MARIANA BARBOSA DE SOUZA

**Estudo do Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF) em pacientes
com carcinoma epidermoide da cavidade bucal**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de: Oncologia

Orientador:

Dr. Marcos Brasilino de Carvalho

São Paulo

2014

MARIANA BARBOSA DE SOUZA

**Estudo do Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF) em pacientes
com carcinoma epidermoide da cavidade bucal**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de: Oncologia

Orientador:

Dr. Marcos Brasilino de Carvalho

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Mariana Barbosa de

Estudo do Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF) em pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade bucal / Mariana Barbosa de Souza. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Oncologia .

Orientador: Marcos Brasilino de Carvalho.

Descritores: 1.Proteína MIF humana 2.Marcadores biológicos 3.Neoplasias bucais 4.Carcinoma epidermoide 5.Detecção precoce de câncer 6.Prognóstico 7.Proteínas e peptídeos salivares 8.Citocinas 9.Antígenos de histocompatibilidade classe II 10.Fatores inibidores da migração de macrófagos 11.Imunoistoquímica

USP/FM/DBD-049/14

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todos os pacientes com câncer, especialmente àqueles com câncer de cabeça e pescoço integrantes do presente trabalho, que mesmo no momento mais difícil de suas vidas, mostraram-se disponíveis a colaborar com a pesquisa pensando no bem que poderiam gerar para os futuros pacientes.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelos dons que me conferiu e pelo amor aos pequeninos, seus preferidos, plantado em meu coração.

À minha mãe, Cleusa, por ser meu exemplo de amor a Deus e ao próximo. Eu certamente não teria conseguido nada nesta vida sem o seu cuidado e amor.

Ao meu pai, Nelcino, pela compreensão e apoio durante todos esses anos de estudo. Seu orgulho é uma alegria para mim.

Ao meu noivo, Adriel, pela paciência sem limites, cumplicidade e amor que me dedicou durante esses 3 anos. A sua presença ao meu lado certamente tornou tudo mais leve e mais bonito.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Fabiano, meus exemplos desde sempre, pelo incentivo, companheirismo e amor. Dedico a vocês todas as minhas conquistas.

Aos meus sobrinhos, Leonardo e Henrique, pelos sorrisos que me fizeram esquecer qualquer dificuldade. Não há palavras que possam descrever o tamanho do meu amor por vocês e da minha gratidão a Deus por tê-los me dado de presente.

Às minhas cunhadas, Letícia e Cristiani, pela amizade, incentivo e ânimo nos momentos difíceis.

A todos os meus familiares e amigos que estiveram presentes nesse período, pelas palavras de carinho e incentivo.

Ao meu orientador e amigo, Dr. Marcos Brasilino de Carvalho, exemplo de profissional e ser humano, por me ensinar que a pesquisa em câncer é, mais que uma meta profissional, ferramenta de ajuda ao próximo. Obrigada por compartilhar comigo durante esses anos mais que o seu extenso conhecimento, também a sua sabedoria.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, pela oportunidade de pleitear uma titulação acadêmica pela Universidade de São Paulo.

Aos integrantes do Programa de Pós-graduação em Oncologia, professores, pesquisadores, secretárias, técnicos e colegas alunos, pelo auxílio sempre que necessário.

Ao Hospital Heliópolis e todos os seus funcionários e estagiários, pelo suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis pelo auxílio na seleção de pacientes e coletas de material biológico.

A todos os integrantes, médicos assistentes, médicos residentes, enfermeiros, técnicos, secretários e demais, dos Serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis e da Faculdade de Medicina do ABC, pelo apoio e auxílio em todas as etapas deste trabalho e por viabilizarem o acesso aos registros médicos dos pacientes.

Ao Dr. Otávio Alberto Curioni, chefe do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis, pelas contribuições de grande relevância para este trabalho, pela credibilidade e pelo tratamento gentil que sempre me dedicou.

À Dra. Jossi Ledo Kanda, chefe do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina do ABC e amiga, pela credibilidade neste trabalho e por tornar os caminhos mais fáceis para sua concretização.

A todos os integrantes, médicos patologistas, médicos residentes, técnicos, secretários e demais, do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Heliópolis, principalmente à Dra. Ana Maria da Cunha Mercante, pelo auxílio técnico e por possibilitar o acesso ao arquivo de material histológico.

Ao Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina do ABC, nas pessoas da Dra. Lucila Simardi e Dr. Luiz Henrique Cecanecchia Fernandes, por possibilitar o acesso ao arquivo de material histológico.

Ao Dr. Hugo Cuellar, médico patologista do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Heliópolis, pela disponibilidade em auxiliar com as análises de expressão imunoistoquímica, pela eficiência e comprometimento.

Ao Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da USP, na pessoa do Dr. Fábio Daumas Nunes, pelo auxílio técnico e científico.

À Dra. Lília Alves Rocha, pesquisadora de Pós-Doc do Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da USP, pelo empenho e dedicação às análises de expressão imunoistoquímica deste trabalho e principalmente pela agradável companhia e amizade.

À *University of Louisville*, pela estrutura cedida para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao Dr. Robert A. Mitchell, Beatriz Eugenia Rendon e Erin Stephanie Brock pela calorosa acolhida em Louisville e por compartilharem comigo conhecimentos preciosos sobre a MIF, "*The Most Interesting Factor*".

A todos os integrantes do Centro Internacional de Pesquisa do AC Camargo *Cancer Center*, especialmente ao Dr. Emmanuel Dias-Neto e alunos, pela contribuição para minha formação técnica e científica.

Ao Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço, GENCAPO, pelo apoio técnico e científico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro ao projeto (2010/20765-3), pela bolsa de mestrado no país (2011/03281-5) e pela bolsa estágio de pesquisa no exterior (2012/08575-0) concedidas.

À Dra. Inês N. Nishimoto pela assessoria na análise estatística.

Aos membros da banca do exame de qualificação para o mestrado, pelas oportunas e valiosas sugestões e críticas.

EPÍGRAFE

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

- Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	26
1.1 Carcinoma Epidermoide da Cavidade Bucal	26
1.2 Biomarcadores no Câncer e o Fator Inibitório da Migração de Macrófagos	27
1.3 CD74, receptor do Fator Inibitório da Migração de Macrófagos.....	30
1.4 MIF e CD74 como marcadores em CECB.....	31
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 Geral	33
2.2 Específicos.....	33
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. REVISÃO DE LITERATURA	35
4.1. MIF no câncer: bases moleculares dos mecanismos de ação.....	35
4.2. MIF no câncer: expressão tecidual e concentração sorológica.....	38
4.3. MIF e CD74: importância prognóstica no câncer	39
4.4. MIF, inflamação e câncer	41
5. MÉTODOS.....	44
5.1. Locais de estudo	44
5.2. Casuística	44
5.3. Coleta de material biológico	51
5.4. ELISA : concentração sorológica e salivar da proteína MIF	52
5.5. Imunoistoquímica: expressão tecidual das proteínas MIF e CD74	55
5.6. Variáveis clínicas e histopatológicas	57
5.7. Análises suplementares	58
5.7.1. Índices LNI e GNI	58
5.7.2. Estudo <i>in vitro</i>	58

5.8. Aspectos Éticos.....	60
5.9. Estatística	61
6. RESULTADOS.....	64
6.1. Concentração sorológica e salivar pré e pós-operatória da proteína MIF ..	64
6.2. Concentração sorológica e salivar da proteína MIF e variáveis clínicas e histopatológicas	69
6.3. Concentração sorológica e salivar da proteína MIF e desfecho da doença.....	74
6.4. Expressão das proteínas MIF e CD74 em CECB e em epitélio livre.....	77
6.5. Expressão tecidual da proteína MIF e variáveis clínicas e histopatológicas	88
6.6. Expressão tecidual da proteína CD74 e variáveis clínicas e histopatológicas	93
6.7. Expressão tecidual das proteínas MIF e CD74, sobrevida e desfecho da doença.....	97
6.8. Avaliação da ação sinérgica das proteínas MIF e CD74 em relação às variáveis clínicas e histopatológicas e ao desfecho da doença	112
6.9. Correlações entre as concentrações sorológica e salivar e a expressão tecidual da MIF e CD74	119
6.10. Análises suplementares: Concentração sorológica e salivar da MIF segundo a quantidade de tumor estimada	123
6.11. Análises suplementares: MIF em células de CECB.....	126
7. DISCUSSÃO	128
8. CONCLUSÕES	139
9. INFERÊNCIAS	140
10. REFERÊNCIAS.....	141
11. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	154

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Apêndice B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - Hospital Heliópolis

Apêndice C - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - FMABC

Apêndice D - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - FMUSP

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
c-Myc	<i>v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CD44	<i>Cluster of Differentiation 44</i>
CD59	<i>Cluster of Differentiation 59</i>
CD74	<i>Cluster of Differentiation 74</i>
CDK4/6	<i>Cyclin-Dependent Kinase 4/6</i>
CEC	Carcinoma espinocelular
CECB	Carcinoma epidermoide da cavidade bucal
CID-10	Código Internacional de Doenças 10 ^a edição
DDT	<i>D-Dopachrome tautomerase</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
E2F	<i>Early-region-2 transcription factor</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracelular signal-Regulated Kinase</i>
et al.	e outros
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FMABC	Faculdade de Medicina do ABC
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
Freq.	frequência
G1	<i>gap 1 phase of cell cycle</i>
GENCAPO	Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço
Gengiva inf.	gengiva inferior
GNI	índice geral

HIF-1α	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPV	<i>human papillomavirus</i>
IFN-γ	<i>Interferon γ</i>
ISO-1	<i>(S,R)-3-(4-Hydrophenyl)- 4,5-dihydro-5-isoazole acetic acid methyl ester</i>
IL-1β	<i>Interleucina-1β</i>
IL-6	<i>Interleucina-6</i>
IL-2	<i>Interleucina-2</i>
IL-8	<i>Interleucina-8</i>
Jab1	<i>c-Jun activation domain-binding protein-1</i>
LNI	<i>índice linfonodo</i>
LPA	<i>Lysophosphatidic acid</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
M2BP	<i>human Mac-2 Binding Protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MAT	<i>macrófagos associados ao tumor</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
MMP-9	<i>Matrix Metalloproteinase 9</i>
MRP14	<i>Myeloid-Related Protein 14</i>
n	<i>número de pacientes</i>
Na3VO4	<i>Ortovanadato de sódio</i>
NaCl	<i>Cloreto de sódio</i>
NaF	<i>Fluoreto de sódio</i>
NFkB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NKG2D	<i>Natural Killer cell receptor G2D</i>
p21	<i>Protein 21</i>
p27	<i>Protein 27</i>
p53	<i>Tumor supressor protein 53</i>
PI3K/AKT	<i>Phosphoinositide 3-Kinase/protein kinase B</i>
Pós	<i>Pós-operatório</i>

Pré	Pré-operatório
pTNM	Classificação patológica (T: Tumor primário / N: Linfonodos regionais / M: Metástase a distância)
Rb	<i>Retinoblastoma</i>
Rho	<i>Rhodopsin</i>
rMIF	proteína MIF recombinante
RPM	<i>revolutions per minute</i>
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i>
S	<i>synthesis phase of cell cycle</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
4-IPP	<i>4-iodo-6-phenylpyrimidine</i>
A	Ampere
ml	mililitro
mm	milímetro
M	Molar
ng	nanograma
nm	nanometro
pg	picograma
ug	micrograma
ul	microlitro
uM	micromolar
V	Volts
°C	grau Celsius
(-)	negativo
(+)	positivo
%	porcentagem
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
<	menor
>	maior

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação gráfica da concentração da proteína MIF (ng/ml) no soro pré-operatório e no soro pós-operatório de pacientes com CECB.....	68
Figura 2 - Representação gráfica da concentração da proteína MIF (ng/ml) na saliva pré-operatória e na saliva pós-operatória de pacientes com CECB	68
Figura 3 - Representação gráfica da distribuição de pacientes com CECB (% / n) segundo a expressão da proteína MIF (negativa: <5% / baixa: 5% - 50% / alta: > 50%) em tecido tumoral (Tumor) e margens epiteliais livres de tumor (Margem)	79
Figura 4 - Representação gráfica da distribuição de pacientes com CECB (% / n) segundo a expressão da proteína CD74 (negativa: <1% / baixa: 1% - 10% / alta: > 10%) em tecido tumoral (Tumor) e margens epiteliais livres de tumor (Margem)	79
Figura 5 - Detecção imunoistoquímica da proteína MIF em CECB (estudo prospectivo e retrospectivo)	83
Figura 6 - Detecção imunoistoquímica da proteína MIF na margem epitelial livre de tumor (estudo prospectivo e retrospectivo)	84
Figura 7 - Detecção imunoistoquímica da proteína CD74 em CECB (estudo prospectivo e retrospectivo)	85
Figura 8 - Detecção imunoistoquímica da proteína CD74 em CECB (estudo prospectivo e retrospectivo)	86
Figura 9 - Detecção imunoistoquímica da proteína CD74 na margem epitelial livre de tumor (estudo prospectivo e retrospectivo)	87
Figura 10 - Detecção imunoistoquímica das proteínas MIF e CD74 em glândula salivar de pacientes com CECB (estudo prospectivo e retrospectivo)	88
Figura 11 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida global (%) em função do tempo (meses). (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102)	99
Figura 12 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida global (%) em função do tempo (meses) segundo a idade ao diagnóstico do CECB. (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102)	100

Figura 13 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida global (%) em função do tempo (meses) segundo o estágio pT. (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102)	100
Figura 14 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida global (%) em função do tempo (meses) segundo o estágio pN. (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102)	101
Figura 15 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida global (%) em função do tempo (meses) segundo o estadiamento patológico. (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102)	101
Figura 16 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida global (%) em função do tempo (meses) segundo a intensidade do infiltrado inflamatório peritumoral. (estudo prospectivo e retrospectivo – n=102)	102
Figura 17 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida livre de doença (%) em função do tempo (meses). (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102)	105
Figura 18 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida livre de doença (%) em função do tempo (meses) segundo o estágio pT. (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102)	106
Figura 19 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida livre de doença (%) em função do tempo (meses) segundo o estágio pN. (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102)	106
Figura 20 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida livre de doença (%) em função do tempo (meses) segundo o estadiamento patológico. (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102)	107
Figura 21 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida livre de doença (%) em função do tempo (meses) segundo a intensidade do infiltrado inflamatório peritumoral. (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102)	107
Figura 22 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida livre de doença (%) em função do tempo (meses) segundo o estado de comprometimento das margens cirúrgicas (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102)	108

Figura 23 - Representação gráfica da correlação entre a concentração da MIF no soro e saliva pré-operatórios (estudo prospectivo – n=48)	119
Figura 24 - Representação gráfica da correlação entre a concentração da MIF no soro e saliva pós-operatórios (estudo prospectivo – n=33)	120
Figura 25 - Detecção por western blotting da expressão da proteína MIF em células de CECB e inibição da MIF por 4-IPP)	127

.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes segundo características demográficas, clínicas e de tratamento*	46
Tabela 2 - Distribuição dos pacientes segundo características histopatológicas obtidas do exame do espécime cirúrgico*	47
Tabela 3 - Distribuição dos pacientes segundo o desfecho da doença observado na última avaliação após o tratamento*	48
Tabela 4 - Distribuição dos pacientes segundo características demográficas, clínicas e de tratamento*	49
Tabela 5 - Distribuição dos pacientes segundo características histopatológicas do exame do espécime cirúrgico*	50
Tabela 6 - Distribuição dos pacientes segundo o desfecho da doença observado na última avaliação após o tratamento*	51
Tabela 7 - Disponibilidade e qualidade para análise das amostras de soro e de saliva*	54
Tabela 8 - Distribuição dos pacientes segundo a concentração da proteína MIF em soro e saliva*	65
Tabela 9 - Concentração da proteína MIF nas amostras de soro e saliva pré e pós-operatórios por paciente*	66
Tabela 10 - Concentração sorológica e salivar pré e pós-operatória da proteína MIF*	67
Tabela 11 - Associação entre a concentração da proteína MIF no soro antes e após o tratamento cirúrgico e variáveis clínicas*	70
Tabela 12 - Associação entre a concentração da proteína MIF no soro antes e após o tratamento cirúrgico e variáveis histopatológicas*	71
Tabela 13 - Associação entre a concentração da proteína MIF na saliva antes e após o tratamento cirúrgico e variáveis clínicas*	72
Tabela 14 - Associação entre a concentração da proteína MIF na saliva antes e após o tratamento cirúrgico e variáveis histopatológicas*	73
Tabela 15 - Associação entre a concentração da proteína MIF no soro antes e após o tratamento cirúrgico e o desfecho da doença*	75

Tabela 16 - Associação entre a concentração da proteína MIF na saliva antes e após o tratamento cirúrgico e o desfecho da doença*	76
Tabela 17 - Distribuição dos pacientes de acordo com a expressão das proteínas MIF e CD74 em tecido tumoral e margem	78
Tabela 18 - Expressão das proteínas MIF e CD74 em tecido tumoral e em margem epitelial livre de tumor por paciente*	80
Tabela 19 - Associação entre a expressão da proteína MIF em tumor e margem e variáveis clínicas*	90
Tabela 20 - Associação da expressão da proteína MIF em tumor e margem e variáveis histopatológicas*	91
Tabela 21 - Associação entre a expressão do CD74 em tumor e margem e variáveis clínicas*	94
Tabela 22 - Associação entre a expressão do CD74 em tumor e margem e variáveis histopatológicas*	95
Tabela 23 - Distribuição da sobrevida global (%) em 1 ano de seguimento dos pacientes em relação à variáveis clínicas e histopatológicas*	98
Tabela 24 - Distribuição da sobrevida global (%) em 1 ano de seguimento dos pacientes em relação à expressão das proteínas MIF e CD74 no tumor e na margem*	103
Tabela 25 - Distribuição da sobrevida livre de doença (%) em 1 ano de seguimento dos pacientes em relação às variáveis clínicas e histopatológicas*	104
Tabela 26 - Distribuição da sobrevida livre de doença (%) em 1 ano de seguimento dos pacientes em relação à expressão das proteínas MIF e CD74 no tumor e na margem*	109
Tabela 27 - Associação entre a expressão da MIF em tumor e margem e o desfecho da doença*	110
Tabela 28 - Associação entre a expressão do CD74 em tumor e margem e o desfecho da doença*	111
Tabela 29 - Associação entre os perfis de expressão MIF alta/CD74(-) e MIF alta/CD74(+) em CECB e variáveis histopatológicas*	113

Tabela 30 - Associação entre os perfis de expressão MIF alta/CD74(-) e MIF alta/CD74(+) em CECB e o desfecho da doença*	115
Tabela 31 - Associação entre os perfis de expressão MIF(+)/CD74(-) e MIF(+)/CD74(+) em CECB e variáveis histopatológicas*	116
Tabela 32 - Associação entre os perfis de expressão MIF(+)/CD74(-) e MIF(+)/CD74(+) em CECB e o desfecho da doença*	118
Tabela 33 - Correlação entre a expressão no tumor e margem e concentração no soro e saliva da proteína MIF	121
Tabela 34 - Correlação entre a expressão das proteínas MIF e CD74 no tumor e margem.....	122
Tabela 35 - Distribuição dos pacientes segundo a quantidade de tumor estimada*	124
Tabela 36 - Associação entre o LNI e o desfecho da doença*	125
Tabela 37 - Associação entre a concentração da MIF no soro pré-operatório e a quantidade de tumor estimada*	125
Tabela 38 - Associação entre a concentração da MIF na saliva pré-operatória e a quantidade de tumor estimada*	126

RESUMO

SOUZA, M.B. **Estudo do Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF) em pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade bucal.** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO. A proteína Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF) é frequentemente observada com expressão elevada em tecidos tumorais quando comparados aos tecidos equivalentes normais e estudos têm sugerido seu papel como marcador prognóstico de neoplasias malignas, incluindo carcinomas hepatocelular, de ovário, de esôfago e também de cabeça e pescoço. Adicionalmente, alguns de seus mecanismos de ação já demonstrados, como a indução da proliferação e migração celular permitem implicar essa expressão diferencial no desenvolvimento tumoral e, consequentemente, no prognóstico das neoplasias malignas. **OBJETIVO.** Esse estudo objetivou avaliar o papel diagnóstico e prognóstico da proteína MIF em carcinoma epidermoide da cavidade bucal. **METODOLOGIA.** O estudo foi composto por 50 pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade bucal coletados prospectivamente e 57 casos retrospectivos admitidos nos Serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis e da Faculdade de Medicina da Fundação ABC. As análises foram feitas por meio de imunohistoquímica dos tecidos tumorais e margens epiteliais normais e de ELISA das amostras de soro e saliva, coletadas pré e pós-tratamento cirúrgico, dos pacientes participantes. Os resultados foram correlacionados aos achados clínicos e histopatológicos. **RESULTADOS.** A expressão da proteína MIF e seu receptor CD74 mostrou-se elevada em tecido tumoral quando comparado ao tecido epitelial livre de neoplasia ($p < 0,0001$). Associação entre a alta expressão da MIF no tumor e infiltração vascular linfática foi observada ($p = 0,005$) e alta expressão da MIF no epitélio livre de tumor apresentou correlação marginalmente significativa com ocorrência de segundo tumor primário ($p = 0,072$). A expressão positiva do receptor CD74 não apresentou associação

com variáveis clínicas ou histopatológicas. A concentração sorológica da proteína MIF apresentou associação inversa com metástase linfonodal ($p=0,018$) e estádios patológicos avançados ($p=0,040$) e foi significativamente reduzida após a ressecção do tumor ($p=0,001$). A concentração da MIF na saliva não apresentou redução significativa após o tratamento cirúrgico, mas foi associada aos estágios pT3 e pT4 ($p=0,001$) e a estádios patológicos avançados ($p=0,032$). **CONCLUSÕES.** A redução significativa da concentração da MIF observada no soro dos pacientes após a ressecção cirúrgica do tumor permite sugerir papel potencial dessa proteína como biomarcador para a detecção precoce de recorrência do carcinoma epidermoide da cavidade bucal. A expressão tecidual da proteína MIF e seu receptor CD74 apresentou papel controverso, mas a concentração salivar da proteína MIF parece relacionar-se a um possível papel pró-tumoral em carcinoma epidermoide da cavidade bucal.

Descritores: Proteína MIF humana; Marcadores biológicos; Neoplasias bucais; Carcinoma epidermoide; Detecção precoce de câncer; Prognóstico; Proteínas e peptídeos salivares; Citocinas; Antígenos de histocompatibilidade classe II; Fatores Inibidores da Migração de Macrófagos; Imunoistoquímica.

ABSTRACT

SOUZA, M.B. **Study of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in patients with oral squamous cell carcinoma** [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

INTRODUCTION. The Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) overexpression is frequently observed in tumor tissues compared to normal tissues and some previous studies have suggested its role as a prognostic marker of malignancies, including hepatocellular, ovarian, esophageal and also head and neck carcinoma. Additionally, some of its mechanisms of action, as migration and cell proliferation induction, have been demonstrated, which allow imply a differential expression in tumor progression and therefore in the prognosis of malignant neoplasms. **OBJECTIVES.** This study aimed to evaluate the role of MIF protein and its receptor CD74 in prognosis and diagnostic of oral squamous cell carcinoma. **METHODS.** The study consisted of 50 patients with oral squamous cell carcinoma prospectively collected and 57 patients retrospectively collected admitted at the Head and Neck Surgery Service from Heliópolis Hospital and ABC Medical School. The analysis were performed by Immunohistochemistry of tumor and normal tissues and by ELISA of serum and saliva samples collected pre and post-surgical treatment. Results were correlated to clinical and histopathological data. **RESULTS.** The expression of MIF protein and of its receptor CD74 was higher in OSCC than in normal epithelium ($p < 0,0001$). Association between overexpression of MIF in tumor tissue and lymphatic vessel invasion was observed ($p = 0,005$) and higher concentration of MIF in normal epithelium showed correlation of marginal significance with second primary tumor occurrence ($p = 0,072$). The positive expression of the receptor CD74 did not presented association with clinical or histopathological variables. Serum MIF concentration presented inverse association with lymph node metastasis ($p = 0,018$) and advanced pathological stage ($p = 0,040$) and it was significantly reduced after the surgery ($p = 0,001$). The salivary MIF concentration was not significantly reduced after the surgery,

but it was associated with pT3 and pT4 stages ($p=0,001$) and advanced pathological findings ($p=0,032$). **CONCLUSIONS.** The results showing significant reduction of MIF concentration in post-surgical serum of patients suggest its potential role as a biomarker to early detection of oral squamous cell carcinoma recurrence. The MIF and CD74 expression presented controversial role, but the salivary concentration of MIF seems to develop a possible pro-tumoral role.

Descriptors: MIF protein, human; Biological Markers; Mouth Neoplasms; Carcinoma, Squamous Cell, Early Detection of Cancer; Prognosis; Salivary Proteins and Peptides; Cytokines; Histocompatibility Antigens Class II; Macrophage Migration-Inhibitory Factors; Immunohistochemistry.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carcinoma Epidermoide da Cavidade Bucal (CECB)

As neoplasias malignas mais freqüentes originárias do epitélio de revestimento das vias aerodigestivas superiores são os carcinomas epidermoides ou carcinomas espinocelulares (CEC), representando mais de 90% de todos os tumores desta região anatômica. Entre os diferentes sítios primários da cabeça e pescoço, a cavidade bucal é a localização mais freqüentemente acometida no nosso meio.

O câncer de boca é a 15ª neoplasia maligna em incidência no mundo acometendo a população geral, sendo a 10ª entre os homens e a 17ª entre as mulheres, constituindo aproximadamente 3% de todos os casos de câncer. (CANCELA et al., 2010; GLOBOCAN 2012).

