.....	14
2.3	PREVENÇÃO DE CÂNCER E DETECÇÃO PRECOCE.....	15
2.3.1	Gestão em câncer	16
2.3.2	Gerenciamento do câncer: diagnóstico e estadiamento	17
2.4	DADOS SOBRE CÂNCER NO BRASIL	18
2.5	LARINGE: DEFINIÇÃO, ANATOMIA E FISIOLOGIA	18
2.6	TUMORES MALIGNOS DE LARINGE	19
2.7	FATORES ETIOLÓGICOS E SUA RELAÇÃO COM OS TUMORES MALIGNOS DE LARINGE	19
2.8	ESTADIAMENTO E DIAGNÓSTICO	20
2.8.1	Classificação TNM	21
2.9	p53	22
3	METODOLOGIA	25
3.1	DELINEAMENTO.....	25
3.2	PERÍODO DE COLETA DE DADOS.....	25
3.3	POPULAÇÃO-ALVO, AMOSTRA, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	25
3.3.1	População-alvo	25
3.3.2	Amostra	25
3.3.3	Critérios de inclusão	25
3.3.4	Critérios de exclusão	26
3.4	ENTREVISTADORES.....	26
3.5	VARIÁVEIS COLETADAS	26
3.5.1	Variáveis coletadas em prontuários	26
3.5.2	Variáveis coletadas nas amostras cirúrgicas	26
3.6	BANCO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
3.7	ASPECTOS ÉTICOS	28
3.8	RISCOS E BENEFÍCIOS.....	29
4	ARTIGO EM PORTUGUÊS	30
5	ARTIGO EM INGLÊS	47
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXO A – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS	68
	ANEXO B – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE	69
	ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UFSM	70
	ANEXO D – APROVAÇÃO DA EMENTA NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UFSM	73
	ANEXO E – NORMATIVAS DA REVISTA PARA PUBLICAÇÃO	76

1 INTRODUÇÃO

Os cânceres de cabeça e pescoço possuem etiologias multifatoriais e são conhecidos por seu agressivo comportamento locorregional (ALVARENGA *et al.*, 2008). Atualmente, o câncer de laringe ocupa a sexta posição nas causas de morte no mundo, tendo uma sobrevida global de cerca de 40%, considerando todos os estágios da doença (ALVARENGA *et al.*, 2008; COLOMBO, RAHAL, 2009; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER..., 2017).

De acordo com dados e estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de óbitos relacionados ao câncer – considerando todas as localizações – aumentou de 6 milhões, no ano 2000, para 7,6 milhões, em 2007. Os dados revelam um aumento de 32% na magnitude das mortes entre 2000 e 2007. Segundo o Instituto Nacional do Câncer, em 2007, o câncer foi responsável por 13% de todas as mortes em todo o mundo (FACINA, 2014).

O tipo histológico mais frequentemente encontrado é o carcinoma de células escamosas, associado, principalmente, ao uso de álcool e tabaco. Os indivíduos mais acometidos pelo câncer são pacientes do sexo masculino, embora tenha havido, nos últimos anos, um aumento no número desses cânceres entre mulheres tabagistas (ALVARENGA *et al.*, 2008).

O tratamento se baseia-se em classificações tradicionais, como tamanho tumoral, local e presença de metástases regionais ou à distância. No entanto, com o entendimento mais apurado da biologia molecular, percebeu-se que características histológicas também estão associadas à agressividade tumoral e à sua recorrência (ALVARENGA *et al.*, 2008; COLOMBO, RAHAL, 2008).

A recidiva locorregional e as metástases são os principais fatores que comprometem a sobrevida desses pacientes a despeito do avanço das tecnologias empregadas no tratamento (ALVARENGA *et al.*, 2008). Muitas vezes, o mesmo estadiamento clínico apresenta padrões de crescimento e evolução divergentes, demonstrando a necessidade de avaliar outros parâmetros para uma análise mais adequada do prognóstico da doença (CHUNG, LEVY, YARBROUGH, 2006; COLOMBO, RAHAL, 2009).

Tendo em mente a relevância do câncer na população brasileira e seu impacto nas ações do sistema de saúde, o monitoramento das tendências de mortalidade ao longo do tempo e o conhecimento sobre os futuros padrões de mortalidade são relevantes para o planejamento e a avaliação das políticas de controle do câncer. Tais aspectos também são importantes para a implementação de métodos para detecção e tratamento precoces, com direcionamento para as áreas mais vulneráveis (TANNURE; PINHEIRO, 2010).

Marcadores moleculares, como a análise da influência do p53 na fisiopatologia dos tumores de laringe, têm sido investigados para auxiliar o diagnóstico precoce e o prognóstico da doença. O p53 atua como um gene supressor tumoral que regula a proliferação celular e impede que as células se tornem malignas. Porém, quando mutações ocorrem nesse gene, há um aumento na sua concentração intracelular, desregulando o ciclo celular fisiológico (ALVARENGA *et al.*, 2008).

Portanto, a pesquisa do p53 em espécimes cirúrgicos é primordial para determinar a relação desse gene com o prognóstico do câncer de laringe, favorecendo, assim, o aumento da sobrevida dos pacientes e a utilização de abordagens cirúrgicas com menor morbidade (KARP, 2005; ALVARENGA *et al.*, 2008).

1.1 JUSTIFICATIVA

Mensalmente, no Hospital Universitário de Santa Maria (Husm), são realizadas cerca de quatro laringectomias – sejam laringectomias parciais ou totais – após o diagnóstico de câncer de laringe. Dispor de dados para avaliar, com maior clareza, o prognóstico dessa doença e aperfeiçoar o método diagnóstico por meio da biologia molecular auxiliará no atendimento aos pacientes e no entendimento dessa patologia.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Analisar a expressão imuno-histoquímica do marcador p53 nos cânceres de laringe dos pacientes tratados cirurgicamente no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Husm, RS/Brasil.

1.2.2 Objetivos específicos

- Descrever o perfil da população estudada;
- Verificar possíveis diferenças entre os gêneros dos pacientes e a expressividade do p53;
- Correlacionar a expressão imuno-histoquímica do p53 à idade dos pacientes;

- Correlacionar a expressão imuno-histoquímica do p53 ao estadiamento cirúrgico pré-operatório;
- Correlacionar a expressão imuno-histoquímica do p53 ao acometimento e à disseminação linfonodal;
- Correlacionar a expressão imuno-histoquímica do p53 às margens cirúrgicas;
- Correlacionar a expressão imuno-histoquímica do p53 à taxa de recidiva;
- Correlacionar a expressão imuno-histoquímica do p53 ao tempo de sobrevida dos pacientes;
- Definir fatores de risco para alta expressão imuno-histoquímica do p53.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER: UM BREVE RESUMO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm, em comum, o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de célula no corpo. Segundo o Instituto Nacional do Câncer, o crescimento das células forma uma massa de tecidos conhecida como tumor, o qual pode ser benigno ou maligno e se espalhar para outras regiões do corpo, processo denominado metástase (SANTOS, 2018).

Trata-se de um grande problema universal de saúde pública, sendo a segunda causa de morte nos Estados Unidos da América (EUA), apresentando, também, grande impacto na saúde da população brasileira. Dados estatísticos sobre o câncer são coletados ao longo de dois a quatro anos de pesquisa, tempo necessário para coleta de informações, compilação, controle de qualidade e disseminação de dados.

Estudos apontam que os cânceres mais comuns em homens seguem sendo os de pulmão, de próstata e colorretal, representando 42% de todas as incidências. Já em mulheres, os três cânceres mais comuns são de mama, de pulmão e colorretal, representando, juntos, a metade de todos os casos (BARBOSA, 2015).

O câncer pode acometer múltiplos órgãos do corpo humano, sendo caracterizado por modificações do DNA e exacerbada multiplicação celular, podendo formar tumores malignos capazes de se multiplicar para outras regiões e levar o indivíduo à morte. Em todo o mundo, aproximadamente 8,8 milhões de pessoas morrem de câncer, e a maioria reside em países desenvolvidos. No ano de 2015, o câncer, a diabetes, as doenças cardiovasculares e as doenças crônicas do pulmão, juntas, mataram cerca de 40 milhões de pessoas, aproximadamente 70% das 56 milhões de mortes (OMS, 2017).

2.2 CONTROLE DO CÂNCER

Os elementos básicos do controle do câncer são os mesmos em todo o mundo: planejamento, prevenção, detecção precoce (rastreamento), tratamento e diagnóstico, incluindo cuidados paliativos entregues por uma equipe multidisciplinar e apoio psicossocial para pacientes e familiares (CURADO; SOUZA, 2014).

Para que o controle do câncer avance de forma sistemática, a gestão requer, no mínimo, configuração de prioridades e orçamento, o que exige uma compreensão dos problemas relacionados à doença que existem em um país e os meios disponíveis para abordá-los. O processo pelo qual isso ocorre é, logicamente, o planejamento do controle do câncer e a análise da situação de saúde, que pode ser local, regional ou nacional.

Devido às diferenças entre os países, o planejamento e os programas de controle do câncer devem ser adaptados às situações de cada país, levando em consideração as realidades do tempo e do lugar. No final, um planejamento e um plano de controle e/ou tratamento de câncer adequados podem ser limitados a uma ou algumas atividades ou podem ser mais abrangentes. Planos e programas devem ser revisados em poucos anos e mudar conforme as necessidades e os recursos determinam (CURADO; SOUZA, 2014).

A OMS tem sido líder mundial na promoção e na orientação para o planejamento de programas de controle de câncer. Em 2001, menos de metade dos 167 Estados-membros da OMS que responderam a uma pesquisa relataram ter um plano para atingir o câncer ou outras doenças crônicas. Oitenta por cento dos países africanos não tinham planos nacionais (AL WAN., 2001). Para abordar isso, a OMS produziu uma edição atualizada dos Programas Nacionais de Controle do Câncer: Diretrizes de Política e Gerenciamento (OMS, 2002).

Essas diretrizes fornecem orientações sobre planejamento, implementação, gerenciamento e avaliação de programas de câncer para ajudar os formuladores de políticas e os gerentes de programas a usarem os recursos disponíveis. Elas descrevem a base científica para a prevenção, a detecção precoce, a cura e os cuidados do câncer. As diretrizes também discutem a adequação de tecnologias específicas e descrevem como gerenciar programas nacionais adaptados às diferentes configurações de recursos.

Em maio de 2005, os 192 países membros da 58ª Assembleia Mundial da Saúde, órgão governante da OMS, aprovaram uma resolução que exorta todos os Estados-membros da OMS a desenvolverem programas nacionais de câncer que cubram medidas preventivas, detecção precoce e rastreamento, tratamento e cuidados paliativos.

2.3 PREVENÇÃO DE CÂNCER E DETECÇÃO PRECOCE

Impedir que o câncer ocorra (prevenção primária) é a maneira mais definitiva de diminuir o fardo do câncer. O desenvolvimento de estratégias de prevenção primária exige saber algo sobre as causas ou os fatores de risco associados ao câncer. Se a causa ou o fator de risco pode ser eliminado ou reduzido, a prevenção é possível mediante a modificação do

comportamento, a modificação do meio ambiente ou, no caso de agentes infecciosos, a vacinação ou o tratamento (CONCEIÇÃO; BOING; PERES, 2014).

Não surpreendentemente, a maioria das evidências sobre prevenção de câncer e detecção precoce se relaciona a países de alta renda. A única causa modificável do câncer que anula todas as outras é o uso do tabaco. Felizmente, as intervenções específicas são conhecidas por trabalhar na redução do uso do tabaco. Devido à grande carga de câncer de agentes infecciosos, a prevenção por meio da vacinação ou do tratamento é um foco importante. Quando se trata de outras medidas preventivas, sabe-se muito sobre o que poderia ser feito: ter uma dieta saudável, manter um peso saudável, exercitar-se, não beber muito álcool, etc. Mas como motivar essas mudanças nas pessoas ainda é um campo em desenvolvimento (CONCEIÇÃO; BOING; PERES, 2014).

O rastreio de estágios iniciais do câncer ou estados pré-cancerosos é outra estratégia para reduzir a taxa de mortalidade por câncer, assumindo que o gerenciamento adequado está disponível quando uma condição tratável é detectada. O rastreio que atinge uma proporção substancial da população requer infraestrutura significativa para a seleção em si, bem como a capacidade de tratamento. Seja em um país, um estado ou uma cidade, embarcar em um programa de triagem dependerá do estado de prontidão para lidar com ambos os aspectos – seleção e gerenciamento (CONCEIÇÃO; BOING; PERES, 2014).

2.3.1 Gestão em câncer

Quando se suspeita de câncer em um indivíduo, seja por meio de um teste de triagem ou por sinais e sintomas que levem a pessoa a procurar cuidados, uma série de serviços pode ser necessária. Idealmente, a pessoa teria acesso a serviços de diagnóstico adequados ao tipo e ao estágio do câncer, se um câncer é, de fato, diagnosticado. Para algumas pessoas, isso significa um tratamento potencialmente curativo, com cirurgia, radioterapia ou quimioterapia ou, muito mais frequentemente, uma combinação dessas modalidades, aplicada por uma equipe médica multidisciplinar trabalhando em conjunto. Mesmo nos primeiros estágios tratáveis e, muitas vezes, como resultado do tratamento, os cuidados paliativos para o controle de sintomas podem ser benéficos (CONCEIÇÃO; BOING; PERES, 2014).

2.3.2 Gerenciamento do câncer: diagnóstico e estadiamento

Um diagnóstico preciso é fundamental para que o paciente receba cuidados adequados para o câncer. Os testes diagnósticos incluem técnicas de imagem, de laboratório e de patologia, além de exame físico. As mesmas técnicas são aplicáveis ao diagnóstico e ao estadiamento iniciais e, quando necessárias, novas avaliações são realizadas para determinar o estado de um paciente em pontos de tempo posteriores. Como é o caso de outros aspectos do gerenciamento do câncer, técnicas de diagnóstico novas e mais sofisticadas (geralmente mais caras) foram adicionadas às técnicas tradicionalmente disponíveis, exigindo que escolhas sejam feitas quando os recursos são limitados. Um diagnóstico pode exigir um ou mais testes em sequência (SIEGEL; MILLER; JAMAL, 2018).

A imagiologia inclui radiografias convencionais, ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética. Esses métodos são utilizados para visualizar a anatomia dos tumores. Dois tipos de técnica de imagem nuclear foram recentemente adicionados às modalidades de imagem de câncer: tomografia por emissão de pósitrons e tomografia computadorizada de emissão de fótons únicos. Essas técnicas detectam a atividade metabólica em células e podem diferenciar células de câncer por seus diferentes níveis de atividade (BOING; ANTUNES, 2011).

Testes laboratoriais incluem testes em sangue, tais como: biópsia, urina, outros fluidos e tecidos. Os espécimes são coletados por flebotomia, citologia de aspiração com agulha fina ou biópsia de agulha fina e procedimentos cirúrgicos. Além dos testes que visam, diretamente, às células cancerosas, outros tipos de testes para avaliar a função hepática ou procurar marcadores tumorais (compostos biológicos ou químicos que podem aumentar quando o câncer está presente) podem fornecer informações sobre o estado do câncer.

O exame patológico para a maioria dos tumores sólidos requer excisão cirúrgica de uma amostra do tumor, uma biópsia. As células encontradas nos fluidos corporais também são avaliadas por técnicas patológicas. A avaliação microscópica do tecido é realizada para determinar o tamanho do tumor, seu crescimento em outros tecidos e órgãos, o tipo de células cancerígenas e o grau do tumor (o quanto as células cancerígenas se assemelham às do tecido normal).

Informações adicionais sobre cânceres são encontradas durante a cirurgia. Os relatórios cirúrgicos descrevem o tamanho e a aparência dos tumores e podem incluir observações sobre os gânglios linfáticos e os órgãos próximos (SIEGEL; MILLER; JAMAL, 2018).

2.4 DADOS SOBRE CÂNCER NO BRASIL

As taxas de mortalidade por câncer no Brasil estão bem abaixo das taxas de países desenvolvidos e em uma faixa similar às verificadas em países em desenvolvimento. Essa tendência geral de redução das taxas padronizadas de mortalidade por câncer no Brasil é corroborada por outro estudo brasileiro que observou comportamento similar nas capitais dos estados, indicando redução nas taxas específicas de idade até a idade de 69 anos para ambos os sexos. Ainda assim, desde 1980, o Brasil vem apresentando um aumento de mortalidade por câncer (PEREA *et al.*, 2018).

No entanto, as tendências estáveis e/ou decrescentes para a mortalidade por câncer no Brasil estão na direção oposta das perspectivas para a América Latina, seguindo as tendências dos países mais desenvolvidos. Na América Latina, as estimativas indicam um aumento de incidência de 72% e um aumento de 78% na mortalidade de homens entre 2011 e 2030. Para as mulheres, essas taxas são, respectivamente, 62% e 74% (BOING; ANTUNES, 2011).

A diminuição da tendência de mortalidade em todos os tipos de câncer aqui observadas são o resultado da soma dos comportamentos das tendências individuais do câncer. Entre as mudanças epidemiológicas sofridas pelo Brasil nas últimas décadas, um comportamento específico no perfil de mortalidade para alguns tipos de câncer deve ser destacado. Exemplos incluem câncer de próstata, de pulmão e colorretal, os quais, nas últimas décadas, permanecem com tendências ascendentes (PEREA *et al.*, 2018).

2.5 LARINGE: DEFINIÇÃO, ANATOMIA E FISILOGIA

A laringe é um órgão responsável por diversas atividades fisiológicas. O conhecimento anatômico e fisiológico da laringe é fundamental para qualquer pessoa que se proponha a tratar pacientes e doenças com base nesse órgão.

Anatomicamente, a laringe é um órgão tubular, músculo-cartilaginoso, ímpar, localizado na linha mediana, anterior e cervical ao nível de C3-C5. Didaticamente, é dividida em supraglote, glote e infraglote.

Sua função primordial é ser uma válvula de proteção para as vias aéreas e participar da vocalização (BEHLAU; AZEVEDO; MADAZIO, 2001).

2.6 TUMORES MALIGNOS DE LARINGE

Mundialmente, estima-se o surgimento de 780.000 novos casos de tumores de laringe por ano, ocupando a quinta posição na lista de neoplasias mais frequentes e sendo considerado a sexta maior causa de morte no mundo (ALVARENGA *et al.*, 2008; COLOMBO, RAHAL, 2009). Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (Inca) de 2016, levando-se em consideração somente os tumores de vias aéreas, os cânceres de laringe ocupam a sétima posição entre as neoplasias mais frequentes no Brasil.

Os tumores malignos de laringe são classificados de acordo com a sua histologia: espinocelular, verrucoso (1-2%), de glândulas salivares menores, paragangliomas, adenocarcinomas, sarcomas, linfomas e neuroendócrinos. O tipo histológico mais comumente encontrado é o carcinoma espinocelular, ocorrendo em cerca de 90% do número total de casos de tumores da laringe, entre os quais 40% se localizam na cavidade oral, 15% na faringe, 25% na laringe e o restante nas demais glândulas (NADAL *et al.*, 1995).

Segundo a análise do *SEER Cancer Statistics NCI* (2003-2007), a idade média de morte por câncer de laringe é 68 anos. O sexo masculino é o mais acometido pela doença, padrão que vem se modificando nos últimos anos devido às mudanças de hábitos de vida, como o aumento do tabagismo entre as mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER..., 2019; JÄCKEL *et al.*, 2000).

Os principais fatores etiológicos associados ao desenvolvimento desses tumores são o papilomavírus humano (HPV), o álcool e o cigarro (PAI *et al.*, 1998).

2.7 FATORES ETIOLÓGICOS E SUA RELAÇÃO COM OS TUMORES MALIGNOS DE LARINGE

Todo tipo de célula acometida persistentemente por agentes de risco, como o álcool e o tabaco, por exemplo, pode desenvolver uma neoplasia (SPAFFORD, KOEPPE, PAN, 1996; HIRVIKOSKI *et al.*, 1997).

Entre os agentes mutagênicos e carcinogênicos do cigarro, podemos citar: a nicotina, o alcatrão, a amônia, o monóxido de carbono, o dióxido de carbono, o formaldeído, a acroleína, a acetona, os benzopirenos, a hidroxiquinona, o óxido de azoto e o cádmio. Assim como essas substâncias, o consumo de álcool também pode contribuir para a carcinogênese das células devido à supressão da resposta imune inata, pois, no álcool – principal constituinte da bebida

alcoólica –, a ação cancerígena está relacionada à sua oxidação em acetaldeído (COLOMBO; RAHAL, 2009).

O desenvolvimento do tumor inicia-se pela agressão persistente de carcinógenos no epitélio celular normal, determinando hiperplasia da mucosa com ou sem metaplasia. Conseqüentemente, mantendo essa exposição sobre as células, ocorrerá displasia em menor ou maior grau e, quanto maior o grau da displasia, maior a probabilidade de transformação em um carcinoma invasivo. A displasia leve, moderada e grave transforma-se em carcinoma invasivo em, proporcionalmente, 7%, 18% e 24% dos pacientes, respectivamente (KARP, 2005).

Outro fator de risco também relacionado ao câncer de laringe é a infecção pelo HPV. Pertencentes à família *papillomaviridae*, esses são vírus de DNA (ácido desoxirribonucleico) com intenso tropismo pelo epitélio escamoso, levando à sua replicação dentro do núcleo das células. Logo após a infecção, há a expressão da região E, local no qual são codificadas as proteínas envolvidas na regulação da síntese de DNA.

O HPV é classificado em baixo e alto risco, de acordo com as variações genotípicas da sequência de base do DNA: E6 e E7. Os de baixo risco incluem os HPVs 6,11,42 e 43, e os de alto risco incluem os de número 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51,52 e 58. Mais de 200 tipos de HPV foram identificados, mas nem todos os tipos estão relacionados ao aparecimento de cânceres. Aqueles ditos de alto risco estão mais associados à doença maligna, sendo o subtipo 16 o mais relacionado aos tumores de laringe (ALVARENGA *et al.*, 2008).

Estudos epidemiológicos também vêm demonstrando que diferenças genéticas próprias do indivíduo influenciam na carcinogênese desses tumores, justificando o fato de que, entre indivíduos expostos aos mesmos fatores de risco, somente uma parcela deles desenvolverá câncer (KUMARB *et al.*, 2008).

2.8 ESTADIAMENTO E DIAGNÓSTICO

Os tumores de laringe são estadiados mediante exame clínico, nasofibrolaringoscopia e exames de imagem (tomografia computadorizada, por exemplo). Um exame detalhado da área laríngea é a base da avaliação de pacientes com queixas vocais. Equipamentos de alta tecnologia proporcionaram a visualização mais detalhada da anatomia do trato vocal, sendo o nasofibrolaringoscópio o equipamento mais importante deles. O nasofibrolaringoscópio é utilizado para se visualizar estruturas laríngeas por meio de uma câmera de alta resolução, que aumenta significativamente o tamanho das estruturas anatômicas e as reproduz em uma tela acoplada ao equipamento. O exame pode ser realizado indiretamente por espelho, fibra óptica

flexível, laringoscópio rígido ou diretamente através do laringoscópio de suspensão. O diagnóstico definitivo é realizado com a análise histopatológica da biópsia, realizada no exame nasofibrolaringoscópico ou na laringoscopia de suspensão (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER..., 2019).

2.8.1 Classificação TNM

O *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) define a classificação dos cânceres de laringe de acordo com o TNM (tumor/nódulos/metástases) conforme as alterações visualizadas pelo exame clínico, pela nasofibrolaringoscopia, pelo raio X de tórax e pela tomografia computadorizada de pescoço com contraste. Essa classificação divide a laringe didaticamente, em três subníveis: supraglótico, glótico e infraglótico, determinando um estágio TNM diferente para cada localização, conforme ilustrado na seguinte tabela:

Tabela 1 – NCCN Guidelines Version 2.2011 Staging Head and Neck Cancers. American Joint Committee of Cancer (AJCC) TNM Staging System for the Larynx (7th ed., 2010).
(continua)

Tumor Primário (T)
Tx Tumor primário não pode ser acessado
T0 Não há evidências de tumor
Tis Carcinoma in situ
Supraglote
T1 Tumor limitado a um subsítio da supraglote com mobilidade da prega vocal normal
T2 Tumor invade mucosa em mais de um subsítio da supraglote ou glote ou região for a da supraglote (ex.: mucosa da base da língua, valécula, parede medial do seio piriforme) sem fixação da laringe
T3 Tumor limitado a laringe com fixação da corda vocal e/ou invade qualquer área pós-cricóide seguinte, espaço pré-epiglótico, espaço paraglótico, e/ou invasão da cortical da cartilagem tireoide.
T4a Doença moderadamente avançada. Tumor invade através da cartilagem tireoide e/ou invade tecidos adjacentes a laringe (ex.: traqueia, tecidos moles do pescoço incluindo músculos extrínsecos da língua, músculo infra-hioideos, tireoide ou esôfago)
Glote
T1 Tumor limitado a corda vocal (pode envolver comissura anterior ou posterior) com mobilidade normal.
T1a Tumor limitado em uma corda vocal
T1b Tumor envolve ambas cordas vocais.
T2 Tumor estende para supraglote e/ou subglote, e/ou com paralisia da mobilidade da corda vocal
T3 Tumor limitado na laringe com fixação da corda vocal e/ou invasão do espaço paraglótico, e/ou invasão cortical da cartilagem tireoidea.
T4a Doença moderadamente avançada localmente - tumor invade através da cortical da cartilagem tireoidea e/ou invade tecidos adjacentes a laringe (ex.: traqueia, tecidos moles do pescoço incluindo músculos extrínsecos profundos da língua, músculos infra-hioideos, tireoide ou esôfago.)
T4b Doença muito avançada - Tumor invade espaço pré-vertebral, adventícia da artéria carótida ou invade estruturas mediastinais.