No Brasil, o câncer bucal é a 5ª neoplasia mais frequente entre os homens, a 12ª mais frequente entre as mulheres e as estimativas para o ano de 2014 são de 11.280 novos casos entre os homens e 4.010 entre as mulheres, totalizando 15.290 novos casos. (INCA, 2014)

Os principais fatores de risco para o carcinoma bucal são o consumo de álcool e tabaco e diversos outros fatores têm sido também associados, como o risco genético, uso de betel, fumo de *cannabis* e de khat, uso medicinal de nicotina, ingestão de mate quente, infecção por HIV, infecção por HPV, uso de enxaguantes bucais contendo álcool, má higiene bucal e, inclusive, baixas condições sócio-econômicas. (BOING et al. 2011; CANCELA et al., 2010; MARQUES et al., 2008; PURDUE et al., 2009)

Esses tumores podem ser diagnosticados precocemente devido à acessibilidade da cavidade bucal por avaliação visual, mas apesar disso, a maioria dos tumores de cavidade oral e orofaringe é diagnosticada em estágios avançados, o que contribui para as baixas taxas de sobrevida global. A taxa de sobrevida em 5 anos chega a 75% quando o diagnóstico é realizado

precocemente, enquanto com o diagnóstico tardio cai para 20%. (BAYKUL et al., 2010; NIH, 2010)

Algumas variáveis clínicas e histopatológicas têm sido estudadas e propostas como marcadores de prognóstico em câncer bucal e podem auxiliar na predição da resposta ao tratamento e da evolução da doença. Variáveis como padrão de crescimento endofítico, maior profundidade de invasão, presença de infiltração vascular linfática, presença de invasão perineural, invasão muscular, maior espessura do tumor, comprometimento das margens cirúrgicas por tumor, presença de metástase linfonodal e menor idade ao diagnóstico têm sido associadas ao pior prognóstico do câncer bucal. Também o estadiamento patológico, que considera a classificação pTNM, fornece dados mais precisos para avaliar o prognóstico do paciente com câncer. (JERJES et al., 2010; SHARMA, et al., 2013; SOBIN; WITTEKIND, 2002; TAI et al., 2013)

1.2. Biomarcadores no Câncer e o Fator Inibitório da Migração de Macrófagos

Os biomarcadores são parâmetros genéticos, moleculares ou bioquímicos que podem ser objetivamente quantificados e avaliados para discernir a presença e progressão da doença. Seu papel tem sido ampliado para atender todos os aspectos da assistência ao paciente, desde a detecção precoce do câncer, ao estadiamento mais preciso do tumor, seleção de pacientes mais susceptíveis de serem beneficiados com terapias específicas e à resposta do tumor pós-tratamento. (PAI; WESTRA, 2009)

O carcinoma epidermoide bucal, como a maioria das outras neoplasias malignas, consiste de uma população celular heterogênea de variado comportamento biológico e admite-se que parâmetros clínico-patológicos isolados não são suficientes para inferir as características e o comportamento biológico do tumor. O reconhecimento de diferentes perfis genéticos e moleculares pode permitir uma classificação mais específica do carcinoma epidermoide em subtipos distintos que diferem com respeito aos fatores de

risco, patogênese e comportamento clínico e biológico. Nesse contexto, torna-se necessária a identificação de biomarcadores moleculares clinicamente significativos para ampliar os parâmetros clínicos atualmente utilizados no desenvolvimento de novos protocolos de diagnósticos e terapias. (PAI; WESTRA, 2009; PALKA; SLEBOS; CHUNG, 2008; SOLOMON; CARNELIO; GUDATTU, 2010)

Hipoteticamente os tumores produzem proteínas que podem chegar à corrente sanguínea e que teriam papel importante como biomarcadores, porém os efeitos de diluição, expressão de tecidos não tumorais e o mascaramento de proteínas séricas abundantes tornam difícil sua detecção. Uma forma de superar tais limitações na investigação de potenciais biomarcadores teciduais e sorológicos é analisar ambos o soro e o tecido, detectando e identificando proteínas expressas diferencialmente em tecido e então quantificar as mesmas no soro por meio de testes baseados em anticorpos.

Na procura por biomarcadores de carcinoma epidermoide da cavidade bucal uma abordagem promissora, segundo HU et al. (2008), é a análise do proteoma da saliva, já que as células de câncer bucal estão imersas no meio salivar. No estudo referido foi detectada, por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e *Imunoblotting*, concentração elevada das proteínas catalase, profilina, CD59, *human Mac-2 Binding Protein* (M2BP) e *Myeloid-Related Protein* (MRP14) em amostras salivares de 64 pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade bucal, em relação à saliva de 64 controles saudáveis.

É sabido que o câncer possui um componente inflamatório importante que em alguns casos é o fator desencadeador da transformação maligna e em outros, como por exemplo o CECB, é originado e modulado por alterações genéticas e epigenéticas induzidas por carcinógenos tais como o tabaco e o álcool. A modulação da resposta inflamatória contribui para a progressão neoplásica induzindo a proliferação e sobrevivência da célula tumoral, estimulando a angiogênese e reduzindo a imunidade antitumoral e a resposta do tumor à terapias. As citocinas são importantes componentes desse processo inflamatório associado ao câncer. Adicionalmente, células tumorais frequentemente superexpressam citocinas a fim de modular o microambiente, o que sugere papel potencial para as citocinas como biomarcadores e alvos

terapêuticos. (CANDIDO; HAGEMANN, 2013; DOUGLAS et al., 2004; DUFFY et al., 2008; FELLER; ALTINI; LEMMER, 2013; HAMATAKE et al., 2008; HATHAWAY et al., 2005; MANTOVANI; GARLANDA; ALLAVENA, 2010; MURAMAKI et al., 2006; TAKES et al., 2008)

O Fator Inibitório da Migração de Macrófagos é uma citocina pró-inflamatória, cuja ação relacionada à progressão tumoral também tem sido relatada. (BACH et al., 2008)

A MIF foi primeiramente identificada por BLOOM, BENNETT (1966) e DAVID (1966) em estudos de hipersensibilidade tipo tardia como substância inibidora da migração randômica de macrófagos peritoneais normais, derivada de células T ativadas, mas relatos recentes mostram que a MIF é secretada também pela hipófise anterior, macrófagos, células endoteliais e células epiteliais de vários órgãos, incluindo pulmão, rim e fígado. O gene localizado no braço longo do cromossomo 22 (22q11.2) codifica o Fator Inibitório da Migração de Macrófagos, uma proteína não glicosilada, composta por 115 aminoácidos e com peso molecular de 12,5 kDa, que em sua forma ativa aparece como uma molécula homotrimérica. (BLOOM; BENNETT, 1966; CALANDRA et al., 1994; DAVID, 1966; OMIM; REN et al., 2005; SUN et al., 1996;)

Quando localizada no citoplasma da célula normal a MIF contribui para a sobrevivência, o ciclo celular e a regulação da homeostase. A MIF endógena ou localizada no citoplasma por endocitose tem como um de seus ligantes *c-Jun activation domain-binding protein-1* (Jab1) e essa interação estabiliza a proteína p27, inibindo o ciclo celular. (KLEEMAN et al., 2000; REN et al., 2005; VERJANS et al., 2009; WU et al., 2009; YASASEVER et al., 2007)

No sistema imune, a MIF regula a resposta inata e adquirida, aumenta a fagocitose, inibe o efeito anti-inflamatório de glucocorticóides e induz a produção de outras citocinas inflamatórias, como a Interleucina-1 β (IL-1 β), a Interleucina-6 (IL-6), a Interleucina-2 (IL-2), *Interferon* γ (IFN- γ) e *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α). O papel da MIF como mediador do sistema imune já foi relatado na resposta hospedeira ao choque endotóxico e em doenças inflamatórias, incluindo glomerulonefrites, arteriosclerose, artrite reumatóide, diabetes tipo I e tipo II, asma, fibrose cística, colite, esclerose múltipla, psoríase

e lúpus eritematoso sistêmico. (COOKE; ARMSTRONG; DONNELLY, 2009; REN et al., 2005; SANCHEZ-ZAMORA et al., 2010; VERJANS et al., 2009)

Além da Jab1, a MIF tem como parceira de ligação intracelular a p53, com papel bem estabelecido na regulação do ciclo celular. Recentemente foi descoberto que o receptor de superfície celular da MIF é o CD74, uma cadeia invariante do peptídeo HLA classe II, mas que a MIF também pode se ligar aos receptores de quimiocina *C-X-C chemokine receptor type 4* (CXCR4) e *C-X-C chemokine receptor type 2* (CXCR2). (BERNHAGEM, 2007; MCCLELLAND et al., 2009; RENDON et al., 2009)

A proteína MIF pode ser mensurada em tecidos tumorais e soro por técnicas como as descritas para avaliação da expressão gênica do MIF por imunistoquímica e ELISA realizadas respectivamente por MCCLELLAND et al. (2009), em 70 pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células, e CAMLICA et al. (2008), em 63 pacientes com câncer gástrico e 50 indivíduos saudáveis, utilizando anticorpos comerciais disponíveis. Esta proteína aparece aumentada em diversos tipos de tumor e sua ação pró-tumoral sugere papel potencial como marcador prognóstico. (CAMLICA et al., 2008; FANG et al., 2008; KAMIMURA et al., 2000; MOHRI et al., 2009; REN et al., 2005; TOMIYASU et al., 2002; XIA et al., 2005; YASASEVER et al., 2007)

1.3. CD74, receptor do Fator Inibitório da Migração de Macrófagos

A molécula CD74 é uma proteína de membrana tipo II com função de chaperona na síntese, processamento e apresentação de antígenos do MHC (*major histocompatibility complex*) classe II. Tem sido demonstrado, porém que a proteína CD74 aparece também em células não apresentadoras de antígenos, por exemplo, em células epiteliais, o que indica funções adicionais para a mesma. (LENG et al., 2003)

Mais recentemente, foi reportado que a ligação da MIF ao seu receptor CD74 ocorre por formação de um complexo proteico na superfície celular que

inclui também a proteína de membrana CD44. (SHI et al., 2006; GORE et al., 2008)

Segundo Beswick et al., a molécula CD74 como receptor da MIF desenvolve papel importante na inflamação crônica e pode representar o *link* principal entre esta e a carcinogênese em câncer gástrico e intestinal. (BESWICK; REYES, 2009)

Em estudo in vitro, o CD74 mostrou ser um receptor de sobrevivência. Em células epiteliais normais de cólon murino e células de carcinoma de cólon murino, a MIF aumentou a expressão da proteína *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) e Ciclina E de maneira dependente de CD74, diminuindo a apoptose e aumentando a proliferação celular, respectivamente. Na ausência de CD74, a MIF não foi capaz de aumentar a sobrevivência celular, sugerindo que o CD74 pode ser útil como marcador de câncer colorretal e como alvo terapêutico. (MAHARSHAK et al., 2010)

Por suas funções na indução da sobrevivência e vias de proliferação celular e seu papel na regulação da resposta imune, pode-se pensar na utilidade do CD74 como alvo de intervenção terapêutica, talvez por uso de RNA de interferência ou por antagonismo da proteína. (GOLD et al., 2010)

1.4. MIF e CD74 como marcadores em CECB

Os mecanismos de ação da MIF e seu papel pró- tumoral têm sido estudados em diferentes tipos tumorais e o silenciamento da MIF por *small interfering RNA* (siRNA) em linhagens celulares de câncer de pâncreas induziu a diminuição da proliferação celular acompanhada por indução da apoptose, como visto por DENZ et al. (2010)

A relação entre a MIF e fatores prognósticos foi estudada por REN et al. (2005) em carcinoma epidermoide de esôfago de 72 pacientes por meio de imunoistoquímica dos tecidos tumorais e não tumorais distantes do sítio primário e observaram que os carcinomas pouco diferenciados expressavam nível mais alto da proteína MIF comparados com os bem diferenciados e que a

expressão também era mais alta em pacientes com metástase linfonodal. O tempo médio de sobrevida para pacientes com baixa (<50% das células tumorais coradas) e alta (>50% das células tumorais coradas) expressão da MIF neste estudo foi de 28,3 meses e 15,8 meses e a taxa de sobrevida em 3 anos foi de 37,7% e 12,1% respectivamente. O mesmo estudo mostrou que as concentrações séricas da MIF nos pacientes (100 ng/ml) eram mais altas que em controles saudáveis (2,5 ng/ml).

A escolha da proteína MIF e seu receptor CD74 como potenciais marcadores de prognóstico do carcinoma epidermóide da cavidade bucal nesse estudo deve-se à superexpressão de ambos, encontrada em carcinomas de outras localizações do corpo humano e também de outros sítios da cabeça e do pescoço, bem como aos seus mecanismos de ação relacionados ao desenvolvimento tumoral. (HAN et al., 2009; GOLD et al., 2010; MAHARSHAK et al., 2010; SUZUKI et al., 2005)

Neste sentido, uma contribuição significativa vem de HAN et al. (2009) que estudaram 17 amostras tumorais de carcinoma epidermóide de base de língua, tonsila, laringe, supraglote e mucosa bucal por meio de microarranjo de RNA e identificaram 192 genes superexpressos nos tecidos tumorais comparados aos tecidos normais de tonsila, dentre eles o Fator Inibitório da Migração de Macrófagos e seu receptor de membrana CD74. Os autores sugeriram que a MIF pode servir como marcador diagnóstico de CEC e o CD74 como alvo para terapia anti-câncer.

SUZUKI et al. (2005), por análise imunoistoquímica de tumores de diferentes sítios da região da cabeça e pescoço de pacientes submetidos à quimioterapia e radioterapia concomitantes, mostraram associação entre alta expressão da MIF e acometimento linfonodal e entre a expressão positiva da MIF e melhor sobrevida, evidenciando a necessidade de melhor compreensão do comportamento dessa proteína em neoplasias de cabeça e pescoço.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Avaliar a proteína MIF como marcador diagnóstico e prognóstico em carcinoma epidermoide da cavidade bucal.

2.2. Específicos

- Caracterizar a expressão tecidual diferencial da proteína MIF em carcinoma epidermoide da cavidade bucal em comparação com as margens cirúrgicas livres de neoplasia.
- Verificar a correlação entre a expressão diferencial da proteína MIF em tumor, soro e saliva e variáveis histológicas de importância prognóstica.
- Avaliar os níveis séricos e salivares da MIF antes e após o tratamento em pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade bucal como marcador de controle ou de recorrência da doença.

3. JUSTIFICATIVA

O carcinoma epidermóide da cavidade bucal possui grande carência de marcadores moleculares com utilidade no diagnóstico, na predição do prognóstico e como alvos terapêuticos.

O estabelecimento de marcadores salivares e séricos pode ser interessante uma vez que essas amostras são de mais fácil acesso e menos invasivas que amostras biopsiadas e a MIF como citocina livre pode ser secretada pelas células tumorais na corrente sanguínea e, em se tratando de carcinoma epidermóide de cavidade bucal, no meio salivar, apresentando então potencial como marcador prognóstico e diagnóstico de recidivas para este tipo de neoplasia.

A avaliação da concentração da proteína MIF na saliva realizada neste estudo é um feito inédito até o momento e gerou contribuição metodológica valiosa. Também as observações da expressão do CD74 em CECB e em epitélio de revestimento da cavidade bucal morfolologicamente normal são originais e contribuem significativamente para estudos posteriores.

A presente investigação buscou compreender o papel da proteína MIF, bem como do seu receptor de membrana CD74, na biologia e como marcador diagnóstico do carcinoma epidermóide da cavidade bucal.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. MIF no câncer: bases moleculares dos mecanismos de ação

Alguns mecanismos de ação da MIF como citocina de mediação autócrina e parácrina observada em anos de estudo têm sugerido sua possível relação com a origem e desenvolvimento das doenças neoplásicas. (FANG et al., 2008; HIRA et al., 2005; KROCKENBERGER et al., 2010)

Numerosos estudos têm sugerido o papel da MIF na angiogênese, progressão do ciclo celular e proliferação, inibição da apoptose e da lise por células *Natural Killer* (NK), sobrevivência celular, migração e metástase. Como observado em estudo *in vitro*, o silenciamento da MIF por siRNA foi capaz de reduzir a proliferação e migração celular em linhagens de câncer de ovário (TOV-21G, HO-8910, HO-8910PM). (CHEN et al., 2010; DENZ et al., 2010; KROCKENBERGER et al., 2010; LEE et al., 2008; LI et al., 2009; MCCLELLAND et al., 2009; RENDON et al., 2009; SCHRADER et al., 2009; SUN et al., 2005; VERJANS et al., 2009, WU et al., 2009)

Alguns dos mecanismos pelos quais a MIF induz o desenvolvimento tumoral estão associados às vias *Phosphoinositide 3-Kinase/protein kinase B* (PI3K/AKT), *Retinoblastoma/Early-region-2 transcription factor* (Rb/E2F), *Extracelular signal-Regulated Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase* (ERK/MAPK) e à inibição do receptor *Natural Killer cell receptor G2D* (NKG2D). (AMIN et al., 2003; DENZ et al., 2010; KROCKENBERGER et al., 2010; LEE et al., 2008; LI et al., 2009; MCCLELLAND et al., 2009; RENDON et al., 2009; SCHRADER et al., 2009; SUN et al., 2005; VERJANS et al., 2009)

Partindo da superexpressão em relação ao tecido normal, detectada por análise de perfil de expressão gênica em adenocarcinoma ductal pancreático, estudos *in vitro* de uma série de linhagens celulares de câncer pancreático mostraram que o silenciamento da MIF por siRNA inibe a proliferação celular e induz apoptose e que esses mecanismos estão associados à mudança no

estado de fosforilação de AKT provocada pela ausência da MIF. (DENZ et al., 2010)

Em células de câncer gástrico (MGC-803) tratadas com proteína MIF recombinante (rMIF) foi observada maior expressão de Ciclina D1, inibição de p27 e indução da fosforilação de AKT e este fenótipo foi revertido pelo tratamento com um inibidor de AKT (LY294002), sugerindo ação da MIF por meio da via de sinalização AKT no aumento da proliferação e progressão do ciclo celular. (LI et al., 2009)

Também a inibição da MIF por plasmídeo anti-senso e anticorpo monoclonal em linhagens celulares de glioma humano (LN18 e LN229) culminou em aumento da expressão de p21, p27 e p53, diminuição da atividade de ERK e AKT e redução da proliferação, fenótipo associado à restauração de inibição por contato. (SCHRADER et al., 2009)

A MIF endógena da célula apresenta papel na transição do ciclo celular de G1 para S por ativar reguladores positivos do ciclo celular tais como MAPK, PI3K/Akt, *Nuclear Factor Kappa B* (NFκB), *v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog* (c-Myc) and E2F. Um dos mecanismos pode ser pela ativação contínua da MAPK por MIF, que levaria a expressão de Ciclina D1 para ativar *Cyclin-Dependent Kinase 4/6* (CDK4/6), fosforilar a proteína Rb, resultando na liberação do fator transcricional E2F e entrada das células na fase de síntese de DNA, com enzimas e fatores regulatórios necessários para o processo transcricional. (LIAO; BUCALA; MITCHELL, 2003; LIU et al., 2008; PETRENKO; MOLL, 2005; WU et al., 2009)

Em estudo realizado por HUDSON et al. (1999) a MIF foi capaz de inibir a atividade da p53 *in vitro*, o que sugere uma relação entre inflamação e tumorigênese, bem como entre proliferação celular e desenvolvimento tumoral.

O silenciamento da MIF provocou a diminuição do potencial invasivo em linhagem celular de câncer de cólon 26 de ratos. Nessas células, foi observado que a MIF colabora com o *Lysophosphatidic acid* (LPA) na ativação da via dependente de *Rhodopsin* (Rho GTPase) e seus efetores Integrina β1 e *Focal Adhesion Kinase* (FAK), com papel conhecido na formação de fibras de estresse e adesão focal, mecanismos importantes para a migração e invasão celular. (SUN et al., 2005)

Em linhagens celulares de câncer pancreático (Capan-2 and Panc-1), células com superexpressão da MIF apresentaram consequentes expressão diminuída de E-caderina e expressão aumentada de Vimentina, situação característica do processo de transição epitélio-mesenquimal, associado ao fenótipo celular invasivo. No mesmo estudo, *in vivo*, implantes de células tumorais com superexpressão da MIF apresentaram crescimento e metástases elevados comparados às células controle implantadas. (FUNAMIZU et al., 2012)

Associação da MIF com hipóxia já foi relatada, tendo sido reportado que maiores níveis de mRNA da MIF são induzidos por hipóxia em linhagens celulares de carcinoma epidermoide humano. Segundo RENDON et al. (2009), quando superexpressa no tumor, a MIF pode aumentar a estabilização da proteína *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* (HIF-1 α) induzida por hipóxia e, subsequentemente, as respostas angiogênica, metabólica, do ciclo celular e metastática. Além disso, resultados do mesmo estudo sugerem que a MIF induzida por hipóxia difunde para dentro de regiões normóxicas do tumor onde pode modular a expressão de fatores de crescimento angiogênicos, como *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) e IL-8, a progressão do ciclo celular e a migração e invasão de células malignas normóxicas.

A estabilização de HIF-1 α pode se dar pela ligação da MIF ao seu receptor de membrana e consequente ativação da via ERK, bem como pela inativação de p53, sabido ser regulador negativo da HIF-1 α . (BABU, CHETAL, KUMAR, et al., 2012)

MIF e *D-Dopachrome tautomerase* (DDT), homólogo estrutural e funcional da MIF, em células normais ativam *AMP-activated protein kinase* (AMPK), proteína com função supressora de tumor. Em câncer de pulmão não-pequenas células porém, MIF e DDT por meio de CD74 inibiram a função de AMPK mesmo em estado desbalanceado de nutrientes, permitindo a manutenção do ciclo e sobrevivência celular. (BROCK et al., 2012; MERKA et al., 2011)

São crescentes os estudos mostrando interações da MIF com vias de sinalização e proteínas com papel já estabelecido nas funções celulares de

utilidade para o desenvolvimento neoplásico, suportando a provável importância da MIF no prognóstico de diferentes tipos tumorais.

4.2. MIF no câncer: expressão tecidual e concentração sorológica

Além das numerosas observações a respeito de seus mecanismos de ação relacionados ao desenvolvimento tumoral, a MIF tem sido relatada como superexpressa, comparada ao tecido normal, em tecido de câncer de pulmão, carcinoma epidermóide de esôfago, carcinoma de nasofaringe e também seus níveis séricos foram aumentados em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago, câncer gástrico e câncer colorretal em relação a controles sem neoplasia. (CAMLICA et al., 2008; FANG et al., 2008; KAMIMURA et al., 2000; MOHRI et al., 2009; REN et al., 2005; TOMIYASU et al. , 2002; XIA et al., 2005; YASASEVER et al., 2007)

Em análise imunoistoquímica HE et al. (2009) observaram 20 a 40 vezes mais células positivas para MIF na mucosa de pacientes com câncer colorretal que em tecido normal. Nos mesmos pacientes, quando com metástase hepática, células positivas para MIF apareceram em quantidade aumentada no tecido hepático doente, mas não em áreas do fígado com morfologia normal.

MURAMAKI et al. (2006) observaram níveis da MIF no soro significativamente mais altos em pacientes com câncer de próstata que em pacientes com doença benigna ou controles saudáveis. Já a diferença nos níveis da MIF entre pacientes com doença benigna de próstata e controles saudáveis foi insignificante.

Níveis séricos da MIF foram mais altos também em pacientes com câncer colorretal e pacientes com melanoma maligno quando comparados a controles saudáveis. (YASASEVER et al., 2007)

Em outro estudo, a média das concentrações de MIF no soro foi de 35.2 ng/ml em pacientes com câncer de cólon e 21.3 ng/ml em controles sem câncer. (LEE et al., 2008)

Ainda, a relação direta entre a expressão da MIF nas células epiteliais de câncer gástrico e a concentração da MIF no soro foi relatada por HE et al. (2006) No mesmo estudo foi mostrado aumento significativo e progressivo da concentração da MIF no soro em pacientes com mucosa normal, gastrite, metaplasia intestinal e câncer gástrico, respectivamente.

4.3. MIF e CD74: importância prognóstica no câncer

Conforme já abordado, as células tumorais produzem altos níveis da proteína MIF que tem ação no desenvolvimento tumoral por meio de mecanismos variados, e então estudos têm relacionado sua expressão gênica a fatores de prognóstico da doença. Em carcinoma pancreático ductal a MIF foi observada estar superexpressa em comparação ao tecido normal adjacente e a alta expressão foi independentemente associada com pior sobrevida. (FUNAMIZU et al., 2012)

KROCKENBERGER et al. (2010), observaram que alta expressão da MIF está associada com a progressão do tumor, uma vez que amostras teciduais, analisadas por imunohistoquímica e RT-PCR, provenientes de displasia cervical, neoplasia intraepitelial cervical e câncer cervical invasivo, apresentaram, respectivamente, aumento progressivo na expressão da MIF.

Alto nível de expressão da MIF nos tecidos tumorais obtidos de 58 pacientes com osteosarcoma, avaliados por imunohistoquímica, foi independentemente associado com menor sobrevida global e sobrevida livre de doença e com maior densidade microvascular intratumoral. No mesmo estudo, tratamento in vitro de linhagens celulares de osteosarcoma (U2-OS e MG63) com rMIF induziu a expressão do fator angiogênico VEGF e o silenciamento da MIF por siRNA diminuiu o potencial invasivo das dessas células. (HAN et al., 2008)

MEYER-SIEGLER, BELLINO e TANNENBAUM (2002), estudando pacientes com câncer de próstata, observaram que células que superexpressavam MIF mostravam maior potencial de indução da

angiogênese, aumentando a sobrevivência da célula tumoral e a capacidade de metástase. No mesmo estudo, os pacientes com carcinoma de próstata apresentando níveis séricos da MIF maiores que 6000 pg/ml mostraram ter maior risco de recorrência e menor sobrevida comparados aos pacientes com concentrações mais baixas, que apresentaram melhor prognóstico. Interessantemente, segundo análise por real time RT-PCR de tumores de pulmão obtidos de 59 pacientes, o tipo histológico carcinoma epidermóide apresentou maior expressão de MIF mRNA que o adenocarcinoma e pacientes com carcinoma epidermóide de pulmão com alta expressão tumoral da MIF (150.000 cópias) apresentaram pior sobrevida que aqueles com baixa expressão (<150.000 cópias). (TOMIYASU et al., 2002)

Baixa expressão tumoral e baixa concentração sorológica da MIF foram associadas com maior sobrevida livre de doença em estudos com 56 pacientes com carcinoma hepatocelular e 97 pacientes com câncer gástrico respectivamente, quando comparados aos pacientes com alta expressão ou concentração da MIF. (HIRA et al., 2005; XIA et al., 2009)

Também a relação com potencial metastático do tumor foi observada para alta expressão tumoral da MIF em estudo com 40 pacientes com carcinoma adenoide cístico. A expressão tumoral da MIF foi 5 vezes mais alta que em tecido de glândula salivar normal e a expressão tumoral correlacionou com expressão de *matrix metalloproteinase 9* (MMP-9), proteína importante para a capacidade invasiva da célula. (LIU et al., 2013)

Em estudo realizado por REN et al. (2005), carcinoma epidermóide de esôfago com MIF altamente expressa correlacionou com perda de diferenciação da célula tumoral e metástase linfonodal, indicadores de pior prognóstico.

VERJANS et al. (2009) observaram uma superexpressão da MIF em 175 amostras de câncer de mama invasivo comparadas aos 35 tecidos normais. Os pacientes com expressão citoplasmática abundante da MIF mostraram ter, segundo o estudo, sobrevida doença específica de 5 anos de 67% e sobrevida livre de doença de 5 anos de 52%, comparados aos pacientes com baixa expressão com 50% e 36%, respectivamente. Esse resultado somado à observação de que a expressão abundante da MIF no citoplasma está

significativamente associada a tumores pequenos, levaram os autores à hipótese de que a MIF intracelular pode inibir a proliferação celular e ser indicativa de prognóstico favorável, enquanto a MIF extracelular derivada de tecido tumoral pode ser pró-inflamatória e constituir um marcador de prognóstico desfavorável.

Em pesquisa realizada por Schrader et al. (2009) com linhagem celular de glioma maligno (LN18), a inibição da MIF por meio do inibidor sintético *(S,R)-3-(4-Hydrophenyl)-4,5-dihydro-5-isoazole acetic acid methyl ester* (ISO-1) que bloqueia a atividade da MIF intra e extracelular, pareceu ter efeito mais forte na proliferação das células tumorais que o tratamento com anticorpos, que bloqueiam somente a MIF extracelular. Em concordância, a restauração do fenótipo proliferativo por adição de rMIF em células transfectadas por plasmídeo anti-MIF foi deficiente, o que sugere que a MIF intracelular e seus parceiros de ligação intracelulares possuem papéis únicos nesse processo. Esses resultados concordam com o estudo acima relatado sobre a ação diferencial da MIF dependendo de sua localização no tecido, o que pode levar também a possíveis diferenças no prognóstico.

Também o receptor da MIF, a proteína de membrana CD74, mostrou significância prognóstica em estudo imunoistoquímico de adenocarcinoma de ducto pancreático. Pacientes com expressão de CD74 menor que 70% tiveram melhor taxa de sobrevida em cinco anos que aqueles com expressão maior que 70%. Além disso, apresentou associação com outros fatores significantes para o prognóstico, como permeabilidade vascular, metástase linfonodal e estadiamento patológico. (NAGATA, et al., 2009)

4.4. MIF, inflamação e câncer

São numerosos os mecanismos da MIF que sugerem seu papel como link entre inflamação e tumorigênese e inflamação e progressão tumoral. (BACH et al., 2008)

A expressão da MIF e seu receptor CD74 sob inflamação crônica seria um estímulo para a transformação de células pré-malignas. Células malignas expressam MIF e CD74 continuamente e a interação entre essas duas moléculas pode ser necessária para o crescimento celular por ativação de ERK 1/2 e produção de outras moléculas inflamatórias. (BESWICK e REYES, 2009)

Como anteriormente introduzido neste trabalho, por ser uma citocina e ter função no aumento da angiogênese, proliferação, sobrevivência e migração celular, a MIF já seria um link entre inflamação e câncer. Entretanto, há outras funções dessa proteína ainda mais diretamente associadas ao sistema imunológico, que corroboram para seu papel no câncer. (MITCHELL, 2004)

Segundo MITCHELL (2004), a MIF sustenta a viabilidade de macrófagos e conseqüentemente mantém uma reação inflamatória que pode ser de importância para a progressão tumoral, como por exemplo a sustentação de macrófagos associados ao tumor (MAT), os quais segundo relatos são modulados pelo tumor para exercer função pró-tumoral.

Ao mesmo passo que induz a promoção do tumor, a MIF colabora para a inibição da reação imune contra o tumor, visto que regula negativamente a lise de células tumorais por células NK e a atividade de linfócitos T citotóxicos. (ABE et al., 2001 ; REEP et al., 2000)

Em modelo de câncer de cólon (CT26), observou-se que a MIF endógena ao hospedeiro induziu a geração de células T reguladoras e que tumores implantados em ratos nocaute para MIF apresentaram crescimento reduzido em relação aos implantados em ratos selvagens, sugerindo que a MIF produzida pelas células do estroma tumoral possa ter papel pró-neoplásico importante. (CHOI et al., 2012)

Em concordância, a MIF produzida pelas células tumorais em modelo de melanoma, mostrou não ser suficiente para a progressão tumoral, mas que esta depende também da MIF proveniente das células do hospedeiro, provavelmente sendo de maior importância aquelas que compõem o estroma, como por exemplo as do infiltrado inflamatório. Nesse estudo, tumores desenvolvidos a partir de linhagem celular de melanoma (B16-F10) silenciada para MIF, em ratos selvagens, não apresentaram diferença no crescimento em relação aos ratos selvagens implantados com células controle. Em

contrapartida, os mesmos tumores, implantados em ratos nocauteados para MIF tiveram seu crescimento reduzido em 47% em comparação aos ratos selvagens. A mais importante causa dessa redução no crescimento tumoral parece ser a angiogênese diminuída observada por imunohistoquímica e que possivelmente seja modulada pela MIF endógena ao hospedeiro, principalmente. (GIRARD et al., 2012)

5. MÉTODOS

5.1. Locais de estudo

Os pacientes participantes do estudo foram selecionados nos Serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis, São Paulo – SP e da Faculdade de Medicina da Fundação ABC, Santo André – SP.

A confecção dos blocos parafinados e lâminas e os exames anatomopatológicos foram realizados nos Laboratórios de Anatomia Patológica do Hospital Heliópolis e da Faculdade de Medicina da Fundação ABC.

As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular e no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Heliópolis.

5.2. Casuística

A população de estudo foi composta por pacientes com carcinoma epidermóide primário da cavidade bucal confirmado histopatologicamente e sem tratamento prévio. Foram incluídos no estudo os pacientes tratados cirurgicamente com ou sem radioterapia e/ou quimioterapia pós-operatória, segundo protocolo em vigor nos serviços responsáveis pela coleta dos casos.

Os casos participantes do estudo foram classificados pelo Código Internacional de Doenças (CID-10) e incluíram o C02 (Língua), C03.1 (Gengiva inferior), C04 (Soalho da Boca) e C06.2 (Área retromolar), compreendendo o andar inferior da cavidade bucal. (OMS, 1997)

Foram excluídos os pacientes com histórico de neoplasia prévia de qualquer outro sítio anatômico, doenças autoimunes referidas e, para análise da saliva e soro, pacientes do gênero feminino.

Os indivíduos selecionados foram convidados a responder um questionário para a coleta de dados e todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A) permitindo o uso do material biológico e das informações coletadas.

A casuística para análise da concentração da proteína MIF em soro e saliva foi composta por 50 pacientes com carcinoma epidermóide do andar inferior da cavidade bucal coletados prospectivamente de abril de 2011 a fevereiro de 2013, todos do gênero masculino, cujas características demográficas e clínicas e de tratamento, características histopatológicas e o status da doença estão descritos nas tabelas 1, 2 e 3 respectivamente.

Para análise da expressão das proteínas MIF e CD74 foram incluídos 46 destes pacientes prospectivos e outros 57 foram selecionados retrospectivamente da casuística do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço (FAPESP nº 2004/12054-9) atendidos no período de 2002 a 2005 no Hospital Heliópolis. As características demográficas e clínicas e de tratamento, características histopatológicas e o status da doença desse grupo estão descritos nas tabelas 4, 5 e 6 respectivamente.

O seguimento dos pacientes foi realizado por equipe multidisciplinar de acordo com a rotina estabelecida no serviço.

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes segundo características demográficas, clínicas e de tratamento*

Variável	Categoria	Freq. (%)
Idade (anos)	Variação	40 - 88
	Mediana	56,5
	Média (Desvio padrão)	56,2 (8,3)
Gênero	Masculino	50 (100,0)
Etnia	Branco	31 (62,0)
	Não branco	16 (32,0)
	Não informado	3 (6,0)
Tabagismo	Atual	42 (84,0)
	No passado	8 (16,0)
Etilismo	Atual	29 (58,0)
	No passado	20 (40,0)
	Nunca	1 (2,0)
Tabagismo e Etilismo	Sim	25 (50,0)
	Não	25 (50,0)
Sítio	C02 (Língua)	22 (44,0)
	C04 (Soalho da boca)	18 (36,0)
	C03.1/C06.2 (Gengiva inf/ Retromolar)	10 (20,0)
Radioterapia pós-operatória	Sim	22 (44,0)
	Não	28 (56,0)
Quimioterapia pós-operatória	Sim	8 (16,0)
	Não	42 (84,0)

*Estudo prospectivo (n=50)

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes segundo características histopatológicas obtidas do exame do espécime cirúrgico*

Variável	Categoria	Freq. (%)
Espessura do tumor (mm)	≤10	19 (38,0)
	>10	28 (56,0)
	Não avaliável	3 (6,0)
pT	pT1	10 (20,0)
	pT2	15 (30,0)
	pT3	12 (24,0)
	pT4	13 (26,0)
pN	pN0	30 (60,0)
	pN1	6 (12,0)
	pN2	13 (26,0)
	pN3	1 (2,0)
Estádio patológico**	I	8 (16,0)
	II	9 (18,0)
	III	12 (24,0)
	IV	21 (42,0)
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	10 (20,0)
	Moderadamente diferenciado	38 (76,0)
	Pouco diferenciado	2 (4,0)
Infiltração vascular sanguínea	Ausente	47 (94,0)
	Presente	3 (6,0)
Infiltração vascular linfática	Ausente	38 (76,0)
	Presente	12 (24,0)
Invasão perineural	Ausente	29 (58,0)
	Presente	21 (42,0)
Infiltrado inflamatório	Escasso	12 (24,0)
	Moderado	30 (60,0)
	Intenso	2 (4,0)
	Não avaliável	6 (12,0)
Margens cirúrgicas	Livres	44 (88,0)
	Comprometidas	6 (12,0)

*Estudo prospectivo (n=50)

** I (pT1N0M0) / II (pT2N0M0) / III (pT1N1M0 / pT2N1M0 / pT3N0M0 / pT3N1M0) / IV (pT1N2M0 / pT2N2M0 / pT3N2M0 / pT4aN0M0 / pT4aN1M0 / pT4aN2M0 / N3 / T4b / M1)

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes segundo o desfecho da doença observado na última avaliação após o tratamento*

Variável	Categoria	Freq. (%)
Recidiva local	Não	38 (76,0)
	Sim	12 (24,0)
Recidiva regional	Não	43 (86,0)
	Sim	7 (14,0)
Metástase à distância	Não	48 (96,0)
	Sim	2 (4,0)
Recidiva	Não	35 (70,0)
	Sim	15 (30,0)
Tempo para ocorrência de recidivas (meses)	Variação	2,4 – 19,4
	Mediana	8,2
	Média (Desvio padrão)	8,9 (5,1)
Segundo tumor primário	Não	47 (94,0)
	Sim	3 (6,0)
Status	Vivo sem doença	30 (60,0)
	Vivo com doença	6 (12,0)
	Morte por câncer	9 (18,0)
	Morte por outras causas	4 (8,0)
	Perdido de seguimento	1 (2,0)
Tempo de seguimento	Variação	20 dias- 28,6 meses
	Mediana	12,9 meses
	Média (Desvio padrão)	13,7 (7,9) meses

*Estudo prospectivo (n=50)

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes segundo características demográficas, clínicas e de tratamento*

Variável	Categoria	Freq. (%)
Idade (anos)	Variação	34 – 88
	Mediana	56
	Média (Desvio padrão)	55,1 (9,3)
Gênero	Masculino	97 (94,2)
	Feminino	6 (5,8)
Etnia	Branco	72 (69,9)
	Não branco	28 (27,2)
	Não informado	3 (2,9)
Tabagismo	Atual	83 (80,6)
	No passado	20 (19,4)
Etilismo	Atual	63 (61,2)
	No passado	34 (33,0)
	Nunca	6 (5,8)
Sítio	C02 (Língua)	44 (42,7)
	C04 (Soalho da boca)	39 (37,9)
	C03.1/C06.2 (Gengiva inf/Retromolar)	20 (19,4)
Radioterapia pós-operatória	Sim	46 (44,7)
	Não	57 (55,3)
Quimioterapia pós-operatória	Sim	10 (9,7)
	Não	93 (90,3)

*Estudo prospectivo (n= 46) e estudo retrospectivo (n= 57)

Tabela 5 - Distribuição dos pacientes segundo características histopatológicas do exame do espécime cirúrgico*

Variável	Categoria	Freq. (%)
Espessura do tumor (mm)	≤10	33 (32,0)
	>10	66 (64,1)
	Não avaliável	4 (3,9)
pT	pT1	12 (11,6)
	pT 2	35 (34,0)
	pT3	21 (20,4)
	pT4	35 (34,0)
pN	pN0	54 (52,4)
	pN1	15 (14,6)
	pN2	33 (32,0)
	pN3	1 (1,0)
Estádio patológico*	I	9 (8,7)
	II	21 (20,4)
	III	24 (23,3)
	IV	49 (47,6)
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	33 (32,0)
	Moderadamente diferenciado	65 (63,1)
	Pouco	5 (4,9)
Infiltração vascular sanguínea	Ausente	99 (96,1)
	Presente	4 (3,9)
Infiltração vascular linfática	Ausente	57 (55,3)
	Presente	46 (44,7)
Invasão perineural	Ausente	53 (51,5)
	Presente	50 (48,5)
Infiltrado inflamatório	Escasso	37 (35,9)
	Moderado	52 (50,5)
	Intenso	9 (8,7)
	Não avaliável	5 (4,8)
Margens cirúrgicas	Livres	86 (83,5)
	Comprometidas	17 (16,5)

*Estudo prospectivo (n= 46) e estudo retrospectivo (n= 57)

** I (pT1N0M0) / II (pT2N0M0) / III (pT1N1M0 / pT2N1M0 / pT3N0M0 / pT3N1M0) / IV (pT1N2M0 / pT2N2M0 / pT3N2M0 / pT4aN0M0 / pT4aN1M0 / pT4aN2M0 / N3 / T4b / M1)

Tabela 6 - Distribuição dos pacientes segundo o desfecho da doença observado na última avaliação após o tratamento*

Variável	Categoria	Freq. (%)
Recidiva local / regional	Não	63 (61,2)
	Sim	40 (38,8)
Metástase à distância	Não	90 (87,4)
	Sim	13 (12,6)
Segundo tumor primário	Não	94 (91,3)
	Sim	9 (8,7)
Status observado na última avaliação após o tratamento	Vivo sem doença	36 (35,0)
	Vivo com doença	2 (1,9)
	Morte por câncer	40 (38,8)
	Morte por outras causas	13 (12,6)
	Perdido de seguimento	12 (11,7)
Tempo de seguimento	Variação	7 dias – 122,7 meses
	Mediana	18,3 meses
	Média (Desvio padrão)	28,8 (27,8) meses

*Estudo prospectivo (n= 46) e estudo retrospectivo (n= 57)

5.3. Coleta de material biológico

Os pacientes selecionados prospectivamente para a análise da concentração da MIF em soro e saliva foram submetidos a coletas de amostras de 8 ml de sangue em tubo com coagulante e gel separador entre 30 dias e 1 dia anterior ao procedimento cirúrgico; a mesma coleta foi refeita entre o 20º dia e o terceiro mês pós-operatório, antes do início de terapias adjuvantes.

Nos mesmos intervalos de tempo foram também coletadas amostras de saliva total não estimulada, acumulada por um período de 5 minutos pelo método do cuspe em tubo de centrífuga com capacidade 50 ml. Os pacientes foram privados de comer ou beber algo além de água, nem fumar ou utilizar produtos de higiene oral por no mínimo 2 horas antes da coleta. Para reduzir a

interferência do ciclo circadiano na composição da saliva e do soro, todas as coletas foram realizadas entre 9 e 10 horas.

As amostras de sangue e saliva foram transportadas em gelo e imediatamente centrifugadas a 6000 RPM, 4°C por 15 minutos e 20 minutos, respectivamente. Do soro e do sobrenadante da saliva foram separadas alíquotas de 400 uL a fim de evitar ciclos de congelamento/descongelamento das amostras e, para melhor conservação das mesmas, a cada alíquota foram adicionados 0,8 uL de coquetel de inibidor de proteases (Sigma®, #P8340). As alíquotas foram então armazenadas a -80°C para serem analisadas posteriormente por ELISA e na medida do necessário para o estudo foram descongeladas em temperatura ambiente (18 – 25 °C) e utilizadas imediatamente.

A identificação das amostras foi feita por código numérico, iniciais do nome do paciente e data de coleta do material.

Blocos parafinados armazenados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Heliópolis durante o Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço (FAPESP nº 2004/12054-9) e durante a coleta dos casos prospectivos foram utilizados para a análise imunoistoquímica das proteínas MIF e CD74 em tecido tumoral e epitélio livre de tumor nas margens cirúrgicas dos pacientes desse grupo.

5.4. ELISA : concentração sorológica e salivar da proteína MIF

A concentração da proteína MIF nas amostras de soro e saliva dos pacientes, obtidas nos períodos pré e pós-operatório, foi avaliada por meio do kit ELISA para detecção de MIF humana Quantikine® (R&D Systems, #DMF00B).

O kit comercial é composto de diluente de amostras, diluente calibrador, microplaca com 96 poços revestidos com anti-MIF humano, tampão de lavagem, padrão de MIF humana recombinante, anticorpo de detecção da MIF,

solução substrato e solução de parada. O protocolo seguido foi o indicado pelo fabricante do kit.

A proteína MIF humana recombinante foi ressuspensa e diluída em concentrações seriadas de 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,313 ng/ml, 0,156 ng/ml e o diluente de amostras foi utilizado como concentração 0 ng/ml para a construção da curva padrão. As amostras foram diluídas também utilizando o diluente fornecido pelo kit, sendo que a diluição padrão para o soro foi de 1:10 e para a saliva 1:100. As amostras cuja absorbância resultante extrapolou a curva padrão foram diluídas para mais ou para menos dependendo do resultado. Foram adicionados 100 uL do diluente calibrador em cada poço e em seguida adicionados os padrões e as amostras aos seus respectivos poços e a placa selada foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente com agitação a 500 RPM. Após quatro lavagens com 400 uL de tampão por poço e remoção completa da solução ao final de cada lavagem, foram adicionados 200 uL do anticorpo de detecção em cada poço, seguido por incubação da placa selada por 1 hora à temperatura ambiente com agitação de 500 RPM. O passo de lavagem anterior foi repetido e posteriormente adicionados 200 uL de solução substrato em cada poço, com incubação por 30 minutos à temperatura ambiente privando a placa de luz. Por fim foram adicionados 50 uL da solução de parada em cada poço e determinada imediatamente a densidade óptica no comprimento de onda 450nm com correção a 620nm na leitora de microplacas (Biotek ELX480®).

As amostras foram analisadas em triplicatas, os dados de absorbância obtidos por comparação com a curva padrão de MIF recombinante e os resultados apresentados em ng/ml.

A análise da concentração da MIF por ELISA em soro pré-operatório, soro pós-operatório, saliva pré-operatória e saliva pós-operatória foi realizada para 50 (100%), 38 (76%), 48 (96%) e 35 casos (70%) respectivamente, de acordo com a disponibilidade e a qualidade do material biológico relacionados na tabela 7.

Tabela 7 - Disponibilidade e qualidade para análise das amostras de soro e de saliva*

ID_paciente	Soro pré	Saliva pré	Soro pós	Saliva pós
MIFHH/002	sim	sim	sim	sim
MIFHH/003	sim	sim	sim	sim
MIFHH/004	sim	sim	sim	sim
MIFHH/005	sim	sim	sim	não (viscosa)
MIFHH/006	sim	sim	não (hemólise)	sim
MIFHH/007	sim	sim	sim	sim
MIFHH/008	sim	sim	sim	sim
MIFHH/009	sim	sim	sim	sim
MIFHH/010	sim	sim	sim	não (viscosa)
MIFHH/012	sim	sim	sim	sim
MIFHH/015	sim	sim	sim	sim
MIFHH/016	sim	sim	sim	sim
MIFHH/017	sim	sim	não (óbito po)	não (óbito po)
MIFHH/020	sim	sim	sim	sim
MIFHH/021	sim	sim	sim	sim
MIFHH/022	sim	sim	sim	sim
MIFHH/024	sim	sim	sim	sim
MIFHH/025	sim	sim	sim	sim
MIFHH/028	sim	sim	não (óbito po)	não (óbito po)
MIFHH/029	sim	sim	sim	sim
MIFHH/030	sim	sim	sim	sim
MIFHH/031	sim	sim	não (recusa)	não (recusa)
MIFHH/034	sim	sim	sim	sim
MIFHH/035	sim	não (viscosa)	não (óbito po)	não (óbito po)
MIFHH/036	sim	sim	sim	não (xerostomia)
MIFHH/037	sim	sim	sim	sim
MIFHH/039	sim	sim	sim	sim
MIFHH/040	sim	sim	sim	não (viscosa)
MIFHH/041	sim	sim	não (perdido)	não (perdido)
MIFHH/045	sim	sim	não (recusa)	não (recusa)
MIFHH/047	sim	sim	sim	sim
MIFHH/048	sim	sim	sim	sim
MIFHH/049	sim	sim	não (perdido)	não (perdido)
MIFHH/051	sim	sim	não (perdido)	não (perdido)
MIFABC/002	sim	sim	sim	sim
MIFABC/003	sim	sim	sim	sim
MIFABC/004	sim	sim	sim	sim
MIFABC/006	sim	sim	sim	sim
MIFABC/008	sim	sim	sim	sim

continua

conclusão

Tabela 7 - Disponibilidade e qualidade para análise das amostras de soro e de saliva*

ID_paciente	Soro pré	Saliva pré	Soro pós	Saliva pós
MIFABC/009	sim	sim	sim	sim
MIFABC/010	sim	sim	sim	sim
MIFABC/011	sim	sim	não (óbito)	não (óbito)
MIFABC/012	sim	sim	sim	sim
MIFABC/013	sim	sim	não (perdido)	não (perdido)
MIFABC/014	sim	sim	sim	sim
MIFABC/015	sim	sim	sim	não (viscosa)
MIFABC/016	sim	não (viscosa)	sim	sim
MIFABC/017	sim	sim	não (recusa)	sim
MIFABC/018	sim	sim	sim	sim
MIFABC/019	sim	sim	sim	sim

* Estudo prospectivo

5.5. Imunoistoquímica: expressão tecidual das proteínas MIF e CD74

A expressão da proteína MIF e do seu receptor de membrana CD74 foi avaliada por imunoistoquímica em tecido tumoral e tecido epitelial livre de tumor das margens cirúrgicas conforme disponibilidade do material biológico no bloco parafinado.

Uma vez selecionados os casos, cortes histológicos de 3 μ de espessura foram obtidos a partir de tecido embebido em parafina e aplicados em lâminas silanizadas para a realização de imunoistoquímica.

A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 3% e a recuperação antigênica foi realizada em câmara pressurizada por 30 minutos, utilizando tampão EDTA para as lâminas a serem coradas com anticorpo anti-MIF e tampão citrato para as que seriam coradas com anti-CD74.

Os cortes foram posteriormente incubados durante 12 horas a 4°C com os anticorpos primários anti-MIF® (1:100, abcam #ab55445) ou anti-CD74® (1:50, clone LN-2, abcam #ab9514), diluídos em diluente de anticorpo® (DAKO #S3022). Após a incubação foi aplicado o sistema de amplificação por polímero

não biotinilado (HiDef DetecçãoTM HRP®; CELL MARQUE #954D30) composto de amplificador e polímero HRP, seguidos de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente cada um. Para a revelação das reações, foi utilizada a diaminobenzidina (DAB®; DAKO #K3468) e contra coloração com hematoxilina de Harris.

Como controles positivos e negativos, lâminas de tecido de tonsila normal em duplicata foram imunocoradas com e sem a adição do anticorpo primário, respectivamente. Para cada reação foram feitos novos controles positivos e negativos.

A análise da imunomarcação foi realizada por um patologista e compreendeu análise descritiva bem como semi-quantitativa das lâminas em toda a extensão do corte, na magnitude de 100x ao microscópio de luz. A análise semi-quantitativa considerou o índice de células coradas (% de células positivas) conforme os pontos de corte descritos anteriormente para a expressão da MIF em CEC de esôfago (REN et al., 2005) e para a expressão do CD74 em câncer de mama (TIAN et al., 2012). Sinteticamente, o índice de células coradas nos tecidos tumorais e margens foi determinado obedecendo os pontos de corte para imunomarcação da MIF em 0-5% (negativo, escore 0), 5-50% (escore 1), 50-100% (escore 2); e para imunomarcação do CD74 em 0-1% (negativo, escore 0); 1-10% (escore 1), 10-100% (escore 2). O escore 0 representou expressão negativa das proteínas, escore 1 a baixa expressão e escore 2 a alta expressão.

A análise descritiva foi composta pela análise da localização celular (nuclear, citoplasmática) predominante da expressão da MIF e do CD74.

As análises por imunoistoquímica da expressão da MIF no tumor, MIF na margem, CD74 no tumor e CD74 na margem foram realizadas em 98, 65, 98 e 87 espécimes respectivamente, de acordo com a disponibilidade do tecido nos cortes histológicos obtidos.

5.6. Variáveis clínico-demográficas e histopatológicas

As variáveis clínico-demográficas consideradas nesse estudo foram idade e hábitos tabagista e etilista. A idade considerada foi a referida pelo paciente no momento do diagnóstico do câncer. O tabagismo e etilismo também foram referidos pelo paciente e para este estudo, foram considerados ex-tabagistas os pacientes que disseram ter cessado o hábito tabagista ou etilista há mais de 1 ano. Aqueles que não fumavam ou bebiam há um ano ou menos ou que relataram ainda fumar ou beber foram considerados tabagistas ou etilistas atuais.

Os indicadores histológicos considerados para análise incluíram o tipo histológico e variante morfológica do tumor, grau de diferenciação, infiltração vascular sanguínea e linfática, invasão perineural, infiltrado inflamatório peritumoral, espessura do tumor, estado de acometimento das margens cirúrgicas, estágios pT e pN.

O exame anatomopatológico da peça cirúrgica foi realizado conforme a rotina dos serviços de patologia do Hospital Heliópolis e da Faculdade de Medicina do ABC e os parâmetros utilizados nas análises histológicas foram os validados no consenso de 2003 em Lyon, França. (BARNES et al., 2005).