Tabela 1 – NCCN Guidelines Version 2.2011 Staging Head and Neck Cancers. American Joint Committee of Cancer (AJCC) TNM Staging System for the Larynx (7th ed., 2011).
(conclusão)

Infraglote
T1 Tumor limitado a infraglote
T2 Tumor com extensão para corda vocal com mobilidade ou estrutura normal
T3 Tumor limitado na laringe com fixação da corda vocal.
T4a Doença moderadamente avançada localmente - tumor invade através da cortical da cartilagem tireóidea e/ou invade tecidos adjacentes a laringe (ex.: traquéia, tecidos moles do pescoço incluindo músculos extrínsecos profundos da língua, músculos infra-hioideos, tireóide ou esôfago.)
T4b Doença muito avançada - Tumor invade espaço pré-vertebral, adventícia da artéria carótida ou invade estruturas mediastinais.

Fonte: National Comprehensive Cancer Network (2011).

2.9 P53

O gene TP53 (*tumorprotein p53*), por exemplo, é considerado um gene supressor tumoral que regula a proliferação celular e impede as células de se tornarem malignas. Está localizado no cromossomo 17p13, gene que codifica proteínas que transmitem sinais regulatórios do crescimento celular (RUIZ *et al.*, 2006; COLOMBO, RAHAL, 2009; JÄCKEL *et al.*, 2000; KOKOSKA *et al.*, 1996; SPAFFORD, KOEPPE, PAN, 1996; MIGUEL-LUKEN, CHAVES-CONDE, CARNERO, 2016; PESCHOS *et al.*, 2005; NYLANDER, DABELSTEEN, HALL, 2000; KHADEMI *et al.*, 2002).

Em resposta aos danos no DNA, a produção da proteína p53 é aumentada, induzindo à parada do ciclo celular na transição G1/S. Se o dano for irreparável, a proteína p53 pode iniciar a morte celular por apoptose (ALVARENGA *et al.*, 2008). Em geral, nas células normais, a concentração da proteína p53 é baixa e sua meia vida é curta (20 minutos) (COLOMBO; RAHAL, 2009). Caso haja mutação no TP53, seu produto proteico estará presente em altas concentrações. Mutações, especialmente nos éxons 5-8 ou 5-9, tem sido encontradas em cerca de 60% dos casos de câncer de cabeça e pescoço (COLOMBO, RAHAL, 2009; MIGUEL-LUKEN, CHAVES-CONDE, CARNERO, 2016).

As mutações no gene TP53 e a expressão da proteína p53 mutada estão associadas ao aumento do risco de recorrência do tumor com índices reduzidos de sobrevida global e de tempo livre de doença, principalmente nos cânceres de laringe (COLOMBO, RAHAL, 2009; JACKEL *et al.*, 2000; JIN *et al.*, 1998; MIGUEL-LUKEN, CHAVES-CONDE, CARNERO, 2016; YANG *et al.*, 2014; ALLEGRA *et al.*, 2003; JALALI *et al.*, 2011; NATHAN *et al.*, 2000; OZTURK *et al.*, 2014; VIELBA *et al.*, 2003; PUKKILA *et al.*, 2002).

Jäckel *et al.* (2000) constataram que altos níveis de positividade do p53 estavam associadas a estádios avançados do tumor e à alta atividade mitótica das células, repercutindo em um tempo reduzido de sobrevida geral dos pacientes. Peschos *et al.* (2005) observaram que a superexpressão do p53 em estádios avançados da doença está associado a um aumento do risco de recorrência locorregional, comprometendo seu prognóstico.

Um trabalho que se destacou por mostrar um resultado totalmente diferente da literatura, demonstrando um prognóstico positivo em relação ao p53, foi o de Hirvikoski *et al.* (1997). Nesse estudo, realizado com 103 pacientes com câncer de laringe, a superexpressão do p53 mostrou um melhor prognóstico no tempo total de sobrevida e do tempo livre de doença. No entanto, o trabalho apresenta vários vieses, o que pode ter gerado esse resultado é que nem toda proteína p53 expressa é determinada por uma mutação.

Kumarb *et al.* (2008) avaliaram a associação da p53 e do Bcl-xL como preditores de preservação da laringe após a realização da quimioterapia em estádios avançados. A baixa expressão do p53 e A baixa expressão do Bcl-xL tiveram 100% de resposta na preservação da laringe. Com expressão aumentada do Bcl-xL, de maneira independente aos valores de expressão do p53, houve a preservação da laringe em 50% nos casos do p53 baixo e em 76% dos casos com o p53 alto. Isso deixou evidente a importância desses marcadores no estabelecimento da conduta terapêutica (KUMARB *et al.*, 2008).

Sarafoleanu *et al.* (2009) determinaram a importância do p53 associado ao PCNA e à Ki-67 no grau de diferenciação do carcinoma epidermoide de laringe nos estádios avançados. Os resultados encontrados foram que valores da expressão do p53 (20-60%), PCNA (60-80%) e de Ki-67(> 40%) estão relacionados diretamente à agressividade tumoral.

Nos estádios iniciais dos tumores de laringe, Simsek *et al.* (2014) demonstraram uma expressão de 49,9% do marcador p53 na carcinogênese do tumor, mas não houve associação com o prognóstico da doença. Yang *et al.* (2014) demonstraram a expressividade do p53, da p21 e da Cdc2 nas margens de tumores precoces da laringe. A recorrência local do tumor estava diretamente relacionada a esses marcadores em 71,4%, 50,0% e 57,1%, respectivamente.

Allegra *et al.* (2003) correlacionaram a expressão da proteína p53 nas bordas adjacentes aos tumores de 39 pacientes tratados com laser de CO₂. Como resultado, encontraram uma relação positiva entre o p53 e a recorrência local do tumor. O tempo livre de recidiva foi menor entre os pacientes com superexpressão do p53 (68,4%) se comparados aos pacientes com p53 negativo (94,7%). Com esses resultados, percebeu-se que a adjuvância com radioterapia ou radioterapia e quimioterapia tem um papel primordial no controle de recorrência e de tempo livre de doença (YANG *et al.*, 2014; ALLEGRA *et al.*, 2003; JALALI *et al.*, 2011).

As pesquisas têm sido contínuas devido à diversidade de resultados com marcadores moleculares, sendo a maioria delas retrospectivas e com amostras pequenas (TANDON *et al.*, 2010; FRIEDMAN *et al.*, 2001; SMARDOVA *et al.*, 2004). Muitos autores têm estudado a associação desses marcadores para uma melhor compreensão da biologia molecular e seu papel na história natural da doença (CANEVARI, ROGATTO, 2004; VIELBA *et al.*, 2003; FRIEDMAN *et al.*, 2001; PUKKILA *et al.*, 2002). O maior objetivo dessas pesquisas é estabelecer uma conduta terapêutica mais adequada, buscando, sempre que possível, a cura e a preservação funcional da laringe (KUMARB *et al.*, 2008; MIGUEL-LUKEN, CHAVES-CONDE, CARNERO, 2016; KARP, 2005; CANEVARI, ROGATTO, 2004).

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO

Estudo de coorte prospectivo.

3.2 PERÍODO DE COLETA DE DADOS

Os dados foram coletados de janeiro de 2014 a janeiro de 2018.

3.3 POPULAÇÃO-ALVO, AMOSTRA, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

3.3.1 População-alvo

Pacientes com o diagnóstico de câncer de laringe tratados de forma cirúrgica pela equipe do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Universitário de Santa Maria (Husm). Atenta-se que essa população-alvo foi a população previamente estudada no projeto de pesquisa vinculado à Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Caminha Vidal, já aprovado pelo Gabinete de Projetos do Husm e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.3.2 Amostra

Realizou-se o cálculo amostral utilizando o *sample size calculator* do site surveysystem.com/sscalc.htm, com base no artigo de Allegra *et al.* (2003). Considerando a população de 38 sujeitos utilizada pelos autores, a prevalência encontrada para expressão da proteína tumoral p53 foi de 48,7%. Utilizando esse valor e considerando um desvio de ± 4 e um erro amostral de 5% com um nível de confiança de 95%, obtivemos uma amostra necessária variando entre 26 e 38 sujeitos.

3.3.3 Critérios de inclusão

Todos os pacientes com o diagnóstico de câncer de laringe tratados de forma cirúrgica pela equipe do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Husm no período determinado pelo estudo.

3.3.4 Critérios de exclusão

- Os pacientes que realizaram tratamento prévio de quaisquer tipos em outros serviços;
- Os pacientes que, por qualquer motivo, perderam o acompanhamento clínico com a equipe responsável durante o período determinado pelo estudo.

3.4 ENTREVISTADORES

Os dados foram coletados pelos investigadores do estudo. Para a coleta de dados, foi utilizado um formulário (Anexo A), desenvolvido pelos autores do projeto.

3.5 VARIÁVEIS COLETADAS

3.5.1 Variáveis coletadas em prontuários

A coleta de dados foi realizada através da consulta desses dados no sistema de prontuário eletrônico (AGHU) vigente no Husm no período referido. Os dados coletados nos prontuários dos pacientes foram: idade, sexo, estadiamento clínico e acompanhamento clínico pós-operatório.

3.5.2 Variáveis coletadas nas amostras cirúrgicas

Os espécimes cirúrgicos ressecados em todas as cirurgias do Husm são encaminhados rotineiramente para o Serviço de Patologia. As peças são analisadas e guardadas em blocos de parafina para um possível estudo ou uma revisão posterior. Como o estudo se utilizou de peças cirúrgicas previamente ressecadas e já analisadas em projeto previamente aprovado – período de 2014 a 2018 –, utilizou-se uma análise histológica complementar através de um estudo imuno-histoquímico mais apurado, com vistas à identificação da expressividade do p53 nessas peças. Essa análise foi realizada sob os cuidados da patologista Dr.^a Alessandra Bastianello, médica contratada do Serviço de Patologia do Husm.

As amostras dos espécimes cirúrgicos ressecados foram processadas em blocos de parafina, a partir dos quais foram confeccionadas as lâminas para a análise imuno-histoquímica. Foram realizadas secções em micrótomo nos blocos de parafina sendo distendidos em lâminas com carga elétrica. Houve o preparo entre o antígeno da célula neoplásica com o anticorpo do

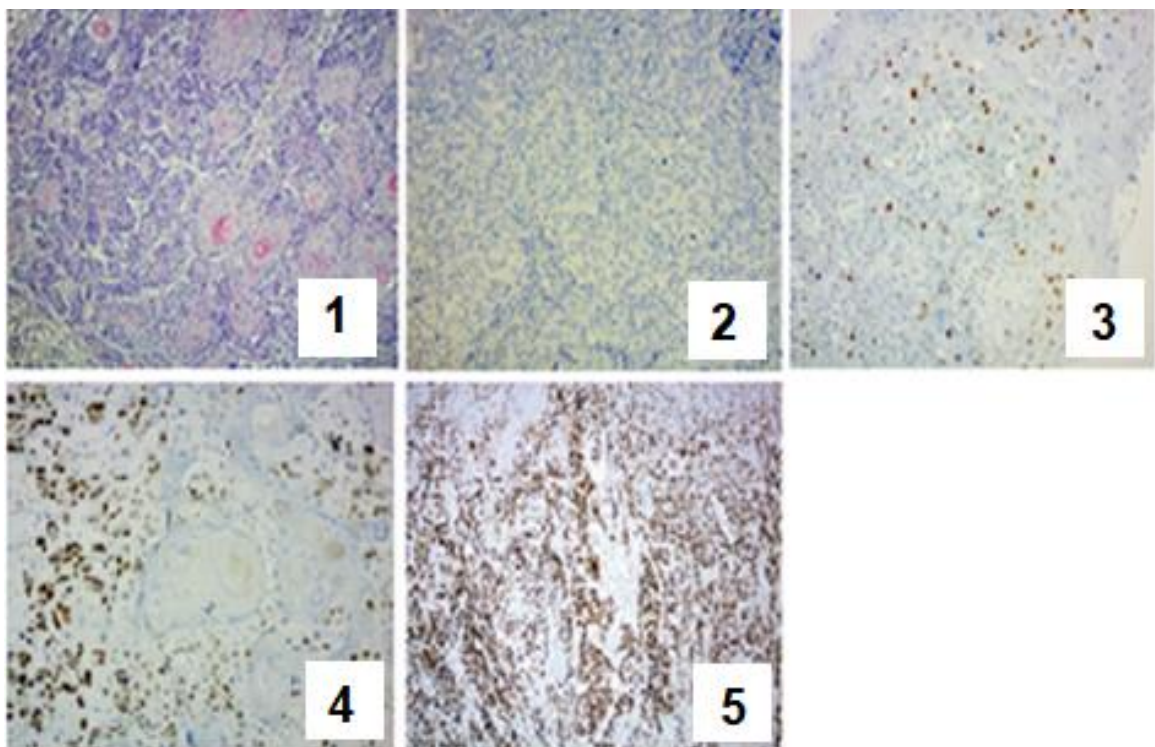
marcador em várias etapas da formação das lâminas para verificar sua imuno-histoquímica, sendo que, em todas as lâminas preparadas, foram verificadas a positividade do marcador p53.

A presença do marcador p53 foi verificada nos núcleos das células neoplásicas conforme sua intensidade de cor e classificados em um dos seguintes níveis (WANG *et al.*, 1993):

- **Negativo:** Ausência do marcador nos núcleos das células;
- **Nível A:** Leve intensidade: células isoladas com p53 positivo nos núcleos;
- **Nível B:** Moderada intensidade: agrupamentos de células com p53 nos núcleos;
- **Nível C:** Forte intensidade: extensão difusa de muitas células com p53 nos seus núcleos.

O preparo das lâminas e a imuno-histoquímica foram realizados em todos os casos por meio do equipamento BENCHMARK GX – VENTANA (Alemanha), seguindo o protocolo previamente padronizado pelo Serviço de Patologia do Husm para o marcador p53.

Figura 1 – Imagens microscópicas das lâminas com análise imuno-histoquímica do p53.



Legenda: 1) Hematoxilina-eosina; 2) Marcador p53 negativo; 3) Marcador p53 positivo nível A; 4) Marcador p53 positivo nível B; 5) Marcador p53 positivo nível C.

Fonte: Fotos cedidas do acervo desse trabalho realizadas pela Dr.^a Alessandra Saldanha Bastianello.

3.6 BANCO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Elaborou-se uma planilha contendo as variáveis coletadas no *Microsoft Excel 2017*. Após o término da coleta, essa tabela foi exportada para o *Statistical Package for The Social Sciences*, versão 18.0 (SPSS Inc., IBM Corporation, Armonk, NY). Ao término da coleta de dados, eles foram digitados em uma planilha do Excel® 2007. A análise estatística foi realizada usando o SPSS versão 18.0 (SPSS Inc., IBM Corporation, Armonk, Nova York). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade das variáveis quantitativas. As variáveis quantitativas normais foram descritas como média e desvio padrão (DP). As variáveis qualitativas foram descritas como frequências.

Um teste ANOVA foi utilizado para verificar as diferenças de idade entre algumas variáveis de grupos, e um teste Levene foi realizado para verificar a homogeneidade dos grupos. Quando a variável analisada apresentou mais de dois grupos, foi utilizado o teste Post-Hoc de Bonferroni para identificar em qual grupo a diferença estatística estava presente.

O teste do qui-quadrado foi utilizado para verificar a associação, e o teste de Spearman para verificar a correlação. Uma análise univariada considerando possíveis fatores de risco para a recorrência do tumor foi realizada usando a regressão proporcional ao risco de Cox. Todas as variáveis com valor de $p < 0,05$ foram incluídas no modelo de regressão proporcional ao risco de Cox com método reverso. Os fatores de risco que diminuiram o valor da razão de probabilidade foram excluídos automaticamente.

O modelo final foi selecionado com base na melhor razão de verossimilhança. Análises e gráficos de sobrevivência de Kaplan-Meier foram gerados, e um teste de Log Rank (Mantel-Cox) foi realizado para avaliar possíveis diferenças entre os grupos quanto ao tempo de sobrevida e ao tempo de sobrevida livre de tumor. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p bicaudal foi $< 0,05$.

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

Foi mantida a confidencialidade dos dados dos pacientes. Este estudo obedece às determinações da Resolução 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde.

Este projeto faz parte de um projeto maior, o qual já é registrado junto ao Gabinete de Projetos do Husm e aprovado pela Gerência de Ensino do Husm e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (CEP-UFSM) sob o número de registro no Gabinete de Projetos 039947 e na Plataforma Brasil 44642915.6.0000.5346. Foi realizada uma

complementação/ementa nesse projeto maior, com vistas à autorização para análise histológica mais apurada do p53 das peças de anatomopatológico já coletadas no projeto já aprovado. Portanto, não foram incluídos novos pacientes, apenas foi realizada uma análise extra nas amostras já coletadas no projeto já aprovado. Houve aprovação da análise histopatológica pelos órgãos competentes de pesquisa do Husm e da UFSM, da mesma forma que foi autorizada pelos pacientes através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto já aprovado e citado. Houve aprovação da ementa sobre a análise histológica e metodológica dos dados pelos mesmos órgãos competentes.

Serão divulgadas somente as análises estatísticas decorrentes do estudo em questão, não sendo divulgados nomes, registros ou quaisquer outras informações que possam identificar os pacientes participantes. O material produzido durante a coleta de dados está sob responsabilidade dos pesquisadores.

Todos os dados foram manejados e analisados de forma anônima, sem identificação nominal dos participantes da pesquisa. Os resultados decorrentes do estudo estão apresentados de forma agregada, não permitindo a identificação individual deles.

3.8 RISCOS E BENEFÍCIOS

Por fim, por se tratar de um estudo não intervencionista e que não interferiu ou alterou a rotina e/ou tratamento dos participantes da pesquisa, ele não apresentou ou adicionou riscos e prejuízos ao bem-estar dos pacientes incluídos no estudo.

4 ARTIGO EM PORTUGUÊS

ALTA EXPRESSIVIDADE DA PROTEÍNA TUMORAL P53 ASSOCIADA COM TABAGISMO COMO FATOR DE RISCO PARA RECORRÊNCIA DE TUMORES DE LARINGE. UM ESTUDO DE COORTE OBSERVACIONAL EM PACIENTES COM MARGENS CIRÚRGICAS LIVRES

Resumo

Importância: A influência dos marcadores moleculares, como o p53, na fisiopatologia dos tumores de laringe tem sido investigada nos espécimes cirúrgicos como um fator prognóstico de doença. Determinar a relação desse gene pode favorecer um aumento na sobrevida dos pacientes e facilitar a busca por pacientes mais susceptíveis à recorrência da doença.

Objetivo: Definir se a expressão do marcador p53 é fator de risco para recorrência tumoral. Definir sobrevida livre de doença e sobrevida global na população estudada.

Delineamento: Estudo de coorte prospectivo observacional, realizado em um hospital público terciário de janeiro de 2014 a janeiro de 2018. O tempo médio de seguimento dos pacientes em nossa coorte foi de $23,71 \pm 13,08$ meses (variando de 0,13 a 48,3).

Cenário: Hospital terciário público universitário.

Participantes: Amostra de conveniência de pacientes com diagnóstico de câncer de laringe tratados cirurgicamente. Foram incluídos inicialmente 59 pacientes, mas apenas 39 pacientes com margens cirúrgicas livres foram analisados.

Principal(is) resultado(s) e medida(s): Alcoolismo, tabagismo, localização anatômica, classificação TNM e presença de linfonodo metastático. Data da cirurgia, data do último acompanhamento (última consulta médica ou óbito) e data do diagnóstico de recorrência (se houver uma recorrência). Foram realizadas análises de associação, curvas de sobrevida global e livre de doença pelo método de Kaplan-Meier e análise de fatores de risco para recorrência tumoral através de regressão de Cox.

Resultados: A idade média dos pacientes foi de $63,74 \pm 9,16$ anos. Quatro pacientes apresentaram recidiva do tumor e três (75%) apresentavam nível C da p53 (intensidade forte ou alta expressividade); foi encontrada associação ($p = 0,023$) assim como uma correlação de intensidade moderada ($p = 0,031$ e $r = 0,362$) entre recorrência e alta expressividade da p53. A sobrevida dos pacientes com expressão positiva do gene p53 foi menor em comparação àqueles com expressão negativa ($p = 0,039$). Expressão positiva do p53 associada à classificação TNM e nível C da p53 (forte expressão do gene p53) associada ao tabagismo; foram fatores de risco estatisticamente significativos nas análises univariadas. O preditor de recorrência do tumor da laringe que permaneceu no modelo final de regressão de risco proporcional de Cox foi a forte expressão do p53 associada ao tabagismo (HR: 21,713).

Conclusão e Relevância: O tabagismo e a forte expressão do p53 são fatores de risco que, juntos, aumentam em 21 vezes a chance de recorrência de tumor laríngeo, reforçando a importância do p53 como um marcador útil durante o acompanhamento.

Introdução

O câncer de cabeça e pescoço possui etiologias multifatoriais e é conhecido por seu comportamento locorregional agressivo [1]. Atualmente, o câncer de laringe ocupa a sexta posição nas principais causas de morte do mundo, com uma taxa de sobrevivência global de cerca de 40%, considerando todas as fases da doença [1-3]. Considerando apenas os tumores das vias aéreas, o câncer de laringe corresponde à sétima posição no nosso país [3]. Pacientes do sexo masculino são os mais afetados, apesar de, nos últimos anos, os casos terem aumentado entre mulheres fumantes [1]. O carcinoma espinocelular é o tipo histológico mais frequentemente encontrado e está associado, principalmente, ao tabagismo e ao uso de álcool [1].

O tratamento é baseado em classificações tradicionais, como tamanho do tumor, invasão local e presença de metástases regionais ou à distância [2, 4]. No entanto, com o melhor entendimento da biologia molecular, observou-se que as características histológicas também estão associadas à agressividade e à recorrência do tumor [1, 2]. A recorrência e a metástase na região são os principais fatores que comprometem a sobrevida desses pacientes, apesar dos avanços e das tecnologias utilizadas no seu tratamento [1]. Além disso, apesar de ter o mesmo estágio clínico, diferenças na evolução e no crescimento do tumor têm demonstrado a necessidade da evolução dos parâmetros de estadiamento, bem como a necessidade de buscar novos parâmetros. Tais achados contribuiriam substancialmente para uma análise mais confiável do prognóstico e da sobrevida desses pacientes [2, 5].

Marcadores moleculares como a proteína p53 foram investigados para auxiliar no diagnóstico precoce, no prognóstico da doença e na análise de sua influência na fisiopatologia dos tumores de laringe. O p53 atua como um gene supressor de tumor, pois regula a proliferação celular e impede que as células se tornem malignas. Entretanto, quando ocorrem mutações nesse gene, ocorre um aumento na concentração intracelular, desregulando o ciclo celular fisiológico [1, 5]. Portanto, a busca de p53 em espécimes cirúrgicos é essencial para determinar a relação desse gene com o prognóstico do câncer de laringe, favorecendo o aumento da sobrevida dos pacientes e o uso de abordagens cirúrgicas com menor morbidade [1, 5].

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da proteína p53 em pacientes com tumores laríngeos com margem cirúrgica livre e os fatores de risco para recorrência do tumor.

Métodos

Desenho e Cenário do Estudo

Estudo de coorte prospectivo realizado em um hospital universitário público terciário no sul do Brasil, de janeiro de 2014 a janeiro de 2018. O estudo foi aprovado pelo conselho de revisão institucional (CAAE 44642915.6.0000.5346) e seguiu as diretrizes éticas da Declaração de 1975, de Helsinque. Este estudo segue a declaração de STROBE. Os pacientes participaram voluntariamente após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

População e Seleção de Pacientes

Inicialmente, foram selecionados os pacientes com diagnóstico de câncer de laringe tratados cirurgicamente pela equipe de cirurgia de cabeça e pescoço do hospital. Os critérios de exclusão foram pacientes que tiveram tratamento prévio de qualquer tipo em outros hospitais, pacientes que, por qualquer motivo, perderam o acompanhamento clínico durante o período de estudo e pacientes com margens cirúrgicas comprometidas.

Variáveis incluídas no estudo

Foram coletadas várias variáveis para o estudo, tais como: dados demográficos, condições predisponentes (alcoolismo e tabagismo), localização anatômica do câncer (supraglótico, glótico, infraglótico e Transglótico), a classificação de tumores malignos (TNM) [6], a presença de linfonodos comprometidos e se houve recorrência do câncer. O tratamento cirúrgico aplicado aos pacientes foi laringectomia total ou parcial. A data da cirurgia, a data do último acompanhamento (última consulta médica ou data do óbito) e os dados do diagnóstico de recorrência também foram coletados.

Análise imuno-histoquímica da proteína tumoral p53

Todos os pacientes incluídos no estudo e, portanto, submetidos ao tratamento cirúrgico, tiveram seus espécimes cirúrgicos analisados imuno-histoquimicamente. A positividade do marcador p53 foi investigada nas amostras. A expressão do marcador p53 foi avaliada através da análise dos núcleos das células neoplásicas de acordo com a sua intensidade. O número de células positivas foi avaliado como uma porcentagem da área do tecido com coloração positiva. Essa expressão é classificada de acordo com Wang *et al.* e Fouret *et al.* [7, 8] nos seguintes níveis:

- Negativo: ausência do marcador nos núcleos das células (<5%).
- Nível A; intensidade leve: células isoladas com coloração com p53 no núcleo (+) (5-30%).

- Nível B, intensidade moderada: aglomerados de células com p53 no núcleo (++) (30-50%).
- Nível C; intensidade forte: extensão difusa de muitas células com p53 no núcleo (+++) (> 50%).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o SPSS versão 18.0 (SPSS Inc., IBM Corporation, Armonk, Nova York). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade das variáveis quantitativas. As variáveis quantitativas normais foram descritas como média e desvio padrão (DP). As variáveis qualitativas foram descritas por suas frequências. A ANOVA foi utilizada para verificar diferenças de idade entre algumas variáveis e um teste de Levene foi realizado para verificar a homogeneidade dos grupos. Quando a variável analisada apresentou mais de dois grupos, foi utilizado o teste de post-hoc de Bonferroni para identificar em qual grupo a diferença estatística estava presente. O teste do qui-quadrado foi utilizado para verificar associações, e o teste de Spearman para verificar correlações.

A análise univarietal utilizando a regressão de Cox foi realizada para verificar possíveis fatores de risco para a recorrência do tumor. Todas as variáveis com um valor $p < 0,05$ foram incluídas em um modelo multivarietal de regressão proporcional de risco de Cox com o método *backward*. Os fatores de risco que diminuíram o valor da razão de probabilidade foram excluídos automaticamente. O modelo final foi selecionado com base na melhor razão de verossimilhança. Análises e gráficos de sobrevivência de Kaplan-Meier foram gerados, e o teste de Log Rank (Mantel-Cox) foi realizado para avaliar possíveis diferenças entre os grupos quanto ao tempo de sobrevida global e ao tempo de sobrevida livre de doença. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p bicaudal foi $< 0,05$.

Resultados

Cinquenta e oito pacientes foram selecionados inicialmente e, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, 39 pacientes com câncer de laringe tratados cirurgicamente foram incluídos no estudo. A idade média no momento da cirurgia foi de $63,74 \pm 9,16$ anos (média \pm desvio padrão), faixa de 48-87 anos. Havia consideravelmente mais homens do que mulheres em nossa coorte, e a idade média da coorte foi de $63,97 \pm 9,43$ anos para homens e de $61 \pm 5,29$ anos para mulheres ($p = 0,60$); os grupos eram homogêneos ($p = 0,28$). As características dos participantes são mostradas na **Tabela 1**. Não foram observadas diferenças de idade entre

fumantes e não fumantes ($p = 0,94$), alcoolistas e não alcoólicos ($p = 0,71$) ou entre os diferentes locais tumorais ($p = 0,34$). Os grupos analisados foram todos homogêneos ($p = 0,41$, $p = 0,74$ e $p = 0,18$, respectivamente). O tempo médio de seguimento dos pacientes em nossa coorte foi de $23,71 \pm 13,08$ meses (variando de 0,13 a 48,3).

Tabela 1 – Características da população.

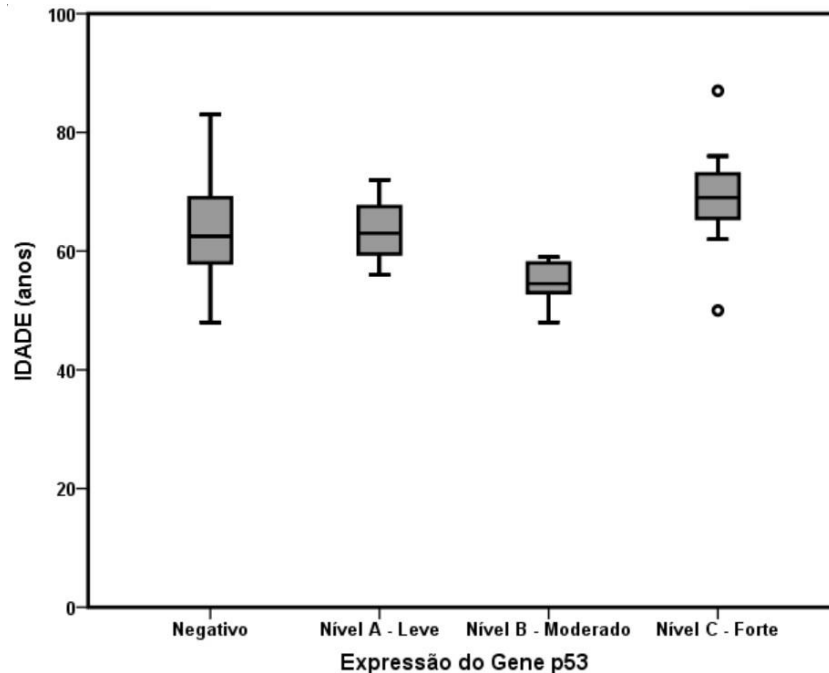
Características	
Gênero n (%)	
Masculino	36 (92,3)
Feminino	3 (7,7)
Alcoolismo n (%)	
Não	29 (74,4)
Sim	10 (25,6)
Tabagismo n (%)	
Não	12 (30,8)
Sim	27 (69,2)
Localização Anatômica do Tumor n (%)	
Supraglótico	6 (15,4)
Glótico	26 (66,7)
Infraglótico	-
Transglótico	7 (17,9)
Tratamento	
Cirurgia	16 (41)
Cirurgia e quimioterapia e radioterapia adjuvante	11 (18,2)
Cirurgia e radioterapia adjuvante	12 (30,8)

n= Número

Trinta e seis (92,3%) pacientes não apresentaram metástase linfonodal. Quanto ao estágio do tumor (TNM), a distribuição apresentada foi: T1 15 (38,5%), T2 7 (17,9%), T3 10 (25,6%) e T4 7 (17,9%). Não foram observadas diferenças de idade em pacientes com ou sem metástase linfonodal ($p = 0,37$) nem nos diferentes estágios do TNM ($p = 0,25$). Os grupos foram homogêneos ($p = 0,32$ e $p = 0,59$, respectivamente).

Vinte e um (53,8%) pacientes apresentaram análise imuno-histoquímica positiva para o marcador p53. Não foi observada diferença de idade entre casos positivos e negativos ($p = 0,8$) e os grupos foram homogêneos ($p = 0,48$). A expressão da proteína p53 mostrou a seguinte distribuição: 18 (46,2%) eram negativas, 3 (7,7%) eram de nível A (intensidade leve), 6 (15,4%) eram de nível B (intensidade moderada) e 12 (30,8%) eram nível C (forte intensidade). Foi encontrada diferença na distribuição etária entre os níveis de expressão da proteína p53 ($p = 0,012$) e os grupos eram homogêneos ($p = 0,58$) (**eFigura 1**).

eFigura 1 – Distribuição etária entre os níveis de expressão da proteína p53.



Legenda: Foi encontrada diferença na distribuição etária entre os níveis de expressão do gene p53 ($p = 0,012$) e os grupos foram homogêneos ($p = 0,58$): $63,33 \pm 62,5$ anos para pacientes negativos, $63,67 \pm 8,02$ anos para o nível A, $54,5 \pm 4,04$ anos para o nível B e $69 \pm 8,8$ anos para pacientes com nível C. O teste post hoc de Bonferroni ($p = 0,007$) demonstrou que o nível B (expressão moderada do marcador p53) apresentava pacientes mais jovens, enquanto o nível C (expressão forte do marcador p53) apresentava pacientes mais idosos.

Dos 7 casos de tumor de laringe T4, 6 (85,7%) apresentaram expressão da proteína p53 moderado ou forte. Da mesma forma, dos 15 casos classificados no estágio T1, 10 (66,6%) apresentaram expressão negativa ou leve. Mais detalhes são mostrados na **eTabela 1**. Não foi encontrada associação entre a expressão do marcador p53 e o estágio TNM ($p = 0,403$), mas uma correlação positiva de intensidade moderada foi encontrada entre essas variáveis ($p = 0,05$ e $r = 0,318$). Quando houve aumento na intensidade da expressão da proteína p53, houve aumento no estágio TNM. O oposto também foi verdadeiro.

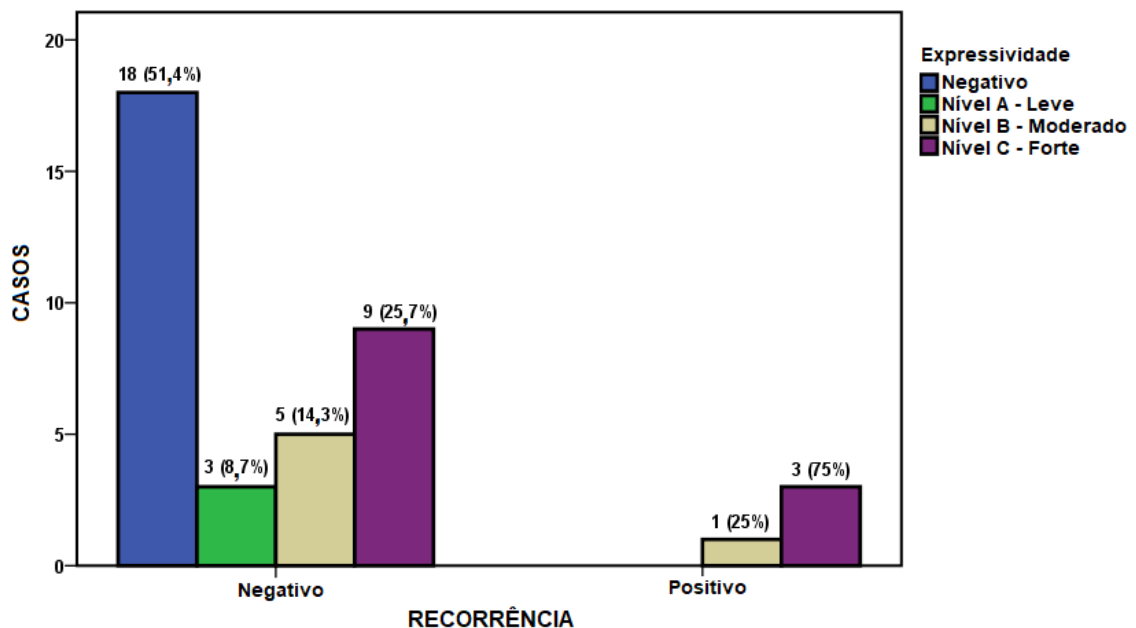
eTabela 1 – TNM e expressão da proteína p53.

Estádio TNM	Total	expressão da proteína p53			
		Negativo	Nível A (Leve)	Nível B (Moderado)	Nível C (Forte)
T1	15 (38,5)	8 (53,3)	2 (13,3)	2 (13,3)	3 (20)
T2	7 (17,9)	4 (57,1)	1 (14,3)	1 (14,3)	1 (14,3)
T3	10 (25,6)	5 (50)	0	2 (20)	3 (30)
T4	7 (17,9)	1 (14,3)	0	1 (14,3)	5 (71,4)

n (%)

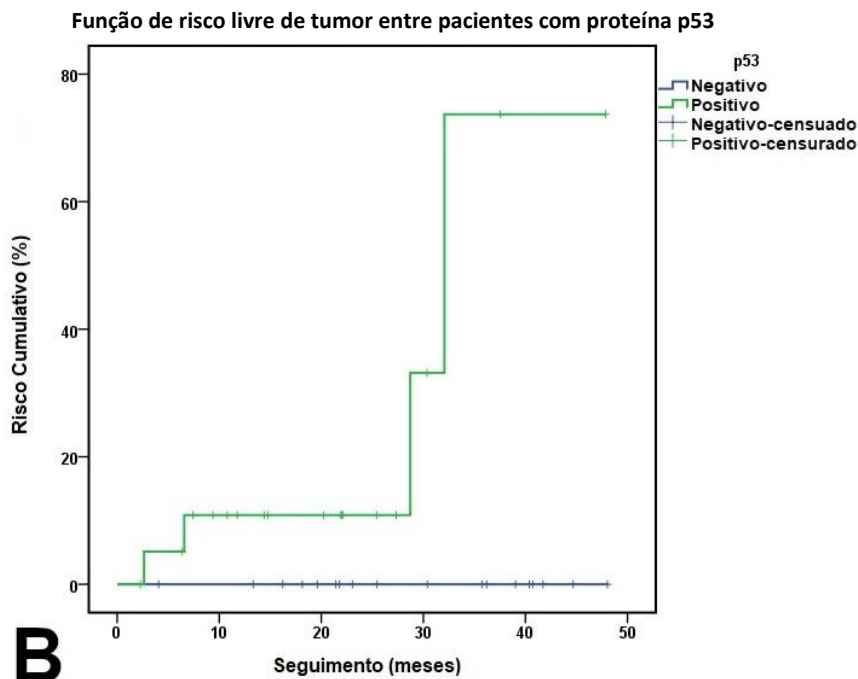
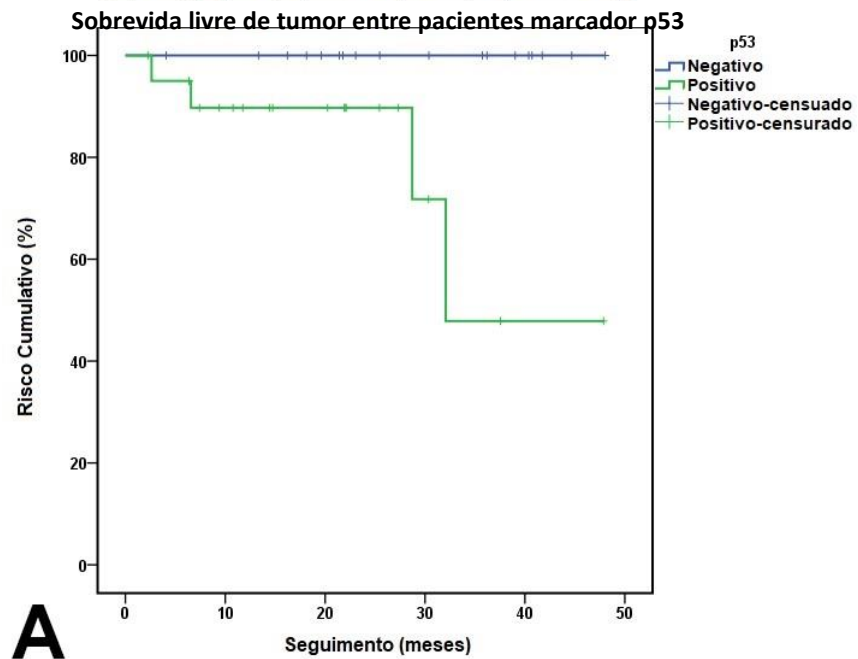
Apenas quatro (10,3%) pacientes da coorte tiveram recorrência do tumor. Dois (50%) estavam no estágio T2 (TNM) e os outros dois (50%) no estágio T4. Desses quatro pacientes com recidiva, três (75%) apresentavam nível C de p53 (intensidade forte), tendo sido encontrada uma associação ($p = 0,023$) e uma correlação de intensidade moderada ($p = 0,031$ e $r = 0,362$) entre recidiva tumoral e nível C de p53 (**Figura 1**). Não foi encontrada associação ($p = 0,583$) ou correlação ($p = 0,772$) entre a recorrência do tumor e o tipo de tratamento empregado. 22,51% foi o risco cumulativo de recorrência do tumor em nossa coorte, e a sobrevida livre de doença analisada pelas curvas de Kaplan-Meier foi 43,10 [2,26 (38,67 - 47,54)] meses. O teste de Log Rank (Mantel-Cox) mostrou diferenças significativas na sobrevida livre de doença entre pacientes com o marcador p53 ($p = 0,016$). Em pacientes com marcador p53 negativo, a sobrevida livre de doença foi de 49,02 [2,99 (43,15 - 54,89)] meses em comparação a 36,99 [4,24 (28,68 - 45,30)] meses observados em pacientes com marcador p53 positivo (**Figura 2**).

Figura 1 – Recorrência do tumor da laringe versus expressão da proteína p53.



Legenda: Todos os casos de recorrência de tumor na laringe foram observados no nível de expressão do p53 B ou C. Não foi observada recorrência na expressão do marcador p53 negativo e no nível A. Foi encontrada uma associação importante pelo teste do qui-quadrado entre a recorrência do tumor e o nível de expressão do p53 ($p = 0,031$), assim como uma correlação de intensidade moderada entre o nível de expressão do marcador p53 com a recorrência do tumor. De acordo com o teste de Spearman ($p = 0,023$ e $r = 0,362$), a expressão do p53 negativa foi correlacionada sem recorrência do tumor, e a expressão gênica moderada e alta de p53 correlacionou-se com a recorrência da doença.

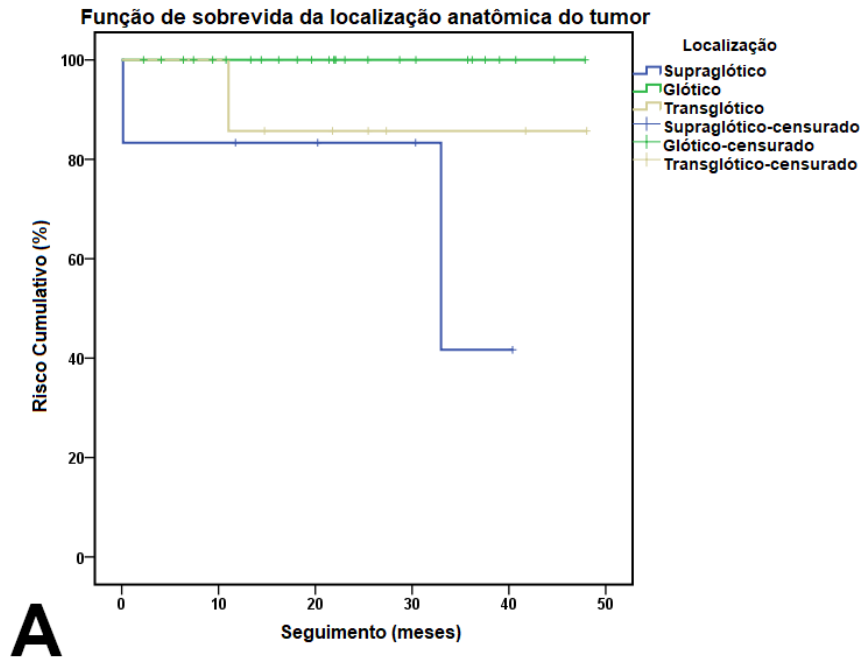
Figura 2 – Sobrevida livre de doença e risco de recidiva entre pacientes do marcador p53.

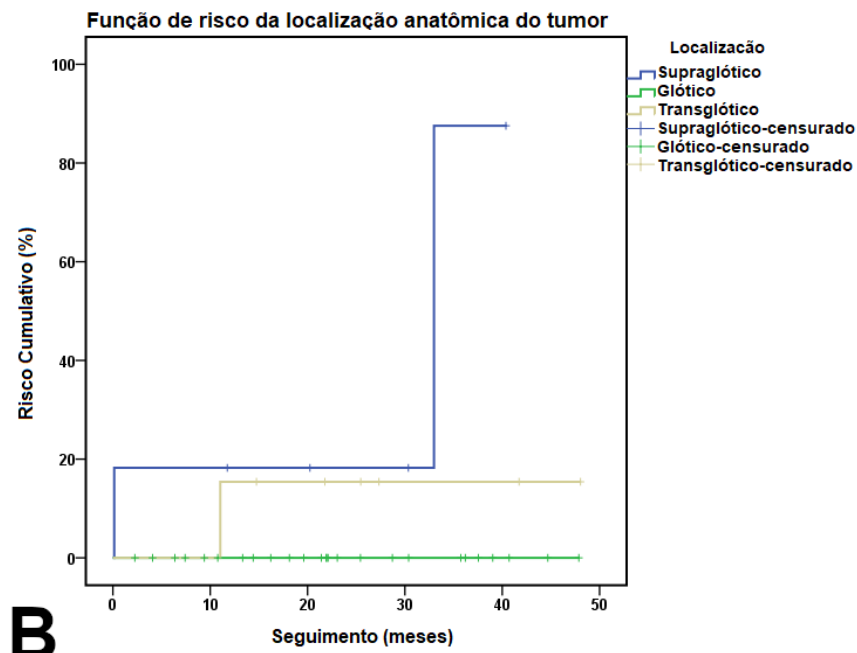


Legenda: **A)** Curvas de sobrevida livre de doença entre pacientes com marcador p53 positivo e pacientes com expressão negativa do marcador p53. Através do teste Log Rank (Mantel-Cox), foi observada uma diferença significativa na sobrevida livre de doença entre pacientes com expressão positiva e negativa do p53 ($p = 0,016$). Em pacientes com p53 negativos, a sobrevida livre de doença foi de 49,02 [2,99 (43,55 - 54,89)] meses em comparação com 36,99 [4,24 (28,68 - 45,30)] meses observados em pacientes com p53 positiva. **B)** A figura demonstra em função tempo livre de doença para pacientes com expressão positiva e negativa do marcador p53. Pacientes com expressão negativa do marcador p53 apresentaram risco de recidiva de 0% em comparação a pacientes positivos para p53 e com risco cumulativo de recorrência de tumor laríngeo de 73,71%.

Três (7,7%) pacientes morreram durante o nosso estudo e todos tiveram uma análise imuno-histoquímica positiva para o marcador p53 e uma forte intensidade (nível C) de expressão do marcador p53. A sobrevida global observada em nossa coorte foi de 44,39 [1,99 (40,48 - 48,3)] meses [média (intervalo de confiança de 95%)]. Foi encontrada uma diferença significativa na sobrevida dos pacientes com marcador p53 positivo em comparação àqueles com marcador p53 negativo ($p = 0,039$). O tempo de sobrevida de pacientes com gene p53 negativo foi de 44,78 [2,18 (40,72 - 49,08)] meses em comparação a 33,75 [3,70 (26,50 - 41,01)] meses em pacientes com expressão positiva no marcador p53. Além disso, houve diferença significativa observada em pacientes com diferentes localizações anatômicas de câncer ($p = 0,032$) (**Figura 3**). Não foram encontradas diferenças no tempo de sobrevida entre os diferentes níveis de expressão da proteína p53 ($p = 0,059$), sexo ($p = 0,523$), classificação TNM ($p = 0,135$), presença de LS ($p = 0,113$), alcoólatras e não alcoólatras ($p = 0,343$) e fumantes e não fumantes ($p = 686$).

Figura 3 – Sobrevida livre de tumor e localização anatômica do câncer.





Legenda: **A)** Curvas de sobrevida tumoral em pacientes com localização anatômica diferente do tumor laríngeo, mostrando diferença significativa ($p = 0,032$). Os pacientes com câncer supraglótico tiveram 26,93 [3,02 (21,01 - 32,86)] meses de sobrevivência, os pacientes glóticos tiveram 48,79 [3,61 (41,71 - 55,87)] meses e os pacientes com localização anatômica transglótica tiveram 42,52 [2,26 (34,02 - 42,89)] meses. **B)** O risco cumulativo de morte entre diferentes localizações anatômicas do câncer de laringe. Pacientes com câncer supraglótico apresentaram risco cumulativo de 85,55%, pacientes transglóticos apresentaram risco cumulativo de 15,42% e pacientes glóticos apresentaram risco cumulativo de 0% de morte.

A taxa de risco (HR) da recorrência do tumor laríngeo medida a partir das análises de regressão de Cox é mostrada na **Tabela 2**. Através da análise univariada na regressão de Cox, p53 positivo associado à classificação TNM, expressão do marcador p53 associado à classificação TNM e nível C de p53 (expressão forte do marcador p53) associado ao tabagismo foram estatisticamente significantes como fatores de risco. O preditor de recorrência do tumor da laringe que permaneceu no modelo final de regressão de risco proporcional de Cox (modelo ajustado) foi o nível C de p53 (forte expressão da proteína) associado à condição de fumante (HR: 21,713).

Tabela 2 – Fatores de risco para recorrência tumoral.