O grau de diferenciação do tumor foi avaliado considerando a diferenciação das células, o grau de queratinização e foi caracterizado como bem, moderadamente ou pouco diferenciado. (BARNES et al., 2005)

A infiltração vascular sanguínea e linfática foi avaliada a partir da presença de células neoplásicas na luz do vaso. (CLOSE et al, 1989)

A detecção de invasão perineural foi baseada na presença de células minimamente invadindo a região do perineuro e endoneuro. (BARNES et al., 2005; RAHIMA et al., 2004)

A espessura do tumor foi medida em centímetros durante a avaliação macroscópica e corrigida posteriormente na microscopia. (SLOOTWEG et al., 1994)

O infiltrado inflamatório peritumoral foi avaliado semiquantitativamente e classificado como leve, moderado ou intenso. (KIRITA et al., 1994; SLOOTWEG et al., 1994)

A definição do estágio patológico considerou a classificação histopatológica pós-cirúrgica (pTNM), tendo por base as evidências conseguidas antes do tratamento, complementadas ou modificadas pela evidência adicional obtida através do exame histopatológico da peça cirúrgica. (SOBIN; WITTEKIND, 2002)

As avaliações de recidivas e metástases à distância foram feitas por exames clínicos e radiológicos e confirmados pela análise histológica do tecido biopsiado ou ressecado.

5.7. Análises suplementares

5.7.1. Índices LNI e GNI

Foram propostos neste estudo novos índices a fim de melhor representar a quantidade total de tecido tumoral no paciente. O índice linfonodo (LNI) foi calculado como a soma do número de linfonodos metastáticos e do diâmetro em centímetros do maior linfonodo positivo. O índice geral (GNI) foi definido como a soma do LNI e do maior diâmetro em centímetros do tumor primário.

5.7.2. Estudo *in vitro*

As análises *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Alvos Moleculares do James Graham Brown Cancer Center, University of Louisville – USA.

A expressão e secreção da proteína MIF por células de CECB foram avaliadas em linhagem celular de carcinoma epidermóide bucal SCC-25 (sítio: língua; gênero: masculino; idade: 55 anos), adquirida da ATCC (Manassas, VA-USA), por *western blotting* e ELISA respectivamente.

As células foram cultivadas em meio DMEM HAm's F12® (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*, GIBCO # 21331-020) suplementado com 10% de FBS (*Fetal bovine serum*), 0,04% de hidrocortisona, 1% de antibiótico, 1% de tampão HEPES® (*N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid*, GIBCO # 15630-056) e 1% de L-glutamina.

As células foram tratadas *4-iodo-6-phenylpyrimidine* (4-IPP), um inibidor da MIF desenvolvido e produzido pelo Dr. Robert A. Mitchell no laboratório onde as análises foram realizadas (Patente: US6492428B1), na concentração de 50uM por 24 horas. Aos controles foi adicionado *Dimethyl sulfoxide* (DMSO), mesmo solvente utilizado na produção de 4-IPP, na concentração de 50 ug/ml.

A extração de proteínas das células para *western blotting* foi realizada com solução de lise composta por tampão RIPA® (1:10, Thermo Scientific #89900), 1% de inibidor de protease, 1% do inibidor de fosfatase ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) e 0,4% de fluoreto de sódio (NaF) 0,5 M. Em seguida as placas foram incubadas por 5 minutos em agitação e então com o auxílio de um mini rodo o conteúdo de cada placa foi transferido para microtubo de 1,5 mL e mantidos em gelo. Após centrifugação por 5 minutos a 80 RPM e 4°C, o sobrenadante foi separado, sendo que 5uL foi utilizado no ensaio de quantificação de proteínas com o kit *DC Protein Assay*® (Bio Rad #500-0112) conforme instruções do fabricante. Segundo o resultado do ensaio, quantidades diferentes das amostras foram utilizadas a fim de se obter a mesma concentração entre todas e então o tampão desnaturante Laemmli® (Bio Rad #161-0737) foi adicionado na proporção 1:1. As amostras foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Gel, Bio Rad #456-1094) a 220 V. As amostras foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose (Immobilon-P Membrane®, Millipore #IPVH00010) a 350 A por 45 minutos. A membrana foi incubada em agitação por 1 hora a temperatura ambiente com 6mL da solução de bloqueio composta por 2% de Tris-HCL 1M pH7,5® (Cellgro, #46-030-CM), 7% de

cloreto de sódio (NaCl) 5M , 0,2% de Tween 20 (Sigma® #P7949), 1% de soro de cabra® (Gibco #16210064) e 5% de leite em pó desnatado (Blotting-Grade Blocker®, Bio Rad #170-6404) em água destilada. Ao término da incubação, 6 ul do anticorpo primário anti-MIF (FL-115, Santa Cruz Biotechnology® #sc-20121) ou 2 ul do anti- β actina (Clone AC-15, Sigma® #A5441) foram adicionados à solução de bloqueio e realizada nova incubação em agitação por 1 hora a temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem para *western blotting*, 6ml da solução de bloqueio e 0,75 ul do anticorpo secundário foram adicionados à membrana e nova incubação em agitação por 45 minutos a temperatura ambiente foi realizada. Após cinco novas lavagens com tampão de lavagem para *western blotting*, foi realizada a revelação por quimioluminescência (Pierce ECL Western Blotting Substrate®, Thermo Scientific #32106).

Igualmente após 24 horas de tratamento, a concentração da MIF no meio de cultivo das células SCC-25 foi avaliada por ELISA (Human MIF duoset®, R&D Systems #DY289) seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas em ambas diluições 1:10 e 1:20 em diluente fornecido pelo kit comercial.

Os tratamentos, bem como as análises de *western blotting* e ELISA foram realizados em duplicata.

5.8. Aspectos Éticos

Parte do material utilizado nesse estudo foi constituída por amostras de tecido neoplásico e margens coletadas durante o procedimento cirúrgico, amostras de sangue e de saliva coletadas durante o tratamento dos pacientes e informações adquiridas por meio do prontuário e do questionário aplicado.

As amostras foram coletadas no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis, sob a responsabilidade do Dr. Otávio Alberto Curioni e no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Fundação ABC, sob a

responsabilidade da Dra. Jossi Ledo Kanda. Os pacientes incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A) permitindo o uso das informações e do material biológico coletados.

O material coletado foi armazenado e analisado de acordo com as normas técnicas do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis e do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Heliópolis.

Foi solicitada e concedida autorização para uso nesse estudo das amostras biológicas e informações armazenadas durante o Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço (FAPESP nº 2004/12054-9) aprovado pelo comitê de ética do Hospital Heliópolis dia 03 de outubro de 2003 sob nº 135, que constituiu a parte retrospectiva do material utilizado.

Se os resultados desse estudo trouxerem benefícios em relação ao diagnóstico ou prognóstico da doença, asseguraremos o contato com os pacientes envolvidos.

Os resultados obtidos desse trabalho serão enviados à publicação em revista científica, garantindo a confidencialidade dos dados e o respeito aos indivíduos envolvidos.

O presente projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis em 14 de setembro de 2010 sob nº 756 (Apêndice B), da Faculdade de Medicina do ABC em 29 de junho de 2011 sob nº 055/2011 (Apêndice C) e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Apêndice D).

5.9. Estatística

A distribuição de frequências foi utilizada para descrever as variáveis categóricas e as medidas de tendência central e de variabilidade para as variáveis numéricas. A mediana das variáveis numéricas foi utilizada como ponto de corte para as análises posteriores. Entretanto, para as análises relacionadas à espessura do tumor, foi admitido o ponto de corte em 10 mm

em função do seu impacto prognóstico descrito anteriormente em uma população semelhante. (PINTO et al.,2013)

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a existência da distribuição normal dos dados de concentração da MIF em soro e saliva e como estes não mostraram ter distribuição normal, foram aplicados os testes não paramétricos U de Mann-Whitney para verificar a associação das medianas de MIF soro/saliva às variáveis com 2 categorias e o teste de Kruskal-Wallis para as variáveis com 3 ou mais categorias.

Para verificar associação entre as variáveis categóricas “expressão negativa”, “baixa expressão” e “alta expressão” em tabelas de contingência, o teste de frequências do qui-quadrado foi utilizado e, quando pelo menos uma frequência esperada foi menor do que 5 em tabelas 2x2 o teste exato de Fisher foi adotado. As comparações entre as medidas MIF soro pré e pós-operatório ou MIF saliva pré e pós-operatório foram realizadas através do teste pareado de sinais de Wilcoxon.

Para verificar a correlação entre as variáveis numéricas MIF (soro, saliva), o coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado.

A atualização do seguimento dos pacientes utilizado nesse estudo foi realizada até setembro de 2013. O tempo de seguimento foi o período entre a data da cirurgia até a data do óbito e, para os casos censurados até a data da última informação ou até setembro de 2013.

Para a análise de sobrevida do estudo retrospectivo e prospectivo, com 103 casos, foram considerados somente os casos com data de cirurgia até agosto de 2012 (n=102) a fim de se obter 1 ano de seguimento mínimo.

Para estimar a sobrevida livre de doença, considerou-se o período livre de recidivas como sendo o tempo decorrido da data da cirurgia até o diagnóstico de recidiva (local ou à distância).

A técnica de Kaplan-Meier foi adotada para estimar as probabilidades de sobrevida global e livre de doença e a diferença entre as curvas de sobrevida de uma mesma variável foi verificada através do teste de logrank.

O desfecho da doença foi analisado como frequência da ocorrência de óbitos e recidivas independente do tempo de seguimento e para esta análise foram excluídos os casos de óbito no período pós-operatório imediato.

O nível de significância de 5% foi considerado em todos os testes estatísticos. O programa estatístico de computador STATA versão 7.0 (STATACorp. Stata Corporation. Intercooled Stata 7.0. College Station, Texas, USA 2001) foi utilizado para a realização das análises estatísticas.

6. RESULTADOS

6.1. Concentração sorológica e salivar pré e pós-operatória da proteína MIF

A concentração mediana da proteína MIF em soro pré-operatório, soro pós-operatório, saliva pré-operatória e saliva pós-operatória foi 50.6 ng/ml, 33.7 ng/ml, 320.8 ng/ml e 261.4 ng/ml, respectivamente. (Tabela 8)

Quando observada caso a caso, após a ressecção do tumor a concentração sorológica da MIF diminuiu em 74% e aumentou em 26% dos casos com material biológico de ambas as coletas disponíveis. Já na saliva houve redução pós-operatória da concentração da MIF em 47% e elevação em 53% dos casos. (Tabela 9)

A concentração mediana da MIF no soro pré-operatório (50,6 ng/ml) foi significativamente mais alta ($p=0,001$) que a mediana no soro pós-operatório (33,7 ng/ml). (Tabela 10, Figura 1)

Entre as concentrações medianas da MIF na saliva pré e pós-operatória não houve diferença significativa, mas a concentração da MIF na saliva apareceu elevada em relação ao soro dos pacientes com CEC bucal. (Tabela 10, Figura 2)

Tabela 8 - Distribuição dos pacientes segundo a concentração da proteína MIF em soro e saliva*

Variável	Categoria	Freq. (%) / Medidas	p
Soro pré (ng/ml)	n	50	0,006**
	Variação	17,7 – 136,6	
	Mediana	50,6	
	Média (Desvio padrão)	54,9 (28,0)	
Soro pós (ng/ml)	n	38	<0,001**
	Variação	15,2 – 118,5	
	Mediana	33,7	
	Média (Desvio padrão)	38,0 (20,0)	
Saliva pré (ng/ml)	n	48	<0,001**
	Variação	32,5 – 1770,6	
	Mediana	320,8	
	Média (Desvio padrão)	421,7 (399,3)	
Saliva pós (ng/ml)	n	35	<0,001**
	Variação	64,5 – 2046,8	
	Mediana	261,4	
	Média (Desvio padrão)	371,5 (385,6)	
Soro pré (ng/ml)	≤ 50,6	25 (50,0)	
	> 50,6	25 (50,0)	
Soro pós (ng/ml)	≤ 33,7	19 (50,0)	
	> 33,7	19 (50,0)	
Saliva pré (ng/ml)	≤ 320,8	24 (50,0)	
	> 320,8	24 (50,0)	
Saliva pós (ng/ml)	≤ 261,4	18 (51,4)	
	> 261,4	17 (48,6)	

***Estudo prospectivo**

**p obtido pelo teste de Shapiro Wilk (valores da concentração da MIF em soro e saliva não apresentam distribuição normal)

Tabela 9 - Concentração da proteína MIF (ng/ml) nas amostras de soro e saliva pré e pós-operatórios por paciente*

ID	Soro Pré (ng/ml)	Soro Pós (ng/ml)	Saliva Pré (ng/ml)	Saliva Pós (ng/ml)
MIFHH/002	20,36	24,01	49,13	162,28
MIFHH/003	42,48	16,23	332,19	261,44
MIFHH/004	129,51	66,68	382,42	130,00
MIFHH/005	31,59	28,21	474,26	-
MIFHH/006	39,51	-	82,61	832,79
MIFHH/007	17,73	28,10	960,33	2046,81
MIFHH/008	49,46	40,04	976,37	348,85
MIFHH/009	23,08	32,29	682,65	106,48
MIFHH/010	43,98	29,47	1013,18	-
MIFHH/012	20,93	18,29	124,71	272,86
MIFHH/015	59,61	30,72	461,80	512,09
MIFHH/016	40,26	50,97	101,66	112,86
MIFHH/017	25,82	-	867,63	-
MIFHH/020	56,96	36,33	255,49	878,65
MIFHH/021	64,88	23,20	32,54	64,51
MIFHH/022	38,31	27,84	248,67	166,18
MIFHH/024	54,22	29,63	102,65	244,03
MIFHH/025	50,14	32,41	1059,09	1015,55
MIFHH/028	22,80	-	76,41	-
MIFHH/029	104,62	41,46	67,64	122,13
MIFHH/030	95,52	35,30	764,29	278,43
MIFHH/031	84,26	-	309,38	-
MIFHH/034	79,12	45,63	1490,26	280,57
MIFHH/035	68,13	-	-	-
MIFHH/036	23,15	34,59	891,16	-
MIFHH/037	48,60	26,09	50,12	261,60
MIFHH/039	36,44	25,04	126,07	1011,95
MIFHH/040	27,53	34,21	176,89	-
MIFHH/041	31,62	-	455,64	-
MIFHH/045	65,00	-	822,25	-
MIFHH/047	39,74	20,50	42,72	394,57
MIFHH/048	95,01	55,35	417,39	149,98
MIFHH/049	48,26	-	1770,63	-
MIFHH/051	17,70	-	125,02	-
MIFABC/002	27,61	45,62	504,00	388,88
MIFABC/003	70,39	53,64	208,96	215,81
MIFABC/004	28,55	15,15	167,16	405,27
MIFABC/006	69,15	118,53	68,27	170,67
MIFABC/008	51,15	36,94	159,22	79,69
MIFABC/009	62,08	41,84	429,08	358,43
MIFABC/010	56,87	78,10	406,23	261,39
MIFABC/011	85,62	-	45,64	-

continua

conclusão

Tabela 9 - Concentração da proteína MIF (ng/ml) nas amostras de soro e saliva pré e pós-operatórios por paciente*

ID	Soro Pré (ng/ml)	Soro Pós (ng/ml)	Saliva Pré (ng/ml)	Saliva Pós (ng/ml)
MIFABC/012	52,28	74,80	817,77	250,90
MIFABC/013	76,23	-	384,81	-
MIFABC/014	136,59	38,34	101,30	169,48
MIFABC/015	59,09	35,18	136,43	-
MIFABC/016	76,75	19,91	-	156,23
MIFABC/017	59,57	-	348,50	221,79
MIFABC/018	38,99	33,17	499,02	543,47
MIFABC/019	99,88	18,88	172,65	125,02

*Estudo prospectivo

Tabela 10 - Concentração sorológica e salivar pré e pós-operatória da proteína MIF (ng/ml)*

Variável	Categoria	Pré-operatório	Pós-operatório	p
Soro (ng/ml)	n	38	38	0,001
	Variação	17,7 – 136,6	15,2 – 118,5	
	Mediana	50,6	33,7	
	Média (Desvio padrão)	55,8 (29,3)	38,0 (20,0)	
Saliva (ng/ml)	n	34	34	0,966
	Variação	32,5 – 1490,2	64,5 – 2046,8	
	Mediana	252,1	261,4	
	Média (Desvio padrão)	373,3 (354,9)	377,8 (389,5)	

*Estudo prospectivo

p-valor obtido pelo teste pareado de sinais de Wilcoxon

Figura 1 - Representação gráfica da concentração da proteína MIF (ng/ml) no soro pré-operatório e no soro pós-operatório de pacientes com CECB. Redução significativa da concentração mediana da proteína MIF no soro após a ressecção cirúrgica do tumor ($p=0,001$). (linha vermelha: mediana)

Figura 2 - Representação gráfica da concentração da proteína MIF (ng/ml) na saliva pré-operatória e na saliva pós-operatória de pacientes com CECB. Não houve redução significativa da concentração mediana da proteína MIF na saliva após a ressecção cirúrgica do tumor. (linha vermelha: mediana)

6.2. Concentração sorológica e salivar da proteína MIF e variáveis clínicas e histopatológicas

A concentração sorológica pré ou pós-operatória da proteína MIF não foi associada a idade e hábitos tabagista e etilista. (Tabela 11)

Menor concentração sorológica pré-operatória da proteína MIF mostrou associação com acometimento linfonodal ($p=0,018$) e com os estádios patológicos mais avançados ($p=0,040$). Não houve associação entre MIF no soro pré-operatório e espessura do tumor, estadiamento pT, grau de diferenciação, infiltração vascular sanguínea e linfática, invasão perineural, infiltrado inflamatório peritumoral e estado de comprometimento das margens. (Tabela 12)

Na saliva pós-operatória, menor concentração da proteína MIF apareceu associada ao hábito tabagista atual ($p=0,040$). (Tabela 13)

Níveis mais altos de concentração da proteína MIF na saliva pré-operatória mostraram estar associados aos estágios pT3/pT4 ($p=0,001$), aos estádios patológicos mais avançados ($p=0,032$) e ao comprometimento das margens cirúrgicas por tumor ($p=0,045$). Não houve associação entre MIF na saliva pré-operatória e espessura do tumor, estadiamento pN, grau de diferenciação, infiltração vascular sanguínea e linfática, invasão perineural e infiltrado inflamatório peritumoral. (Tabela 14)

Tabela 11 - Associação entre a concentração da proteína MIF no soro antes e após o tratamento cirúrgico e variáveis clínicas*

Variável	Categoria	n	Soro pré (ng/ml)		p	n	Soro pós (ng/ml)		p
			Variação	Mediana			Variação	Mediana	
Idade (anos)	≤56,5	25	17,7–95,5	44,0	0,051	21	15,2–78,1	33,2	0,826
	>56,5	25	20,9–136,6	59,1		17	16,2–118,5	34,2	
Tabagismo	Atual	42	17,7–136,6	51,7	0,711	34	15,1–118,5	32,7	0,216
	No passado	8	25,8–76,2	49,8		4	32,4–45,6	40,9	
Etilismo	Atual	29	17,7–104,6	50,1	0,630	24	15,1–118,5	31,6	0,263
	Nunca/No passado	21	17,7–136,6	56,9		14	20,5–78,1	35,2	

***Estudo prospectivo**

p-valor obtido pelo teste não paramétrico U Mann-Whitney

Tabela 12 - Associação entre a concentração da proteína MIF no soro antes e após o tratamento cirúrgico e variáveis histopatológicas*

Variável	Categoria	n	Soro pré (ng/ml)		p
			Variação	Mediana	
Espessura do tumor (mm)	≤ 10	19	17,7-99,9	50,1	0,280
	>10	28	17,7-129,5	49,0	
pT	pT1 / pT 2	25	17,7-136,6	57,0	0,184
	pT3 / pT4	25	17,7-95,0	48,3	
pN	pN0	30	20,9-136,6	56,9	0,018
	pN+	20	17,7-104,6	37,8	
Estádio Patológico ***	I / II	17	20,9-136,6	59,6	0,040
	III / IV	33	17,7-104,6	48,3	
Grau de diferenciação	Pouco	2	17,7-104,6	61,2	0,618**
	Moderadamente	38	20,3-136,6	51,7	
	Bem	10	17,7-79,1	44,3	
Infiltração vascular sanguínea	Ausente	47	17,7-136,6	49,5	0,638
	Presente	3	52,3-59,6	56,9	
Infiltração vascular linfática	Ausente	38	17,7-136,6	50,6	0,910
	Presente	12	22,8-104,6	50,4	
Invasão perineural	Ausente	29	17,7-136,6	50,1	0,929
	Presente	21	22,8-95,0	51,2	
Infiltrado inflamatório	Escasso	12	17,7-95,0	44,0	0,370
	Moderado+Intenso	32	20,3-136,6	54,6	
Margem cirúrgica	Livre de tumor	44	17,7-136,6	50,6	0,355
	Comprometida	6	39,0-95,0	58,2	

***Estudo prospectivo**

p-valor obtido pelo teste não paramétrico U Mann-Whitney

**p-valor obtido pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis

*** I (pT1N0M0) / II (pT2N0M0) / III (pT1N1M0 / pT2N1M0 / pT3N0M0 / pT3N1M0) / IV (pT1N2M0 / pT2N2M0 / pT3N2M0 / pT4aN0M0 / pT4aN1M0 / pT4aN2M0 / N3 / T4b / M1)

Tabela 13 - Associação entre a concentração da proteína MIF na saliva antes e após o tratamento cirúrgico e variáveis clínicas*

Variável	Categoria	n	Saliva pré (ng/ml)		p	n	Saliva pós (ng/ml)		p
			Variação	Mediana			Variação	Mediana	
Idade (anos)	≤56,5	25	32,5–1013,2	348,5	0,992	20	64,5–2046,8	270,0	0,594
	>56,5	23	67,6–1770,6	309,4		15	122,1–1015,5	244,0	
Tabagismo	Atual	40	32,5–1770,6	228,8	0,072	29	64,5–2046,8	244,0	0,040
	No passado	8	82,6–1059,1	466,5		6	221,8–1015,5	373,6	
Etilismo	Atual	28	32,5–1490,2	216,2	0,587	21	64,5–1015,5	261,4	0,919
	Nunca/No passado	20	42,7–1770,6	383,6		14	106,5–2046,8	238,6	

***Estudo prospectivo**

p-valor obtido pelo teste não paramétrico U Mann-Whitney

Tabela 14 - Associação entre a concentração da proteína MIF na saliva antes e após o tratamento cirúrgico e variáveis histopatológicas*

Variável	Categoria	n	Saliva pré (ng/ml)		p
			Variação	Mediana	
Espessura do tumor (mm)	≤ 10	18	42,7-1059,1	165,9	0,453
	>10	28	32,5-1770,6	383,6	
pT	pT1 / pT 2	24	45,6-867,6	165,9	0,001
	pT3 / pT4	24	32,5-1770,6	445,8	
pN	pN0	29	42,7-1490,2	255,5	0,317
	pN+	19	32,5-1770,6	474,2	
Estádio Patológico***	I / II	17	45,6-461,8	172,6	0,032
	III / IV	31	32,5-1770,6	417,4	
Grau de diferenciação	Pouco	2	67,6-960,3	514,0	0,938**
	Moderadamente	36	32,5-1059,1	320,8	
	Bem	10	82,6-1770,6	254,9	
Infiltração vascular sanguínea	Ausente	45	32,5-1770,6	255,5	0,383
	Presente	3	348,5-817,8	406,2	
Infiltração vascular linfática	Ausente	36	42,7-1490,2	252,1	0,475
	Presente	12	32,5-1770,6	544,4	
Invasão perineural	Ausente	28	49,1-1059,1	252,1	0,645
	Presente	20	32,5-1770,6	411,8	
Infiltrado inflamatório	Escasso	11	42,7-1770,6	176,9	0,978
	Moderado+Intenso	32	32,5-1490,2	340,3	
Margem cirúrgica	Livre de tumor	43	32,5-1490,2	248,7	0,045
	Comprometida	5	309,4-1770,6	499,0	

***Estudo prospectivo**

p-valor obtido pelo teste não paramétrico U Mann-Whitney

** p-valor obtido pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis

*** I (pT1N0M0) / II (pT2N0M0) / III (pT1N1M0 / pT2N1M0 / pT3N0M0 / pT3N1M0) / IV (pT1N2M0 / pT2N2M0 / pT3N2M0 / pT4aN0M0 / pT4aN1M0 / pT4aN2M0 / N3 / T4b / M1)

6.3. Concentração sorológica e salivar da proteína MIF e desfecho da doença

A concentração da MIF no soro pré ou pós-operatório não apresentou associação com recorrência local, regional ou a distância da doença, com ocorrência de segundo tumor primário ou óbito. Entretanto, os pacientes que apresentaram segundos tumores primários ou foram a óbito pela neoplasia não apresentaram redução significativa nos níveis de MIF no soro após a ressecção do tumor. Ao contrário, os que não desenvolveram segundos tumores primários ($p=0,006$) ou não foram a óbito pela neoplasia ($p=0,004$) apresentaram redução significativa na concentração da proteína MIF no soro após a ressecção do tumor. (Tabela 15)

Maior concentração da MIF na saliva pré-operatória apareceu significativamente associada à ocorrência de óbitos por câncer ($p=0,023$). Não houve associação da concentração da MIF na saliva pré ou pós-operatória com recorrência local, regional ou a distância da doença ou com ocorrência de segundo tumor primário. (Tabela 16)

Tabela 15 - Associação entre a concentração da proteína MIF no soro antes e após o tratamento cirúrgico e o desfecho da doença *

Variável	Categoria	n	Soro pré (ng/ml)		n	Soro pós (ng/ml)		p**
			Variação	Mediana		Variação	Mediana	
Recorrência local	Não	34	17,7-136,6	53,2	28	16,2-118,5	35,2	0,014
	Sim	12	17,7-95,0	46,1	10	15,1-55,3	28,8	0,012
p				0,423			0,208	
Recorrência regional	Não	39	17,7-136,6	51,1	32	15,1-118,5	34,9	0,004
	Sim	7	20,3-95,5	48,6	6	23,2-35,3	27,8	0,046
p				0,963			0,149	
Recorrência local ou regional	Não	31	17,7-136,6	52,3	26	16,2-118,5	35,7	0,021
	Sim	15	17,7-95,5	48,3	12	15,1-55,3	28,8	0,010
p				0,582			0,149	
Metástase à distância	Não	44	17,7-136,6	49,8	36	15,1-118,5	33,7	0,002
	Sim	2	59,6-95,5	77,6	2	30,7-35,3	33,0	NA
p				0,161			0,999	
Segundo tumor primário	Não	40	17,7- 136,6	49,8	36	15,1- 118,5	34,4	0,006
	Sim	6	17,7- 104,6	59,5	2	23,2- 41,5	31,4	0,075
p				0,514			0,603	
Óbito por câncer	Não	37	17,7-136,6	50,1	32	15,1-118,5	34,9	0,004
	Sim	9	17,7-95,5	59,6	6	23,2-35,3	28,8	0,075
p				0,589			0,200	

***Estudo prospectivo** (excluídos os casos que foram a óbito no período pós-operatório imediato)

NA: não avaliável

p-valor obtido pelo teste não paramétrico U de Mann-Whitney

**p-valor obtido pelo teste pareado de sinais de Wilcoxon

Tabela 16 - Associação entre a concentração da proteína MIF na saliva antes e após o tratamento cirúrgico e o desfecho da doença*

Variável	Categoria	n	Saliva pré (ng/ml)		n	Saliva pós (ng/ml)		p**
			Variação	Mediana		Variação	Mediana	
Recorrência local	Não	33	42,7-1059,1	248,7	27	79,7-1015,5	244,0	0,732
	Sim	12	32,5-1770,6	468,0	8	64,5-2046,8	342,9	0,575
p				0,072			0,239	
Recorrência regional	Não	38	42,7-1770,6	320,8	30	79,7-2046,8	256,1	0,854
	Sim	7	32,5-1013,2	499,0	5	64,5-543,5	261,6	0,500
p				0,900			0,741	
Recorrência local ou regional	Não	30	42,7-1059,1	228,8	25	79,7-1015,5	244,0	0,257
	Sim	15	32,5-1770,6	474,2	10	64,5-2046,8	279,5	0,799
p				0,060			0,342	
Metástase à distância	Não	43	32,5-1770,6	282,4	33	64,5-2046,8	250,9	0,896
	Sim	2	461,8-764,3	613,0	2	278,4-512,1	395,2	NA
p				0,247			0,286	
Segundo tumor primário	Não	39	42,7- 1770,6	332,2	29	79,7- 1015,5	261,4	0,699
	Sim	6	32,5- 960,3	300,8	6	64,5- 2046,8	261,2	0,249
p				0,664			0,965	
Óbito por câncer	Não	36	42,7-1490,2	228,8	31	79,7-1015,5	250,9	0,861
	Sim	9	32,5-1770,6	764,3	4	64,5-2046,8	395,2	0,465
p				0,023			0,437	

***Estudo prospectivo** (excluídos os casos que foram a óbito no período pós-operatório imediato)

NA: não avaliável

p-valor obtido pelo teste não paramétrico U de Mann-Whitney

**p-valor obtido pelo teste pareado de sinais de Wilcoxon

6.4. Expressão das proteínas MIF e CD74 em CECB e em epitélio livre de tumor

A proteína MIF foi positiva em 94,9% das 98 amostras de tumor e em 58,5% das 65 amostras de margem epitelial livre de tumor avaliadas, apresentando expressão significativamente elevada no tumor em relação à margem ($p < 0,0001$). (Tabela 17, Figura 3)

Quando positiva, a proteína MIF apareceu predominantemente expressa no citoplasma das células tumorais e epiteliais livres de tumor, mas também apresentou expressão nuclear associada à citoplasmática em 24% dos tumores e em 34% das margens positivas. (Figuras 5 e 6)

A molécula CD74, receptor de membrana da MIF, apareceu positiva em 44,9% dos 98 espécimes de tumor e em 4,6% dos 87 espécimes de margem epitelial livre de tumor avaliados, apresentando expressão significativamente elevada no tumor em relação à margem ($p < 0,0001$). (Tabela 17, Figura 4)

A imunomarcagem do CD74 foi exclusivamente na membrana celular quando detectado no tumor ou na margem epitelial livre de tumor. (Figuras 7 e 9)

Dentre os casos positivos para CD74, 13 apresentaram expressão elevada nas células tumorais com características mais invasivas (células soltas ou infiltrando tecidos adjacentes) quando comparadas às células menos ou não invasivas (agrupadas em blocos ou carcinoma in situ) presentes no mesmo espécime. Exemplos estão representados na figura 8.

Notavelmente, glândulas salivares presentes nos espécimes observados também apresentaram forte expressão da MIF e CD74, predominantemente nas células serosas da glândula. (Figura 10)

A expressão individual das proteínas MIF e CD74 no tumor e na margem de cada caso está representada na tabela 18.

Tabela 17 - Distribuição dos pacientes de acordo com a expressão das proteínas MIF e CD74 em tecido tumoral e margem*

Variável	Categoria	Freq. (%)
MIF tumor (n=98)	Expressão negativa (<5%)	5 (5.1)
	Baixa expressão (5% - 50%)	23 (23.5)
	Alta expressão (> 50%)	70 (71.4)
MIF margem (n=65)	Expressão negativa (<5%)	27 (41.5)
	Baixa expressão (5% - 50%)	26 (40.0)
	Alta expressão (> 50%)	12 (18.5)
p		<0,0001
CD74 tumor (n=98)	Expressão negativa (<1%)	54 (55,1)
	Baixa expressão (1% - 10%)	21 (21,4)
	Alta expressão (> 10%)	23 (23,5)
CD74 margem (n=87)	Expressão negativa (<1%)	83 (95,4)
	Baixa expressão (1% - 10%)	2 (2,3)
	Alta expressão (> 10%)	2 (2,3)
p		<0,0001

*Estudo prospectivo e retrospectivo

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

Figura 3 - Representação gráfica da distribuição de pacientes com CECB (% / n) segundo a expressão da proteína MIF (negativa: <5% / baixa: 5% - 50% / alta: > 50%) em tecido tumoral (Tumor) e margens epiteliais livres de tumor (Margem). Expressão elevada da proteína MIF no tumor em relação à margem epitelial livre de tumor ($p<0,0001$)

Figura 4 - Representação gráfica da distribuição de pacientes com CECB (% / n) segundo a expressão da proteína CD74 (negativa: <1% / baixa: 1% - 10% / alta: > 10%) em tecido tumoral (Tumor) e margens epiteliais livres de tumor (Margem). Expressão elevada da proteína CD74 no tumor em relação à margem epitelial livre de tumor ($p<0,0001$)

Tabela 18 - Expressão das proteínas MIF e CD74 em tecido tumoral e em margem epitelial livre de tumor por paciente*

<i>ID</i>	<i>MIF tumor</i>	<i>MIF margem</i>	<i>CD74 tumor</i>	<i>CD74 margem</i>
MIFHH/002	alta	negativa	baixa	negativa
MIFHH/003	alta	baixa	baixa	negativa
MIFHH/004	alta	alta	alta	negativa
MIFHH/005	baixa	sem tecido	negativa	negativa
MIFHH/006	alta	alta	alta	alta
MIFHH/007	alta	baixa	alta	negativa
MIFHH/008	alta	baixa	alta	negativa
MIFHH/009	alta	negativa	alta	negativa
MIFHH/010	alta	negativa	baixa	baixa
MIFHH/012	baixa	negativa	baixa	negativa
MIFHH/015	alta	negativa	baixa	negativa
MIFHH/016	baixa	alta	baixa	negativa
MIFHH/017	alta	negativa	alta	negativa
MIFHH/020	alta	negativa	baixa	negativa
MIFHH/021	baixa	negativa	baixa	negativa
MIFHH/022	alta	negativa	negativa	negativa
MIFHH/024	alta	negativa	baixa	negativa
MIFHH/025	alta	sem tecido	alta	negativa
MIFHH/028	alta	negativa	negativa	negativa
MIFHH/029	alta	sem tecido	negativa	negativa
MIFHH/030	alta	alta	alta	negativa
MIFHH/031	negativa	baixa	negativa	negativa
MIFHH/034	baixa	baixa	negativa	negativa
MIFHH/035	negativa	negativa	baixa	negativa
MIFHH/036	baixa	negativa	negativa	negativa
MIFHH/037	alta	negativa	negativa	sem tecido
MIFHH/039	alta	sem tecido	negativa	negativa
MIFHH/040	baixa	sem tecido	sem tecido	negativa
MIFHH/041	alta	sem tecido	negativa	negativa
MIFHH/045	sem tecido	sem tecido	alta	negativa
MIFHH/047	baixa	baixa	negativa	negativa
MIFHH/048	alta	baixa	negativa	negativa
MIFHH/049	alta	sem tecido	alta	negativa
MIFABC/004	baixa	alta	negativa	negativa
MIFABC/006	baixa	sem tecido	alta	sem tecido
MIFABC/008	baixa	sem tecido	negativa	sem tecido
MIFABC/009	baixa	sem tecido	alta	negativa
MIFABC/010	alta	alta	negativa	negativa
MIFABC/011	baixa	sem tecido	negativa	negativa
MIFABC/012	alta	sem tecido	alta	Negative

continua

continuação

Tabela 18 - Expressão das proteínas MIF e CD74 em tecido tumoral e em margem epitelial livre de tumor por paciente*

ID	MIF tumor	MIF margem	CD74 tumor	CD74 margem
MIFABC/014	alta	sem tecido	negativa	negativa
MIFABC/015	baixa	baixa	alta	negativa
MIFABC/016	alta	alta	negativa	negativa
MIFABC/017	alta	negativa	negativa	negativa
MIFABC/018	alta	negativa	negativa	negativa
MIFABC/019	alta	sem tecido	negativa	negativa
CP2/0008	alta	baixa	baixa	negativa
CP2/0010	baixa	negativa	negativa	negativa
CP2/0013	alta	baixa	negativa	negativa
CP2/0019	baixa	negativa	alta	negativa
CP2/0023	alta	baixa	negativa	negativa
CP2/0036	alta	negativa	negativa	negativa
CP2/0039	alta	sem tecido	negativa	sem tecido
CP2/0071	sem tecido	sem tecido	negativa	sem tecido
CP2/0074	alta	sem tecido	negativa	sem tecido
CP2/0081	alta	sem tecido	baixa	sem tecido
CP2/0087	alta	sem tecido	negativa	sem tecido
CP2/0093	alta	sem tecido	negativa	sem tecido
CP2/0094	alta	alta	baixa	negativa
CP2/0109	alta	baixa	negativa	negativa
CP2/0114	alta	sem tecido	alta	sem tecido
CP2/0115	alta	alta	negativa	negativa
CP2/0117	alta	baixa	baixa	negativa
CP2/0118	alta	baixa	alta	negativa
CP2/0120	sem tecido	baixa	sem tecido	negativa
CP2/0122	alta	baixa	negativa	negativa
CP2/0125	baixa	negativa	sem tecido	negativa
CP2/0132	alta	sem tecido	negativa	negativa
CP2/0133	alta	baixa	sem tecido	sem tecido
CP2/0144	alta	sem tecido	negativa	sem tecido
CP2/0149	alta	sem tecido	sem tecido	sem tecido
CP2/0152	negativa	sem tecido	negativa	negativa
CP2/0168	alta	sem tecido	alta	negativa
CP2/0169	baixa	baixa	alta	negativa
CP2/0170	alta	baixa	baixa	negativa
CP2/0182	alta	sem tecido	negativa	negativa
CP2/0188	alta	alta	negativa	negativa
CP2/0195	alta	sem tecido	alta	alta

continua

conclusão

Tabela 18 - Expressão das proteínas MIF e CD74 em tecido tumoral e em margem epitelial livre de tumor por paciente*

<i>ID</i>	<i>MIF tumor</i>	<i>MIF margem</i>	<i>CD74 tumor</i>	<i>CD74 margem</i>
CP2/0196	alta	sem tecido	negativa	negativa
CP2/1002	alta	sem tecido	negativa	sem tecido
CP2/1003	sem tecido	sem tecido	negativa	sem tecido
CP2/1010	baixa	sem tecido	baixa	sem tecido
CP2/1012	alta	sem tecido	baixa	negativa
CP2/1019	negativa	negativa	alta	negativa
CP2/1021	alta	baixa	alta	baixa
CP2/1022	alta	baixa	negativa	negativa
CP2/1033	baixa	alta	negativa	negativa
CP2/1036	alta	baixa	alta	negativa
CP2/1041	alta	negativa	baixa	negativa
CP2/1043	alta	baixa	negativa	negativa
CP2/1044	sem tecido	baixa	negativa	negativa
CP2/1065	alta	negativa	baixa	negativa
CP2/1069	alta	baixa	negativa	negativa
CP2/1071	alta	baixa	negativa	negativa
CP2/1073	negativa	negativa	negativa	negativa
CP2/1074	baixa	negativa	negativa	negativa
CP2/1080	alta	sem tecido	negativa	negativa
CP2/1099	baixa	sem tecido	baixa	negativa
CP2/1104	alta	negativa	negativa	negativa
CP2/1109	alta	negativa	baixa	negativa
CP2/1113	alta	alta	negativa	negativa
CP2/1114	alta	sem tecido	negativa	negativa
CP2/1120	baixa	sem tecido	negativa	negativa

*Estudo prospectivo e retrospectivo

Figura 5 - Detecção imunoistoquímica da proteína MIF em CECB (estudo prospectivo e retrospectivo). A expressão da MIF está corada em marrom e a cor roxa é a contracoloração que indica o núcleo celular. Alta expressão citoplasmática e nuclear da MIF no tumor (B: ampliação original em 400x). Expressão citoplasmática da MIF no tumor (B: ampliação original em 400x). Expressão negativa da MIF no tumor (C: ampliação original em 400x).

Figura 6 - Detecção imunoistoquímica da proteína MIF na margem epitelial livre de tumor (estudo prospectivo e retrospectivo). A expressão da MIF está corada em marrom e a cor roxa é a contracoloração que indica o núcleo celular. Expressão citoplasmática positiva da MIF predominante na camada basal do epitélio livre de tumor (A: ampliação original em 400x). Expressão positiva e predominantemente nuclear da MIF difusa no epitélio livre de tumor (B: ampliação original em 400x). Expressão negativa da MIF no epitélio livre de tumor (C: ampliação original em 400x).

Figura 7 - Detecção imunoistoquímica da proteína CD74 em CECB (estudo prospectivo e retrospectivo). A expressão do CD74 está corada em marrom e a cor roxa é a contracoloração que indica o núcleo celular. Expressão membranar do CD74 nas células tumorais (A: ampliação original em 100x / B: ampliação original em 400x). Expressão membranar difusa do CD74 nas células tumorais (C: ampliação original em 400x). Expressão negativa do CD74 nas células tumorais e positiva no infiltrado inflamatório peritumoral (D: ampliação original em 100x).

Figura 8 - Detecção imunoistoquímica da proteína CD74 em CECB (estudo prospectivo e retrospectivo). A expressão do CD74 está corada em marrom e a cor roxa é a contracoloração que indica o núcleo celular. Expressão membranar do CD74 em CECB invasivo (A: ampliação original em 100x / B: ampliação original em 400x) e expressão negativa em carcinoma in situ (C: ampliação original em 100x) no mesmo espécime. Expressão positiva da MIF na frente de invasão e negativa nos blocos de células tumorais. (D: ampliação original em 100x)

Figura 9 - Detecção imunoistoquímica da proteína CD74 na margem epitelial livre de tumor (estudo prospectivo e retrospectivo). A expressão do CD74 está corada em marrom e a cor roxa é a contracoloração que indica o núcleo celular. Expressão negativa do CD74 em margem epitelial livre de tumor e positiva no infiltrado inflamatório (A: ampliação original em 100x). Expressão membranar positiva do CD74 em margem epitelial livre de tumor (B: ampliação original em 400x).

Figura 10 - Detecção imunoistoquímica das proteínas MIF e CD74 em glândula salivar de pacientes com CECB (estudo prospectivo e retrospectivo). A expressão das proteínas MIF e CD74 está corada em marrom e a cor roxa é a contracoloração que indica o núcleo celular. Expressão membranar do CD74 predominante nas células serosas da glândula salivar (A: ampliação original em 100x / B: ampliação original em 400x). Expressão citoplasmática da MIF predominante nas células serosas da glândula salivar (C: ampliação original em 400x).

6.5. Expressão tecidual da proteína MIF e variáveis clínicas e histopatológicas

A proteína MIF apresentou expressão significativamente elevada ($p=0.004$) nos pacientes de etnia branca em relação aos não brancos. As demais variáveis clínicas não apresentaram associação com a expressão da MIF no tumor ou na margem. (Tabela 19)

A maior expressão proteica da MIF no tumor foi associada com presença de infiltração vascular linfática ($p=0.005$) e sua positividade na margem associada à menor espessura do tumor ($p=0,023$). (Tabela 20)

Tabela 19 - Associação entre a expressão da proteína MIF em tumor e margem e variáveis clínicas*

Variável	Categoria	MIF tumor		p	MIF margem		p
		Baixa n (%)	Alta n (%)		Negativa n (%)	Positiva n (%)	
Idade (anos)	≤ 55,5	14 (29.8)	33 (70.2)	0.798	14 (38.9)	22 (61.1)	0.629
	> 55,5	14 (27.5)	37 (72.5)		13 (44.8)	16 (55.2)	
Gênero	Feminino	0 (0.0)	3 (100.0)	0.555**	0 (0.0)	3 (100.0)	0.260
	Masculino	28 (29.5)	67 (70.5)		27 (43.6)	35 (56.4)	
Etnia	Branca	13 (19.1)	55 (80.9)	0.004	19 (41.3)	27 (58.7)	0.860
	Não branca	13 (48.1)	14 (51.9)		7 (38.9)	11 (61.1)	
Tabagismo	Atual	25 (31.2)	55 (68.8)	0.216	21 (38.9)	33 (61.1)	0.504**
	No passado	3 (16.7)	15 (83.3)		6 (54.5)	5 (45.4)	
Etilismo	Atual	20 (32.3)	42 (67.7)	0.289	19 (47.5)	21 (52.5)	0.217
	Nunca/No passado	8 (22.2)	28 (77.8)		8 (32.0)	17 (68.0)	
Sítio	Língua	11 (26.2)	31 (73.8)	0.587	12 (34.3)	23 (65.7)	0.440
	Soalho	13 (34.2)	25 (65.8)		9 (50.0)	9 (50.0)	
	Gengiva inf/ Retromolar	4 (22.2)	14 (77.8)		6 (50.0)	6 (50.0)	

***Estudo prospectivo e retrospectivo**

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

** p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

Tabela 20 - Associação da expressão da proteína MIF em tumor e margem e variáveis histopatológicas*

Variável	Categoria	MIF tumor		p	MIF margem		p
		Baixa n (%)	Alta n (%)		Negativa n (%)	Positiva n (%)	
Espessura do tumor (mm)	≤10	5 (16,1)	26 (83,9)	0,079	3 (17,6)	14 (82,4)	0,023**
	>10	21 (33,3)	42 (66,7)		23 (50,0)	23 (50,0)	
pT	pT1 / pT 2	12 (27.3)	32 (72.7)	0.787	12 (42.9)	16 (57.1)	0.851
	pT3 / pT4	16 (29.6)	38 (70.4)		15 (40.5)	22 (59.5)	
pN	pN0	16 (30.8)	36 (69.2)	0.609	13 (40.6)	19 (59.4)	0.883
	pN+	12 (26.1)	34 (73.9)		14 (42.4)	19 (57.6)	
Estádio Patológico***	I / II	10 (34.5)	19 (65.5)	0.401	7 (43.8)	9 (56.2)	0.836
	III / IV	18 (26.1)	51 (73.9)		20 (40.8)	29 (59.2)	
Grau de diferenciação	Pouco	9 (31.0)	20 (69.0)	NA	7 (35.0)	13 (65.0)	NA
	Moderadamente	19 (29.7)	45 (70.3)		20 (46.5)	23 (53.5)	
	Bem	0 (0.0)	5 (100.0)		0 (0.0)	2 (100.0)	
Infiltração vascular sanguínea	Ausente	28 (29.8)	66 (70.2)	0.576**	26 (41.3)	37 (58.7)	0.999**
	Presente	0 (0.0)	4 (100.0)		1 (50.0)	1 (50.0)	
Infiltração vascular linfática	Ausente	22 (40.0)	33 (60.0)	0.005	17 (48.6)	18 (51.4)	0.214
	Presente	6 (14.0)	37 (86.0)		10 (33.3)	20 (66.7)	

continua

Tabela 20 - Associação da expressão da proteína MIF em tumor e margem e variáveis histopatológicas*

Variável	Categoria	MIF tumor		p	MIF margem		p
		Baixa n (%)	Alta n (%)		Negativa n (%)	Positiva n (%)	
Invasão perineural	Ausente	15 (30.0)	35 (70.0)	0.749	14 (48.3)	15 (51.7)	0.323
	Presente	13 (27.1)	35 (72.9)		13 (36.1)	23 (63.9)	
Infiltrado inflamatório	Escasso	12 (36.4)	21 (63.6)	0.229	8 (38.1)	13 (61.9)	0.943
	Moderado/Intenso	15 (24.6)	46 (75.4)		16 (39.0)	55 (61.0)	
Margens cirúrgicas	Livres	25 (30.5)	57 (69.5)	0.342	21 (39.6)	32 (60.4)	0.510
	Comprometidas	3 (18.8)	13 (81.2)		6 (50.0)	6 (50.0)	

***Estudo prospectivo e retrospectivo**

NA: não avaliável

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

** p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

*** I (pT1N0M0) / II (pT2N0M0) / III (pT1N1M0 / pT2N1M0 / pT3N0M0 / pT3N1M0) / IV (pT1N2M0 / pT2N2M0 / pT3N2M0 / pT4aN0M0 / pT4aN1M0 / pT4aN2M0 / N3 / T4b / M1)

6.6. Expressão tecidual da proteína CD74 e variáveis clínicas e histopatológicas

A expressão do CD74, molécula receptora da proteína MIF, não mostrou associação estatisticamente significativa com nenhuma variável clínica ou histopatológica. (Tabelas 21 e 22)

Tabela 21 - Associação entre a expressão do CD74 em tumor e margem e variáveis clínicas*

Variável	Categoria	CD74 tumor		p	CD74 margem		p
		negativa n (%)	positiva n (%)		negativa n (%)	positiva n (%)	
Idade (anos)	≤ 55,5	25 (53.2)	22 (46.8)	0.715	41 (95.4)	2 (4.6)	0.999**
	> 55,5	29 (56.9)	22 (43.1)		42 (95.4)	2 (4.6)	
Gênero	Feminino	3 (60.0)	2 (40.0)	0.999	4 (100.0)	0 (0.0)	0.999**
	Masculino	51 (54.8)	42 (45.2)		79 (95.2)	4 (4.8)	
Tabagismo	Atual	47 (59.5)	32 (40.5)	0.075	69 (95.8)	3 (4.2)	0.538**
	No passado	7 (36.8)	12 (63.2)		14 (93.3)	1 (6.7)	
Etilismo	Atual	35 (58.3)	25 (41.7)	0.419	50 (94.3)	3 (5.6)	0.999**
	Nunca/No passado	19 (50.0)	19 (50.0)		33 (97.1)	1 (2.9)	
Sito	Língua	22 (52.4)	20 (47.6)	0.851	37 (94.9)	2 (5.1)	NA
	Soalho da boca	20 (55.6)	16 (44.4)		31 (96.9)	1 (3.1)	
	Gengiva inf/ Retromolar	12 (60.0)	8 (40.0)		15 (93.8)	1 (6.2)	

***Estudo prospectivo e retrospectivo**

NA: não avaliável

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

** p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

Tabela 22 - Associação entre a expressão do CD74 em tumor e margem e variáveis histopatológicas*

Variável	Categoria	CD74 tumor		p	CD74 margem		p
		negativa n (%)	positiva n (%)		negativa n (%)	positiva n (%)	
Espessura do tumor (mm)	≤10	20 (60,6)	13 (39,4)	0,363	2 (8,0)	23 (92,0)	0,580**
	>10	31 (50,8)	30 (49,2)		2 (3,4)	56 (96,6)	
pT	pT1 / pT 2	22 (47,8)	24 (52,2)	0.173	36 (94,7)	2 (5,3)	0.999**
	pT3 / pT4	32 (61,5)	20 (38,5)		47 (95,9)	2 (4,1)	
pN	pN0	33 (62,3)	20 (37,7)	0.122	44 (97,8)	1 (2,2)	0.349**
	pN+	21 (46,7)	24 (53,3)		39 (92,9)	3 (7,1)	
Estádio patológico***	I / II	15 (50,0)	15 (50,0)	0.500	22 (95,6)	1 (4,4)	0.999*
	III / IV	39 (57,3)	29 (42,7)		61 (95,3)	3 (4,7)	
Grau de diferenciação	Pouco	19 (59,4)	13 (40,6)	NA	26 (92,9)	2 (7,1)	NA
	Moderadamente	33 (54,1)	28 (45,9)		54 (96,4)	2 (3,6)	
	Bem	2 (40,0)	3 (60,0)		3 (100,0)	0 (0,0)	
Infiltração vascular sanguínea	Ausente	52 (55,3)	42 (44,7)	0.999	80 (95,2)	4 (4,8)	0.999**
	Presente	2 (50,0)	2 (50,0)		3 (100,0)	0 (0,0)	
Infiltração vascular linfática	Ausente	29 (51,8)	27 (48,2)	0.446	47 (95,9)	2 (4,1)	0.999*
	Presente	25 (59,5)	17 (40,5)		36 (94,7)	2 (5,3)	

continua

Tabela 22 - Associação entre a expressão do CD74 em tumor e margem e variáveis histopatológicas*

Variável	Categoria	CD74 tumor		p	CD74 margem		p
		negativa n (%)	positiva n (%)		negativa n (%)	positiva n (%)	
Invasão perineural	Ausente	27 (54.0)	23 (46.0)	0.823	44 (97.8)	1 (2.2)	0.349**
	Presente	27 (56.2)	21 (43.8)		39 (92.9)	3 (7.1)	
Infiltrado inflamatório	Escasso	21 (61.8)	13 (38.2)	0.480	26 (96.3)	1 (3.7)	0.999**
	Moderado/Intenso	32 (54.2)	27 (45.8)		52 (94.6)	3 (5.4)	
Margens cirúrgicas	Livres	43 (53.1)	38 (46.9)	0.381	69 (95.8)	3 (4.2)	0.538**
	Comprometidas	11 (64.7)	6 (35.3)		14 (93.3)	1 (6.7)	