Variáveis	HR Bruto (95% IC)	Valor p		Valor p Ajustado
		Bruto	HR Ajustado (95% IC)	
Idade	1,038 (0,940 - 1,146)	0,46	refutado	refutado
Alcoolismo	0,034 (0 - 1941,392)	0,546	refutado	refutado
Localização anatômica do tumor				
Supraglótico	referência		refutado	refutado
Glótico	0,131 (0,012 - 1,446)	0,097	refutado	refutado
Infraglótico		-	refutado	refutado
Transglótico	1,105 (0,111 - 11045)	0,932	refutado	refutado
Gênero				
Masculino	referência		refutado	refutado
Feminino	0,039 (0 - 16,514)	0,624	refutado	refutado
p53 [†]	75,622 (0,023 - 248992,672)	0,295	refutado	refutado
p53 [†] * tabagismo	10,117 (0,913 - 112,073)	0,059	refutado	refutado
p53 [†] * TNM	1,960 (1,010 - 3,802)	0,047	refutado	refutado
p53 [†] * tabagismo * TNM	1,605 (0,790 - 3,261)	0,191	refutado	refutado
p53 EP				
Negativo	0,013 (0 - 43,541)	0,295	refutado	refutado
A (leve)	0,044 (0 - 408353086,166)	0,79	refutado	refutado
B (moderado)	2,128 (0,220 - 20,562)	0,514	refutado	refutado
C (forte)	6,973 (0,725 - 67,052)	0,093	refutado	refutado
p53 EP * TNM	1,241 (1,010 - 1,524)	0,04	refutado	refutado
p53 EP * tabagismo	2,819 (1,076 - 7,391)	0,035	refutado	refutado
p53 EP * tabagismo				
p53 negativo * tabagismo	referência			
p53 A * tabagismo	0 (0 - 0)	0,994	0 (0 - 0)	0,994
p53 B * tabagismo	7,732 (0,473 - 126,411)	0,151	7,732 (0,473 - 126,411)	0,151
p53 C * tabagismo	21,713 (1,040 - 453,318)	0,047	21,713 (1,040 - 453,318)	0,047
p53 EP * tabagismo * TNM	1,211 (0,924 - 1,586)	0,165	refutado	refutado
Linfonodo sentinela	3,119 (0,321 - 30,334)	0,327	refutado	refutado
Tabagismo	2,031 (0,285 - 14,455)	0,479	refutado	refutado
TNM				
T1	0,025 (0 - 147,755)	0,406	refutado	refutado
T2	4,619 (0,651 - 32,790)	0,126	refutado	refutado
T3	0,030 (0 - 324,821)	0,459	refutado	refutado
T4	3,854 (0,539 - 27,559)	0,179	refutado	refutado

IC = Intervalo de confiança; HR = Hazard ratio; p53[†] = Presença ou não do marcador p53; TNM = tumor (T), lymph node (N) and metastasis (M)

Discussão

Durante o acompanhamento oncológico de pacientes com câncer de laringe, a recorrência é a maior preocupação de todo cirurgião. Prevenir a recorrência do tumor é um grande desafio para o cirurgião e um fator determinante na sobrevida dos pacientes afetados por essa doença. O tabagismo e o nível C do p53 (forte expressão da proteína p53) são fatores de risco que, juntos, aumentam em 21 vezes a chance de recorrência do tumor de laringe. A positividade imuno-histoquímica da proteína p53 diminui significativamente a sobrevida do paciente e, da mesma maneira diminui, a sobrevida livre de doença. Uma observação importante é que a grande maioria dos pacientes com estágio tumoral T4 apresentaram expressão moderada ou forte da proteína p53. Portanto, pesquisas relacionadas a investigações e manipulação genética assumiram um papel extremamente importante na identificação de genes que podem estar associados a piores resultados no prognóstico de pacientes com esse tipo de câncer [9].

Em nosso estudo, observou-se que 53% dos pacientes apresentaram expressão positiva da proteína p53, o que está parcialmente de acordo com Nathan *et al.* [9], Yang *et al.* [10], Ozturk *et al.* [11] e Allegra *et al.* [12], os quais apresentaram 47%, 60%, 55% e 48,7% em relação à expressão do gene p53, respectivamente. Yang *et al.* [10] avaliaram apenas pacientes com tumores laríngeos precoces e utilizaram um laser de CO₂ complementar ao tratamento cirúrgico, o que poderia ter dificultado a avaliação dos cortes na análise imuno-histoquímica. Nathan *et al.* [9], por outro lado, não excluíram os pacientes submetidos à radioterapia neo ou adjuvante, o que também poderia influenciar a análise de p53 nas margens cirúrgicas. Portanto, esses estudos [9, 10] podem ter subestimado a positividade da expressão da proteína p53.

Por outro lado, em nosso estudo, apenas pacientes com margens cirúrgicas negativas (livres) e sem intervenções e tratamentos prévios foram incluídos. Nos estudos de Ozturk *et al.* [11] e Allegra *et al.* [12], ao considerarem apenas margens cirúrgicas livres de tumor, a expressão gênica foi identificada apenas em 11% e 38,2% dos pacientes, respectivamente. No entanto, comparado com esses estudos [11, 12], observamos um aumento considerável na positividade da expressão do p53, possivelmente relacionada a hábitos locais em nossa população, como o tabagismo, que é alto em países subdesenvolvidos [13]. O tabagismo é um fator importante que modifica a expressão do p53 [1-5, 9-12].

O câncer de laringe afeta mais os homens que as mulheres e se apresenta com mais frequência entre 50 e 60 anos de idade [14-17]. Na maioria da literatura, observou-se que 60% do câncer de laringe ocorre na região glótica, e menos de 1% ocorre na região subglótica [18, 19]. Nosso artigo encontrou uma idade média de 63,74 anos e o sexo masculino é mais

prevalente que o feminino. Da mesma forma, também de acordo com a literatura, 66,7% dos nossos casos ocorreram na região glótica e nenhum caso foi observado na região subglótica. Observamos diferença ao comparar nossos resultados com os achados de Simsek *et al.*, os quais encontraram 20% e 38% dos casos na região glótica e 8% e 19,6% na região subglótica, descritos em suas publicações em 2013 [17] e de 2014 [14], respectivamente. Da mesma forma, observamos diferenças na distribuição dos pacientes de acordo com o estágio TNM, para os quais Simsek *et al.* [14, 17] apresentaram frequências mais altas nos estágios T2 e T4, os quais, juntos, correspondem a 56% e 59,8%, descritos nos estudos de 2013 e de 2014, respectivamente. Em nosso artigo, observamos a maioria (64,1%) dos pacientes nos estágios T1 e T3. Tais diferenças na localização anatômica do tumor e na classificação TNM podem ser justificadas porque os autores [14, 17] não condicionaram seu estudo apenas a pacientes com margens livres na análise anatomopatológica. Outro achado importante que se destaca em nossa pesquisa é a correlação positiva entre a expressão do p53 e a classificação TNM. Identificou-se que, à medida que a intensidade da expressão da proteína p53 aumentava, a classificação TNM também aumentava. Esse achado também foi descrito por Wood *et al.* [20].

Sabe-se que fatores de risco, como o tabagismo, podem influenciar a superexpressão do marcador p53 nos carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Isso sugere que os agentes cancerígenos presentes na fumaça do cigarro podem causar mutações no gene p53, provocando grandes alterações no desenvolvimento do câncer [1-5, 9-12]. Metheerairut *et al.* [21] e Chrysovergis *et al.* [22] encontraram uma frequência de tabagismo – de 76,2% e 100%, respectivamente, – em pacientes com câncer de laringe. No entanto, nenhum deles encontrou associação entre tabagismo e expressão da p53 nem investigaram a associação do tabagismo com a recorrência do tumor. Karpathiou *et al.* [23], em oposição a Metheerairut *et al.* [21] e Chrysovergis *et al.* [22], encontraram associação entre expressão anormal da p53 e tabagismo. Porém, como os demais autores [21, 22], eles não avaliaram a associação entre tabagismo e recorrência tumoral. Alguns autores [10, 11, 24] tentaram demonstrar uma associação na qual pacientes com positividade para p53, mesmo nos estágios iniciais do tumor e com margens cirúrgicas livres, apresentam maior recorrência da doença. No entanto, outros autores não encontraram essa associação [25]. É importante notar que todos os autores [10, 11, 21-25] procuraram encontrar, em seus estudos e seus dados, uma possível associação entre o ato de fumar e a expressão do p53 ou sua simples positividade. Da mesma forma, eles procuraram encontrar uma associação entre a recorrência do tumor e a expressão ou positividade da p53. No entanto, nenhum desses artigos procurou definir o tabagismo e/ou a expressão do p53 como fatores de risco para recorrência tumoral ou sobrevida livre de doença nesses grupos.

Em nossa opinião, a definição de um fator de risco e a mensuração da sobrevida livre de doença têm muito mais valor clínico e científico do que uma associação. Mei *et al.* [26] relataram um risco de 2,61 vezes de recorrência tumoral em pacientes com superexpressão da proteína p53. Mesmo depois de definir a superexpressão da proteína p53 como fator de risco, os autores não analisaram a sobrevida livre de doença. Allegra *et al.* [12] identificaram que pacientes com expressão positiva de p53 tiveram uma incidência significativamente maior de recorrência do tumor e uma taxa de sobrevida de 79,1% em comparação aos pacientes negativos para p53, nos quais observamos uma taxa de sobrevivência de 86,9%. Esses autores não definiram o tabagismo como fator de risco para recorrência.

Nosso estudo é um dos poucos na literatura – se não o único – que define que a associação entre tabagismo e a forte intensidade da expressão do p53 (p53 nível C) é um fator de risco extremamente relevante para a recorrência do tumor. Juntos, eles aumentam o risco de recorrência do câncer de laringe em 21 vezes. Foi encontrado um risco cumulativo geral de 22,51% de recorrência do tumor. A expressão negativa do marcador p53 foi associada a um risco de 0% de recorrência em comparação a pacientes positivos do marcador p53 com um risco cumulativo de 73,71%. A sobrevida global livre de doença foi de 43,10 meses. Os pacientes negativos para a expressão da proteína p53 tiveram sobrevida livre de doença de 49,02 meses em comparação aos 36,99 meses observados em pacientes positivos para o marcador p53.

Em nosso estudo, foi encontrada uma sobrevida de 44,78 meses em pacientes com expressão negativa de p53 em comparação a 33,75 meses em pacientes com expressão positiva da proteína p53: uma diferença estatística significativa de 11,03 meses. Esse valor foi muito próximo ao de Nathan *et al.* [9], que encontraram uma diferença de 13,5 meses. Essa grande diferença na sobrevida observada no estudo de Nathan *et al.* [9] pode ser uma consequência do uso de terapias neo e adjuvantes, as quais influenciam a identificação de p53 nas margens cirúrgicas livres e comprometem o resultado. Isso subestimaria a identificação de pacientes que não teriam margens livres positivas e deveriam ser excluídos do estudo. No entanto, devido ao uso dessas terapias, esses pacientes acabam por ter margens livres negativas.

Dessa forma, eles entram na análise: são p53 positivos na análise e têm menor tempo de sobrevida, aumentando, assim, a diferença observada entre a sobrevida dos pacientes com expressão p53 negativa e positiva. Também observamos uma diferença estatisticamente significativa na sobrevida entre pacientes com diferentes localizações anatômicas do tumor. Pacientes com tumores supraglóticos tiveram um tempo de sobrevida menor em comparação a pacientes com tumores em outras regiões anatômicas da laringe. Ao mesmo tempo, observou-se que o risco cumulativo de morte desses pacientes com tumores supraglóticos foi maior que

nos demais. Anatomicamente, os tumores na região supraglótica têm maior drenagem linfática, e isso representa uma área que progride com manifestações clínicas tardias e atraso no diagnóstico, o que pode levar a resultados significativos em relação a esse local e à sobrevida do paciente [27].

Nosso estudo tem algumas limitações. Foi um estudo com poucos sujeitos e representativo de uma população de aproximadamente 541.247 habitantes, atendida pelo nosso hospital público terciário. Portanto, pode não ser representativo da população de nosso país, assim como seus resultados podem não ser aplicáveis a outras populações em outros países. No entanto, nosso estudo tem vários pontos fortes, pois foi um estudo de coorte prospectivo com uma população estritamente selecionada, ou seja: foram incluídos apenas pacientes com margens cirúrgicas livres. O estudo utilizou metodologia padrão e análise estatística adequada. Da mesma forma, é um dos poucos estudos que demonstra que ser fumante e ter forte expressão da proteína p53 são fatores de risco que aumentam a chance de recorrência do tumor em 21 vezes.

Conclusão

A expressão da proteína p53 no câncer de laringe está intimamente relacionada à diminuição da sobrevida e à sobrevida livre de doença. Associada ao tabagismo, é um fator de risco extremamente importante para a recorrência do tumor. Nosso estudo reforça a ideia de usar marcadores moleculares durante o tratamento do câncer de laringe, como o marcador p53, o qual é um auxílio importante na detecção precoce de pacientes com alto risco de recorrência da doença, mesmo aqueles que possuem margens cirúrgicas livres na análise anatomopatológica. Como a análise imuno-histoquímica é, hoje, um teste fácil e amplamente utilizado, a busca pela expressão da p53 deve ser realizada em pacientes com câncer de laringe, uma vez que a positividade do p53 está associada a uma maior chance de recidiva e pior sobrevida. Portanto, aqueles pacientes com câncer de laringe que apresentam superexpressão da proteína p53 no pós-operatório devem receber outra terapia adjuvante ou devem ter um acompanhamento diferenciado do câncer, com retornos mais frequentes para identificar uma possível recorrência precoce da doença.

Referências

1. WHO. *Estimated cancer disease markers incidence and mortality and prevalence worldwide in 2021*. 201701/01/2019]; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Colombo, J.; P. Rahal, *Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço*. VerBrasCancerol, 2009. **55**(2): p. 165-174.
3. INCA, *Os Principais Tipos de Câncer*, in *ABC do Câncer: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer* M.D. SAÚDE; .N.d.C.J.A.G.d. Silva, Editors. 2017: Rio de Janeiro, RJ. p. 22-26.
4. Worsham, M.J., *et al.*, *Delineating genetic pathways of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2003. **129**(7): p. 702-8.
5. Chung, C.H., S. Levy, and W.G. Yarbrough, *Clinical applications of genomics in head and neck cancer*. Head & Neck, 2006. **28**(4): p. 360-368.
6. Brierley, J.D., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th Edition ed. 2017: Wiley-Blackwell. 272.
7. Wang, L.D., *et al.*, *Accumulation of p53 protein in human esophageal precancerous lesions: a possible early biomarker for carcinogenesis*. Cancer Res, 1993. **53**(8): p. 1783-7.
8. Fouret, P., *et al.*, *Expression of p53 protein related to the presence of human papillomavirus infection in precancer lesions of the larynx*. Am J Pathol, 1995. **146**(3): p. 599-604.
9. Nathan, C.-A.O., *et al.*, *Correlation of p53 and the Proto-Oncogene eIF4E in Larynx Cancers: Prognostic Implications*. Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3599-3604.
10. Yang, J.Q., *et al.*, *Over-expression of p53, p21 and Cdc2 in histologically negative surgical margins is correlated with local recurrence of laryngeal squamous cell carcinoma*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(7): p. 4295-302.
11. Ozturk, K., *et al.*, *The prognostic value of p53 expression in negative surgical margins of early glottic carcinoma in the prediction of local recurrences*. Acta Otolaryngol, 2014. **134**(5): p. 525-30.
12. Allegra, E., *et al.*, *p53 overexpression on the resection margins as a marker of local recurrence in glottic T1a carcinoma*. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2003. **23**(6): p. 454-8.
13. da Silva, F.B., *et al.*, *Prevalence of solid neoplasms diagnosed between the years of 2011 to 2016 and oncologically treated at the University Hospital of Santa Maria*. J Clin Med Res, 2019. **11**(4): p. 275-282.
14. Simsek, H., *et al.*, *The expression of EGFR, cerbB2, p16, and p53 and their relationship with conventional parameters in squamous cell carcinoma of the larynx*. Turk J Med Sci, 2014. **44**(3): p. 411-6.
15. Sternberg, S.S., *Histology for Pathologists*. 2nd ed. 1997, Philadelphia, PA, USA: Lippincott-Raven Publishers.
16. Mills, S.E., *et al.*, *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*. 4th ed. 2004, Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
17. Simsek, G., *et al.*, *Expression of cydin D1, p27, p21, bcl-2, and p53 in laryngeal squamous cell carcinoma and an investigation of the correlation with conventional prognostic factors*. Turk J Med Sci, 2013. **43**: p. 27-32.
18. Cardesa, A. and P.J. Slootweg, *Pathology of the Head and Neck*. 2006. 1-316.
19. Pilch, B.Z., *Head and Neck Surgical Pathology*. 1st ed. 2000, Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins (LWW).
20. Wood, N.B., *et al.*, *Mutation of p53 in squamous cell cancer of the head and neck: relationship to tumor cell proliferation*. Laryngoscope, 1997. **107**(6): p. 827-33.

21. Metheetrairut, C., *et al.*, *Expression levels of miR-34-family microRNAs are associated with TP53 mutation status in head and neck squamous cell carcinoma*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2019. **276**(2): p. 521-533.
22. Chrysovergis, A., *et al.*, *P53/MDM2 co-expression in laryngeal squamous cell carcinoma based on digital image analysis*. *Anticancer Res*, 2019. **39**(8): p. 4137-4142.
23. Karpathiou, G., *et al.*, *p16 and p53 expression status in head and neck squamous cell carcinoma: a correlation with histological, histoprognostic and clinical parameters*. *Pathology*, 2016. **48**(4): p. 341-8.
24. Jalali, M.M., *et al.*, *P53 Overexpression impacts on the prognosis of laryngeal squamous cell carcinomas*. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 2011. **12**(7): p. 1731-1734.
25. Kazkayasi, M., *et al.*, *Over-expression of p53 and c-erbB-2 oncoproteins in laryngeal carcinoma*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2001. **258**(7): p. 329-35.
26. Mei, J., *et al.*, *Risk factors of stomal recurrence after laryngectomy: asystematic review and meta-analysis*. *Ann OtolRhinolLaryngol*, 2017. **126**(9): p. 654-668.
27. Patel, T.D., *et al.*, *Supraglottic squamous cell carcinoma: apopulation-based study of 22,675 cases*. *Laryngoscope*, 2019. **129**(8): p. 1822-1827.

5 ARTIGO EM INGLÊS

HIGH EXPRESSIVENESS OF TUMOR PROTEIN P53 ASSOCIATED WITH SMOKING AS RISK FACTORS FOR LARYNGEAL TUMOR RECURRENCE. AN OBSERVATIONAL COHORT STUDY IN PATIENTS WITH FREE SURGICAL MARGINS.

Abstract

Importance: The influence of molecular markers, such as p53, on the physiopathology of laryngeal tumors has been investigated in surgical specimens as a prognostic factor of the disease. Determining the relationship of this gene may favor an increase in patient survival and can facilitate the search for patients more susceptible to recurrence.

Objective: Define whether p53 protein expression is a risk factor for tumor recurrence. Define disease-free survival and overall survival in the studied population.

Design: A prospective, consecutive patient cohort study, performed in a public tertiary university hospital from January 2014 to January 2018. The mean follow-up time of the patients in our cohort was 23.71 ± 13.08 months (ranging from 0.13-48.3).

Setting: Public tertiary university hospital.

Participants: Convenience sample of patients with laryngeal cancer diagnosis treated surgically. Fifty-nine patients were initially included. Only 39 patients with free surgical margins were analyzed.

Main Outcome(s) and Measure(s): Alcoholism, smoking, anatomical cancer localization, TNM classification and the presence of lymph nodes metastasis. Date of surgery, date of last follow-up (last medical appointment or death) and data of recurrence diagnosis (if there was a recurrence). Association analyses, global and disease-free survival curves using the Kaplan-Meier method and analysis of risk factors for tumor recurrence using Cox regression were performed.

Results: The mean age of patients was 63.74 ± 9.16 years. Four patients had a tumor recurrence and three (75%) of these were at p53 level C (strong intensity); an association was found ($p=0.023$) as well as a correlation of moderate intensity ($p=0.031$ and $r=0.362$). The survival of patients who had positive p53 protein expression was lower compared with those who had negative expression ($p=0.039$). Positive p53 protein expression associated with TNM classification and p53 level C (strong p53 marker expression) associated with smoking; these were statistically significant risk factors in the univariate analyses. The predictor of laryngeal tumor recurrence that remained in the final Cox proportional hazard regression model was strong p53 protein expression associated with smoking (HR: 21.713).

Conclusions and Relevance: Smoking and strong p53 protein expression are risk factors that together increase by 21 times the chance of laryngeal tumor recurrence, reinforcing the importance of p53 as a useful marker during follow-up.

KEYWORDS: p53 expression; laryngeal neoplasms; surgery treatment; prognosis.

Introduction

Head and neck cancers have multifactorial etiologies and are known for their aggressive locoregional behavior [1]. Currently, laryngeal cancer occupies the sixth position in the world's top causes of death, with a global survival rate of around 40%, considering all stages of disease [1-3]. Considering only airway tumors, laryngeal cancer corresponds to the seventh position in our country [3]. Male patients are most affected, although in recent years, cases have increased among female smokers [1]. Squamous cell carcinoma is the most frequently encountered histological type and is mainly associated with smoking and alcohol use [1].

The treatment is based on traditional classifications such as tumor size, local invasion, and the presence of regional or distant metastasis [2, 4]. However, with the best understanding of molecular biology, it has been observed that histological characteristics are also associated with tumor aggressiveness and recurrence [1, 2]. Locoregional recurrence and metastasis are the main factors that compromise the survival of these patients despite the advances and technologies used in their treatment [1]. Moreover, despite having the same clinical stage, differences in tumor evolution and growth have demonstrated the need for the evolution of staging parameters, as well as the need to search for new parameters. Such findings would contribute substantially to a more reliable analysis of the prognosis and survival of these patients [2, 5].

Molecular markers such as the tumor protein p53 have been investigated to aid in the early diagnosis and prognosis of the disease and to analyze its influence on the physiopathology of laryngeal tumors. p53 acts as a tumor suppressor gene as it regulates cell proliferation and prevents cells from becoming malignant. However, when mutations occur in this gene, there is an increase in the intracellular concentration, thereby deregulating the physiological cell cycle [1, 5]. Therefore, the search for p53 in surgical specimens is essential to determine the relationship of this gene to the prognosis of laryngeal cancer, thus favoring an increase in patient survival and the use of surgical approaches with lower morbidity [1, 5].

The aim of this study was to assess the expression of the tumor protein p53 in patients with free margin laryngeal tumors and the risk factors for tumor recurrence.

Methods

Study Design and Setting

This was a prospective, consecutive patient cohort study, performed in a public tertiary university hospital in southern Brazil from January 2014 to January 2018. The study was approved by the institutional review board (CAAE 44642915.6.0000.5346) and followed the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. This study follows the STROBE statement. Patients participated voluntarily after signing the consent form.

Patient Population and Selection

Patients with a diagnosis of laryngeal cancer treated surgically by the hospital's head and neck surgery staff were initially selected. The exclusion criteria were patients who had previous treatment of any type in other hospitals, patients who for any reason were lost to clinical follow-up during the study period, and patients with compromised surgical margins.

Variables Included in the Study

A number of variables were collected to the study, including demographic data, predisposing conditions (alcoholism and smoking), anatomical cancer localization (supraglottic, glottic, infraglottic and transglottic), as well as the classification of malignant tumors (TNM) [6], the presence of lymph nodes metastasis and if there was a recurrence of cancer. The surgery treatment applied to patients was total or partial laryngectomy. The date of surgery, date of last follow-up (last medical appointment or date of death) and data of recurrence diagnosis were also collected.

Immunohistochemical Analysis of the Tumor Protein p53

All the patients included in the study, and therefore submitted to surgical treatment, had their surgical specimens analyzed immunohistochemically. The positivity of p53 marker was investigated in the specimens. p53 protein expression was assessed through the analysis of the nuclei of the neoplastic cells according to their intensity. The number of positive cells was assessed as a percentage of the positively staining tissue area. This expression is classified according to Wang *et al.* and Fouret *et al.* [7, 8] the following levels:

- Negative: Absence of the marker in the nuclei of the cells (<5%).
- Level A; Mild intensity: Cells isolated with p53 staining in the nucleus (+) (5-30%).
- Level B; Moderate intensity: Clusters of cells with p53 in the nucleus (++) (30-50%).
- Level C; Strong intensity: Diffuse extension of many cells with p53 in the nucleus (+++) (>50%).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 18.0 (SPSS Inc., IBM Corporation, Armonk, New York). The Kolmogorov-Smirnov test was used to test the normality of quantitative variables. Normal quantitative variables were described as mean and standard deviation (SD). Qualitative variables were described as frequencies. ANOVA was used to verify age differences among some variables and a Levene test was conducted to verify the homogeneity of groups. When the analyzed variable presented more than two groups, the Bonferroni post-hoc test was used to identify in which group the statistical difference was present. The chi squared test was used to verify associations and Spearman test to verify correlations. A univariate analysis considering possible risk factors for tumor recurrence was performed using Cox's proportional hazard regression. All variables with a p-value<0.05 were included in a Cox's proportional hazard regression model with the backward method. Risk

factors that decreased the value of likelihood ratio were automatically excluded. The final model was selected based on the best likelihood ratio. Kaplan-Meier survival analyses and graphs were generated, and a Log Rank (Mantel-Cox) test was performed to evaluate possible differences among groups regarding survival time and disease-free survival time. Differences were considered significant when the two-tailed p-value was <0.05.

Results

Fifty eight patients were initially screened, and depending on the inclusion and exclusion criteria, 39 laryngeal cancer patients treated surgically were included in the study. The mean age at the time of surgery was 63.74 ± 9.16 years (mean \pm standard deviation), range 48-87 years. There were considerably more males than females in our cohort, and the mean age of the cohort was 63.97 ± 9.43 years for men, and 61 ± 5.29 years for women ($p=0.60$); the groups were homogeneous ($p=0.28$). The characteristics of the participants are shown in **Table 1**. No age differences were observed between smokers and non-smokers ($p=0.94$), alcoholics and non-alcoholics ($p=0.71$), or between the different tumor sites ($p=0.34$). The analyzed groups were all homogeneous ($p=0.41$, $p=0.74$ and $p=0.18$, respectively). The mean follow-up time of the patients in our cohort was 23.71 ± 13.08 months (ranging from 0.13-48.3).