***Estudo prospectivo e retrospectivo**

NA: não avaliável

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

** p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

*** I (pT1N0M0) / II (pT2N0M0) / III (pT1N1M0 / pT2N1M0 / pT3N0M0 / pT3N1M0) / IV (pT1N2M0 / pT2N2M0 / pT3N2M0 / pT4aN0M0 / pT4aN1M0 / pT4aN2M0 / N3 / T4b / M1)

6.7. Expressão tecidual das proteínas MIF e CD74, sobrevida e desfecho da doença

Menor sobrevida global do grupo de pacientes retrospectivo e prospectivo foi associada com idade avançada ($p=0,008$), estágios pT3 e pT4 ($p=0,039$), metástase linfonodal ($p=0,005$), estádios patológicos avançados ($p=0,016$) e escasso infiltrado inflamatório peritumoral ($p=0,045$). (Tabela 23; Figuras 11-16)

A sobrevida livre de doença apresentou redução significativa associada a estágios pT3 e pT4 ($p=0,017$), metástase linfonodal ($p=0,058$), estádios patológicos avançados ($p=0,009$), escasso infiltrado inflamatório peri-tumoral ($p=0,037$) e margens cirúrgicas comprometidas por tumor ($p=0,043$). (Tabela 25; Figuras 17-22)

A expressão tecidual da MIF ou seu receptor CD74 não mostrou associação com sobrevida global ou sobrevida livre de doença nessa casuística. (Tabelas 24 e 26)

Não houve associação significativa entre a expressão tecidual da MIF ou CD74 no tumor ou na margem e a ocorrência de recidiva, metástase, segundo tumor primário ou óbito. Entretanto, todos os casos com ocorrência de segundo tumor primário apresentavam expressão positiva da MIF na margem. Os segundos tumores primários diagnosticados foram localizados predominantemente na cavidade bucal, mas também na laringe, esôfago e hipofaringe. (Tabelas 27 e 28)

Tabela 23 - Distribuição da sobrevida global (%) em 1 ano de seguimento dos pacientes em relação à variáveis clínicas e histopatológicas*

Variável	Categoria	Sobrevida global 1 ano (%)	p
SOBREVIDA	GLOBAL	79.6	
Idade (anos)	≤55,5 >55,5	83.5 75.8	0.008
Tabagismo	Atual No passado	79.7 78.9	0.990
Etilismo	Atual No passado/Nunca	79.7 79.3	0.603
Sítio	C02 (Língua) C04 (Soalho da boca) C03.1/C06.2 (Gengiva inf/Retromolar)	80.2 81.3 74.7	0.829
pT	pT1 / pT 2 pT3 / pT4	89.2 71.1	0.039
pN	pN0 pN+	90.4 67.7	0.005
Estádio patológico**	I / II III / IV	96.7 72.3	0.016
Grau de diferenciação	Bem diferenciado Moderadamente diferenciado Pouco diferenciado	81.8 79.8 60,0	0.070
Infiltração vascular sanguínea	Ausente Presente	80.1 60.0	0.512
Infiltração vascular linfática	Ausente Presente	81.3 77.4	0.524
Invasão perineural	Ausente Presente	84.1 74.7	0.586
Infiltrado inflamatório	Escasso Moderado / Intenso	65.5 89.6	0.045

continua

conclusão

Tabela 23 - Distribuição da sobrevida global (%) em 1 ano de seguimento dos pacientes em relação à variáveis clínicas e histopatológicas*

Variável	Categoria	Sobrevida global 1 ano (%)	p
Margens cirúrgicas	Livres	81.5	0.064
	Comprometidas	69.7	

*Estudo prospectivo e retrospectivo (n=102)

** I (pT1N0M0) / II (pT2N0M0) / III (pT1N1M0 / pT2N1M0 / pT3N0M0 / pT3N1M0) / IV (pT1N2M0 / pT2N2M0 / pT3N2M0 / pT4aN0M0 / pT4aN1M0 / pT4aN2M0 / N3 / T4b / M1)
p-valor obtido pelo teste de logrank

Figura 11 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida global (%) em função do tempo (meses). (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102)

Figura 12 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da **probabilidade de sobrevida global (%)** em função do tempo (meses) segundo a idade ao diagnóstico do CECB. (estudo prospectivo e retrospectivo - $n=102$). Pacientes com idade acima de 55,5 anos apresentaram menor probabilidade de sobrevida global ($p=0,008$).

Figura 13 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da **probabilidade de sobrevida global (%)** em função do tempo (meses) segundo o estágio pT. (estudo prospectivo e retrospectivo - $n=102$). Pacientes com tumor pT3 ou pT4 apresentaram menor probabilidade de sobrevida global ($p=0,039$).

Figura 14 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida global (%) em função do tempo (meses) segundo o estágio pN. (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102). Pacientes com metástase linfonodal apresentaram menor probabilidade de sobrevida global ($p=0,005$).

Figura 15 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida global (%) em função do tempo (meses) segundo o estadiamento patológico. (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102). Pacientes em estádios patológicos III ou IV apresentaram menor probabilidade de sobrevida global ($p=0,016$).

Figura 16 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida global (%) em função do tempo (meses) segundo a intensidade do infiltrado inflamatório peritumoral. (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102). Pacientes com infiltrado inflamatório peritumoral escasso apresentaram menor probabilidade de sobrevida global ($p=0,045$).

Tabela 24 - Distribuição da sobrevida global (%) em 1 ano de seguimento dos pacientes em relação à expressão das proteínas MIF e CD74 no tumor e na margem*

Variável	Categoria	Sobrevida global 1 ano (%)	p
MIF tumor	negativa	80.0	0.493
	baixa expressão	80.8	
	alta expressão	79.0	
MIF tumor	baixa expressão	81.0	0.283
	alta expressão	79.0	
MIF margem	negativa	68.4	0.205
	baixa expressão	83.5	
	alta expressão	100.0	
MIF margem	negativa	68.4	0.077
	positiva	88.9	
CD74 tumor	negativa	88.3	0.579
	baixa expressão	71.4	
	alta expressão	72.6	
CD74 tumor	negativa	88.3	0.326
	positiva	72.0	
CD74 margem	negativa	81.0	0.095
	baixa expressão	50.0	
	alta expressão	100.0	
CD74 margem	negativa	81.0	0.687
	positiva	75.0	

*Estudo prospectivo e retrospectivo (n=102)

p-valor obtido pelo teste de logrank

Tabela 25 - Distribuição da sobrevida livre de doença (%) em 1 ano de seguimento dos pacientes em relação às variáveis clínicas e histopatológicas*

Variável	Categoria	Sobrevida livre de doença 1 ano (%)	p
SOBREVIDA	LIVRE DE DOENÇA	72.9	
Idade (anos)	≤55,5 >55,5	72.9 72.8	0.267
Tabagismo	Atual No passado	69.4 88.3	0.260
Etilismo	Atual Nunca / No passado	70.5 76.9	0.282
Sítio	C02 (Língua) C04 (Soalho da boca) C03.1/C06.2 (Gengiva inf/Retromolar)	67.1 83.5 64.6	0.446
pT	pT1 / pT 2 pT3 / pT4	86.0 61.2	0.017
pN	pN0 pN+	77.6 67.6	0.058
Estádio patológico**	I / II III / IV	89.1 65.8	0.009
Grau de diferenciação	Bem Moderadamente Pouco	64.4 79.5 50.0	0.389
Infiltração vascular sanguínea	Ausente Presente	72.2 100.0	0.331
Infiltração vascular linfática	Ausente Presente	72.4 73.5	0.399
Invasão perineural	Ausente Presente	75.1 70.6	0.506
Infiltrado inflamatório	Escasso Moderado + Intenso	54.9 82.5	0.037

continua

continuação

Tabela 25 - Distribuição da sobrevida livre de doença (%) em 1 ano de seguimento dos pacientes em relação às variáveis clínicas e histopatológicas*

Variável	Categoria	Sobrevida livre de doença 1 ano (%)	p
Margens cirúrgicas	Livres	77.6	0.043
	Comprometidas	49.2	

*Estudo prospectivo e retrospectivo (n=102)

p-valor obtido pelo teste de logrank

** I (pT1N0M0) / II (pT2N0M0) / III (pT1N1M0 / pT2N1M0 / pT3N0M0 / pT3N1M0) / IV (pT1N2M0 / pT2N2M0 / pT3N2M0 / pT4aN0M0 / pT4aN1M0 / pT4aN2M0 / N3 / T4b / M1)

Figura 17 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida livre de doença (%) em função do tempo (meses). (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102)

Figura 18 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida livre de doença (%) em função do tempo (meses) segundo o estágio pT. (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102). Pacientes com tumor pT3 ou pT4 apresentaram menor probabilidade de sobrevida livre de doença ($p=0,017$).

Figura 19 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida livre de doença (%) em função do tempo (meses) segundo o estágio pN. (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102). Pacientes com metástase linfonodal apresentaram menor probabilidade de sobrevida livre de doença ($p=0,058$).

Figura 20 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida livre de doença (%) em função do tempo (meses) segundo o estadiamento patológico. (estudo prospectivo e retrospectivo - $n=102$). Pacientes em estádios patológicos III ou IV apresentaram menor probabilidade de sobrevida livre de doença ($p=0,009$).

Figura 21 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida livre de doença (%) em função do tempo (meses) segundo a intensidade do infiltrado inflamatório peritumoral. (estudo prospectivo e retrospectivo - $n=102$). Pacientes com infiltrado inflamatório peritumoral escasso apresentaram menor probabilidade de sobrevida livre de doença ($p=0,037$).

Figura 22 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida livre de doença (%) em função do tempo (meses) segundo o estado de comprometimento das margens cirúrgicas (estudo prospectivo e retrospectivo - n=102). Pacientes com margens cirúrgicas comprometidas por tumor apresentaram menor probabilidade de sobrevida livre de doença ($p=0,043$).

Tabela 26 - Distribuição da sobrevida livre de doença (%) em 1 ano de seguimento dos pacientes em relação à expressão das proteínas MIF e CD74 no tumor e na margem*

Variável	Categoria	Sobrevida livre de doença 1 ano (%)	p
MIF tumor	negativa	50.0	0.519
	baixa expressão	84.8	
	alta expressão	73.3	
MIF tumor	baixa expressão	78.7	0.338
	alta expressão	73.3	
MIF margem	negativa	61.1	0.397
	baixa expressão	67.0	
	alta expressão	82.6	
MIF margem	negativa	61.1	0.445
	positiva	72.1	
CD74 tumor	negativa	73.0	0.756
	baixa expressão	69.1	
	alta expressão	70.9	
CD74 tumor	negativa	73.0	0.691
	positiva	70.1	
CD74 margem	negativa	72.9	NA
	baixa expressão	50.0	
	alta expressão	100.0	
CD74 margem	negativa	72.9	0.920
	positiva	50.0	

*Estudo prospectivo e retrospectivo (n=102)

p-valor obtido pelo teste de logrank

Tabela 27 - Associação entre a expressão da MIF em tumor e margem e o desfecho da doença*

Variável	Categoria	MIF tumor		p	MIF margem		p
		Baixa n (%)	Alta n (%)		Negativa n (%)	Positiva n (%)	
Recidiva	Não	18 (32,1)	38 (67,9)	0,302	12 (37,5)	20 (62,5)	0,756
	Sim	8 (22,2)	28 (77,8)		12 (41,4)	17 (58,6)	
Metástase à distância	Não	25(30,9)	56 (69,1)	0,170**	22 (42,3)	30 (57,7)	0,461**
	Sim	1 (9,1)	10 (90,9)		2 (22,2)	7 (77,8)	
Segundo tumor primário	Não	24 (28,9)	59 (71,1)	0,999**	24 (43,6)	31 (56,4)	0,072**
	Sim	2 (22,2)	7 (77,8)		0 (0,0)	6 (100,0)	
Óbito	Não	13 (26,5)	36 (73,5)	0,694	12 (37,5)	20 (62,5)	0,756
	Sim	13 (30,2)	30 (69,8)		12 (41,4)	17 (58,6)	

***Estudo prospectivo e retrospectivo** (excluídos os casos que foram a óbito no período pós-operatório imediato)

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

** p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

Tabela 28 - Associação entre a expressão do CD74 em tumor e margem e o desfecho da doença*

Variável	Categoria	CD74 tumor		p	CD74 margem negativa		p
		negativa n (%)	positiva n (%)		positiva n (%)		
Recidiva	Não	28 (53,8)	24 (46,2)	0,912	46 (95,8)	2 (4,2)	0,999**
	Sim	22 (55,0)	18 (45,0)		31 (93,9)	2 (6,1)	
Metástase à distância	Não	41 (51,3)	39 (48,7)	0,212**	67 (94,4)	4 (5,6)	0,999**
	Sim	9 (75,0)	3 (25,0)		10 (100,0)	0 (0,0)	
Segundo tumor primário	Não	47 (56,0)	37 (44,0)	0,461**	69 (94,5)	4 (5,5)	0,999**
	Sim	3 (37,5)	5 (62,5)		8 (100,0)	0 (0,0)	
Óbito	Não	28 (58,3)	20 (41,7)	0,422	40 (95,2)	2 (4,8)	0,999**
	Sim	22 (50,0)	22 (50,0)		37 (94,9)	2 (5,1)	

***Estudo prospectivo e retrospectivo** (excluídos os casos que foram a óbito no período pós-operatório imediato)

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

** p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

6.8. Avaliação da ação sinérgica das proteínas MIF e CD74 em relação às variáveis clínicas e histopatológicas e ao desfecho da doença

Agrupando os pacientes em grupos segundo a expressão das proteínas MIF e CD74, sendo MIF alta/CD74(-) e MIF alta/CD74(+), não houve diferença significativa entre os grupos em relação às variáveis histopatológicas ou ao desfecho da doença. (Tabelas 29 e 30)

Entre os grupos MIF(+)/CD74(-) e MIF(+)/CD74(+) também não houve associação estatisticamente significativa entre os grupos e as variáveis histopatológicas ou desfecho da doença. (Tabelas 31 e 32)

Tabela 29 - Associação entre os perfis de expressão MIF alta/CD74(-) e MIF alta/CD74(+) em CECB e variáveis histopatológicas*

Variável	Categoria	MIF alta/CD74(-) n (%)	MIF alta/CD74(+) n (%)	p
Espessura do tumor (mm)	≤10	16 (61,5)	10 (38,5)	0,264
	>10	19 (47,5)	21 (52,5)	
pT	pT1 / pT2	15 (46,9)	17 (53,1)	0,239
	pT3 / pT4	22 (61,1)	14 (38,9)	
pN	pN0	22 (61,1)	14 (38,9)	0,239
	pN+	15 (46,9)	17 (53,1)	
Estádio patológico***	I / II	9 (47,4)	10 (52,6)	0,467
	III / IV	28 (57,1)	21 (42,9)	
Grau de diferenciação	Pouco	2 (40,0)	3 (60,0)	0,708
	Moderadamente	23 (53,5)	20 (46,5)	
	Bem	12 (60,0)	8 (40,0)	
Infiltração vascular sanguínea	Ausente	35 (54,7)	29 (45,3)	0,999**
	Presente	2 (50,0)	2 (50,0)	
Infiltração vascular linfática	Ausente	16 (48,5)	17 (51,5)	0,340
	Presente	21 (60,0)	14 (40,0)	

continua

Tabela 29 - Associação entre os perfis de expressão MIF alta/CD74(-) e MIF alta/CD74(+) em CECB e variáveis histopatológicas* conclusão

Variável	Categoria	MIF alta/CD74(-) n (%)	MIF alta/CD74(+) n (%)	p
Invasão perineural	Ausente	18 (52,9)	16 (47,1)	0,807
	Presente	19 (55,9)	15 (44,1)	
Infiltrado inflamatório	Escasso	11 (52,4)	10 (47,6)	0,736
	Moderado/Intenso	25 (56,8)	19 (43,2)	
Margens cirúrgicas	Livres	28 (50,9)	27 (49,1)	0,354**
	Comprometidas	9 (69,2)	4 (30,8)	

***Estudo prospectivo e retrospectivo**

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

** p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

*** I (pT1N0M0) / II (pT2N0M0) / III (pT1N1M0 / pT2N1M0 / pT3N0M0 / pT3N1M0) / IV (pT1N2M0 / pT2N2M0 / pT3N2M0 / pT4aN0M0 / pT4aN1M0 / pT4aN2M0 / N3 / T4b / M1)

Tabela 30 - Associação entre os perfis de expressão MIF alta/CD74(-) e MIF alta/CD74(+) em CECB e o desfecho da doença*

Variável	Categoria	MIF alta/CD74(-) n (%)	MIF alta/CD74(+) n (%)	p
Recidiva local	Não	20 (55,6)	16 (44,4)	0,658
	Sim	14 (50,0)	14 (50,0)	
Metástase à distância	Não	27 (50,0)	27 (50,0)	0,313**
	Sim	7 (70,0)	3 (30,0)	
Segundo tumor primário	Não	32 (55,2)	26 (44,8)	0,406**
	Sim	2 (33,3)	4 (66,7)	
Óbito	Não	21 (60,0)	14 (40,0)	0,226
	Sim	13 (44,8)	16 (55,2)	

***Estudo prospectivo e retrospectivo** (excluídos os casos que foram a óbito no período pós-operatório imediato)

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

** p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

Tabela 31 - Associação entre os perfis de expressão MIF(+)/CD74(-) e MIF(+)/CD74(+) em CECB e variáveis histopatológicas*

Variável	Categoria	MIF(+)/CD74(-) n (%)	MIF(+)/CD74(+) n (%)	p
Espessura do tumor (mm)	≤10	18 (58,1)	13 (41,9)	0,658
	>10	27 (50,0)	27 (50,0)	
pT	pT1 / pT2	18 (43,9)	23 (56,1)	0,079
	pT3 / pT4	30 (62,5)	18 (37,5)	
pN	pN0	30 (61,2)	19 (38,8)	0,126
	pN+	18 (45,0)	22 (55,0)	
Estádio patológico***	I / II	12 (44,4)	15 (55,6)	0,236
	III / IV	36 (58,1)	26 (41,9)	
Grau de diferenciação	Pouco	2 (40,0)	3 (60,0)	0,690
	Moderadamente	30 (52,6)	27 (47,4)	
	Bem	16 (59,3)	11 (40,7)	
Infiltração vascular sanguínea	Ausente	46 (54,1)	39 (45,9)	0,999**
	Presente	2 (50,0)	2 (50,0)	
Infiltração vascular linfática	Ausente	25 (51,0)	24 (49,0)	0,340
	Presente	23 (57,5)	17 (42,5)	
Invasão perineural	Ausente	23 (51,1)	22 (48,9)	0,589
	Presente	25 (56,8)	19 (43,2)	

continua

Tabela 31 - Associação entre os perfis de expressão MIF(+)/CD74(-) e MIF(+)/CD74(+) em CECB e variáveis histopatológicas* conclusão

Variável	Categoria	MIF(+)/CD74(-) n (%)	MIF(+)/CD74(+) n (%)	p
Infiltrado inflamatório	Escasso	16 (57,1)	12 (42,9)	0,747
	Moderado/Intenso	31 (53,4)	27 (46,6)	
Margens cirúrgicas	Livres	39 (51,3)	37 (48,7)	0,367**
	Comprometidas	9 (69,2)	4 (30,8)	

***Estudo prospectivo e retrospectivo**

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

** p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

*** I (pT1N0M0) / II (pT2N0M0) / III (pT1N1M0 / pT2N1M0 / pT3N0M0 / pT3N1M0) / IV (pT1N2M0 / pT2N2M0 / pT3N2M0 / pT4aN0M0 / pT4aN1M0 / pT4aN2M0 / N3 / T4b / M1)

Tabela 32 - Associação entre os perfis de expressão MIF(+)/CD74(-) e MIF(+)/CD74(+) em CECB e o desfecho da doença.*

Variável	Categoria	MIF(+)/CD74(-) n (%)	MIF(+)/CD74(+) n (%)	p
Recidiva	Não	26 (52,0)	24 (48,0)	0,932
	Sim	18 (52,9)	16 (47,1)	
Metástase à distância	Não	36 (49,3)	37 (50,7)	0,200**
	Sim	8 (72,7)	3 (27,3)	
Segundo tumor primário	Não	41 (53,9)	35 (46,1)	0,469**
	Sim	3 (37,5)	5 (62,5)	
Óbito	Não	26 (56,5)	20 (43,5)	0,403
	Sim	18 (47,4)	20 (52,6)	

***Estudo prospectivo e retrospectivo** (excluídos os casos que foram a óbito no período pós-operatório imediato)

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

** p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

6.9. Correlações entre as concentrações sorológica e salivar e a expressão tecidual da MIF e CD74

Não houve correlação entre a concentração sorológica e a concentração salivar da MIF anteriores à cirurgia e da mesma forma as concentrações sorológica e salivar pós-operatórias não apresentaram correlação. (Figuras 23 e 24)

A alta expressão da MIF no tumor não mostrou associação com a positividade da MIF na margem. A expressão da MIF no tumor ou na margem não apareceu associada às concentrações pré e pós-operatórias da MIF no soro ou na saliva. (Tabela 33)

Todos os casos com positividade do CD74 na margem eram positivos também no tumor e essa associação mostrou ser estatisticamente significativa ($p=0,047$). Não houve associação entre a expressão da MIF e do seu receptor CD74 no tumor ou na margem. (Tabela 34)

Figura 23 - Representação gráfica da correlação entre a concentração da MIF no soro e saliva pré-operatórios (estudo prospectivo – $n=48$). A concentração da proteína MIF no soro pré-operatório não apresentou correlação com a concentração da proteína MIF na saliva pré-operatória.

Figura 24 - Representação gráfica da correlação entre a concentração da MIF no soro e saliva pós-operatórios (estudo prospectivo – n=33). A concentração da proteína MIF no soro pós-operatório não apresentou correlação com a concentração da proteína MIF na saliva pós-operatória.

Tabela 33 - Correlação entre a expressão no tumor e margem e concentração no soro e saliva da proteína MIF

Variável	Categoria	MIF tumor		p	MIF margem		p
		baixa n (%)	alta n (%)		negativa n (%)	positiva n (%)	
MIF margem	negativa positiva	10 (37,0) 8 (22,2)	17 (63,0) 28 (77,8)	0.198*			
MIF Soro pré	n Variação Mediana	16 20.9 -85.6 55.1	29 17.7-136.6 49.5	0.962	16 20.4-68.1 41.5	15 17.7-129.5 56.9	0.063
MIF Soro pós	n Variação Mediana	13 15.1-118.5 34.6	23 16.2-78.1 32.3	0.908	12 18.3-36.3 29.5	13 15.1-78.1 35.3	0.211
MIF Saliva pré	n Variação Mediana	15 32.5-1490.3 159.2	28 49.1-1770.6 394.3	0.093	15 32.5-1013.2 255.5	8 42.7-1490.3 357.3	0.541
MIF Saliva pós	n Variação Mediana	9 64.5-405.3 272.9	24 106.5-2046.8 256.1	0.518	11 64.5-878.6 244.0	13 112.9-2046.8 278.4	0.582

p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

Tabela 34 - Correlação entre a expressão das proteínas MIF e CD74 no tumor e margem.

Variável	Categoria	CD74 tumor		p	CD74 margem		p
		negativa n (%)	positiva n (%)		negativa n (%)	positiva n (%)	
CD74 margem	negativa	44 (55.0)	36 (45.0)	0.047*			
	positiva	0 (0.0)	4 (100.0)				
MIF tumor	baixa	14 (53,8)	12 (46,2)	0.961	25 (31.2)	0 (0.0)	0.313*
	alta	37 (54,4)	31 (45,6)		55 (68.8)	4 (100.0)	
MIF margem	negativa	11 (42,3)	15 (57,7)	0.303	25 (41.7)	1 (33.3)	0.999*
	positiva	20 (55,6)	16 (44,4)		35 (58.3)	2 (66.7)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

* p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

6.10. Análises suplementares: Concentração sorológica e salivar da MIF segundo a quantidade de tumor estimada

Entre os pacientes que apresentaram linfonodos comprometidos por tumor, as medianas da quantidade numérica e do maior diâmetro dentre os linfonodos comprometidos foi 2 e 1,6cm, respectivamente. Considerando todos os pacientes com informações disponíveis sobre as extensões do tumor primário, a mediana do maior diâmetro do tumor foi 3,9 cm. Os índices LN e GNI apresentaram medianas 3,5 e 5,1 respectivamente. (Tabela 35)

O LNI não mostrou associação estatisticamente significativa com o desfecho da doença. (Tabela 36)

Elevada concentração da proteína MIF no soro pré-operatório apareceu associada ao maior LNI, maior quantidade de tecido tumoral nos linfonodos ($p=0,025$). Não houve, porém, associação entre a concentração da MIF no soro pré-operatório e a quantidade de linfonodos metastáticos, o maior diâmetro dos linfonodos metastáticos, o maior diâmetro do tumor primário e o GNI. (Tabela 37)

A maior concentração pré-operatória da MIF na saliva foi associada ao maior diâmetro do tumor ($p=0,020$) e ao maior índice GNI ($p=0,025$), maior quantidade de tumor no paciente. Não houve associação entre a concentração da MIF na saliva pré-operatória e a quantidade de linfonodos metastáticos, o maior diâmetro dos linfonodos metastáticos e o índice LNI. (Tabela 38)

Tabela 35 - Distribuição dos pacientes segundo a quantidade de tumor estimada*

Variável	Categoria	Freq. (%) / Medidas
Metástase linfonodal	Não	28 (58.3)
	Sim	20 (41.7)
Quantidade de linfonodos metastáticos	n	20
	Variação	1 – 6
	Mediana	2
	Média (Desvio padrão)	2.1 (1.5)
Maior diâmetro dos linfonodos metastáticos (cm)	n	20
	Variação	0.5 – 8.0
	Mediana	1.6
	Média (Desvio padrão)	2.4 (1.9)
Índice LN (LNI)	n	20
	Variação	1.9 – 11.0
	Mediana	3.5
	Média (Desvio padrão)	4.6 (2.6)
Maior diâmetro do tumor primário (cm)	n	48
	Variação	0.6 – 7.0
	Mediana	3.9
	Média (Desvio padrão)	3.7 (1.5)
Índice geral (GNI)	n	48
	Variação	0.6 – 15.0
	Mediana	5.1
	Média (Desvio padrão)	5.6 (3.4)

*Estudo prospectivo

Tabela 36 - Associação entre o LNI e o desfecho da doença*

Variável	Categoria	LNI ≤ 3,5 n (%)	LNI > 3,5 n (%)	p
Recidiva	Não	9 (75,0)	3 (25,0)	0,167
	Sim	3 (37,5)	5 (62,5)	
Metástase à distância	Não	12 (63,2)	7 (36,8)	0,400
	Sim	0 (0,0)	1 (100,0)	
Segundo tumor primário	Não	12 (63,2)	7 (36,8)	0,400
	Sim	0 (0,0)	1 (100,0)	
Óbito	Não	8 (72,7)	3 (27,3)	0,361
	Sim	4 (44,4)	5 (55,6)	

*Estudo prospectivo

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

Tabela 37 - Associação entre a concentração da MIF no soro pré-operatório e a quantidade de tumor estimada*

Variável	Categoria	n	Soro pré (ng/ml)		p
			Variação	Mediana	
Quantidade de linfonodos metastáticos	1-2	15	17,7-104,62	27.6	0.631
	3-6	5	23,08-95,52	95.5	
Maior diâmetro dos linfonodos metastáticos (cm)**	≤ 1.5	10	17.7 – 59.6	35.8	0.545
	> 1.5	10	17.7 – 104.6	40.1	
Índice LN (LNI) **	≤ 3.5	12	17.7 – 59.6	26.7	0.025
	> 3.5	8	23.1 – 104.6	56.7	
Maior diâmetro do tumor primário (cm)***	≤ 2.5	13	17.7 – 104.6	54.2	0.754
	> 2.5	35	17.7 – 129.5	48.6	
Índice geral (GNI)***	≤ 2.9	10	20.9 – 99.9	64.4	0.071
	> 2.9	38	17.7 – 129.5	46.1	

*Estudo prospectivo

**Ponto de corte na mediana

***Ponto de corte no primeiro quartil

p-valor obtido pelo teste não paramétrico U Mann-Whitney

Tabela 38 - Associação entre a concentração da MIF na saliva pré-operatória e a quantidade de tumor estimada*

Variável	Categoria	n	Saliva pré (ng/ml)		p
			Varição	Mediana	
Quantidade de linfonodos metastáticos	1-2	14	32,54-1770,63	262.7	0.579
	3-6	5	50,12-1013,18	682.6	
Maior diâmetro dos linfonodos metastáticos (cm)**	≤ 1.5	10	76.4 -1770.6	426.2	0.327
	> 1.5	9	32.5 – 960.3	474.2	
Índice LN (LNI) **	≤ 3.5	12	49.1 –1770.6	426.2	0.447
	> 3.5	7	32.5 -1013.2	474.2	
Maior diâmetro do tumor primário (cm) ***	≤ 2.5	13	49.1 - 867.6	125.0	0.020
	> 2.5	33	32.5 -1770.6	406.2	
Índice geral (GNI) ***	≤ 2.9	10	45.6 – 461.8	142.0	0.025
	> 2.9	36	32.5 –1770.6	395.5	

*Estudo prospectivo

**Ponto de corte na mediana

***Ponto de corte no primeiro quartil

p-valor obtido pelo teste não paramétrico U Mann-Whitney

6.11. Análises suplementares: MIF em células de CECB

As análises por western blotting mostraram forte expressão intracelular da proteína MIF em células de linhagem de CECB (SCC25) e o tratamento com 4-IPP foi capaz de inibir parcialmente essa expressão. (Figura 25)

Figura 25 - Detecção por western blotting da expressão da proteína MIF em células de CECB e inibição da MIF por 4-IPP. (A: MIF / B: controle de expressão endógena β -actina / DMSO: tratamento controle / 4-IPP: inibição da expressão intracelular da MIF por 4-IPP)

Análises por ELISA mostraram concentração média de 2560 pg/ul da proteína MIF no meio de cultivo das células SCC-25, indicando que essas células secretam MIF em quantidade considerável.

7. DISCUSSÃO

A proteína MIF é uma citocina que tem sido considerada importante *link* entre inflamação e câncer em função do seu papel pró-inflamatório, superexpressão em uma gama de tecidos tumorais e interações com vias que promovem a progressão tumoral. Seus mecanismos moleculares incluem, entre outros, a inibição de p53 e ativação de Erk/MAPK, AKT/PKB e HIF-1 α , vias que promovem a proliferação e sobrevivência das células tumorais e a neoangiogênese associada ao tumor. (BUCALA; DONNELLY, 2007; DENZ et al.,2010; HUDSON et al.,1999; LI; XIE; LEI; ZHANG, 2009; RENDON; WILLER; ZUNDEL; MITCHELL, 2009; SCHRADER et al.,2009)

Em condições normais, diversas células imunológicas, bem como a hipófise, células endoteliais e células epiteliais de diferentes órgãos expressam a proteína MIF. (CALANDRA; BERNHAGEN; MITCHELL; BUCALA, 1994; CALANDRA; ROGER, 2003) Nos últimos anos, vários estudos reportaram a superexpressão da MIF em tumores quando comparados a tecidos sem neoplasia e altas concentrações da MIF já foram detectadas no soro de pacientes com câncer quando comparados a indivíduos sem câncer. Essas observações sugerem um papel potencial para esta proteína como biomarcador em doenças neoplásicas. (CAMLICA et al; 2008; FANG et al.,2008; KAMIMURA et al.,2000; LEE et al.,2008; MOHRI et al.,2009; MURAMAKI; MIYAKE; YAMADA; HARA, 2006; REN et al.,2005; TOMIYASU et al.,2002; XIA et al.,2005; YASASEVER et al.,2007)

Visando avaliar a MIF como um biomarcador salivar e sorológico de CECB, a concentração dessa proteína foi investigada em amostras de soro e saliva coletadas no período pré e pós-operatório de pacientes com CECB. A fim de evitar a interferência de variáveis não controladas na comparação da concentração da MIF em diferentes indivíduos, amostras coletadas do mesmo paciente após a ressecção do tumor foram utilizadas como controles. Uma vez que a alta expressão da MIF também tem sido demonstrada em doenças autoimunes e associada com polimorfismos previamente descritos no promotor do gene *mif*, a comparação de amostras do mesmo indivíduo antes e após a

ressecção do tumor permitiu maior controle dessas variáveis. (BAUGH et al.,2002; COOKE; ARMSTRONG, DONNELLY, 2009; DONN et al.,2001; MORAND, 2005; SANCHEZ-ZAMORA et al.,2010)

Em pacientes com CEC de laringe foi encontrada maior concentração da MIF no soro (217,9 pg/ml) quando comparados a indivíduos sem neoplasia (74,68 pg/ml). (KINDT et al.,2013) A concentração sorológica elevada da MIF em pacientes com câncer em relação a controles saudáveis tem sido observada em diversos estudos, mas os níveis de concentração tanto entre os indivíduos saudáveis quanto entre pacientes com câncer apresenta ampla oscilação. (TAS et al.,2013; XIA et al.,2009) Provavelmente os interferentes já citados e as diferenças na metodologia utilizada têm levado a tamanha variação. Este estudo utilizou inibidor de protease para maior preservação das proteínas sorológicas e salivares, prática que não tem sido frequentemente descrita na metodologia dos demais trabalhos na literatura.

A concentração sorológica da MIF, quando comparada individualmente, não apresentou redução após a ressecção do tumor em 26% dos casos. Isto pode ter ocorrido uma vez que o soro reflete condições sistêmicas e que a MIF é uma citocina aumentada também em condições inflamatórias ou por outras patologias, ou ainda, refletindo a inflamação desencadeada pela cicatrização da ferida operatória. (COOKE; ARMSTRONG, DONNELLY, 2009; HARDMAN et al.,2005; MORAND, 2005; SANCHEZ-ZAMORA et al.,2010)

Entretanto, em 74% dos pacientes houve redução e a concentração sorológica mediana da proteína MIF nas amostras coletadas no período pré-operatório foi significativamente maior comparada à concentração após a ressecção do tumor.

Este resultado, juntamente com os vários relatos na literatura de superexpressão da MIF em tecidos tumorais e, principalmente, com os resultados suplementares do presente estudo demonstrando que células de linhagem humana de carcinoma epidermóide da cavidade bucal expressaram e foram capazes de secretar a proteína MIF *in vitro*, são consistentes com a hipótese inicial de que a concentração sorológica da MIF poderia refletir a expressão tumoral dessa proteína e servir como biomarcador em CECB.

Considerando que não houve diferença significativa na concentração sorológica da MIF segundo o tamanho do tumor, o achado de redução da MIF no soro após a ressecção cirúrgica do tumor sugere um possível papel da MIF como marcador sorológico para a detecção de CECB independente da extensão do tumor.

A concentração da MIF no soro correlacionou inversamente com metástase linfonodal, contrastando com relatos prévios de que a MIF induz a migração e o potencial invasivo das células tumorais. (FUNAMIZU et al., 2012; SUN et al., 2005) Entretanto, a concentração sorológica da MIF apareceu significativamente elevada nos indivíduos com LNI acima da mediana. O LNI foi calculado a fim de comparar as concentrações da proteína MIF na saliva e no soro a dados mais representativos da quantidade de tumor regional total presente no paciente, uma vez que o número de linfonodos metastáticos ou o diâmetro do maior linfonodo metastático isolados não parecem ser suficientemente representativos deste cenário. Embora o LNI não tenha mostrado associação estatisticamente significativa com o desfecho da doença, possivelmente devido ao baixo número de pacientes com acometimento linfonodal utilizados nesta análise (n=20) a distribuição dos pacientes segundo a ocorrência de recidiva, metástase à distância, segundo tumor primário e óbito apresentou tendência à maior frequência de pior desfecho nos pacientes com LNI acima da mediana.

A menor concentração sorológica da MIF apareceu associada também aos estádios patológicos mais avançados, provavelmente como consequência da associação com a presença de metástase linfonodal relatada acima.

Não houve associação da concentração sorológica da MIF com as demais variáveis clínicas e histopatológicas ou com o desfecho da doença, mas interessantemente, apenas os pacientes que permaneceram vivos e sem desenvolvimento de segundo tumor primário apresentaram redução pós-operatória dessa concentração. A manutenção de concentrações elevadas da MIF no soro após a ressecção do tumor poderia então representar o aumento do risco de morte ou de surgimento de novos tumores primários.

O presente estudo foi o primeiro a investigar a concentração da MIF em amostras de saliva e observou que altos níveis desta proteína estão presentes

tanto na saliva pré quanto pós-operatória em pacientes com CECB. Considerando que células de CECB secretam proteínas que podem ser eluídas na saliva, possivelmente por contato direto, o resultado esperado seria que a concentração da MIF diminuísse após a ressecção cirúrgica do tumor. Entretanto, essa redução não foi observada e a alta concentração da proteína MIF na saliva, após a ressecção cirúrgica do tumor, pode ter sido mantida devido à expressão constitutiva da MIF por células endócrinas, imunológicas e especialmente células epiteliais que estão em contato direto com o meio externo e regulam a resposta do hospedeiro às infecções e ao estresse. Padrões moleculares associados a patógenos e citocinas como TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*) e IFN- γ (*interferon-gamma*) são potenciais indutores da secreção da MIF por macrófagos e a vasta microbiota presente na cavidade bucal pode facilitar esse processo, mantendo uma alta concentração de MIF na saliva. (CALANDRA; ROGER, 2003)

Também a inflamação desencadeada pelo processo de cicatrização pode ter levado a manutenção da concentração elevada da MIF nas amostras de saliva mesmo após a ressecção do tumor. Entretanto, o intervalo mínimo de 20 dias após a cirurgia foi mantido para a coleta de amostras, e não um intervalo mais longo, porque após este período e conforme o tratamento planejado, alguns pacientes iniciam radioterapia ou quimioterapia pós-operatória, o que poderia também interferir nos resultados.

Menor concentração mediana da MIF na saliva pós-operatória foi observada nos pacientes que relataram hábito tabagista atual. Em estudo *in vitro* realizado por DAMICO et al. (2011), a fumaça de cigarro induziu a expressão e ativação de p53 desencadeando apoptose em células endoteliais pulmonares. Ainda, o mesmo estudo mostrou que a exposição à fumaça de cigarro aumentou a expressão também da proteína MIF nessas células, que agiu como um inibidor de p53 e consequentemente da apoptose induzida pelo tabaco. Então é possível que esse fenômeno tenha sido mascarado na saliva pré-operatória pela expressão marcante da MIF pelo tumor, mas que também as células do epitélio de revestimento da cavidade bucal apresentem superexpressão da MIF quando expostas à fumaça do tabaco e que esta

alteração possa participar dos diversos mecanismos carcinogênicos do tabaco já conhecidos.

Notavelmente, a concentração mediana da MIF apareceu significativamente elevada nos pacientes com tumores maiores, em estádios patológicos mais avançados da doença e, conseqüentemente, com GNI acima da mediana, quando comparados aos pacientes com tumores menores e em estádios patológicos iniciais. Considerando então os resultados que mostram a não redução da MIF na saliva após a ressecção do tumor, seria possível sugerir que a MIF pode não ser exclusivamente originária das células tumorais, e portanto não ser um bom marcador diagnóstico, mas pode também ser produzida por células endócrinas, imunológicas e epiteliais e isto pode contribuir com o desenvolvimento tumoral através de mecanismos previamente discutidos levando ao aumento da proliferação celular e do potencial invasivo e, conseqüentemente, ao avanço da doença.

Interessantemente, no estudo imunoistoquímico, foi possível observar em alguns espécimes cirúrgicos de pacientes com CECB que glândulas salivares com morfologia normal apresentam elevada expressão da proteína MIF e seu receptor CD74. Não há relatos na literatura sobre a secreção da MIF por glândulas salivares e seus possíveis mecanismos e funções, mas se a MIF presente na saliva é também produzida pelas glândulas salivares, conforme discutido acima, poderia da mesma maneira possuir ação pró-tumoral.

Em relação à avaliação do desfecho da doença e do prognóstico, foi observada maior concentração da MIF na saliva pré-operatória de pacientes que foram a óbito pela neoplasia quando comparada à dos pacientes ainda vivos. Os óbitos decorreram tanto de recidiva local quanto de recidiva regional da doença, o que não permite relacionar essa associação com os mecanismos específicos de indução da migração e invasão já descritos para a MIF. (FUNAMIZU et al., 2012; SUN et al., 2005) Ainda, maior concentração salivar da MIF pré-operatória apareceu associada também aos estágios pT3 e pT4, aos estádios patológicos mais avançados e conseqüentemente ao comprometimento das margens cirúrgicas por tumor, já que esta última foi predominante em tumores mais extensos. Então, a associação encontrada

entre a MIF na saliva pré-operatória e óbito pode ser decorrente da associação também com os estágios mais avançados da doença.

Contudo, quando observados isoladamente os casos nos estágios iniciais pT1 e pT2, aqueles com expressão elevada da proteína MIF apresentaram maior ocorrência de óbito pela neoplasia (25%) e recidiva da doença (12,5%) quando comparados ao grupo com baixa expressão da MIF, que não apresentou nenhum caso de morte pelo câncer ou recidiva e possuía 93,75% dos casos vivos sem doença.

Partindo dessas observações, é possível racionalizar que talvez a MIF não possua papel tão importante nos casos mais avançados de CECB porque estes já apresentam outros fatores prognósticos mais importantes como metástase linfonodal, e irresssecabilidade, por exemplo, enquanto os casos iniciais parecem sofrer maior influência da MIF no desenvolvimento tumoral e na evolução da doença.

O tempo de seguimento deste estudo prospectivo até o momento não foi suficiente para avaliar de maneira mais adequada a sobrevida, mas os resultados sugerem um papel potencial da MIF no desenvolvimento do CECB e estudos adicionais serão realizados posteriormente para confirmar esta associação.

Buscando investigar a expressão da proteína MIF e seu receptor de membrana, pelo qual, acredita-se, ela ativa vias de sinalização de crescimento e sobrevivência tais como MAPK e AKT, foi avaliado tecido tumoral e margem cirúrgica epitelial livre de neoplasia dos casos prospectivos utilizados na análise de soro e saliva e de casos retrospectivos selecionados com tecido parafinado disponível.

Os resultados mostraram expressão notavelmente maior da MIF em tecido tumoral em relação ao epitélio morfológicamente normal, o que concorda com os vários relatos na literatura de superexpressão da MIF em diferentes tipos de câncer, dentre eles carcinoma cervical, de ovário, colorretal e de nasofaringe, quando comparados ao tecido correspondente normal. (KROCKENBERGER et al.,2009; WU et al.,2009; HE et al.,2009; LIAO; BUCALA; MITCHELL, 2010)

Em 2005, Ren et al. relataram completa ausência de expressão da proteína MIF na margem normal e positividade em CEC de esôfago. Os resultados aqui

obtidos mostraram que a MIF apareceu expressa em metade das margens avaliadas e que a expressão no tumor ocorreu em quase 100% dos casos. (REN et al.,2005)

Recentemente, estudos publicados por um mesmo grupo demonstraram aumento progressivo de expressão entre epitélio normal, displasia de baixo grau, displasia de alto grau e carcinoma epidermoide de hipofaringe ou de laringe. (CLUOTS et al.,2010; KINDT et al.,2013)

No mesmo estudo de CEC de hipofaringe, a expressão da MIF foi predominantemente exclusiva no citoplasma (89%), mas marcação nuclear associada à citoplasmática também foi observada. (CLUOTS et al.,2010) Os resultados aqui apresentados também mostram expressão nuclear da MIF associada à citoplasmática tanto no tumor quanto no epitélio normal, porém isso ocorreu em maior proporção. Contudo, estudos mais específicos devem ser realizados a fim de confirmar a real presença e função dessa proteína no núcleo da célula.

Expressão tumoral elevada da MIF foi associada à etnia branca, mas o mesmo não ocorreu na margem, o que seria esperado se esta associação estivesse relacionada a polimorfismos no gene *Mif* responsáveis pelo aumento da expressão dessa proteína. Adicionalmente, no estudo em fase de finalização no laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis, dois dos principais polimorfismos descritos no promotor do gene *Mif* (rs755622 e rs5844572) e relacionados ao aumento de expressão da proteína, não apresentaram maior frequência na população de etnia branca.

Dentre as variáveis histopatológicas, a presença de infiltração vascular linfática apresentou associação significativa com a alta expressão da proteína MIF no tumor. Entretanto, a expressão da MIF no tumor não apareceu relacionada à presença de metástase linfonodal. É importante ressaltar que segundo o protocolo de rotina do Serviço de Anatomia Patológica, a análise da infiltração vascular é realizada considerando apenas a morfologia das células e estruturas, sem imunomarcagem específica. Então, os resultados referentes a essa variável devem ser analisados com cautela. Em estudos de carcinoma colorretal, de nasofaringe e de esôfago realizados previamente, a expressão tumoral da MIF foi diretamente relacionada com comprometimento de linfonodo

por tumor. (HE; CHEN; YANG, 2009; LIAO; BUCALA; MITCHELL, 2010; REN et al.,2005) Contudo, no único estudo prévio da MIF em câncer bucal até o momento essa associação não foi observada (KINDT et al.,2012)

Além disso, a maior expressão da MIF na margem epitelial livre de neoplasia apresentou associação significativa com menor espessura do tumor. Esse resultado vai contra o esperado devido aos mecanismos da MIF de indução da proliferação e invasividade. Porém, os mecanismos pró-invasivos e proliferativos da MIF geralmente estão associados à ação da MIF extracelular via CD74 e este último não apresentou relação com a espessura do tumor.

Da mesma maneira, a molécula CD74 não apareceu associada a nenhuma das variáveis clínicas e histopatológicas.

A expressão do CD74 na membrana das células epiteliais normais foi quase totalmente negativa e nas células tumorais foi positiva em aproximadamente metade dos casos. Em câncer de pulmão, o CD74 foi expresso em 67% dos tumores e sua co-localização com a proteína MIF foi observada por imunofluorescência. (MCCLELLAND et al.,2009)

No presente estudo não foi investigada a co-localização das proteínas por imunofluorescência, mas a expressão da MIF não apresentou associação com a expressão do CD74 quando comparadas as categorias admitidas. Como exemplo, os pacientes com alta expressão da MIF no tumor não tiveram tendência a serem positivos para CD74 no tumor e as demais correlações MIF tumor e MIF margem, MIF margem e CD74 tumor, MIF margem e CD74 margem não apresentaram correlação. Porém, todos os casos com CD74 positivo na margem eram positivos também no tumor e esta associação foi estatisticamente significativa. Se a positividade no tumor pode, através de sinalização molecular, induzir a positividade do CD74 na margem ou se sua positividade na margem é indicativa de transformação maligna ainda em nível molecular, são questões que devem ser investigadas mais cuidadosamente.

Ainda em relação à co-expressão e ação sinérgica da MIF e seu receptor CD74 no tumor ou na margem epitelial morfolologicamente normal, o agrupamento dos casos segundo a expressão da MIF e CD74 juntos não apresentou qualquer associação com variáveis clínicas, histopatológicas ou

desfecho da doença. Mas possivelmente, a pequena quantidade de pacientes devido a essa estratificação não permita uma visão real desse quadro.

Além disso, a expressão da molécula CD44, previamente descrita como co-ativadora da sinalização da MIF via CD74, pode ser importante para que esta ação sinérgica ocorra, o que ainda precisa ser investigado em CECB. (GORE et al., 2008; SHI et al., 2006)

A sobrevida global e livre de doença foi avaliada para a casuística analisando em conjunto os casos prospectivos e retrospectivos inseridos na análise imunoistoquímica deste estudo. O seguimento mínimo de 1 ano foi admitido devido ao curto período de seguimento dos casos prospectivos até o momento e embora o tempo ideal para cálculo de sobrevida em CEC de cabeça e pescoço seja de no mínimo 2 anos. Por outro lado, estudo recente observou em uma população semelhante à avaliada no presente trabalho, que a maioria das reincidências da doença ocorreram nos primeiros 12 meses após o tratamento. (PINTO et al., 2013)

A expressão tecidual da MIF ou CD74 no tumor ou na margem não apresentou impacto na sobrevida global ou livre de doença dos pacientes ou associação com o desfecho da doença. Porém todos os pacientes com ocorrência de segundo tumor primário durante o seguimento foram positivos para MIF na margem epitelial morfológicamente normal e essa associação foi marginalmente significativa. Kindt et al. encontraram associação entre a alta expressão da MIF em CECB e ocorrência de segundo tumor primário, mas também não observaram associação da MIF com sobrevida. (KINDT et al., 2012)

Interessantemente, o mesmo estudo anterior de CECB encontrou maior frequência de HPV de alto risco nos tumores com baixa expressão da MIF. O HPV tem sido apontado como importante fator de risco e de predição de prognóstico e de resposta ao tratamento em câncer de cabeça e pescoço, principalmente em CEC de orofaringe. Em CEC da cavidade bucal, a frequência e o papel do HPV ainda são controversos e precisam ser mais bem investigados e compreendidos. (RAUTAVA; SYRJÄNEN, 2012)

Este estudo não teve como objetivo avaliar o HPV em CECB, mas se este é realmente um fator importante para a progressão do CECB e se, conforme

observado por KINDT et al. (2012), a MIF é mais expressa nos tumores HPV negativos, isto seria indicativo de que a MIF pode estar mascarada nos casos HPV positivos e por isso apresentou papel prognóstico inconclusivo.

Em CEC de laringe, alta expressão da MIF correlacionou com maior sobrevida doença-específica (local e regional) e maior sobrevida global. (KINDT et al., 2013)

Então, apesar do consenso de que a MIF é altamente expressa em tecido tumoral em relação ao tecido equivalente normal em CEC de cabeça e pescoço e mais especificamente da cavidade bucal, sua correlação funcional com a tumorigênese e o comportamento biológico do tumor permanece não compreendida e pode variar entre os estágios da doença.

Demonstrando o papel complexo da MIF, em estudo de pacientes com CEC de cabeça e pescoço foi observada associação entre a baixa e alta expressão imunoistoquímica da MIF com pior sobrevida e expressão moderada com melhor sobrevida. Além disso, no mesmo estudo, alta expressão da proteína MIF no tumor foi positivamente associada com acometimento linfonodal, enquanto a baixa, que antes havia sido associada a pior sobrevida, e moderada expressão correlacionaram com ausência de metástase regional, importante indicador de melhor prognóstico em CEC de cabeça e pescoço. (SUZUKI et al., 2005)

Em câncer de mama, a expressão citoplasmática da proteína MIF em tecidos tumorais foi associada com melhor sobrevida, mas o estudo *in vitro* mostrou que células invasivas apresentavam maior expressão de CD74 na membrana levando ao aumento da proliferação em relação às células não invasivas. Estes resultados sugeriram que a MIF intracelular poderia inibir a proliferação celular e indicar um prognóstico favorável, enquanto a MIF extracelular derivada do tecido tumoral poderia via CD74 ser pró-inflamatória e representar prognóstico desfavorável. A ação da MIF intracelular parece dar-se através da inibição da Jab1/CSN5, um inibidor de p27, levando à inibição do ciclo celular, o que seria uma ação anti-tumoral dessa proteína. (KLEEMANN et al., 2000; VERJANS et al., 2009)

No presente estudo também foi observada tendência de maior expressão do CD74 em células com maior potencial invasivo.

Os resultados da presente investigação e os dados da literatura revelam que o papel da MIF na progressão e predição do prognóstico de diferentes neoplasias permanece controverso e que mais estudos são necessários para investigar seus diferentes mecanismos de ação, especialmente em relação à sua origem, se de tecidos saudáveis ou do tumor, e à sua localização na célula tumoral.

É importante citar que, como previamente reportado, a expressão da MIF foi induzida pela proteína *Epidermal Growth Factor* (EGF) em células de câncer de mama e também mostrou participar da via proliferativa ativada por EGF. (LIM et al.,2009) Como é sabido, até o momento, a via ativada por *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) é a principal associada ao desenvolvimento do CEC de cabeça e pescoço e investigar a associação da MIF e EGFR em CECB parece ser interessante. Ainda, como o CECB é uma doença bastante heterogênea, o papel da MIF como um biomarcador dessa neoplasia provavelmente será mais útil se associado com outros marcadores de conhecida importância no desenvolvimento e prognóstico do CECB, como outras citocinas e também proteínas da via EGFR por exemplo.

8. CONCLUSÕES

Os resultados do estudo da proteína MIF na presente casuística composta por pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade bucal permitem concluir que:

O carcinoma epidermoide da cavidade bucal apresenta expressão elevada da proteína MIF e do seu receptor de membrana CD74 em relação ao tecido epitelial livre de tumor adjacente.