Table 1 – Population characteristics.

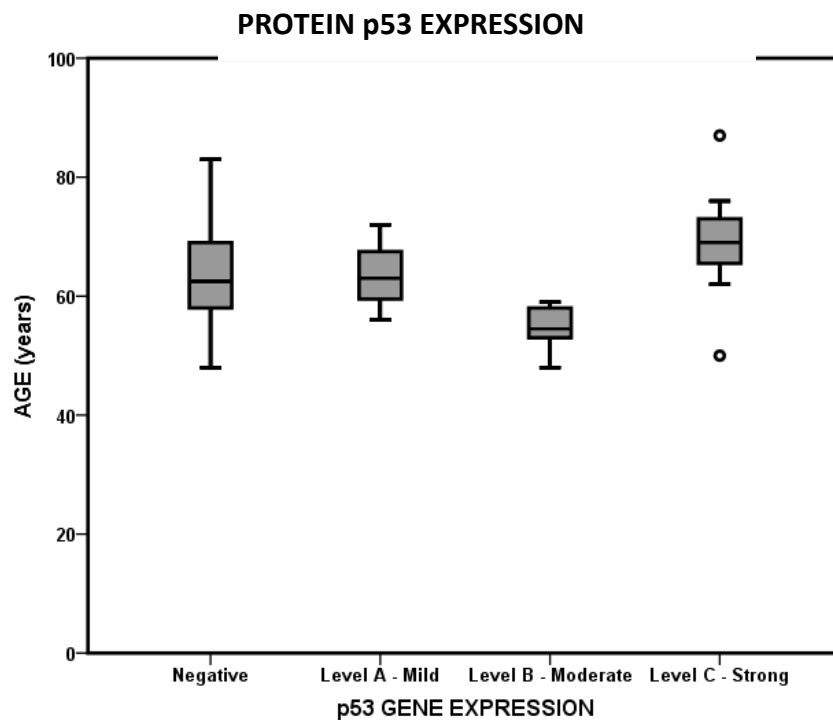
Characteristics	
Sex n (%)	
Male	36 (92.3)
Female	3 (7.7)
Alcoholism n (%)	
No	29 (74.4)
Yes	10 (25.6)
Smoking n (%)	
No	12 (30.8)
Yes	27 (69.2)
Anatomical cancer localization n (%)	
Supraglottic	6 (15.4)
Glottic	26 (66.7)
Infraglottic	-
Transglottic	7 (17.9)
Treatment	
Surgery	16 (41)
Surgery and chemotherapy and radiation adjuvant therapy	11 (18.2)
Surgery and radiotherapy adjuvant	12 (30.8)

n= Number

Thirty-six (92.3%) had negative lymph nodes metastasis. Regarding the tumor stage (TNM), the distribution presented was: T1 15 (38.5%), T2 7 (17.9%), T3 10 (25.6%) and T4 7 (17.9%). No age differences were observed in lymph nodes metastasis ($p=0.37$) and in the TNM different stages ($p=0.25$). And groups were homogeneous ($p=0.32$ and $p=0.59$, respectively).

Twenty-one (53.8%) patients had immunohistochemical analysis positive for the p53 marker. No difference in age was observed between positive and negative cases ($p=0.8$) and the groups were homogeneous ($p=0.48$). Expression of the p53 protein showed the following distribution: 18 (46.2%) were negative, 3 (7.7%) were level A (mild intensity), 6 (15.4%) were level B (moderate intensity) and 12 (30.8%) were level C (strong intensity). A difference in the age distribution was found among levels of p53 gene expression ($p=0.012$) and groups were homogeneous ($p=0.58$) (**eFigure 1**).

eFigure 1: Age distribution among p53 protein expression levels.



Legend: A difference in the age distribution was found among p53 protein expression levels ($p=0.012$) and groups were homogeneous ($p=0.58$): 63.33 ± 62.5 years for negative patients, 63.67 ± 8.02 years for level A, 54.5 ± 4.04 years for level B and 69 ± 8.8 years for level C patients. The Bonferroni post hoc test ($p=0.007$) demonstrated that level B (moderate p53 expression) had younger patients while level C (strong p53 expression) had older patients.

Of the 7 cases of T4 laryngeal tumor, 6 (85.7%) had moderate or strong p53 protein expression. In the same way, the 15 cases classified as stage T1, 10 (66.6%) had negative or mild expression. More details are shown in **eTable1**. No association was found between the

expression of the p53 protein and the TNM stage ($p=0.403$), but a positive correlation of moderate intensity was found among these variables ($p=0.05$ and $r=0.318$). When there was an increase in the intensity of p53 protein expression, there was an increase in the TNM stage. The opposite was also true.

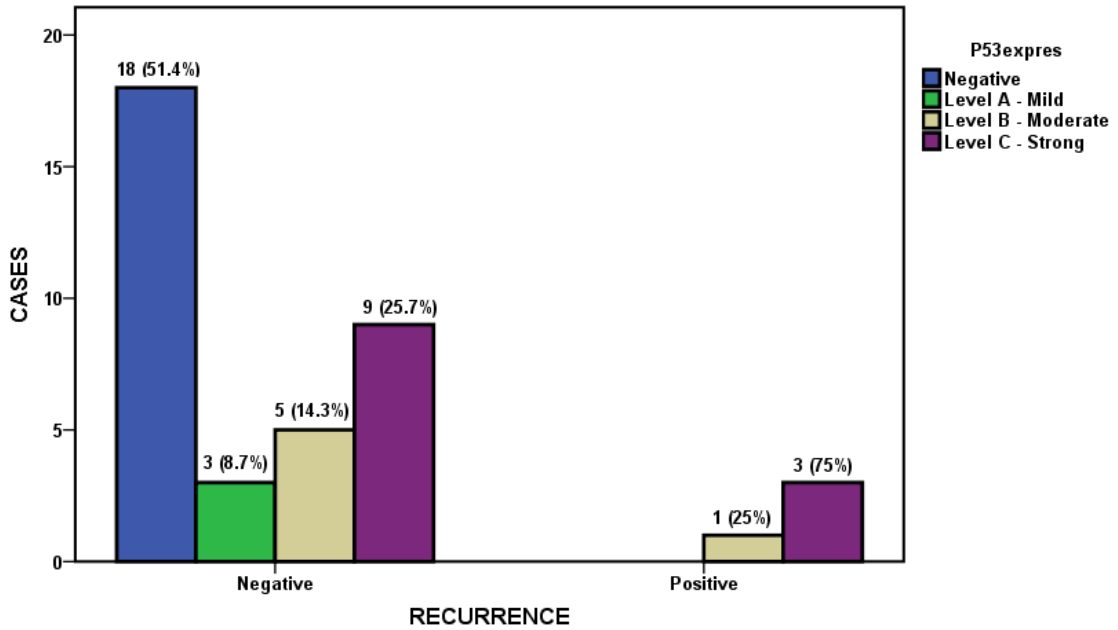
eTable 1: TNM and p53 protein expression.

TNM stage	Total	p53 protein expression			
		Negative	Level A (mild)	Level B (moderate)	Level C (strong)
T1	15 (38.5)	8 (53.3)	2 (13.3)	2 (13.3)	3 (20)
T2	7 (17.9)	4 (57.1)	1 (14.3)	1 (14.3)	1 (14.3)
T3	10 (25.6)	5 (50)	0	2 (20)	3 (30)
T4	7 (17.9)	1 (14.3)	0	1 (14.3)	5 (71.4)

n (%)

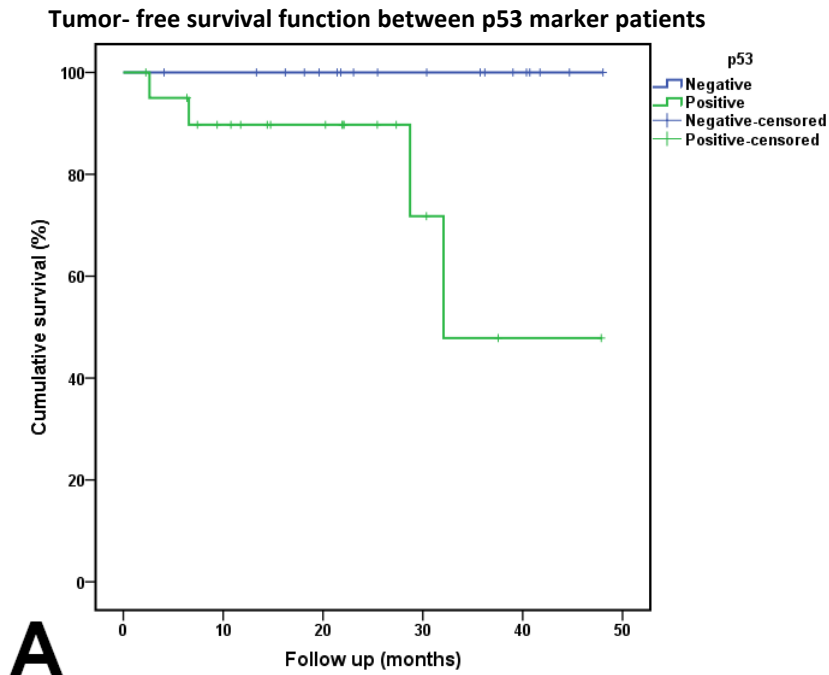
Only four (10.3%) patients in the cohort had tumor recurrence. Two (50%) were T2 TNM stage and the other two (50%) were T4. Of these four patients with recurrence, three (75%) were p53 level C (strong intensity) and an association was found ($p=0.023$) as well as a correlation of moderate intensity ($p=0.031$ and $r=0.362$) (**Figure 1**). No association ($p=0.583$) or correlation ($p=0.772$) were found between tumor recurrence and type of treatment employed. 22.51% was the cumulative risk of tumor recurrence in our cohort and the disease-free overall survival analyzed using Kaplan-Meier curves was 43.10 [2.26 (38.67 - 47.54)] months. A Log Rank (Mantel-Cox) test showed significant differences in disease-free survival between patients with p53 gene ($p=0.016$). In p53 negative patients, the disease-free survival was 49.02 [2.99 (43.15 - 54.89)] months compared with 36.99 [4.24 (28.68 - 45.30)] months observed in p53 marker positive patients (**Figure 2**).

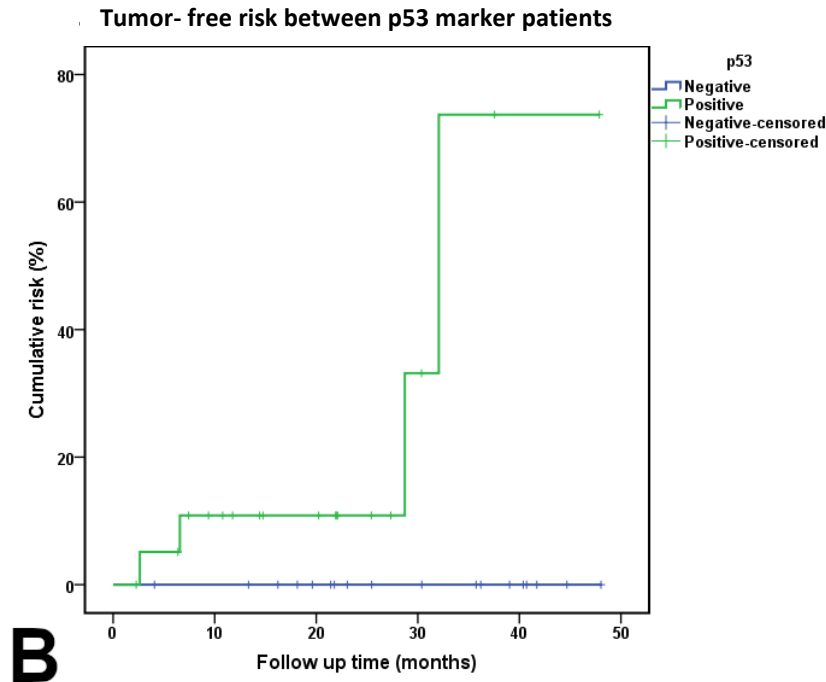
Figure 1: Recurrence of laryngeal tumor versus expression of the p53 protein.



Legend: All cases of laryngeal tumor recurrence were p53 protein expression level B or C. No recurrence was observed in negative p53 protein expression and level A expression. An important association by the chi squared test was found between tumor recurrence and p53 protein expression level C ($p=0.031$) and as was a moderate intensity correlation between the level of p53 protein expression and tumor recurrence. According to the Spearman test ($p=0.023$ and $r=0.362$), negative p53 protein expression was correlated with no tumor recurrence and moderate and high p53 protein expression was correlated with disease recurrence.

Figure 2: Disease-free survival and risk function between p53 marker patients.

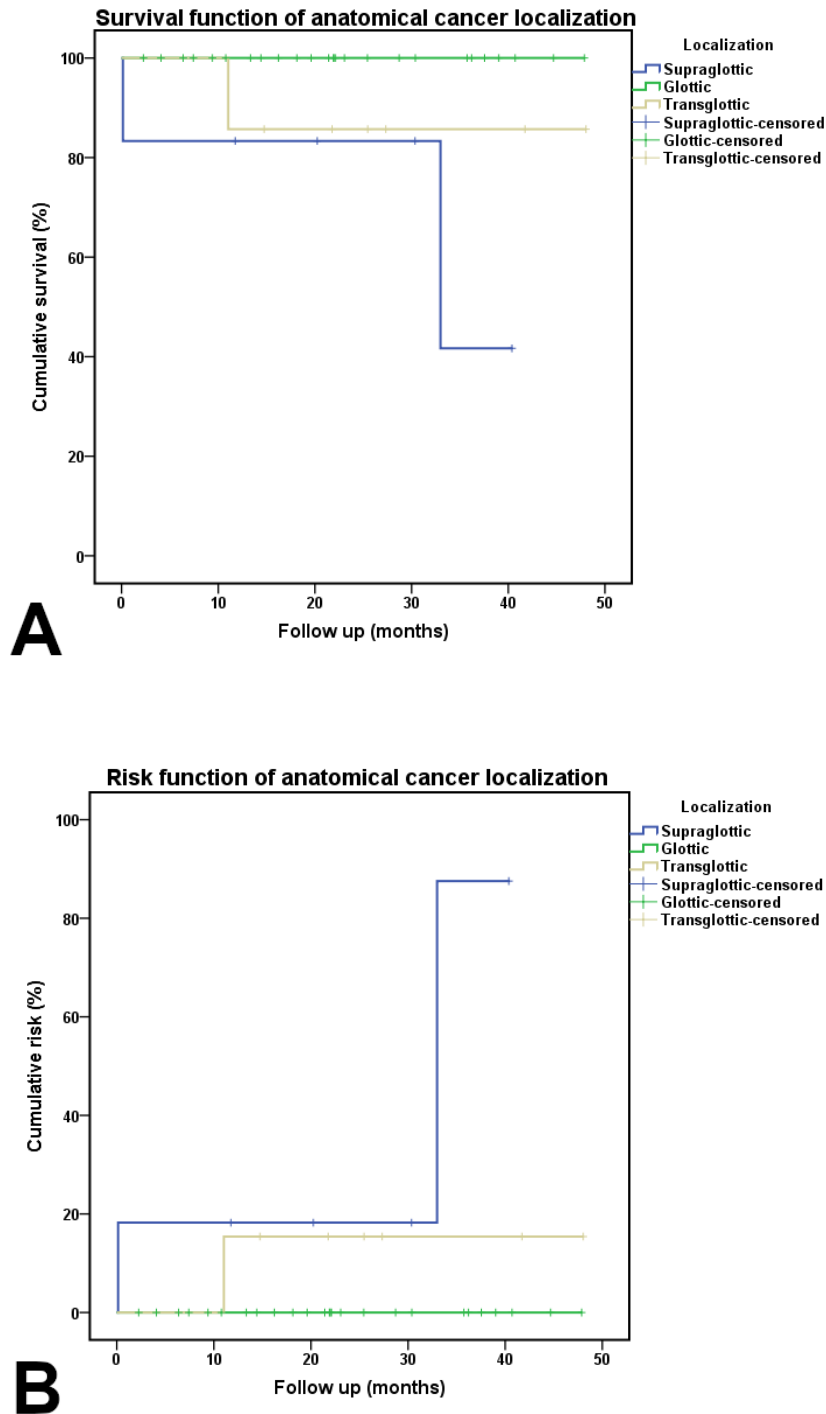




Legend: A) Disease-free survival curves between patients with positive p53 gene and patients with negative p53 marker expression. Through the Log Rank (Mantel-Cox) test, a significant difference in disease-free survival between patients with positive and negative p53 protein expression was observed ($p=0.016$). In p53 negative patients, the disease-free survival was 49.02 [2.99 (43.15 - 54.89) months compared with 36.99 [4.24 (28.68 - 45.30)] months observed in p53 positive patients. **B)** The figure demonstrates the disease-free risk function for patients with positive and negative p53 protein expression. Patients with negative p53 protein expression had a 0% risk of recurrence compared with p53 positive patients with a cumulative risk of laryngeal tumor recurrence of 73.71%.

Three (7.7%) patients died during our study and all had immunohistochemical analysis positive for the p53 protein and a strong intensity (level C) of p53 protein expression. Overall survival of 44.39 [1.99 (40.48 - 48.3)] months [mean (confidence interval of 95%)] was observed in our cohort. A significant difference was found in the survival of patients who were p53 marker positive compared with those who were p53 marker negative ($p=0.039$). The survival time of p53 marker negative patients was 44.78 [2.18 (40.72 - 49.08)] months compared with 33.75 [3.70 (26.50 - 41.01)] months in patients with positive p53 protein expression. As well, there was a significant difference observed in patients with different anatomical cancer localizations ($p=0.032$) (**Figure 3**). No differences in survival time were found between different p53 protein expression levels ($p=0.059$), sexes ($p=0.523$), TNM classifications ($p=0.135$), SLN presence ($p=0.131$), alcoholics and non-alcoholics ($p=0.343$) and smokers and non-smokers patients ($p=0.686$).

Figure 3: Tumor survival and risk function between anatomical cancer localization.



Legend: **A)** Tumor survival curves among patients with different anatomical laryngeal tumor localization showing a significant difference ($p=0.032$). Supraglottic cancer patients had 26.93 [3.02 (21.01 - 32.86)] months of survival time, glottic patients had 48.79 [3.61 (41.71 - 55.87)] months and transglottic anatomical localization patients had 42.52 [2.26 (34.02 - 42.89)] months. **B)** The cumulative risk of death among different anatomical laryngeal cancer localizations. Supraglottic cancer patients had a cumulative risk of 85.55%, transglottic patients had a cumulative risk of 15.42% and glottic patients had a 0% cumulative risk of death.

The crude hazard ratio (HR) for laryngeal tumor recurrence measured using Cox's regression analyses is shown in **Table 2**. Using univariate Cox's analysis, positive p53 gene associated with TNM classification, p53 protein expression associated with TNM classification and p53 level C (strong p53 protein expression) associated with smoking condition were statistically significant as risk factors. The predictor of laryngeal tumor recurrence that remained in the final Cox's proportional hazard regression model (adjusted model) was p53 level C (strong protein expression) associated with patient smoking condition (HR: 21.713).

Table 2 – Tumor recurrence risk factors.

Covariates	Crude HR (95% CI)	Crude p Value	Adjusted HR (95% CI)	Adjusted p Value
Age	1.038 (0.940 - 1.146)	0.460	Refuted	Refuted
Alcoholism	0.034 (0 - 1941.392)	0.546	Refuted	Refuted
Anatomical cancer localization				
Supraglottic	Reference		Refuted	Refuted
Glottic	0.131 (0.012 - 1.446)	0.097	Refuted	Refuted
Infraglottic		-	Refuted	Refuted
Transglottic	1.105 (0.111 - 11045)	0.932	Refuted	Refuted
Gender				
Male	Reference		Refuted	Refuted
Female	0.039 (0 - 16.514)	0.624	Refuted	Refuted
p53 [†]	75.622 (0.023 - 248992.672)	0.295	Refuted	Refuted
p53 [†] * smoking	10.117 (0.913 - 112.073)	0.059	Refuted	Refuted
p53 [†] * TNM	1.960 (1.010 - 3.802)	0.047	Refuted	Refuted
p53 [†] * smoking * TNM	1.605 (0.790 - 3.261)	0.191	Refuted	Refuted
p53 PE				
Negative	0.013 (0 - 43.541)	0.295	Refuted	Refuted
A (mild)	0.044 (0 - 408353086.166)	0.790	Refuted	Refuted
B (moderate)	2.128 (0.220 - 20.562)	0.514	Refuted	Refuted
C (strong)	6.973 (0.725 - 67.052)	0.093	Refuted	Refuted
p53 PE * TNM	1.241 (1.010 - 1.524)	0.040	Refuted	Refuted
p53 PE * smoking	2.819 (1.076 - 7.391)	0.035	Refuted	Refuted

p53 PE * smoking				
p53 negative * Smoking	Reference			
p53 A * Smoking	0 (0 - 0)	0.994	0 (0 - 0)	0.994
p53 B * Smoking	7.732 (0.473 - 126.411)	0.151	7.732 (0.473 - 126.411)	0.151
p53 C * Smoking	21.713 (1.040 - 453.318)	0.047	21.713 (1.040 - 453.318)	0.047
p53 PE * smoking * TNM	1.211 (0.924 - 1.586)	0.165	Refuted	Refuted
Sentinel lymph node (SLN)	3.119 (0.321 - 30.334)	0.327	Refuted	Refuted
Smoking	2.031 (0.285 - 14.455)	0.479	Refuted	Refuted
TNM				
T1	0.025 (0 - 147.755)	0.406	Refuted	Refuted
T2	4.619 (0.651 - 32.790)	0.126	Refuted	Refuted
T3	0.030 (0 - 324.821)	0.459	Refuted	Refuted
T4	3.854 (0.539 - 27.559)	0.179	Refuted	Refuted

CI = Confidence interval; HR = Hazard ratio; p53[†] = Presence or not of p53 marker; p53 PE = p53 protein expression; TNM = tumor (T), lymph node (N) and metastasis (M)

Discussion

During the oncological follow-up of patients with laryngeal cancer, recurrence is the greatest concern for every surgeon. Preventing tumor recurrence is a major challenge for the surgeon and a determining factor in the survival of patients affected by this disease. Smoking and p53 level C (strong p53 protein expression) are risk factors that together increase by 21 times the chance of laryngeal tumor recurrence. The simple immunohistochemical positivity of p53 protein significantly decreases patient survival and in the same way decreases disease-free survival. An important observation is that most patients with T4 laryngeal tumoral stage had moderate or strong p53 protein expression. Therefore, research related to genetic investigations and manipulation have assumed an extremely important role in the identification of genes that may be associated with worse outcomes in the prognosis of patients with this type of cancer [9].

In our study, it was observed that 53% of patients had positive p53 protein expression, which is partly in agreement with Nathan *et al.* [9], Yang *et al.* [10], Ozturk *et al.* [11] and Allegra *et al.* [12], who found 47%, 60%, 55% and 48.7%, respectively, regarding p53 protein expression. Yang *et al.* [10] evaluated only patients with early laryngeal tumors and made use of a CO₂ laser complementary to surgical treatment, which could have hindered the evaluation of the sections in the immunohistochemically analysis. Nathan *et al.* [9], on the other hand, did not exclude patients who underwent neo or adjuvant radiotherapy, which could also influence the analysis of p53 at the surgical margins. So, these studies [9, 10] may have underestimated

the positivity of p53 expression. In contrast, in our study, only patients with negative surgical margins and without previous intervention and treatments were included. In studies by Ozturk *et al.* [11] and Allegra *et al.* [12] when considering solely tumor-free surgical margins, protein expression was identified only in 11% and 38.2% of patients, respectively. However, comparing these studies [11, 12], we observed a considerable increase in the positivity of p53 protein expression, possibly related to local habits in our population such as smoking, which is high when observing underdeveloped countries [13]. Smoking is an important factor that modifies the expression of the p53 protein [1-5, 9-12].

Laryngeal cancer affects men more than women and presents most often between 50 and 60 years of age [14-17]. Most of the literature found that 60% of laryngeal cancer occurs in the glottic region and less than 1% occurs in the subglottic region [18, 19]. Our article found a mean age of 63.74 years and male gender more prevalent than female gender. Likewise, also in agreement with the literature, 66.7% of our cases occurred in the glottic region and no cases were observed in the subglottic region. A difference was observed when comparing our article to the results of Simsek *et al.*, who found 20% and 38% of cases in the glottic region and 8% and 19.6% in the subglottic region, in their publications in 2013 [17] and 2014 [14], respectively. In the same way, we observed differences in the distribution of patients according to the TNM stage, where Simsek *et al.* [14, 17] showed higher frequencies in stages T2 and T4, that together correspond to 56% and 59.8%, in the 2013 and 2014 studies, respectively. In our article, we observed the majority (64.1%) of patients in stages T1 and T3. Such differences in anatomical tumor localization and TNM classification can be justified because the authors [14, 17] did not condition their study only to patients with free margins in the anatomopathological analysis. Another important finding that stands out in our research is the positive correlation between p53 protein expression and TNM classification. It was observed that, as the intensity of p53 protein expression increased, the TNM classification also increased. This finding was also described by Wood *et al.* [20].

It is known that risk factors, such as smoking, can influence the overexpression of the p53 protein in head and neck squamous cell carcinomas. This suggests that the carcinogens present in cigarette smoke can cause mutations in the p53 gene, thereafter, triggering major changes in cancer development [1-5, 9-12]. Metheetraitur *et al.* [21] and Chrysovergis *et al.* [22] found a smoking frequency of 76.2% and 100%, respectively, in patients with laryngeal cancer. However, none of them found an association between smoking and p53 expression and did not investigate the association of smoking with tumor recurrence. Karpathiou *et al.* [23], as opposed to Metheetraitur *et al.* [21] and Chrysovergis *et al.* [22], found an association between

abnormal p53 expression and smoking. But, like the other authors [21, 22], they did not assess the association between smoking and tumor recurrence. Some authors [10, 11, 24] have attempted to demonstrate an association in which patients with p53 positivity, even in early tumor stages and with free surgical margins, have a higher recurrence of the disease; however, other authors have found no such association [25]. It is important to note that all authors [10, 11, 21-25] sought to find in their data possible association between smoking and the expression of the p53 or its simple positivity. Likewise, they sought to find an association between tumor recurrence and p53 expression or positivity. However, none of these articles sought to define smoking and/or p53 protein expression as risk factors for tumor recurrence or defined disease-free survival in these groups. In our opinion, the definition of a risk factor and measurement of disease-free survival has much more clinical and scientific value than an association. Mei *et al.* [26] reported a 2.61-fold risk of recurrence in patients with p53 protein overexpression. Even after defining the overexpression of the p53 protein as a risk factor, the authors did not analyze disease-free survival. Allegra *et al.* [12] identified that patients with positive p53 expression had a significantly higher incidence of tumor recurrence and a 79.1% survival rate compared to patients negative for p53, in which we observed a survival rate of 86.9%. These authors did not define smoking as a risk factor for recurrence. Our study is one of the few in the literature, if not the only one, that defines that the association between smoking and a strong intensity of p53 protein expression (p53 level C) as an extremely relevant risk factor for tumor recurrence. Together, they increase the risk of recurrence of laryngeal cancer by 21 times. We found an overall 22.51% cumulative risk of tumor recurrence. Negative p53 protein expression was associated with a 0% risk of recurrence compared with positive p53 protein patients with a cumulative risk of 73.71%. The overall disease-free survival was 43.10 months. Patients negative for p53 protein expression had disease-free survival of 49.02 months compared with 36.99 months observed in p53 marker positive patients.

In our study, a survival of 44.78 months was found in patients with negative p53 expression compared to 33.75 in patients with positive p53 protein expression. A significantly statistical difference of 11.03 months. This value was awfully close to that of Nathan *et al.* [9] who found a difference of 13.5 months. This large difference in survival observed in the Nathan *et al.* [9] study may be a consequence of the use of neo and adjuvant therapies, which would influence the identification of p53 in the free surgical margins and compromise the result. This would underestimate the identification of patients who would not have positive free margins and should be excluded from the study. However, due to the use of these therapies, these patients have negative free margins. In this way, they enter the analysis, are p53 positive in the

anatomical section and have a shorter survival time, thereby increasing the difference observed between the survival of patients with negative and positive p53 expression. We also observed a statistically significant difference in survival between patients with different anatomical tumor localization. Patients with supraglottic tumors had a shorter survival time compared to patients with tumors in other anatomical regions of the larynx. At the same time, it was observed that the cumulative risk of death of these patients with supraglottic tumors was greater than the others. Anatomically, tumors in the supraglottic region have greater lymphatic drainage and this represents an area that progresses with late clinical manifestations and delayed diagnosis, which can lead to significant results in relation to this location and patient survival [27].

Our study has some limitations. It was a study with few subjects and representative of a population that is served by our public tertiary hospital of approximately 541,247 inhabitants. Therefore, it may not be representative of the population of our country, just as its findings are not applicable to other populations in other countries. However, our study has several strengths, as it was a prospective cohort study with a strictly selected population; that is, only patients with free surgical margins were included. It used a standard methodology and adequate statistical analysis. Likewise, it is one of the few studies to demonstrate that being a smoker and having strong p53 protein expression are risk factors that increase the chance of tumor recurrence by 21 times.

Conclusion

p53 protein expression in laryngeal cancer is closely related to decreased survival, decreased disease-free survival, and combined with smoking, is an extremely important risk factor for tumor recurrence. Our study reinforces the idea of using molecular markers during the treatment of laryngeal cancer, such as the p53 marker. This is an important aid in the early detection of patients with a high risk of disease recurrence, even those who have free surgical margins in the anatomopathological analysis.

Since immunohistochemical analysis is an easy and widely used test today, the search for the expression of p53 should be performed in patients with laryngeal cancer since p53 positivity was associated with a greater chance of recurrence and worse survival. Therefore, those laryngeal cancer patients who present with overexpression of the p53 marker in the postoperative period must receive other adjuvant therapy or must have a differentiated cancer follow-up, with more frequent returns to identify a possible early recurrence of the disease.

References

1. WHO. *Estimated cancer disease markers incidence and mortality and prevalence worldwide in 2021*. 2017 01/01/2019]; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Colombo, J. and P. Rahal, *Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço*. Ver Bras Cancerol, 2009. **55**(2): p. 165-174.
3. INCA, *Os Principais Tipos de Câncer*, in *ABC do Câncer: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer* M.D. SAÚDE and Silva, Editors. 2017: Rio de Janeiro, RJ. p. 22-26.
4. Worsham, M.J., *et al.*, *Delineating genetic pathways of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2003. **129**(7): p. 702-8.
5. Chung, C.H., S. Levy, and W.G. Yarbrough, *Clinical applications of genomics in head and neck cancer*. Head & Neck, 2006. **28**(4): p. 360-368.
6. Brierley, J.D., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th Edition ed. 2017: Wiley-Blackwell. 272.
7. Wang, L.D., *et al.*, *Accumulation of p53 protein in human esophageal precancerous lesions: a possible early biomarker for carcinogenesis*. Cancer Res, 1993. **53**(8): p. 1783-7.
8. Fouret, P., *et al.*, *Expression of p53 protein related to the presence of human papillomavirus infection in precancer lesions of the larynx*. Am J Pathol, 1995. **146**(3): p. 599-604.
9. Nathan, C.A.O., *et al.*, *Correlation of p53 and the Proto-Oncogene eIF4E in Larynx Cancers: Prognostic Implications*. Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3599-3604.
10. Yang, J.Q., *et al.*, *Over-expression of p53, p21 and Cdc2 in histologically negative surgical margins is correlated with local recurrence of laryngeal squamous cell carcinoma*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(7): p. 4295-302.
11. Ozturk, K., *et al.*, *The prognostic value of p53 expression in negative surgical margins of early glottic carcinoma in the prediction of local recurrences*. Acta Otolaryngol, 2014. **134**(5): p. 525-30.
12. Allegra, E., *et al.*, *p53 overexpression on the resection margins as a marker of local recurrence in glottic T1a carcinoma*. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2003. **23**(6): p. 454-8.
13. da Silva, F.B., *et al.*, *Prevalence of solid neoplasms diagnosed between the years of 2011 to 2016 and oncologically treated at the University Hospital of Santa Maria*. J Clin Med Res, 2019. **11**(4): p. 275-282.
14. Simsek, H., *et al.*, *The expression of EGFR, cerbB2, p16, and p53 and their relationship with conventional parameters in squamous cell carcinoma of the larynx*. Turk J Med Sci, 2014. **44**(3): p. 411-6.
15. Sternberg, S.S., *Histology for Pathologists*. 2nd ed. 1997, Philadelphia, PA, USA: Lippincott-Raven Publishers.
16. Mills, S.E., *et al.*, *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*. 4th ed 2004, Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins.

17. Simsek, G., *et al.*, *Expression of cydin D1, p27, p21, bcl-2, and p53 in laryngeal squamous cell carcinoma and an investigation of the correlation with conventional prognostic factors*. Turk J Med Sci, 2013. **43**: p. 27-32.
18. Cardesa, A. and P.J. Slootweg, *Pathology of the Head and Neck*. 2006. 1-316.
19. Pilch, B.Z., *Head and Neck Surgical Pathology*. 1st ed. 2000, Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins (LWW).

6 CONCLUSÃO

Os pacientes com câncer de laringe avaliados nesse trabalho apresentaram a expressividade da proteína p53 em 53,8% das amostras cirúrgicas analisadas e o perfil da população foi predominantemente de homens com idade média no momento da cirurgia de 63,74 (\pm 9,16) anos, com histórico pregresso de tabagismo e etilismo.

Identificamos que os tumores que acometeram a região supraglótica culminaram com uma menor taxa de sobrevida ($p=0,032$).

Com relação ao envolvimento linfonodal, a grande maioria dos pacientes (92,3%) apresentou na análise pós-operatória linfonodos negativos para metástases.

A superexpressão da proteína p53 em suas amostras, tiveram um menor tempo de livre da doença ($p=0,016$).

Estádios mais avançados da doença (T4 da classificação TNM) apresentaram de forma mais acentuada a expressão do marcador quando comparados a estádios inferiores.

O desenvolvimento do tumor de laringe teve forte correlação com o tabagismo, evidenciando que, entre pacientes tabagistas, houve um aumento de 21 vezes na taxa de recorrência do tumoral.

O p53 foi um preditor significativo de menor sobrevida, em nosso estudo, a sobrevida entre pacientes com p53 positiva / negativa foi de aproximadamente 33,75 (26,5 - 41,01) meses.

Portanto, esse estudo reforça que a análise de marcadores moleculares em tumores de laringe é importante aliada na avaliação prognóstica dos casos, podendo influenciar seu manejo terapêutico.

A literatura ainda apresenta resultados controversos a respeito desse marcador pois, devido a apresentação clínico-molecular heterogênea dos tumores de laringe, não se sabe ainda qual a real representatividade prognóstica de sua análise nas amostras estudadas.

REFERÊNCIAS

- ALLEGRA, E. *et al.* p53 overexpression on the resection margins as a marker of local recurrence in glottic T1a carcinoma. **Acta otorhinolaryngologicaitalica**, v. 23, n. 6, p. 454-458, 2003.
- AL ALWAN, N. A. Colposcopy, cervical cytology and human papillomavirus detection as screening tools for cervical cancer. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 7, n. 1-2, 100-105, 2001, 2001.
- ALVARENGA, L. D. M. *et al.* Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, n.1, p. 68-73, 2008.
- BEHLAU, M.; AZEVEDO, R.; MADAZIO, G. Anatomia da laringe e fisiologia da produção vocal. In: BEHLAU, M. *Voz: o livro do especialista*, 2001. p. 1-51
- BOING, A. F.; ANTUNES, J. L. F. Condições socioeconômicas e câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática de literatura. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 615-622, 2011.
- CANEVARI, R. A., ROGATTO, S. R. Câncer de cabeça e pescoço. In: FERREIRA, C. G.; CASALLI, J. C. R. (org.). **Oncologia molecular**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 189-203.
- CHUNG, C. H.; LEVY, S.; YARBROUGH, W. G. Clinical applications of genomics in head and neck cancer. **Head & Neck**, v. 28, n. 4, p. 360-368, 2006.
- COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 2, p. 165-74, 2009.
- CONCEIÇÃO, M. B. M.; BOING A. F.; PERES K. G. Time trends in prostate cancer mortality according to major geographic regions of Brazil: an analysis of three decades. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 3, p. 559-566, 2014.
- CURADO, M. P.; SOUZA, D. L. B. The burden of cancer in Latin America and the Carribean. **An Global Health**, v. 80, p. 370-377, 2014.
- FACINA, T. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n. 1, p. 63, mar. 2014. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/revista/index.php/revista/article/view/964>. Acesso em: 07 dez. 2020.
- FRIEDMAN, M. *et al.* Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. **Head & Neck**, v. 23, n. 4, p. 280-285, 2001.
- HIRVIKOSKI, P. *et al.* p53 expression and cell proliferation as prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, n. 9, p. 3111-3120, 1997.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Disponível em:

<https://santacasadermatoazulay.com.br/wp-content/uploads/2017/06/estimativa-2016-v11.pdf>.

Acesso em: 10 dez. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Tipos de**

câncer. Rio de Janeiro, 12 set. 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>.

Acesso em: 3 out. 2020.

JÄCKEL, M. C. *et al.* Prognostic significance of p53/bcl-2 co-expression in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. **The Laryngoscope**, v. 110, n. 8, p. 1339-1345, 2000.

JALALI, M. M. *et al.* p53 overexpression impacts on the prognosis of laryngeal squamous cell carcinomas. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, n. 7, p. 1731-1734, 2011.

JIN, Y. T. *et al.* The prognostic significance of the biomarkers p21, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 82, n. 11, p. 2159-2165, 1998.

KARP, G. **Biologia celular e molecular.** Barueri: Manole Ltda., 2005.

KHADEMI, B. *et al.* The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. **Cancer Letters**, v. 184, n. 2, p. 223-230, 2002.

KOKOSKA, M. S. *et al.* Prognostic significance of clinical factors and p53 expression in patients with glottic carcinoma treated with radiation therapy. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 78, n. 8, p. 1693-1700, 1996.

KUMAR, B. *et al.* Expression of p53 and Bcl-xL as predictive markers for larynx preservation in advanced laryngeal cancer. **Archives of Otolaryngology: Head & Neck Surgery**, v. 134, n. 4, p. 363-369, 2008.

RUIZ, M. T. *et al.* Epidemiologia e biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço. **Arquivos de Ciência da Saúde**, v. 13, n. 1, p. 34-8, 2006.

MIGUEL-LUKEN, M. J.; CHAVES-CONDE, M.; CARNERO, A. A genetic view of laryngeal câncer heterogeneity. **Cell Cycle**, v. 15, n. 9, p. 1202-1212, 2016.

NADAL, A. *et al.* p53 expression in normal, dysplastic, and neoplastic laryngeal epithelium. Absence of a correlation with prognostic factors. **The Journal of Pathology**, v. 175, n. 2, p. 181-188, 1995.

NATHAN, C. A. O. *et al.* Correlation of p53 and the proto-oncogene eIF4E in larynx cancers: prognostic implications. **Cancer Research**, v. 60, n. 13, p. 3599-3604, 2000.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. **NCCN Guidelines Version**

2.2011: staging head and neck cancers. Disponível em:

https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx. Acesso em: 07 out. 2020.

NYLANDER, K.; DABELSTEEN, E.; HALL, P. A. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 29, n. 9, p. 413-425, 2000.

OZTURK, K. *et al.* The prognostic value of p53 expression in negative surgical margins of early glottic carcinoma in the prediction of local recurrences. **Acta Otolaryngologic**, v. 134, n. 5, p. 525-530, 2014.

PAI, H. H. *et al.* Overexpression of p53 protein does not predict local-regional control or survival in patients with early-stage squamous cell carcinoma of the glottic larynx treated with radiotherapy. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 41, n. 1, p. 37-42, 1998.

PEREA, L. M. E. *et al.* Tendência de mortalidade por câncer de boca e faringe no Brasil no período 2002-2013. **Revista de Saúde Pública**, v. 52, p. 10, 2018.

PESCHOS, D. *et al.* Cell cycle proteins in laryngeal cancer: role in proliferation and prognosis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 3, p. 431-437, 2005.

PUKKILA, M. J. *et al.* Nuclear and cytoplasmic p53 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic implications. **Head & Neck**, v. 24, n. 8, p. 784-791, 2002.

RUIZ, M. T. *et al.* The role of p53, PCNA and Ki-67 as outcome predictors in the treatment of laryngeal cancer. **Journal of Medicine and Life**, v. 2, n. 2, p. 219, 2009.

SANTOS, M de O. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 64, n. 1, p. 119-120, mar. 2018. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/revista/index.php/revista/article/view/115>. Acesso em: 07 dez. 2020.

SARAFOLEANU, D. *et al.* The role of p53, PCNA and Ki-67 as outcome predictors in the treatment of laryngeal cancer. **Journal of Medicine and Life**, v. 2, n. 2, p. 219, 2009.

SEER. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **Cancer Statistics NCI (2003-2007)**. Bethesda, MD: National Cancer Institute, Division of Cancer Control and Population Sciences, 2008.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018.

SIMŞEK, H. *et al.* The expression of EGFR, cerbB2, p16, and p53 and their relationship with conventional parameters in squamous cell carcinoma of the larynx. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 411-416, 2014.

SMARDOVA, J. *et al.* Analysis of tumor suppressor p53 status in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncology Reports**, v. 11, n. 4, p. 923-929, 2004.

SPAFFORD, M. F.; KOEPPE, J.; PAN, Z. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. **Archives of Otolaryngology: Head & Neck Surgery**, v. 122, n. 6, p. 627-632, 1996.

TANDON, S. *et al.* A systematic review of p53 as a prognostic factor of survival in squamous cell carcinoma of the four main anatomical subsites of the head and neck. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 19, n. 2, p. 574-587, 2010.

TANNURE, M. C.; PINHEIRO, A. M. **Sistematização da assistência de enfermagem**. 2 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2010.

VIELBA, R. *et al.* p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. **The Laryngoscope**, v. 113, n. 1, p. 167-172, 2003.

WANG, L. D. *et al.* Accumulation of p53 protein in human esophageal precancerous lesions: a possible early biomarker for carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 53, n. 8, p. 1783-1787, 1993.

WORSHAM, M. J. *et al.* Delineating genetic pathways of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. **Archives of Otolaryngology: Head & Neck Surgery**, v. 129, n. 7, p. 702-708, 2003.

YANG, J. Q. *et al.* Over-expression of p53, p21 and Cdc2 in histologically negative surgical margins is correlated with local recurrence of laryngeal squamous cell carcinoma. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 7, p. 4295, 2014.

ANEXO A – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOSDados Pessoais:

1. **Gênero:** 1-MASCULINO 2- FEMININO
2. **Idade:**
3. **Data de Nascimento:** __/__/__
4. **Sexo:**

Dados da Neoplasia de Laringe:

1. **Localização da Neoplasia:** 1-SUPRAGLÓTICO 2-GLÓTICO 3-INFRAGLÓTICO 4-TRANSGLÓTICO
2. **Estadiamento pós-operatório:** I / II / III / IV
3. **Tratamento realizado:** 1- CIRURGIA EXCLUSIVA 2-RT+QT EXCLUSIVA 3- CIRURGIA + ADJUVÂNCIA COMBINADA 4- CIRURGIA + RT
4. **Presença de linfonodos no Anatomopatológico:** + 1 (LINFONODOS POSITIVOS) / - 2 (LINFONODOS NEGATIVOS)
5. **Positividade do p53:** 1- p53 POSITIVO 2- p53 NEGATIVO
6. **Margens cirúrgicas:** + 1 (POSITIVAS/ COMPROMETIDAS) / - 2 (NEGATIVA/ NÃO COMPROMETIDA)
7. **Recidiva (nos 4 anos do estudo):** 1-NÃO/ 2- SIM (LOCOREGIONAL) 3- SIM (OUTRO LOCAL)
8. **Sobrevida:** 1- VIVO SEM DOENÇA 2- VIVO COM DOENÇA 3- ÓBITO PELA DOENÇA 4-ÓBITO COMPLICAÇÕES DA DOENÇA 5- ÓBITO POR OUTRAS CAUSAS.

ANEXO B – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE

Título do projeto: Expressividade imuno-histoquímica do marcador p53 com fatores prognósticos em pacientes tratados cirurgicamente com câncer de laringe

Pesquisador responsável: Tiango Aguiar Ribeiro

Instituição/Departamento: Departamento de Cirurgia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Universitário de Santa Maria, Hospital Universitário de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria.

Telefone para contato: (55) 991275091

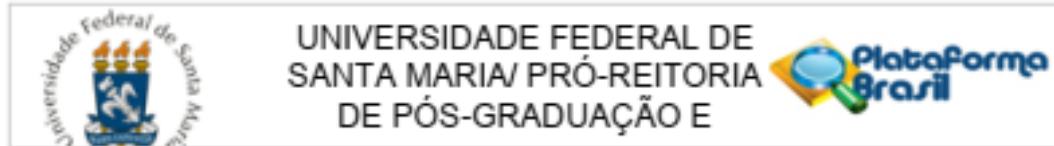
Local da coleta de dados: Ambulatório da Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Patologia do Hospital Universitário de Santa Maria.

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados *em prontuários e bases de dados do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Patologia do Hospital Universitário de Santa Maria*. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas na *sala de materiais e de documentos do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Universitário de Santa Maria* por um período de *cinco anos* sob a responsabilidade do Prof. Dr. Tiango Aguiar Ribeiro. Este projeto de pesquisa foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM para apreciação.

TIANGO AGUIAR RIBEIRO
CRM – RS: 32879
CPF:822.116.800-97

Avenida Roraima, 1000, Prédio da Reitoria, 2º Andar, Sala Comitê de Ética. Cidade Universitária, Bairro Camobi CEP 97105900, Santa Maria, RS Tel. (55) 3220 9362 fax (55) 32208009 e-mail: comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br

ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UFSM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressividade do P53 e do P16 em pacientes com carcinoma de células escamosas de boca, laringe e faringe nas disseminação linfonodal.

Pesquisador: Maria da Graça Caminha Vidal

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 44642915.6.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.103.486

Data da Relatoria: 03/06/2015

Apresentação do Projeto:

O presente estudo tem como o objetivo analisar a frequência da imuno expressividade do gene P53 e da proteína P16 nos pacientes portadores de carcinoma epidermóide na cavidade oral, laringe e faringe, diagnosticados e tratados no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HUSM, no período de 2015 a 2018.

É notória a importância da expressividade do P53 em pacientes com carcinoma de células escamosas de via aérea superior relacionados, a fatores de risco como o tabagismo e as características de invasão local. Porém há controvérsia na literatura, quanto a sua relação direta com a disseminação linfonodal. As mutações no gene TP53 ocorrem em 40% a 60% dos pacientes com CEC em via aéreo-digestivo superior; associado a um pior prognóstico pelo avanço da doença, diminuindo o tempo de sobrevivência. Em relação, ao P16 há estudos recentes que mencionam pacientes com sua expressividade positiva à maior disseminação linfática; porém com uma resposta favorável ao tratamento com radioterapia e quimioterapia. Atualmente, o perfil do paciente com CEC em via aéreo-superior digestiva tem a expressividade citogenética variada e mais complexa tanto relacionados com genes supressores como P53, como os oncogenes relacionados à infecção por HPV (P16); apresentando quadros de comportamentos biológicos

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

Bairro: Camobi

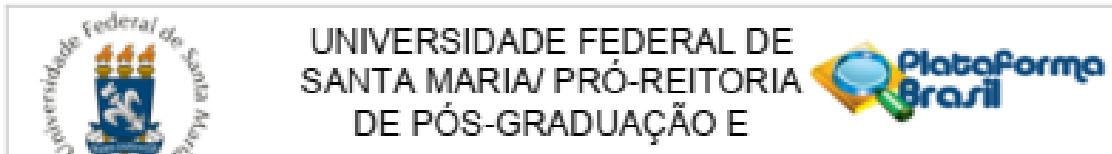
CEP: 97.105-970

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9382

E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.103.486

diferentes, independentes dos estádios oncológicos.

Esse estudo visa verificar a expressividade do P53 e do P16 nos carcinomas epidermóides diagnosticados e tratados nos pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria-RS e sua relação direta com a disseminação local e regional da doença e o tempo livre de doença.

A maior parte desses pacientes é de origem européia, em decorrência da forte origem italiana e alemã da nossa população no Centro do Rio Grande do Sul. Os objetivos visam verificar o grau de disseminação da doença, em estágio clínico e patológico, com o grau de frequência dos genes P53 e p16 nos CEC desses pacientes, relacionando a fatores de risco e étnicos. E por final relacionar a sua expressividade com o tempo de sobrevida livre de doença nesses pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar a existência do aumento da expressividade do gene P53 e da proteína P16 concomitantes ou separados, diagnóstico e no aumento do estadiamento dos pacientes com CEC de boca, laringe e faringe.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram avaliados adequadamente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

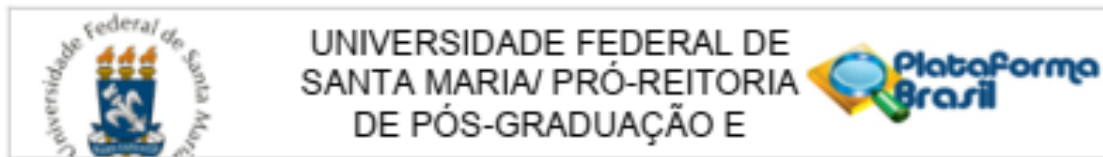
O TCLE apresentado não indica o endereço da Instituição/Departamento descrito de maneira completa.

As informações quanto ao local de guarda dos dados ainda não são claras (Informar no Termo de Confidencialidade) o prédio e a sala onde os mesmos serão mantidos.

Recomendações:

Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/Index.php/cep> - na aba "orientações

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 3ª andar
 Bairro: Camobi CEP: 97.105-970
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.103.486

gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. Acompanhe as orientações disponíveis, evite pendências e agilize a tramitação do seu projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

No termo de confidencialidade deve-se indicar, com precisão, o prédio e a sala onde os dados serão mantidos. No arquivo anexado essas informações estão indicadas por "xx". É preciso corrigir esta informação.

A aprovação não exige o proponente de fazer a correção indicada e requerida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

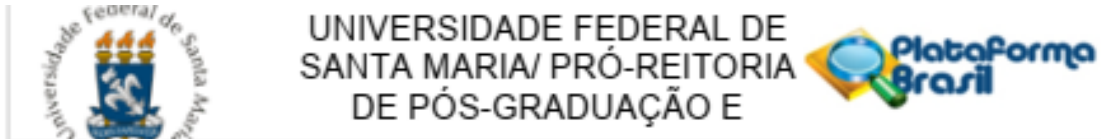
Considerações Finais a critério do CEP:

SANTA MARIA, 11 de Junho de 2015

Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
 (Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
 Bairro: Camobi CEP: 97.105-970
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com

ANEXO D – APROVAÇÃO DA EMENTA NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UFSM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Expressividade do P53 e do P16 em pacientes com carcinoma de células escamosas de boca, laringe e faringe nas disseminação linfonodal.

Pesquisador: Maria da Graça Caminha Vidal

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 44842915.8.0000.5348

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.132.471

Apresentação do Projeto:

Pela notificação o proponente apresentou emenda ao projeto "Expressividade do P53 e do P16 em pacientes com carcinoma de células escamosas de boca, laringe e faringe nas disseminação linfonodal."

A justificativa da emenda foi apresentada nos seguintes termos: "Inclusão de análise histopatológica com imunoistoquímica nas peças anatômicas já coletadas durante este estudo. Portanto não serão incluídos novos pacientes, apenas nas peças anatômicas já utilizadas durante este estudo será feita uma nova análise. Da mesma forma que houveram incrementos na metodologia, referente a esta análise, de como será feita. Da mesma forma que houve incremento nos objetivos secundários do estudo, que foram melhor detalhados. Houve alteração do cronograma em relação a submissão da emenda, coleta destes novos dados referentes a nova análise e quanto a realização do relatório final e divulgação dos resultados."

A emenda pode ser aprovada.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 3.132.471

Objetivo da Pesquisa:

Verificar a existência do aumento da expressividade do gene P53 e da proteína P16 concomitantes ou separados, diagnóstico e no aumento do estadiamento dos pacientes com CEC de boca, laringe e faringe.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1285267_É1.pdf	23/01/2019 18:31:29		Aceito
Outros	Docem.pdf	23/01/2019 18:31:02	Maria da Graça Caminha Vidal	Aceito
Outros	Ementa.pdf	23/01/2019 18:28:51	Maria da Graça Caminha Vidal	Aceito
Outros	Termo de Confidencialidade Maria da Graça.pdf	03/08/2015 15:58:29		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Maria da Graça.pdf	03/08/2015 15:53:09		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO DE DOUTORADO (1)cor (5) 2.pdf	03/08/2015 10:16:59		Aceito
Outros	autorização do husm para o projeto de pesquisa em pdf.pdf	31/05/2015 12:25:31		Aceito

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

Bairro: Camobi

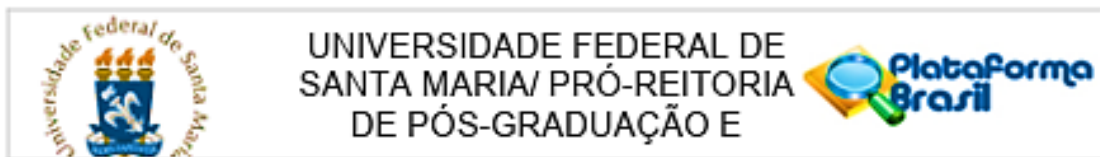
CEP: 97.105-970

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.132.471

Outros	doc reunidos para doutorado.pdf	31/05/2015 10:30:10		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo de Confidencialidade.jpg	04/05/2015 16:12:46		Aceito
Declaração de Pesquisadores	GAP.jpg	04/05/2015 16:11:57		Aceito
Outros	Autorização GEP.jpg	04/05/2015 16:10:12		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.jpg	04/05/2015 16:08:11		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTA MARIA, 05 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
 (Coordenador(a))

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
 Bairro: Camobi CEP: 97.105-970
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com

ANEXO E – NORMATIVAS DA REVISTA PARA PUBLICAÇÃO

7/26/2020

Instructions for Authors | JAMA Surgery | JAMA Network

Instructions for Authors

Contact Information

JAMA Surgery, Melina R. Kibbe, MD, Editor, The University of North Carolina at Chapel Hill; email: jamasurg@jamanetwork.org. Authors should submit inquiries about manuscripts by email. Manuscripts may be submitted online at <http://manuscripts.jamasurg.com> (<http://manuscripts.jamasurg.com>).

How Do I?

Determine My Article Type

Categories of Articles

Research

Article Type	Description	Requirements
Original Investigation <small>full info</small>	Clinical trial Meta-analysis Intervention study Cohort study Case-control study Epidemiologic assessment Survey with high response rate Cost-effectiveness analysis Decision analysis Study of screening and diagnostic tests Other observational study	<ul style="list-style-type: none"> • 3000 words • ≤5 tables and/or figures • Structured abstract • Key Points • Study Type • Follow EQUATOR Reporting Guidelines
Research Letter <small>full info</small>	Concise, focused reports of original research. Can include any of the study types listed under Original Investigation.	<ul style="list-style-type: none"> • 600 words • No more than 7 authors • ≤6 references • ≤2 small tables and/or figures • Study Type • No Abstract or Key Points • Follow EQUATOR Reporting Guidelines

[Back to top](#)

Clinical Review and Education

Article Type	Description	Requirements
Systematic Review (without meta-analysis) <small>full info</small>	This article type requires a presubmission inquiry. See the "full info" below for requirements and contact information. Critical assessments of the literature and data sources pertaining to clinical topics, emphasizing factors such as cause, diagnosis, prognosis, therapy, prevention.	<ul style="list-style-type: none"> • 3500 words • 50-75 references • ≤5 tables and/or figures • A PRISMA-style flow diagram should be included as an online supplement

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

	published as Original Investigations (see Meta-analysis).	<ul style="list-style-type: none"> • Subtitle should be "A Systematic Review" • Structured abstract • Key Points • Follow EQUATOR Reporting Guidelines
Article Type Advances in Diagnosis and Treatment Review <small>full info</small>	Description <p>This article type requires a presubmission inquiry. See the "full info" below for requirements and contact information.</p> <p>A complete systematic review of the last 5 years of published literature focusing on the latest information about management of diseases and conditions, emphasizing what is new; typically written by senior experts in the field.</p> <p>These reviews should address a specific question or issue that is relevant for clinical practice.</p>	Requirements <ul style="list-style-type: none"> • 3500 words • 50-75 references • ≤5 tables and/or figures • A PRISMA-style flow diagram should be included as an online supplement • Include a table with ratings of the quality of the studies/evidence • Subtitle should be "Advances in Diagnosis and Treatment" • Structured abstract • Key Points • Follow EQUATOR Reporting Guidelines
Article Type Narrative Review <small>full info</small>	Description <p>This article type requires a presubmission inquiry. See the "full info" below for requirements and contact information.</p> <p>Up-to-date review for clinicians on a topic of general common interest from the perspective of internationally recognized experts in these disciplines.</p> <p>The focus should be an update on current understanding of the physiology of the disease or condition, diagnostic consideration, and treatment.</p> <p>These reviews should address a specific question or issue that is relevant for clinical practice.</p>	Requirements <ul style="list-style-type: none"> • 2000-3500 words • 50-75 references • ≤5 tables and/or figures • 3-part structured abstract • No Key Points • Subtitle should be "A Review"
Article Type Special Communication <small>full info</small>	Description <p>This journal publishes very few of these types of articles.</p> <p>These manuscripts describe an important issue in clinical medicine, public health, health policy, or medical research in a scholarly, thorough, well-referenced, systematic, and evidence-based manner.</p>	Requirements <ul style="list-style-type: none"> • 3000 words • 50 references • ≤4 tables and/or figures • Depending on the content, either a structured abstract or unstructured abstract • No Key Points
Article Type Surgical Innovation <small>full info</small>	Description <p>This article requires a presubmission inquiry.</p> <p>Succinct review of specific innovative topics or questions in surgery, including innovations in the delivery of clinical care but can also include cutting-edge developments in education, quality, safety,</p>	Requirements <ul style="list-style-type: none"> • 1200 words (or 1000 words with 1 small table or figure) • ≤7 references at submission • ≤3 authors, with no more than 2 affiliations per author

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

[Back to top](#)

Opinion

Article Type Viewpoint
full info**Description**

May address virtually any important topic in medicine, public health, research, discovery, prevention, ethics, health policy, or health law and generally are not linked to a specific article.

Requirements

- 1200 words (or 1000 words with 1 small table or figure)
- ≤7 references at submission
- ≤3 authors, with no more than 2 affiliations per author

[Back to top](#)

Correspondence

Article Type Letter to the Editor
full info**Description**

Letters discussing a recent article in this journal should be submitted within 4 weeks of the article's publication online.

Requirements

- 400 words
- ≤5 references (1 of which should be to the recent article)
- ≤3 authors

Article Type Letter in Reply
full info**Description**

Replies by authors of original articles to letters from readers.

Requirements

- 500 words
- ≤6 references
- ≤3 authors

Study Types

How Do I?

Determine My Study Type

Study Type**Randomized Clinical Trial**
full info**Description**

A trial that prospectively assigns participants to intervention or comparison groups to study the cause-and-effect relationship between an intervention and a health outcome. Interventions include but are not limited to drugs, surgical procedures, devices, behavioral treatments, educational programs, dietary interventions,

Requirements

- 3000 words
- ≤5 tables and/or figures, including CONSORT flow diagram
- 50-75 references
- Structured abstract
- Key Points
- Subtitle should be "A Randomized Clinical Trial"
- Trial registration and ID
- Trial protocol
- CONSORT checklist
- Data Sharing Statement
- Follow CONSORT Reporting Guidelines (<http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/consort/>)

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

process-of-care changes, and the like.

Study Type

Parallel-Design Double-blind Trial

[full info](#)

Description

A randomized trial that prospectively assigns participants to 2 or more groups to receive different interventions. Participants and those administering the interventions are unaware of which intervention individual participants are receiving.

Requirements

- 3000 words
- ≤5 tables and/or figures, including CONSORT flow diagram
- 50-75 references
- Structured abstract
- Key Points
- Subtitle should be "A Randomized Clinical Trial"
- Trial registration and ID
- Trial protocol
- CONSORT checklist
- Data Sharing Statement
- Follow CONSORT Reporting Guidelines (<http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/consort/>)

Study Type

Crossover Trial

[full info](#)

Description

A trial in which participants receive more than 1 of the treatments under investigation, usually in a randomly determined sequence, and with a prespecified amount of time (washout period) between sequential treatments.

Requirements

- 3000 words
- ≤5 tables and/or figures, including CONSORT flow diagram
- 50-75 references
- Structured abstract
- Key Points
- Subtitle should be "A Randomized Clinical Trial"
- Trial registration and ID
- Trial protocol
- CONSORT checklist
- Data Sharing Statement
- Follow CONSORT Reporting Guidelines (<http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/consort/>)

Study Type

Equivalence and Noninferiority Trial

[full info](#)

Description

A trial designed to assess whether the treatment or intervention under study (eg, a new intervention) is no worse than an existing alternative (eg, an active control). In these trials, authors must prespecify a margin of noninferiority that is consistent with all relevant studies and within which the new intervention can be assumed to be no worse than the active control.

Requirements

- 3000 words
- ≤5 tables and/or figures, including CONSORT flow diagram
- 50-75 references
- Structured abstract
- Key Points
- Subtitle should be "A Randomized Clinical Trial"
- Trial registration and ID
- Trial protocol
- CONSORT checklist
- Data Sharing Statement
- Follow CONSORT Reporting Guidelines (<http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/consort/>)

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

<p>Cluster Trial full info</p>	<p>A trial that includes random assignment of groups rather than individuals to intervention and control groups.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 3000 words • ≤5 tables and/or figures, including CONSORT flow diagram • 50-75 references • Structured abstract • Key Points • Subtitle should be "A Randomized Clinical Trial" • Trial registration and ID • Trial protocol • CONSORT checklist • Data Sharing Statement • Follow CONSORT Reporting Guidelines (http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/consort/)
<p>Study Type Nonrandomized Controlled Trial full info</p>	<p>Description A trial that prospectively assigns groups or populations to study the efficacy or effectiveness of an intervention but in which the assignment to the intervention occurs through self-selection or administrator selection rather than through randomization. Control groups can be historic, concurrent, or both. This design is sometimes called a quasi-experimental design.</p>	<p>Requirements</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3000 words • ≤5 tables and/or figures, including CONSORT flow diagram • 50-75 references • Structured abstract • Key Points • Subtitle should be "A Nonrandomized Controlled Trial" • Trial registration and ID • Trial protocol • CONSORT checklist • Data Sharing Statement • Follow TREND Reporting Guidelines
<p>Study Type Meta-analysis full info</p>	<p>Description A systematic review that includes a statistical technique for quantitatively combining the results of multiple studies that measure the same outcome into a single pooled or summary estimate.</p>	<p>Requirements</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3000 words • ≤5 tables and/or figures • 50-75 references • Structured abstract • Key Points • Subtitle should include "A Meta-analysis" • Follow PRISMA Reporting Guidelines (http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/prisma/) or MOOSE Reporting Guidelines (http://dx.doi.org/10.1001/jama.283.15.2008)
<p>Study Type Cohort Study full info</p>	<p>Description An observational study that follows a group (cohort) of individuals who are initially free of the outcome of interest. Individuals in the</p>	<p>Requirements</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3000 words • ≤5 tables and/or figures • 50-75 references • Structured abstract • Key Points • Follow STROBE Reporting Guidelines

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

Research**Original Investigation**

These reports typically include randomized trials (see Clinical Trial), intervention studies, cohort studies, case-control studies, epidemiologic assessments, other observational studies, surveys with high response rates (see Reports of Survey Research), cost-effectiveness analyses and decision analyses (see Reports of Cost-effectiveness Analyses and Decision Analyses), and studies of screening and diagnostic tests (see also Reports of Diagnostic Tests). A study type is required. Each manuscript should clearly state an objective or hypothesis; the design and methods (including the study type and setting and dates, patients or participants with inclusion and exclusion criteria and/or participation or response rates, or data sources, and how these were selected for the study); the essential features of any interventions; the main outcome measures; the main results of the study; a discussion section placing the results in context with the published literature and addressing study limitations; and the conclusions and relevant implications for clinical practice or health policy. Data included in research reports must be original and should be as timely and current as possible (see Timeliness of Data). Follow EQUATOR Reporting Guidelines (<http://www.equator-network.org/>).

A structured abstract is required; for more information, see instructions for preparing Abstracts for Reports of Original Data. A list of 3 Key Points is required (see guidance on preparing Key Points). Maximum length: 3000 words of text (not including abstract, tables, figures, acknowledgments, references, and online-only material) with no more than a total of 5 tables and/or figures.

[Back to top](#)**Research Letter**

Research Letters are concise, focused reports of original research. These should not exceed 600 words of text and 6 references and may include up to 2 tables or figures. Online supplementary material is only allowed for brief additional and absolutely necessary methods but not for any additional results or discussion. Research Letters may have no more than 7 authors. The text should include the full name, academic degrees, and a single institutional affiliation for each author and the email address for the corresponding author. Other persons who have contributed to the study may be indicated in an Acknowledgment, with their permission, including their academic degrees, affiliation, contribution to the study, and an indication if compensation was received for their role. Letters must not duplicate other material published or submitted for publication. In general, Research Letters should be divided into the following sections: Introduction, Methods, Results, and Discussion. They should not include an abstract, but otherwise should follow all of the guidelines in Manuscript Preparation and Submission Requirements. Letters not meeting these specifications are generally not considered.

Clinical Review and Education[Back to top](#)**Reviews**

This article type requires a presubmission inquiry to the editorial office.

The journal will consider 3 types of review articles:

Systematic Reviews**Advances in Diagnosis and Treatment****Narrative Review**

These types of Review articles differ by the scope and level of analysis of the literature searches and the titles used. Systematic Reviews require a complete systematic search of the literature using multiple databases, covering many years, and grading of the quality of the cited evidence. Advances in Diagnosis and Treatment also require a complete systematic search of the literature, but only of the last 5 years of published literature. An assessment of quality of the evidence is not required but is recommended. Narrative Reviews do not require a rigorous literature search but should rely on evidence and should be written by established experts in the field. See below for more detail on each type of Review.

Titles for these Reviews should include a concise description of the main topic. Use specific and not overly broad wording for the title; the type of review should be indicated in the subtitle. For example:

Behavioral Treatment of Obesity: A Systematic Review

Behavioral Treatment of Obesity: Advances in Diagnosis and Treatment

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

Systematic Review (without meta-analysis)

Systematic Reviews are critical assessments of the literature and data sources pertaining to clinical topics, emphasizing factors such as cause, diagnosis, prognosis, therapy, or prevention. Systematic Reviews without meta-analysis are published as Reviews; those with meta-analysis are published as Original Investigations (see Meta-analysis). Systematic Reviews should address a specific question or issue that is relevant for clinical practice and provide an evidence-based, balanced, patient-oriented review on a focused topic. Follow EQUATOR Reporting Guidelines (<http://www.equator-network.org/>).

The basic structure of manuscripts reporting Systematic Reviews should include the following: Abstract (structured abstract of no more than 350 words); Introduction (150-250 words); Methods (150-250 words); Results (1000-1250 words, with the following subsections, if appropriate, depending on the specific question or issue addressed: Pathophysiology, Clinical Presentation, Assessment and Diagnosis, Treatment, and Prognosis); Discussion (1000 words); and Conclusions (2-3 sentences).

Maximum length: 3000 words of text (not including abstract, tables, figures, acknowledgments, references, and online-only material), with no more than a total of 5 tables and/or figures and no more than 50-75 references. For an example of a published Systematic Review, see *JAMA*. 2014;312(6):631-640 and below for the general structure of a Systematic Review article.

Prospective authors interested in submitting a review manuscript should prepare a detailed outline of the proposed article. There should also be a brief summary of the extent and quality of the literature supporting the proposed review. Alternatively, if a draft of the manuscript has been completed, this can be sent. Prospective authors should also summarize their publication record in the field. Send this information to the editorial office via email either to Gerard Doherty, MD (gmdoherty@bwh.harvard.edu).

[Back to top](#)

Specific Components of a Systematic Review

Key Points (75-100 words)

This feature provides a quick structured synopsis of the Review, following 3 key points: Question, Findings, and Meaning. Limit to no more than 100 words. This is different from the Abstract.

Example

Question: What are the most effective medical treatments for adult chronic sinusitis?

Findings: In this systematic review, symptoms of chronic sinusitis were improved with saline irrigation and topical corticosteroid therapy compared to no therapy. Compared with placebo, 3-week courses of systemic corticosteroids or oral doxycycline were associated with reduced polyp size, and a 3-month course of macrolide antibiotic was associated with improved symptoms in patients without polyps.

Meaning: First-line therapy for chronic sinusitis should begin with daily topical intranasal corticosteroid in conjunction with saline irrigation; subsequent therapies should be based on the patient's polyp status and severity of symptoms.

[Back to top](#)

Abstract (350 words)

A structured abstract is required; Systematic Review articles should include a structured abstract of no more than 350 words using the headings listed below.

Importance: Include 1 or 2 sentences describing the clinical question or issue and its importance in clinical practice or public health.

Objective: State the precise primary objective of the review. Indicate whether the review emphasizes factors such as cause, diagnosis, prognosis, therapy, or prevention and include information about the specific population, intervention, exposure, and tests or outcomes that are being reviewed.

Evidence Review: Describe the information sources used, including the search strategies, years searched, and other sources of material, such as subsequent reference searches of retrieved articles. Methods used for inclusion of identified articles and quality assessment should be explained.

Findings: Include a brief summary of the number of articles included, numbers of various types of studies (eg, clinical trials, cohort studies), and numbers of patients/participants represented by these studies.

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

Conclusions and Relevance: The conclusions should clearly answer the questions posed if applicable, be based on available evidence, and emphasize how clinicians should apply current knowledge. Conclusions should be based only on results described in the abstract Findings subsection.

[Back to top](#)

Introduction (150-250 words)

The first 2 to 3 sentences of the Introduction should draw in readers such that they want to continue reading the article and should establish the importance of the Review. Reviews should include the clinical question or issue and its importance for general medical practice, specialty practice, or public health. The first paragraph should provide a general summary of the clinical problem (eg, obesity). The next paragraph should focus on the specific aspect of the clinical problem the article will explore (eg, treatments for obesity). The epidemiology of the disease or condition should be briefly summarized and generally should include disease prevalence and incidence. The third paragraph should discuss exactly what material will be covered in the Review (eg, obesity treatments reported in trials with a minimum follow-up of 2 years including 80% of the original cohort).

[Back to top](#)

Methods/Literature Search (150-250 words)

The literature search should be as current as possible, ideally with end dates within a month or two before manuscript submission. A search of the primary literature should be conducted, including multiple bibliographic databases (eg, PubMed/MEDLINE, Embase, CINAHL, PsycINFO). This can be facilitated by collaborating with a medical librarian to help with the search.

Briefly describe characteristics of the literature searched and included in the review, following the PRISMA reporting guidelines (<http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/prisma/>), including the bibliographic databases and other sources searched, search terms used, dates included in the search, date the literature search was conducted, screening process, language limitations, and inclusion and exclusion criteria. The rating system used to evaluate the quality of the evidence should be specified (see table below) and the methods used to evaluate quality should be described, including number of quality raters, how agreement on quality ratings was assessed, and how disagreements on quality ratings were resolved.

The highest-quality evidence (eg, randomized clinical trials, meta-analyses, systematic reviews, and high-quality prospective cohort studies) should receive the greatest emphasis. Clinical practice guidelines ordinarily should not be used as a primary component of the evidence base for the systematic review, although relevant guidelines should be addressed in the Discussion section of the article.

The search methods should be described in sufficient detail so the search can be reproduced based on the information provided in the manuscript. A summary of the methods of the literature search including this information should be included in the main article; details can be included in an online-only supplement. A PRISMA-style flow diagram (<http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/prisma/>) showing this information should also be included as an online-only supplement. In addition, a completed PRISMA checklist (<http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/prisma/>) should be submitted for the items completed that apply to systematic reviews (the checklist items that apply to meta-analyses do not need to be completed for systematic reviews without meta-analysis). The checklist will be used during review but will not be published.

[Back to top](#)

Results (1000-1250 words)

First, briefly report the results of the literature search, including the number of articles reviewed and included, numbers of various types of studies (eg, clinical trials, cohort studies) included, and the aggregate numbers of patients included in the reviewed studies. Also provide a brief summary of the quality of the evidence. Details of this information can be included in a PRISMA-style flow diagram and table(s).

Next, the subsections listed below should generally appear in the Results sections of most Reviews although all of these subsections may not be necessary for some topics, depending on the specific question or issue addressed. The word counts following each subsection are suggested to assist with keeping the overall Results section limited to 1000-1250 words.

Pathophysiology (150-250 words). Provide a brief overview of the pathophysiology of the disease. The intent is to provide readers with sufficient background information about the underpinnings of a disease to provide context for the rest of the article.

Clinical Presentation (150-250 words). Briefly describe the clinical characteristics that result in a patient seeking medical care for the condition or what features of the disease should lead a clinician to evaluate or treat it.

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#). | [Continue](#)

providing positive and negative likelihood ratios. Sequences of diagnostic tests are best presented as algorithms or in tables.

Treatment (250-500 words). Treatments should be based on the most recently available and highest level of evidence. Treatment options should be summarized in the text and presented in detail in tables along with an indication of the strength of evidence supporting the individual treatments. In general, treatment recommendations should be supported by a systematic review of the literature, either performed by the author of the Review or published in the form of a high-quality review or guideline. If possible, the costs for various treatments should be provided.

Prognosis (100-150 words). A section outlining the overall prognosis for the condition, once treated, should be included.

Discussion (Approximately 1000 words)

Key findings should be summarized in the first paragraph of the Discussion section. All statements made should be supported by evidence. It is very important to not simply list findings from the studies reviewed. This information is best presented in tables. The Discussion should provide a critical synthesis of data and information based on the results of the review, an assessment of the quality of studies summarized, and a description of how studies can be interpreted and used to guide clinical practice. The limitations of the evidence and of the review should be discussed, and gaps in evidence should be addressed. A discussion of controversial or unresolved issues and topics in need of future research also should be included.

Clinical Practice Guidelines: In the Discussion section, describe current clinical practice guidelines, relevant to the topic of the review, if available, and whether the conclusions of this review agree with, or disagree with, the current clinical practice guidelines. If this is done and there is more than 1 guideline, a table should be prepared comparing the major features that differ between the guidelines. Guideline quality should be discussed using the standards outlined for the JAMA Clinical Guidelines Synopsis.

[Back to top](#)

Conclusions

Include a 2- to 3-sentence summary of the major conclusions of the review.

Tables

Construct tables that summarize the search results. Tables summarizing treatments should have information organized by category of treatment and then by individual treatments. Columns should include the name of the treatment, strength of evidence supporting the treatment, the treatment's effect (preferably shown as the treatment's effect as compared to control on the measured outcome together with 95% confidence intervals), adverse effects, and very brief comments, if necessary. Lengthy text-based tables should be avoided. Additional or lengthy tables may be published online only, if justified.

Ratings of the quality of the evidence. Tables summarizing evidence should include ratings of the quality of the evidence. Use the rating scheme listed below with ratings of 1-5 for Reviews that include individual studies (modified from the Oxford Centre for Evidence-based Medicine (<http://www.cebm.net/index.aspx?o=5653>) for ratings of individual studies).

Quality Rating Scheme for Studies and Other Evidence	
1	Properly powered and conducted randomized clinical trial; systematic review with meta-analysis
2	Well-designed controlled trial without randomization; prospective comparative cohort trial
3	Case-control studies; retrospective cohort study
4	Case series with or without intervention; cross-sectional study
5	Opinion of respected authorities; case reports

There are several other preferred systems for rating the quality of evidence in Review articles. For Reviews that synthesize findings from numerous studies into a single summary recommendation, use the rating scale shown above or the Oxford Centre for Evidence-based Medicine's Levels of Evidence and Grades of Recommendation (<http://www.cebm.net/oxford-centre-for-evidence-based-medicine-levels-of-evidence-and-grades-of-recommendation>).

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

in the Methods section or Acknowledgment of the manuscript. To read more about gene nomenclature, see the *AMA Manual of Style*.

[Back to top](#)

Reproduced Material

Please verify that all information and materials in the manuscript are original. The journal generally does not republish text, tables, figures, or other material from other publishers, except in rare circumstances. If you believe that you must include content that is owned by a third party, please let us know and provide information about all material that has been previously published and, when applicable, include author(s), title of article, title of journal or book or other publication, and complete citation, doi, and/or URL. The publisher or other third party's permission to reproduce in print and online and in licensed versions of this journal should be submitted when the manuscript is submitted.

See Permission to Reproduce Copyright-Protected Material Form.

[Back to top](#)

References

Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. Number references in the order they appear in the text; do not alphabetize. In text, tables, and legends, identify references with superscript arabic numerals. When listing references, follow AMA style and abbreviate names of journals according to the journals list in PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). List all authors and/or editors up to 6; if more than 6, list the first 3 followed by "et al." Note: Journal references should include the issue number in parentheses after the volume number.

Examples of reference style:

1. Youngster I, Russell GH, Pindar C, Ziv-Baran T, Sauk J, Hohmann EL. Oral, capsulized, frozen fecal microbiota transplantation for relapsing *Clostridium difficile* infection. *JAMA*. 2014;312(17):1772-1778.
2. Murray CJL. Maximizing antiretroviral therapy in developing countries: the dual challenge of efficiency and quality [published online December 1, 2014]. *JAMA*. doi:10.1001/jama.2014.16376
3. Centers for Medicare & Medicaid Services. CMS proposals to implement certain disclosure provisions of the Affordable Care Act. <http://www.cms.gov/apps/media/press/factsheet.asp?Counter=4221>. Accessed January 30, 2012.
4. McPhee SJ, Winker MA, Rabow MW, Pantilat SZ, Markowitz AJ, eds. *Care at the Close of Life: Evidence and Experience*. New York, NY: McGraw Hill Medical; 2011.

For more examples of electronic references, click here.

[Back to top](#)

Statistical Methods and Data Presentation

General Considerations

Authors are encouraged to consult "Reporting Statistical Information in Medical Journal Articles."¹ In the Methods section, describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to reproduce the reported results. Such description should include appropriate references to the original literature, particularly for uncommon statistical methods. For more advanced or novel methods, provide a brief explanation of the methods and appropriate use in the text and consider providing a detailed description in an online supplement.

In the reporting of results, when possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty, such as confidence intervals (see Reporting Standards and Data Presentation). Avoid relying solely on statistical hypothesis testing, such as the use of *P* values, which fails to convey important quantitative information. For observational studies, provide the numbers of observations. For randomized trials, provide the numbers randomized. Report losses to observation or follow up (see Missing Data). For multivariable models, report all variables included in models, and report model diagnostics and overall fit of the model when available (see Statistical Procedures).

Define statistical terms, abbreviations, and symbols, if included. Avoid nontechnical uses of technical terms in statistics, such as correlation, normal, predictor, random, sample, significant, trend. Do not use inappropriate hedge terms such as marginal significance or trend toward significance for results that are not statistically significant. Causal language (including use of terms such as effect and efficacy) should be used only for randomized clinical trials. For all other study designs (including meta-analyses of randomized clinical trials), methods and results should be described in terms of association or correlation and should avoid cause-and-effect wording.

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

For randomized trials, a statement of the power or sample size calculation is required (see the EQUATOR Network CONSORT Guidelines (<http://www.equator-network.org>)). For observational studies that use an established population, a power calculation is not generally required when the sample size is fixed. However, if the sample size was determined by the researchers, through any type of sampling or matching, then there should be some justification for the number sampled. In any case, describe power and sample size calculations at the beginning of the Statistical Methods section, following the general description of the study population.

[Back to top](#)

Descriptive Statistics

It is generally not necessary to provide a detailed description of the methods used to generate summary statistics, but the tests should be briefly noted in the Methods section (eg, ANOVA or Fisher exact test).

[Back to top](#)

Statistical Procedures

Identify regression models with more than 1 independent variable as multivariable and regression models with more than 1 dependent variable as multivariate. Report all variables included in models, as well as any mathematical transformations of those variables. Provide the scientific rationale (clinical, statistical, or otherwise) for including variables in regression models.

For regression models fit to dependent data (eg, clustered or longitudinal data), the models should account for the correlations that arise from clustering and/or repeated measures. Failure to account for such correlation will result in incorrect estimates of uncertainty (eg, confidence intervals). Describe how the model accounted for correlation. For example, for an analysis based on generalized estimating equations, identify the assumed correlation structure and whether robust (or, sandwich) variance estimators were used. Or, for an analysis based on mixed-effects models, identify the assumed structure for the random effects, such as the level of random intercepts and whether any random slopes were included. Fixed-effects estimation should be described as conditional likelihood. Avoid the term fixed effects for describing covariates.

[Back to top](#)

Missing Data

Report losses to observation, such as dropouts from a clinical trial or those lost to follow-up or unavailable in an observational study. If some participants are excluded from analyses because of missing or incomplete data, provide a supplementary table that compares the observed characteristics between participants with complete and incomplete data. Consider multiple imputation methods to impute missing data and include an assessment of whether data were missing at random. Approaches based on "last observation carried forward" should not be used.

[Back to top](#)

Primary Outcomes, Multiple Comparisons, and Post Hoc Comparisons

Both randomized and observational studies should identify the primary outcome(s) before the study began, as well as any prespecified secondary, subgroup, and/or sensitivity analyses. Comparisons arrived at during the course of the analysis or after the study was completed should be identified as post hoc. For analyses of more than 1 primary outcome, corrections for multiple testing should generally be used. For secondary outcomes, address multiple comparisons or consider such analyses as exploratory and interpret them as hypothesis-generating. The reporting of all outcomes should match that included in study protocols. For randomized clinical trials, protocols with complete statistical analysis plans should be cited in the Methods section and submitted as online supplementary content (see Reporting Clinical Trials). Randomized clinical trials should be primarily analyzed according to the intention-to-treat approach. Deviations from strict intention-to-treat analysis should be described as "modified intention-to-treat," with the modifications clearly described.

[Back to top](#)

Statistical Analysis Subsection

At the end of the Methods section, briefly describe the statistical tests used for the analysis. State any a priori levels of significance and whether hypothesis tests were 1- or 2-sided. Also include the statistical software used to perform the analysis, including the version and manufacturer, along with any extension packages (eg, the svy suite of commands in Stata or the survival package in R). Do not describe software commands (eg, SAS proc mixed was used to fit a linear mixed-effects model). If analysis code is included, it should be placed in the online supplementary content.

[Back to top](#)

Reporting Standards and Data Presentation

Analyses should follow EQUATOR Reporting Guidelines (<http://www.equator-network.org>) and be consistent with the protocol

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

When possible, present numerical results (eg, absolute numbers and/or rates) with appropriate indicators of uncertainty, such as confidence intervals. Use means and standard deviations (SDs) for normally distributed data and medians and ranges or interquartile ranges (IQRs) for data that are not normally distributed. Avoid solely reporting the results of statistical hypothesis testing, such as *P* values, which fail to convey important quantitative information. For most studies, *P* values should follow the reporting of comparisons of absolute numbers or rates and measures of uncertainty (eg, 0.8%, 95% CI -0.2% to 1.8%; *P*=.13). *P* values should never be presented alone without the data that are being compared. If *P* values are reported, follow standard conventions for decimal places: for *P* values less than .001, report as "*P*<.001"; for *P* values between .001 and .01, report the value to the nearest thousandth; for *P* values greater than or equal to .01, report the value to the nearest hundredth; and for *P* values greater than .99, report as "*P*>.99." For studies with exponentially small *P* values (eg, genetic association studies), *P* values may be reported with exponents (eg, *P*=1×10⁻⁵). In general, there is no need to present the values of test statistics (eg, *F* statistics or χ^2 results) and degrees of freedom when reporting results.

For secondary and subgroup analyses, there should be a description of how the potential for type I error due to multiple comparisons was handled, for example, by adjustment of the significance threshold. In the absence of some approach, these analyses should generally be described and interpreted as exploratory, as should all post hoc analyses.

For randomized trials using parallel-group design, there is no validity in conducting hypothesis tests regarding the distribution of baseline covariates between groups; by definition, these differences are due to chance. Because of this, tables of baseline participant characteristics should not include *P* values or statements of statistical comparisons among randomized groups. Instead, report clinically meaningful imbalances between groups, along with potential adjustments for those imbalances in multivariable models. To read more about statistical tests and data presentation, see the *AMA Manual of Style*.

[Back to top](#)

Tables and Figures

Restrict tables and figures to those needed to explain and support the argument of the article and to report all outcomes identified in the Methods section. Number each table and figure and provide a descriptive title for each. Every table and figure should have an in-text citation. Verify that data are consistently reported across text, tables, figures, and supplementary material.

See also [Tables and Figures](#).

Frequency data should be reported as "No. (%)," not as percentages alone (exception, sample sizes exceeding ~10,000). Whenever possible, proportions and percentages should be accompanied by the actual numerator and denominator from which they were derived. This is particularly important when the sample size is less than 100. Do not use decimal places (ie, xx%, not xx.xx%) if the sample size is less than 100. Tables that include results from multivariable regression models should focus on the primary results. Provide the unadjusted and adjusted results for the primary exposure(s) or comparison(s) of interest. If a more detailed description of the model is required, consider providing the additional unadjusted and adjusted results in supplementary tables.

Tables have a minimum of 2 columns. Comparisons must read across the table columns.

Do not duplicate data in figures and tables. For all primary outcomes noted in the Methods section, exact values with measures of uncertainty should be reported in the text or in a table and in the Abstract, and not only represented graphically in figures.

Pie charts and 3-D graphs should not be used and should be revised to alternative graph types.

Bar graphs should be used to present frequency data only (ie, numbers and rates). Avoid stacked bar charts and consider alternative formats (eg, tables or splitting bar segments into side-by-side bars) except for comparisons of distributions of ordinal data.

Summary data (eg, means, odds ratios) should be reported using data markers for point estimates, not bars, and should include error bars indicating measures of uncertainty (eg, SDs, 95% CIs). Actual values (not log-transformed values) of relative data (for example, odds ratios, hazard ratios) should be plotted on log scales.

For survival plots, include the number at risk for each group included in the analysis at intervals along the x-axis scale. For any figures in which color is used, be sure that colors are distinguishable.

All symbols, indicators, line styles, and colors in statistical graphs should be defined in a key or in the figure legend. Axes in statistical graphs must have labels. Units of measure must be provided for continuous data.

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

Tables

- Number all tables in the order of their citation in the text.
- Include a brief title for each table (a descriptive phrase, preferably no longer than 10 to 15 words).
- Include all tables at the end of the manuscript file.
- Refer to Categories of Articles for limits on the number of tables.
- NOTE: Do not embed tables as images in the manuscript file or upload tables in image formats, and do not upload tables as separate files.

[Back to top](#)

Table Creation

Use the table menu in the software program used to prepare the text. Tables can be built de novo using Insert→Table or copied into the text file from another document (eg, Word, Excel, or a statistical spreadsheet).

Avoid using tabs, spaces, and hard returns to set up the table; such tables will have to be retyped, creating delays and opportunities for error.

Tables should be single-spaced and in a 10- or 12-point font (do not shrink the point size to fit the table onto the page). Do not draw extra lines or rules—the table grid will display the outlines of each cell.

Each piece of data needs to be contained in its own cell. Do not try to align cells with hard returns or tabs; alignment will be imposed in the production system if the paper is accepted. Although individual empty cells are acceptable in a table, be sure there are no empty columns. To show an indent, add 2 spaces.

When presenting percentages, include numbers (numerator and denominator).

Include statistical variability where applicable (eg, mean [SD], median [IQR]). For additional detail on requirements for data presentation in tables, see Statistical Methods and Data Presentation.

Place each row of data in a separate row of cells, and note that No. (%) and measures of variability are presented in the same cell as in the example Table 1 below:

[Back to top](#)

Table 1. Baseline Values in the Editors' Health Study

Clinical Values	Intervention (n=200)	Control (n=201)
No. (%) with data	175 (88)	180 (90)
Weight, mean (SD), kg	70 (12)	68 (12)
Cholesterol, mean (SD), mg/dL	212 (10)	214 (13)
Blood pressure, mean (SD), mm Hg		
Systolic	118 (20)	117 (19)
Diastolic	70 (13)	69 (20)

SI conversion factors: To convert cholesterol to mmol/L, multiply values by 0.0259.

Note that JAMA Network journals report laboratory values in conventional units. In a table, provide a footnote with the conversion factor to SI units. For a calculator of SI and conventional units, see the *AMA Manual of Style* (http://www.amamanualofstyle.com/oso/public/jama/si_conversion_table.html).²

To present data that span more than 1 row, merge the cells vertically. For example, in Table 2 the final column presents the *P* value for overall age comparisons.

Table 2. Blood Pressure Values Stratified by Age

Age Range, y	Blood Pressure, mm Hg	<i>P</i> Value
18-34	115/70	.08
35-50	125/75	
51-80	129/79	

The table should be constructed such that the primary comparison reads horizontally. For example, see Table 3 (incorrect) and Table 4 (correct).

Table 3. Patient Data by Study Group

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

Table 4. Patient Data by Study Group

	Placebo	Drug, 10 mg/d	Drug, 20 mg/d
Blood pressure, mm Hg	140/80	130/75	128/72
Heart rate, mean (SD), beats/min	77 (10)	75 (10)	75 (9)
Hospital stay, mean (SD), d	8 (2)	8 (1)	7 (2)

If a table must be continued, repeat the title and column headings on the second page, followed by "(continued)."

[Back to top](#)

Table Footnotes

Footnotes to tables may apply to the entire table, portions (eg, a column), or an individual entry.

The order of the footnotes is determined by the placement in the table of the item to which the footnote refers.

When both a footnote letter and reference number follow data in a table, set the superscript reference number first followed by a comma and the superscript letter.

Use superscript letters (a, b, c) to mark each footnote and be sure each footnote in the table has a corresponding note (and vice versa).

List abbreviations in the footnote section and explain any empty cells.

If relevant, add a footnote to explain why numbers may not sum to group totals or percentages do not add to 100%.

For more detail on the components and recommended structure of tables, see the *AMA Manual of Style*.²

[Back to top](#)

Figures

Number all figures (graphs, charts, photographs, and illustrations) in the order of their citation in the text. The number of figures should be limited. Avoid complex composite or multipart figures unless justified. See Categories of Articles for limits on the number of figures and/or tables according to article type.

For initial manuscript submissions, figures must be of sufficient quality and may be embedded at the end of the file for editorial assessment and peer review. If a revision is requested and before a manuscript is accepted, authors will be asked to provide figures that meet the requirements described in Figure File Requirements for Publication.

Graphs, charts, some illustrations, titles, legends, keys, and other elements related to figures in accepted manuscripts will be re-created and edited according to JAMA Network style and standards prior to publication. Online-only figures will not be edited or re-created (see Online-Only Supplements and Multimedia).

[Back to top](#)

Image Integrity

Preparation of scientific images (clinical images, radiographic images, micrographs, gels, etc) for publication must preserve the integrity of the image data. Digital adjustments of brightness, contrast, or color applied uniformly to an entire image are permissible as long as these adjustments do not selectively highlight, misrepresent, obscure, or eliminate specific elements in the original figure, including the background. Selective adjustments applied to individual elements in an image are not permissible. Individual elements may not be moved within an image field, deleted, or inserted from another image. Cropping may be used for efficient image display or to deidentify patients but must not misrepresent or alter interpretation of the image by selectively eliminating relevant visual information. Juxtaposition of elements from different parts of a single image or from different images, as in a composite, must be clearly indicated by the addition of dividing lines, borders, and/or panel labels.

When inappropriate image adjustments are detected by the journal staff, authors will be asked for an explanation and will be requested to submit the image as originally captured prior to any adjustment, cropping, or labeling. Authors may be asked to resubmit the image prepared in accordance with the above standards.

[Back to top](#)

Acceptable Figure Files for Initial Submission and Review

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

See the Table of Figure Requirements for additional guidance for specific types of figures for suggested resolution and file formats. In general each figure should be no larger than 1 MB.

[Back to top](#)

Figure File Requirements for Publication

Each figure for the main article must be uploaded as a separate file. Online-only figures must be combined into the PDF of the online-only supplement (see Online-Only Supplements and Multimedia).

See the Table of Figure Requirements for additional guidance and file formats for specific types of figures.

Files created by vector programs are best for accurately plotting and maintaining data points. JAMA Network journals are unable to use file formats native to statistical software applications to prepare figures for publication; most statistical software programs allow users to save or export files in digital vector formats.

Images created digitally (by digital camera or electronically created illustrations) must meet the minimum resolution requirements at the time of creation. Electronically increasing the resolution of an image after creation causes a breakdown of detail and will result in an unacceptable poor-quality image. Each component of a composite image must be uploaded separately at submission and individually meet the minimum resolution requirement.

Color photographs should be submitted in RGB mode using profiles such as Adobe RGB or sRGB. Digital cameras capture images in RGB. Do not change any color settings once the file is on the computer. Black-and-white photographs (eg, radiographs, ultrasound images, CT and MRI scans, and electron micrographs) can be submitted in either RGB or grayscale modes.

[Back to top](#)

Figure Titles and Legends (Captions)

At the end of the manuscript, include a title for each figure. The figure title should be a brief descriptive phrase, preferably no longer than 10 to 15 words. A figure legend (caption) can be used for a brief explanation of the figure or markers if needed and expansion of abbreviations. For photomicrographs, include the type of specimen, original magnification or a scale bar, and stain in the legend. For gross pathology specimens, label any rulers with unit of measure. Digitally enhanced images must be clearly identified in the figure legends as enhanced or manipulated, eg, computed tomographic scans, magnetic resonance images, photographs, photomicrographs, x-ray films.

[Back to top](#)

Figures With Labels, Arrows, or Other Markers

Photographs, clinical images, photomicrographs, gel electrophoresis, and other types that include labels, arrows, or other markers must be submitted in 2 versions: one version with the markers and one without. Provide an explanation for all labels, arrows, or other markers in the figure legend. The Figure field in the File Description tab of the manuscript submission system allows for uploading of 2 versions of the same figure.

Number of Figures

Refer to Categories of Articles because there may be a limit on the number of figures by article type.

[Back to top](#)

General Figure Guidelines

- Primary outcome data should not be presented in figures alone. Exact values with measure of variability should be reported in the text or table as well as in the abstract.
- All symbols, indicators (including error bars), line styles, colors, and abbreviations should be defined in a legend.
- Each axis on a statistical graph must have a label and units of measure should be labeled.
- Do not use pie charts, 3-D graphs, and stacked bar charts as these are not appropriate for accurate statistical presentation of data and should be revised to another figure type or converted to a table.
- Error bars should be included in both directions, unless only 1-sided variability was calculated.
- Values for ratio data—odds ratios, relative risks, hazard ratios—should be plotted on a log scale. Values for ratio data should not be log transformed.
- For footnotes, use letters (a, b, c, etc) not symbols.
- Do not submit figures with more than 4 panels unless otherwise justified.
- See the *AMA Manual of Style* for more guidance on figure types and components.

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

- Sampling rate should be either 44.1 kHz or 48 kHz.
- Bit rate should be either 16 or 24 bit.
- To avoid audible clipping noise, please make sure that audio levels do not exceed 0 dBFS.

For each audio file, provide an in-text citation. At the end of the manuscript, include a title (a brief phrase, preferably no longer than 10-15 words) and a caption that includes the file format and a brief explanation for each audio.

NOTE: If your manuscript is accepted for publication, JAMA Network video production staff may contact you to request an original uncompressed audio file in .wav or .aiff format. There is no maximum file size requirement for publication at this stage.

What to Expect

After Submission

[Back to top](#)

Editorial and Peer Review

Authors will be sent notifications of the receipt of manuscripts and editorial decisions by email. During the review process, authors can check the status of their submitted manuscript via the online manuscript submission and review system. Authors should not disclose the fact that their manuscript has been submitted to anyone, except coauthors and contributors, without permission of the editor.

All submitted manuscripts are reviewed initially by one of the editors. Manuscripts are evaluated according to the following criteria: material is original and timely, writing is clear, study methods are appropriate, data are valid, conclusions are reasonable and supported by the data, information is important, and topic has general interest to readers of this journal. From these basic criteria, the editors assess a paper's eligibility for publication. Manuscripts with insufficient priority for publication are rejected promptly. Other manuscripts are sent to expert consultants for peer review. The journal uses a single-blind peer review process: peer reviewer identities are kept confidential (unless reviewers choose to reveal their names in their formal reviews); author identities are made known to reviewers. The existence of a manuscript under review is not revealed to anyone other than peer reviewers and editorial staff. Peer reviewers are required to maintain confidentiality about the manuscripts they review and must not divulge any information about a specific manuscript or its content to any third party without prior permission from the journal editors. At submission, authors may choose to have manuscripts that are not accepted by the journal referred to one of the JAMA Network specialty journals and/or JAMA Network Open along with reviewers' comments (if available). Information from submitted manuscripts may be systematically collected and analyzed as part of research to improve the quality of the editorial or peer review process. Identifying information remains confidential. Final decisions regarding manuscript publication are made by an editor who does not have any relevant conflicts of interest.

Submitted manuscripts may be reviewed with software to detect plagiarism and inappropriate duplication.

[Back to top](#)

Appeals

Authors may appeal decisions. All appeals are reviewed by the editor in chief, on a case-by-case basis, or a designated editor if the editor in chief is recused from the review.

What to Expect

After Revision/Acceptance

[Back to top](#)

Authorship Form and Publishing Agreement

All authors are required to complete an Authorship Form and Publishing Agreement. See Authorship Criteria and Contributions.

[Back to top](#)

Editing

Accepted manuscripts are edited in accordance with the *AMA Manual of Style* (<http://www.amamanualofstyle.com/>),² and returned to the corresponding author (or her/his designee) for approval. Authors are responsible for all statements made in their work, including changes made during editing and production that are authorized by the corresponding author.

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)

Authors should not disclose the fact that their manuscript has been accepted to anyone, except coauthors and contributors, until it is published without permission of the editor or as described in the guidance on Previous or Planned Meeting Presentation or Release of Information and Embargo Policy.

[Back to top](#)

Publication

If accepted for publication, all articles are generally published Online First and then again in a print/online issue.

Selected articles are published quickly online only.

What to Expect

After Publication

Postpublication Correspondence

For accepted manuscripts, the corresponding author will be asked to respond to letters to the editor.

Reprints/e-Prints

Reprints and e-prints may be ordered online (<http://www.ama-authorreprints.com>) when the edited manuscript is sent for approval to the corresponding author.

Corrections

Requests to publish corrections should be sent to the editorial office. Corrections are reviewed by editors and authors, published promptly, and linked online to the original article.¹⁵

Author CME

First authors of peer-reviewed articles are eligible to receive CME credit. See CME From the JAMA Network.

What to Expect

About Previous Release of Information, Embargo, and Access

Previous Publication, Preprint Server Posting, and Related Manuscripts and Reports

Manuscripts are considered with the understanding that they have not been published previously in print or electronic format and are not under consideration by another publication or electronic medium.

Copies of all related or similar manuscripts and reports (ie, those containing substantially similar content or using the same or similar data) that have been previously published or posted, or are under consideration elsewhere must be provided at the time of manuscript submission.

Public dissemination of manuscripts prior to, simultaneous with, or following submission to this journal, such as posting the manuscript on preprint servers or other repositories, will necessitate making a determination of whether publication of the submitted manuscript will add meaningful new information to the medical literature or will be redundant with information already disseminated with the posting of the preprint. Authors should provide information about any preprint postings, including copies of the posted manuscript and a link to it, at the time of submission of the manuscript to this journal.

See also Previous or Planned Meeting Presentation or Release of Information and Depositing Research Articles in Approved Public Repositories.

Previous or Planned Meeting Presentation or Release of Information

Meeting presentation: A complete manuscript submitted to the journal following or prior to presentation at a scientific meeting or publication of preliminary findings elsewhere (ie, as an abstract) is eligible for consideration for publication. Authors considering presenting or planning to present the work at an upcoming scientific meeting should indicate the name and date of the meeting on the manuscript submission form. For accepted papers, the editors may be able to coordinate publication with the meeting presentation. Authors of submitted papers, including those accepted but not yet published,

Our website uses cookies to enhance your experience. By continuing to use our site, or clicking "Continue," you are agreeing to our [Cookie Policy](#) | [Continue](#)