Alta expressão da MIF no tumor está associada à presença de infiltração vascular linfática e alta expressão na margem epitelial normal apresenta associação com menor espessura do tumor, mas também tendência à associação com ocorrência de segundo tumor primário. A expressão do CD74, individual ou associada à expressão da MIF, não foi associada a nenhuma variável clínica ou histopatológica.

A concentração sorológica pré-operatória da proteína MIF em pacientes com CECB está inversamente associada à presença de metástase linfonodal e a estádios patológicos mais avançados da doença, variáveis de pior prognóstico em CECB.

Na saliva pré-operatória, maior concentração da proteína MIF está associada aos estágios pT3 e pT4 e a estádios patológicos avançados, indicadores de pior prognóstico em CECB. Também a ocorrência de óbitos pela neoplasia foi elevada nos pacientes com maior concentração salivar pré-operatória da MIF.

A concentração da proteína MIF foi significativamente reduzida no soro de pacientes com CECB após a ressecção do tumor, mas esta redução não foi observada na saliva, que não parece ser um bom biomarcador diagnóstico de CECB.

9. INFERÊNCIAS

Por fim, os achados de significativa redução na concentração sorológica da MIF nos pacientes após a ressecção cirúrgica do tumor permitem sugerir seu papel potencial como biomarcador para a detecção precoce de recorrência do CECB, mas um estudo de validação em longo prazo precisa ser realizado em um número maior de pacientes para avaliar a concentração sorológica da MIF em diferentes estágios da doença durante todo o período de seguimento ou incluindo a MIF em um painel de marcadores. A expressão tecidual da proteína MIF apresentou papel controverso nessa casuística, mas a elevada concentração salivar da proteína MIF parece possuir papel pró-tumoral potencial, sendo necessárias análises adicionais para um resultado conclusivo.

10. REFERÊNCIAS

Abe R, Peng T, Sailors J, Bucala R, Metz CN. Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol.* 2001; 166: 747-53.

Amin MA, Volpert OV, Woods JM, Kumar P, Harlow LA, Koch AE. Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circ Res.* 2003; 93: 321-29.

Babu SN, Chetal G, Kumar S. Macrophage Migration Inhibitory Factor: a Potential Marker for Cancer Diagnosis and Therapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13: 1737-44.

Bach JP, Rinn B, Meyer B, Dodel R, Bacher M. Role of MIF in Inflammation and Tumorigenesis. *Oncology.* 2008; 75: 127-33.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005.

Baugh JA, Chitnis S, Donnelly SC, Monteiro J, Lin X, Plant BJ, et al. A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 2002; 3: 170-6.

Baykul T, Yilmaz HH, Aydin U, Aydin MA, Aksoy M, Yildirim D. *Early Diagnosis of Oral Cancer.* J Int Med Res. 2010; 38: 737-49.

Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zernecke A, Koenen RR, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med.* 2007; 13: 587-96.

Beswick EJ, Reyes VE. CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol*. 2009; 15: 2855-61.

Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a Reaction in Vitro Associated with Delayed-Type Hypersensitivity. *Science*. 1966; 153: 80-2.

Boing AF, Antunes JL, Carvalho MB, de Góis Filho JF, Kowalski LP, Michaluart P Jr, et al. How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk? *J Epidemiol Community Health*. 2011; 1979: 1-6.

Brock SE, Rendon BE, Yaddanapudi K. Negative Regulation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Activity by MIF Family Members in NSCLC. *J Biol Chem*. 2012; 287: 37917-25.

Calandra T, Bernhagen JL, Mitchell RA, Bucala R: The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med*. 1994; 179: 1895-902.

Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 791-800.

Camlica H, Duranyildiz D, Oguz H, Oral EN, Yasasever V. The diagnostic value of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in gastric cancer. *Pathol Oncol Res*. 2008; 14: 79-83.

de Camargo Cancela M, Voti L, Guerra-Yi M, Chapuis F, Mazuir M, Curado MP. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head Neck*. 2010; 32: 357-67.

Chen YC, Zhang XW, Niu XH, Xin DQ, Zhao WP, Na YQ, Mao ZB. Macrophage migration inhibitory factor is a direct target of HBP1-mediated transcriptional repression that is overexpressed in prostate cancer. *Oncogene*. 2010; 29: 3067-78.

Choi S, Kim HR, Leng L, Kang I, Jorgensen WL, Cho CS, et al. Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Regulatory T Cell Response of Tumor-Bearing Mice. *J Immunol*. 2012; 189: 3905-13.

Close LG, Brown PM, Vuitch MF, Reisch J, Schaefer SD. Microvascular invasion and survival in cancer of the oral cavity and oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1989; 115:1304-9.

Cludts S, Decaestecker C, Johnson B, Lechien J, Leroy X, Kindt N, et al. *Anticancer Res*. 2010; 30: 3313-9.

Cooke G, Armstrong ME, Donnelly SC. Macrophage migration inhibitory factor (MIF), enzymatic activity and the inflammatory response. *Biofactors*. 2009; 35: 165-8.

Damico R, Simms T, Kim BS, Tekeste Z, Amankwan H, Damarla M, Hassoun PM. p53 mediates cigarette smoke-induced apoptosis of pulmonary endothelial cells: inhibitory effects of macrophage migration inhibitor factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011; 44: 323-32.

David J. R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Pathology*. 1966; 56: 72-7.

Denz A, Pilarsky C, Muth D, Rückert F, Saeger HD, Grützmann R. Inhibition of MIF leads to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Surg Res*. 2010; 160: 29-34.

Donn RP, Shelley E, Ollier WE, Thomson W; British Paediatric Rheumatology Study Group. A Novel 59-Flanking Region Polymorphism of Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Associated With Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis & Rheum.* 2001; 44: 1782-5.

Duffy SA, Taylor JM, Terrell JE, Islam M, Li Y, Fowler KE, et al. Interleukin-6 Predicts Recurrence and Survival Among Head and Neck Cancer Patients. *Cancer.* 2008; 113: 750-7.

Fang W, Li X, Jiang Q, Liu Z, Yang H, Wang S, Xie S, et al. Transcriptional patterns, biomarkers and pathways characterizing nasopharyngeal carcinoma of Southern China. *J Transl Med.* 2008; 6: 32.

Funamizu N, Hu C, Lacy C, Schetter A, Zhang G, He P, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Induces Epithelial to Mesenchymal Transition, Enhances Tumor Aggressiveness and Predicts Clinical Outcome in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2012; 132: 785-94.

Girard E, Strathdee C, Trueblood E, Quéva C. Macrophage migration inhibitory factor produced by the tumour stroma but not by tumour cells regulates angiogenesis in the B16-F10 melanoma model. *Br J Cancer.* 2012; 107: 1498-505.

Gore Y, Starlets D, Maharshak N, Becker-Herman S, Kaneyuki U, Leng L, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex. *J Biol Chem.* 2008; 283: 2784-92.

International Agency for Research on Cancer - World Health Organization. [Internet]. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [citado 03.fev.2014]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>

Gold DV, Stein R, Burton J, Goldenberg DM. Enhanced expression of CD74 in gastrointestinal cancers and benign tissues. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010; 4: 1-12.

Hamatake M, Yoshino I, Tomiyasu M, Miura N, Okazaki H, Ohba T, et al. Intratumoral expression of macrophage migration inhibitory factor is correlated with serum C-reactive protein and interleukin-6 in patients with non-small cell lung cancer. *Surg Today*. 2008; 38: 921-5.

Han I, Lee MR, Nam KW, Oh JH, Moon KC, Kim HS. Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor Relates to Survival in High-grade Osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. 2008; 466:2107-13.

Han J, Kioi M, Chu WS, Kasperbauer JL, Strome SE, Puri RK. Identification of potential therapeutic targets in human head & neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol*. 2009; 1: 27.

Hardman MJ, Waite A, Zeef L, Burow M, Nakayama T, Ashcroft GS. Macrophage migration inhibitory factor: a central regulator of wound healing *Am J Pathol*. 2005; 167:1561-74.

Hathaway B, Landsittel DP, Gooding W, Whiteside TL, Grandis JR, Siegfried JM, et al. Multiplexed Analysis of Serum Cytokines as Biomarkers in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Patients. *Laryngoscope*. 2005; 115: 522-7.

He XX, Chen K, Yang J, Li XY, Gan HY, Liu CY, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer. *Mol Med*. 2009; 15: 1-10.

Hira E, Ono T, Dhar DK, El-Assal ON, Hishikawa Y, Yamanoi A, Nagasue N. Overexpression of Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces Angiogenesis and Deteriorates Prognosis after Radical Resection for Hepatocellular Carcinoma. *Cancer*. 2005; 103: 588-98.

Hu S, Arellano M, Boonthung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, et al. Salivary Proteomics for Oral Cancer Biomarker Discovery. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 6246-52.

Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med*. 1999; 190: 1375-82.

Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol*. 2010; 2: 9.

Kamimura A, Kamachi M, Nishihira J, Ogura S, Isobe H, Dosaka-Akita H, Ogata A, et al. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 2000; 89: 334-41.

Kindt N, Lechien J, Decaestecker C, Rodriguez A, Chantrain G, Remmelink M, et al. Expression of macrophage migration-inhibitory factor is correlated with progression in oral cavity carcinomas. *Anticancer Res*. 2012; 32: 4499-505.

Kindt N, Preillon J, Kaltner H, Gabius HJ, Chevalier D, Rodriguez A, et al. Macrophage migration inhibitory factor in head and neck squamous cell carcinoma: clinical and experimental studies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013; 139:727-37.

Kirita T, Okabe S, Izumo T, Sugimura M. Risk factors for the postoperative local recurrence of tongue carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*. 1994; 52: 149-54.

Kleemann R, Hausser A, Geiger G, Mischke R, Burger-Kentischer A, Flieger O, et al. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature*. 2000; 408: 211-6.

Krockenberger M, Engel JB, Kolb J, Dombrowsky Y, Häusler SF, Kohrenhagen N, et al. Macrophage migration inhibitory factor expression in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010; 136: 651-7.

Lee H, Rhee H, Kang HJ, Kim HS, Min BS, Kim NK, Kim H. Macrophage migration inhibitory factor may be used as an early diagnostic marker in colorectal carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2008; 129: 772-9.

Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, et al. MIF Signal Transduction Initiated by Binding to CD74. *J Exp Med*. 2003; 197: 1467-76.

Li GQ, Xie J, Lei XY, Zhang L. Macrophage migration inhibitory factor regulates proliferation of gastric cancer cells via the PI3K/Akt pathway. *World J Gastroenterol*. 2009; 15: 5541-8.

Liao H, Bucala R, Mitchell RA. Adhesion-dependent Signaling by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *J Biol Chem*. 2003; 278: 76–81.

Lim S, Choong L, Kuan CP, Yunhao C, Lim Y. Regulation of Macrophage Inhibitory Factor (MIF) by Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in the MCF10AT Model of Breast Cancer Progression. *J Proteome Res*. 2009; 8: 4062-76.

Liu H, Chen G, Zhang W. et al. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor in adenoid cystic carcinoma: correlation with enhanced metastatic potential. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013; 139: 287-95.

Liu L, Ji C, Chen J. et al. A global genomic view of MIF knockdown-mediated cell cycle arrest. *Cell Cycle* , 2008; 7: 1678-92.

Maharshak N, Cohen S, Lantner F, Hart G, Leng L, Bucala R, Shachar I. CD74 is a survival receptor on colon epithelial cells. *World J Gastroenterol*. 2010; 16: 3258-66.

Marques LA, Eluf-Neto J, Figueiredo RA, Góis-Filho JF, Kowalski LP, Carvalho MB, et al. Oral health, hygiene practices and oral cancer. *Rev Saúde Pública*. 2008; 42: 471-9.

McClelland M, Zhao L, Carskadon S, Arenberg D. Expression of CD74, the receptor for macrophage migration inhibitory factor, in non-small cell lung cancer. *Am J Pathol*. 2009; 174: 638-46.

Merk M, Zierow S, Leng L, Das R, Du X, Schulte W, et al. The D-dopachrome tautomerase (DDT) gene product is a cytokine and functional homolog of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: E577-85.

Meyer-Siegler KL, Bellino MA, Tannenbaum M. Macrophage Migration Inhibitory Factor Evaluation Compared with Prostate Specific Antigen as a Biomarker in Patients with Prostate Carcinoma. *Cancer*. 2002; 94: 1449-56.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Mitchell R.A. Mechanisms and effectors of MIF-dependent promotion of tumourigenesis. *Cell Signal*. 2004; 16: 13-9.

Mohri Y, Mohri T, Wei W, Qi YJ, Martin A, Miki C, et al. Identification of macrophage migration inhibitory factor and human neutrophil peptides 1-3 as potential biomarkers for gastric cancer. *Br J Cancer*. 2009; 101: 295-302.

Morand E. F. New therapeutic target in inflammatory disease; macrophage migration inhibitory factor. *Intern Med J*. 2005; 35: 419-26.

Muramaki M, Miyake H, Yamada Y, Hara I. Clinical utility of serum macrophage migration inhibitory factor in men with prostate cancer as a novel biomarker of detection and disease progression. *Oncol Rep*. 2006; 15: 253-7.

Nagata S, Jin YF, Yoshizato K, Tomoeda M, Song M, Iizuka N, et al. CD74 is a Novel Prognostic Factor for Patients with Pancreatic cancer receiving Multimodal Therapy. *Ann Surg Oncol*. 2009; 16: 2531-8.

National Institutes of Health - NIH [Internet]. Fact sheet - Oral Cancer; [atualizado out.2010; citado 17.fev.2013]. Research Portfolio Online Reporting Tools; [aproximadamente 3 telas]. Disponível em: <http://report.nih.gov/nihfactsheets/ViewFactSheet.aspx?csid=106>.

OMIM [Internet]. MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR (153620). [atualizado 04.abr.2008; citado 07.ago.2010]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/153620>.

Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol*. 2009; 4: 49-70.

OMS - Organização Mundial da Saúde. CID-10 Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde. 10a rev. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1997. vol.1.

OMS - Organização Mundial da Saúde. CID-10 Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde. 10a rev. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1997. vol.2.

Palka KT, Slebos RJ, Chung CH. Update on molecular diagnostic tests in head and neck cancer. *Semin Oncol*. 2008; 35: 198-210.

Petrenko O, Moll UM. Macrophage migration inhibitory factor MIF interferes with the Rb-E2F pathway. *Mol Cell*. 2005; 17: 225-36.

Pinto FR, de Matos LL, Palermo FC, Kulcsar MA, Cavalheiro BG, de Mello ES, et al. Tumor thickness as an independent risk factor of early recurrence in oral cavity squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013. [Epub ahead of print]

Purdue MP, Hashibe M, Berthiller J, La Vecchia C, Dal Maso L, Herrero R, et al. Type of alcoholic beverage and risk of head and neck cancer--a pooled analysis within the INHANCE Consortium. *Am J Epidemiol*. 2009; 169: 132-42.

Rahima B, Shingaki S, Nagata M, Saito C. Prognostic significance of perineural invasion in oral and orofaryngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97: 423-31.

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

Repp AC, Mayhew ES, Apte S, Niederkorn JY. Human uveal melanoma cells produce macrophage migration-inhibitory factor to prevent lysis by NK cells. *J Immunol*. 2000; 165: 710-5.

Ren Y, Law S, Huang X, Lee PY, Bacher M, Srivastava G, Wong J. Macrophage migration inhibitory factor stimulates angiogenic factor expression and correlates with differentiation and lymph node status in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg*. 2005; 242: 55-63.

Rendon BE, Willer SS, Zundel W, Mitchell RA. Mechanisms of macrophage migration inhibitory factor (MIF)-dependent tumor microenvironmental adaptation. *Exp Mol Pathol*. 2009; 86: 180-5.

Sanchez-Zamora Y, Terrazas LI, Vilches-Flores A, Leal E, Juárez I, Whitacre C, et al. Macrophage migration inhibitory factor is a therapeutic target in treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FASEB J*. 2010; 24: 2583-90.

Schrader J, Deuster O, Rinn B, Schulz M, Kautz A, Dodel R, Meyer B, et al. Restoration of contact inhibition in human glioblastoma cell lines after MIF knockdown. *BMC Cancer*. 2009; 9: 464.

Sharma P, Shah SV, Taneja C, Patel AM, Patel MD. A prospective study of prognostic factors for recurrence in early oral tongue cancer. *J Clin Diagn Res*. 2013; 7: 2559-62.

Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, et al. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*. 2006; 25: 595-606.

Slootweg PJ, de Pagter M, de Weger RA, de Wilde PC. Lymphocytes at tumor margins in patients with head and neck cancer. Relationship with tumor size, HLA molecules and metastases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1994; 23: 286-9.

Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer (UICC) TNM classification of malignant tumours. 6th ed. New York: Wiley; 2002.

Solomon MC, Carnelio S, Gudattu V. Molecular analysis of oral squamous cell carcinoma: a tissue microarray study. *Indian J Cancer*. 2010; 47: 166-72.

Sun B, Nishihira J, Yoshiki T, Kondo M, Sato Y, Sasaki F, Todo S. Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Tumor Invasion and Metastasis via the Rho-Dependent Pathway. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 1050-8.

Sun HW, Swope M, Cinquina C, Bedarkar S, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E. The subunit structure of human macrophage migration inhibitory factor: evidence for a trimer. *Protein Eng*. 1996; 9: 631-5.

Suzuki F, Nakamaru Y, Oridate N, Homma A, Nagahashi T, Yamaguchi S, Nishihira J, et al: Prognostic significance of cytoplasmic macrophage migration inhibitory factor expression in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with concurrent chemoradiotherapy. *Oncol Rep.* 2005; 13: 59-64.

Tai SK, Li WY, Yang MH, Chu PY, Wang YF. Perineural invasion in T1 oral squamous cell carcinoma indicates the need for aggressive elective neck dissection. *Am J Surg Pathol.* 2013; 37: 1164-72.

Takes R. P, Rinaldo A, Rodrigo J. P. et al. Can biomarkers play a role in the decision about treatment of the clinically negative neck in patients with head and neck cancer? *Head Neck.* 2008; 30: 525-38.

Tas F, Karabulut S, Serilmez M, Ciftci R, Duranyildiz D. Serum levels of macrophage migration-inhibitory factor (MIF) have diagnostic, predictive and prognostic roles in epithelial ovarian cancer patients. *Tumour Biol.* 2013. [Epub ahead of print]

Tian B, Zhang Y, Li N, Liu X, Dong J. CD74: a potential novel target for triple-negative breast cancer. *Tumour Biol.* 2012; 33: 2273-7.

Tomiyasu M, Yoshino I, Suemitsu R, Okamoto T, Sugimachi K. Quantification of macrophage migration inhibitory factor mRNA expression in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 3755-60.

Verjans E, Noetzel E, Bektas N, Schütz AK, Lue H, Lennartz B, et al: Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *BMC Cancer.* 2009; 9: 230.

Wu HM, Zhu SL, He LJ, Liu YH, Xie D. Clinical significance of macrophage migration inhibitory factor in invasion of ovarian cancer. *Chinese Journal of Cancer.* 2009; 28: 1054-60.

Xia HH, Yang Y, Chu KM, Gu Q, Zhang YY, He H, Wong WM, et al. Serum macrophage migration-inhibitory factor as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *Cancer*. 2009; 115: 5441-9.

Xia HH, Zhang ST, Lam SK, Lin MC, Kung HF, Wong BC. Expression of macrophage migration inhibitory factor in esophageal squamous cell carcinoma and effects of bile acids and NSAIDs. *Carcinogenesis*. 2005; 26: 11-5.

Yasasever V, Camlica H, Duranyildiz D, Oguz H, Tas F, Dalay N. Macrophage migration inhibitory factor in cancer. *Cancer Invest*. 2007; 25: 715-9.

11. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Bucala R. MIF: Most Interesting Factor. Toh Tuck Link: World Scientific Publishing Company; 2007.

Bucala R. The MIF handbook. Toh Tuck Link: World Scientific Publishing Company; 2012.

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de Identificação do paciente

Nome: _____

Sexo: F () M () Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: (____) _____

Título do estudo:

“AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO FATOR INIBITÓRIO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF) COMO MARCADOR PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DA CAVIDADE BUCAL”.

Natureza e objetivo do estudo:

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo a ser realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis relacionado ao carcinoma epidermóide, um tipo de câncer que pode ocorrer em várias localizações da boca e da garganta.

Algumas substâncias presentes nos tumores, no sangue e na saliva de pacientes com carcinoma epidermóide da boca podem estar relacionadas a um melhor ou pior resultado do tratamento da doença.

Esta pesquisa tem por objetivo estudar o papel de uma substância chamada MIF no carcinoma epidermóide da boca e para isso solicita participação voluntária de pacientes com essa doença.

Os materiais biológicos, bem como as informações coletadas durante esse estudo poderão, se autorizado por você, ser utilizados em pesquisas futuras com o objetivo de estudar e buscar melhorias no diagnóstico e tratamento do câncer de cabeça e pescoço.

Procedimentos do estudo:

Para esse estudo serão colhidas amostras do tumor retirado de você durante a cirurgia, bem como amostras de sangue e de saliva durante o seu tratamento e acompanhamento.

Riscos e Benefícios:

Estes materiais serão armazenados no Laboratório de Biologia Molecular para a pesquisa científica. O uso destes materiais não implicará riscos adicionais para você, nem exigirá que se submeta a qualquer outro procedimento.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis sob o nº 756 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina do ABC sob o nº 055/2011 e todo estudo que vier a utilizar este material será previamente apresentado à apreciação destes Comitês.

Não haverá benefícios imediatos decorrentes desta pesquisa para os participantes. Apesar disso, os resultados poderão beneficiar, no futuro, outros pacientes.

Se os resultados obtidos em relação à análise genética trouxerem benefícios em relação ao diagnóstico ou prognóstico da doença, asseguraremos o contato com os pacientes envolvidos. Caso se faça necessário, também será realizado o aconselhamento genético, conforme a resolução nº. 441 do Conselho Nacional de Saúde (12 de maio de 2011).

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, assine este termo de consentimento e em caso de dúvida ligue para os pesquisadores responsáveis Dr. Marcos Brasilino de Carvalho (Hospital Heliópolis) e Dra Jossi Ledo Kanda (Faculdade de Medicina do ABC) nos telefones 2914-5576 / 2067-0569 /. Você poderá retirar o consentimento para pesquisa em qualquer época e sua recusa ou aceitação em participar não alterará em nada em seu tratamento.

Confidencialidade dos registros:

Nesse estudo somente suas iniciais e um número especial do estudo identificarão você.

Caso os resultados do estudo sejam publicados ou apresentados em congresso médico a confidencialidade das informações será garantida e sua identidade não será revelada.

TERMO DE PARTICIPAÇÃO E ASSINATURA

Eu aceito participar do estudo: *“AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO FATOR INIBITÓRIO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF) COMO MARCADOR PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DA CAVIDADE BUCAL”* e declaro que li e não tenho nenhuma dúvida sobre o esclarecido acima.

Autorizo também o uso das informações obtidas na pesquisa em publicações em revista médicas e apresentações em congressos (desde que meus dados de identificação pessoal sejam mantidos em sigilo).

() Declaro que será necessário novo termo de consentimento a cada pesquisa futura que venha a utilizar os materiais biológicos e informações coletados.

() Declaro que estou de acordo com a dispensa de novo termo de consentimento a cada pesquisa futura que venha a utilizar os materiais biológicos e informações coletados, após análise e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis.

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador

Versão 2.0 de 05 de abril de 2012.

Apêndice B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - Hospital Heliópolis

UGA I – UNIDADE DE GESTÃO ASSISTENCIAL – HOSPITAL HELIÓPOLIS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 14 de Setembro de 2010.

Ao Prezado

Dr. Marcos Brasilino de Carvalho.

APROVAÇÃO

Referente: **"Avaliação da expressão do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) como marcador prognóstico em pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade bucal"**.

Registro CEP: 756.

Vimos por meio desta declarar que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis **avaliou e aprovou**, em reunião plenária ocorrida em 14/09/2010 o estudo supracitado, tendo como autor o Dr. Marcos Brasilino de Carvalho e como relator o Dr. Cristiano Augusto de Freitas Zerbini.

OBS: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis segue a Resolução 196/96 CNS/MS e as demais normas e legislações pertinentes a Pesquisa Clínica em nosso país, bem como a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP).

Lembramos que é obrigatório o envio de relatório anual e final do estudo para este Comitê de Ética em Pesquisa.

Estamos a disposição para quaisquer esclarecimentos.

Atenciosamente,

Dr. Odilon Victor Porto Denardin
Coordenador CEP
Comitê de Ética em Pesquisa
HOSPITAL HELIÓPOLIS

Dr. Odilon Victor Porto Denardin.
Coordenador do CEP Heliópolis

Rua Cônego Xavier, 276 – 10º Andar - Sacomã – São Paulo – CEP 04231-030.
Fone: 2215-1001 / 2274-7600 ramal 409 / Fax: 2062-6764
E-mail: cep_heliopolis@yahoo.com.br

Apêndice C - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - FMABC

Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Medicina do ABC

Mantida pela Fundação do ABC

Santo André, 29 de Junho de 2011.

PROTOCOLO CEP/FMABC, REGISTRADO SOB O Nº. 055/2011.

Ilmo(a). Sr(a).

JOSSI LEDO KANDA

Prezado (a) Senhor (a):

Projeto de Pesquisa Intitulado: **"AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO FATOR INIBITÓRIO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF) COMO MARCADOR PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DA CAVIDADE BUCAL."**

Vimos por meio desta, informar que em reunião do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina do ABC, realizada em **22/06/2011**, foi **aprovado** o protocolo de pesquisa acima mencionado.

O Comitê de Ética em Pesquisa da FMABC, em obediência à Resolução 196/96, deverá encaminhar a CONEP/MS, relatórios anuais dos projetos de pesquisa que encontram-se em andamento. Solicitamos informar sobre o andamento do seu projeto anualmente isto é, se já foi concluído, suspenso ou se ainda está em andamento: neste último caso comunicar qual o tempo previsto para a conclusão do mesmo, e encaminhar breve resumo dos resultados obtidos no estudo.

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos com os protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Márcia R. G. Tamosauskas
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FMABC

Apêndice D - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - FMUSP

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 16 de Março de 2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 322/10 intitulado: “**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO FATOR INIBITÓRIO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF) COMO MARCADOR PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DA CAVIDADE BUCAL**” apresentado pelo Departamento de RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Marcos Brasilino de Carvalho

Pesquisador (a) Executante: Mariana Barbosa de Souza

CEP-FMUSP, 16 de Março de 2011.

**Prof. Dr. Daniel Romero Muñoz
Vice-coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa**