



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Brena Luize Cunha Ferreira**

**Determinação da relação de novo biomarcador (IMP3)  
no Carcinoma de Nasofaringe**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio  
de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para  
obtenção do título de Mestre(a) em Patologia

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Maria Aparecida Custódio Domingues  
Coorientador: Prof. Dr. Victor Nakajima

**Botucatu  
2015**

Brena Luize Cunha Ferreira

Determinação da relação de novo biomarcador (IMP3)  
no Carcinoma de Nasofaringe

Dissertação apresentada à Faculdade  
de Medicina, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Botucatu, para obtenção do  
título de Mestre(a) em Patologia.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Maria Aparecida Custódio Domingues  
Coorientador: Prof. Dr. Victor Nakajima

Botucatu  
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ferreira, Brena Luize Cunha.

Determinação da relação de novo biomarcador (IMP3) no carcinoma de nasofaringe / Brena Luize Cunha Ferreira. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria Aparecida Custódio Domingues

Coorientador: Victor Nakajima

Capes: 40101045

1. Aparelho respiratório - Doenças. 2. Nasofaringe - Câncer - Prognóstico. 3. Marcadores biológicos de tumor.

Palavras-chave: Biomarcador; Carcinoma de nasofaringe; IMP3; Prognóstico.

Dedico este trabalho aos que Deus confiou meu coração:  
Meus pais, Lázaro e Jocelina Ferreira, meus irmãos, Thiago e Raissa, e ao meu  
marido, Marcelo Uratani.

## Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues, o meu agradecimento especial e incondicional, pela sua dedicação e empenho, sem os quais certamente não realizaria este desafio. De uma maneira paciente e perspicaz, ensinou-me a buscar a verdade científica através de sua motivação.

*“Porque a bondade pode ser o maior sinal de força...”*

Ao Dr. Odair Michelin, sem o qual não teria dado os primeiros passos em direção à procura pelo mestrado.

À Dra. Bárbara Estefania López pelo grande apoio. Sua contribuição foi fundamental para este trabalho.

À experiência de vida dada pela Residência de Oncologia Clínica da Unesp. Por encontrar, entre os colegas residentes, irmãos de alma. Pelos funcionários da quimioterapia que se tornaram grandes amigos. Pela oportunidade em cuidar de pacientes que ensinaram-me a ser uma pessoa melhor.

## SUMÁRIO

Lista de abreviações e siglas

Resumo

Abstract

<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	1
<b>1. CARCINOMA DE NASOFARINGE</b> .....	2
1.1 Definição.....	2
1.2 Epidemiologia e Fatores de Risco.....	3
1.3 Apresentação Clínica e Morfologia.....	5
1.4 Tratamentos.....	6
1.5 Fatores Prognósticos.....	7
<b>2. O IMP3</b> .....	9
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	12
<b>OBJETIVOS</b> .....	16
1. Objetivo geral.....	17
2. Objetivos específicos.....	17
<b>ARTIGO</b> .....	18
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	33
CONCLUSÕES.....	41
<b>ANEXOS</b> .....	43
ANEXO 1.....	44
ANEXO 2.....	45
ANEXO 3.....	46
ANEXO 4.....	47

## Lista de abreviações e siglas

ABCG2: *ATP-binding cassette sub-family G member 2*

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

CNF: carcinoma de nasofaringe

CEC: carcinoma escamocelular

CENCI: carcinoma escamoso nãoqueratinizante indiferenciado

EBV: *Epstein Barr Virus*

FFPE: fixado em formalina e embebido em parafina

HMG2: *high-mobility group AT-hook 2*

HNRNPMs: *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*

IGFII: *insulin-like growth factor II*

IMP3: *insulin-like growth factor mRNA binding protein 3*

MMP-1: metaloproteinase-1

mRNA: RNA mensageiro

OMS: Organização Mundial de Saúde

PDPN: podoplanina

RNA: *ribonucleic acid*

TNM: *Tumor, Lymphonodes, Metastasis*

## RESUMO

**Introdução:** O Carcinoma de Nasofaringe (CNF) é uma neoplasia epitelial maligna agressiva, com principal incidência entre homens de 40-60 anos de idade, com distribuição geográfica e étnica variada. Está associado à infecção pelo *Epstein-Barr Virus* (EBV), e a presença deste nas células tumorais parece ter impacto no prognóstico. Porém, outros fatores que podem estar relacionados ao desfecho do CNF, têm sido pesquisados. O biomarcador IMP3, proteína de ligação ao mRNA que tem reconhecida função na ação das células tumorais, vem sendo analisado como um marcador factível correlacionado com a sobrevida global nos pacientes com câncer.

**Métodos:** Para explorar a expressão do IMP3 nas amostras tumorais de pacientes com CNF vistos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, foram compilados 35 prontuários e documentados de acordo com as características morfológicas e tempo de sobrevida. A expressão imunohistoquímica foi mensurada e correlacionada com os diversos parâmetros clínico-patológicos.

**Conclusão:** mostrou-se elevado índice de recidiva e morbimortalidade, com grande número de casos avançados ao diagnóstico, e potencial correlação de melhor prognóstico com a alta expressão do marcador analisado.

**Impacto:** Um melhor entendimento do IMP3 como biomarcador, proporcionando novas perspectivas no prognóstico do carcinoma de nasofaringe.

**Palavras-chave:** carcinoma de nasofaringe, biomarcador, IMP3, prognóstico.



## **ABSTRACT**

**Background:** The nasopharyngeal carcinoma (NPC) is an aggressive malignant epithelial neoplasm, mainly prevalent among 40-60-year-old men, with varied geographic and ethnic distribution. It is associated with Epstein Barr Virus (EBV), whose presence in the tumor cell seems to impact the prognosis. However, other factors that may be related to NPC's clinical impact and have been studied. The IMP3 biomarker, a mRNA binding protein, which has a recognized role in the tumor cell formation, has been analyzed as a feasible marker correlated to the overall survival of cancerpatients. Given this evidence, the object of this research is analyze possible correlation of this biomarker to the clinical out come of these patients. **Methods:** To explore the IMP3 expression in the CNF patients' tumor samples seen at the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina in Botucatu-UNESP, were compiled 35 cases and documented in basis of their morphological features and status of life. The immunohistochemical expression was measured and correlated with the several clinic-pathologic parameters. **Results:** The analysis showed high rates of relapse and mortality, also a significant number of local advanced tumors at diagnosis, and potential correlation of better prognosis with the high expression of the biomarkeranalyzed.

**Impact:** A betterunderstandingof IMP3 as a biomarker, providing new routesofprognosis in nasopharynx carcinoma.

**Key-words:** nasopharynx carcinoma, biomarker, IMP3, prognostic.

**REVISÃO DE LITERATURA**

---

# CARCINOMA DE NASOFARINGE

## Definição

O câncer de cabeça e pescoço compreende um grupo heterogêneo de tumores que envolvem pele, lábios, glândula salivar, seios da face, cavidade oral, faringe e laringe (DAVIES; WELCH, 2006). A neoplasia maligna mais comum de cabeça e pescoço é o Carcinoma Escamoso (CEC), que se origina da superfície cutânea e mucosa da laringe, boca e nasofaringe e constitui 90% destas neoplasias (CHIN et al., 2006). Atualmente é a sexta neoplasia mais prevalente no mundo, com 900.000 casos novos diagnosticados anualmente (HOFFMAN et al, 1998; JEMAL et al, 2010). Sua gênese envolve fatores de risco conhecidos, como tabaco, álcool, vírus e, dos cânceres humanos, é o que desenvolve maior grau de estresse, devido à complexidade dos sítios anatômicos envolvidos e consequente perda funcional (TERRELL et al, 2004; CHIN et al, 2006). A nasofaringe ( sinônimo de rino-faringe e *cavun*) é conceituada como a parte exclusivamente respiratória da laringe. É revestida por epitélio de padrão respiratório, com focos de epitélio escamoso. O estroma é rico em tecido linfóide e conjuntivo denso (LAMPS et al, 2013).A neoplasia maligna mais comum da nasofaringe é o Carcinoma de Nasofaringe (CNF). Este é conceituado como neoplasia epitelial maligna, com evidências à microscopia óptica e eletrônica de diferenciação escamosa (BARNES et al, 2005).

## **Epidemiologia e fatores de risco**

O CNF possui uma distribuição geográfica e racial distinta e uma etiologia multi-fatorial (YU; YUAN, 2002). No ano 2000, observou-se 65.000 novos casos globalmente, e 38.000 mortes por esta neoplasia. Espera-se 80.000 casos novos e 50.000 mortes em decorrência desta neoplasia, mundialmente, no ano de 2016 (PETERSON, 2015). Curiosa é sua distribuição geográfica: enquanto em algumas regiões é uma neoplasia muito rara, perfazendo 0,6% de todos os cânceres, em outras regiões possui incidência alta (China, Tailândia, Filipinas, Vietnam, Norte da África - Argélia e Marrocos - Canadá e Alaska). Nestas populações, há uma alta heterogeneidade de linhagens étnicas (CHU et al, 1975; PARKIN et al, 2003). É raro na América do Norte e em europeus de origem caucasiana (PARKIN et al, 2003). Nos Estados Unidos da América a incidência é de 1 caso para 100.000 indivíduos, com distribuição por sexo de 2,4 para 1 em relação sexo masculino e feminino. O pico de incidência está entre 50 e 59 anos (BUELL, 1973). Nos países de maior incidência, como em Hong Kong, 1 a cada 40 homens desenvolvem CNF antes dos 75 anos de idade, sendo muitas vezes, considerado uma doença de asiáticos (LANDRY; GLASTONBURY, 2015). O pico de maior incidência ocorre após os 30 anos, entre os 40-60 anos com declínio após esta idade (YU; YUAN, 2002).

Geralmente, a população que migra das áreas de alto para baixo risco retém o risco muito elevado observado em seu país de origem e este diminui nas gerações sucessivas (PARKIN et al, 2003). A heterogeneidade étnica pode estar associada a vários fatores de possível ação combinada, inclusive o grau de predisposição genética e a prevalência de certos fatores de risco relacionados ao estilo de vida. Esta distribuição geográfica e demográfica, tão específica do CNF, reflete a ligação da

suscetibilidade genética, infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e fatores ambientais (dietéticos e não dietéticos) como causas desta doença (LANDRY et al, 2015). Interessante a associação desta neoplasia com uso de incenso, que contém em sua composição, hidrocarbono aromático policíclico, associados à carcinogênese (YAN; LIN; CHANG, 2007). A constante associação do EBV com CNF, independente da etnia, indica a importância deste vírus como oncogene neste tumor. Nas evidências desta associação incluem: 1) altos níveis de IgA dirigida ao EBV em pacientes com CNF e massa tumoral *bulk* comparados com grupo controle; 2) presença do DNA viral ou RNA em praticamente todas as células tumorais; 3) presença da forma episomal clonal do EBV, indicando que o vírus penetra na célula tumoral antes da expansão clonal; e 4) presença do EBV na lesão precursora do CNF, mas não no epitélio normal da nasofaringe (GABUSI, 2001).

Fatores ambientais, relacionados com a dieta, estão fortemente associados ao uso das nitrosaminas voláteis para preservar os alimentos. Estas substâncias são utilizadas no processo de conservação caseira do peixe. Alimentos fermentados, quando consumidos na infância, podem também exercer um papel importante na origem desta neoplasia (BANES et al, 2005). Outros fatores de risco estão envolvidos como: tabagismo, exposição ocupacional ao cigarro, fumaças químicas e poeira, exposição ao formoldeído e a irradiação (YAN; LIN; CHANG, 2007; HILDESHEIM et al, 2001).

## **Apresentação Clínica e Morfologia**

A localização mais comum do CNF é a fossa de Rosemüller e metástases linfonodais são comuns (BERGIN, 2010). Clinicamente pode ser assintomático em 10% dos pacientes; dor e aumento dos linfonodos cervicais são uns dos sintomas mais comuns. Cerca de 50% dos pacientes queixam de sangramento nasal e perda do olfato. Sintomas relacionados à obstrução da Trompa de Eustáquio podem ser observados, assim como otite média obstrutiva (BREDA, 2007).

O diagnóstico é realizado através da associação dos exames de imagem da nasofaringe complementados com biópsia da lesão (LANDRY et al, 2015). O aspecto morfológico pode variar, conforme descrito na classificação da Organização Mundial de Saúde de 2005 (BANES et al, 2005). O CNF é classificado nos subtipos histológicos: carcinoma escamoso ceratinizante, não ceratinizante; este pode ser diferenciado ou indiferenciado. Existe ainda o subtipo Basalóide que perfaz menos que 0,2% dos casos (PETERSON, 2015). O subtipo mais comum é o carcinoma escamoso não ceratinizante indiferenciado (CENCI) que perfaz cerca de 92% dos casos. Nestes, a associação com EBV é de 100% (NIEDOBITECK et al, 1993). Recentemente, sob o ponto de vista etiológico, uma alternativa simplificada desta classificação foi proposta, dividindo-se o CNF em dois tipos histológicos, carcinomas de células escamosas (CEC) e carcinoma indiferenciado da nasofaringe (tipo CENCI) (TOMOKAZ et al, 2012). Esta classificação correlaciona-se com testes sorológicos para o vírus EpsteinBarr. Os pacientes com CEC apresentam um título menor de EBV, enquanto que aqueles com CENCI possuem títulos elevados. Esta classificação é mais aplicável para pesquisas epidemiológicas e

demonstra valor prognóstico. Os últimos têm alta taxa de controle local, porém desenvolvem metástases precocemente (TOMOKAZU et al, 2012; CHOO et al, 2008). O CNF se caracteriza por sua notória agressividade, com extensivo crescimento loco-regional, infiltração, metástase linfonodal e disseminação hematogênica. Erosão da base do crânio e seios paranasais, infiltração de nervos cranianos e extensão para estruturas mais distantes (fossa infratemporal, órbita, hipofaringe) pode ocorrer nos casos avançados. Os sítios mais comuns de disseminação à distância são os ossos, o pulmão, o fígado e os linfonodos (YANG et al, 1996). Seu estadiamento é realizado segundo o sistema TNM (*Tumor, Lymphonodes, Metastasis*), elaborado pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (EDGE et al, 2010), sendo esta classificação a base para a manejar a escolha terapêutica e aventar possíveis prognósticos.

## **Tratamentos**

O tratamento definitivo nos estádios iniciais do CNF é a radioterapia. A preferência desta em detrimento a cirurgia deve-se pela dificuldade em se obter margem cirúrgica livre, levando a morbidade funcional (SUN et al, 2014). Com essa modalidade de terapia, obtém-se taxas de sobrevida global de 100% para estadio I e 94,3% para estadio II (CHAN et al, 2012). Nos estádios mais avançados, III e IV, o tratamento preconizado é de quimioterapia e radioterapia concomitantes, combinação de eficácia comprovada, com aumento da sobrevida global em cinco anos quando comparado com radioterapia isolada (54,2 *versus* 72,3%,  $p=0,0022$ ) (LIN et al, 2003). A droga comumente utilizada é a cisplatina, um quimioterápico citotóxico do grupo dos

alquilantes (YANIV et al.,2003) podendo, a depender da extensão da apresentação inicial e *performance status* do paciente, ser acompanhada por outro agente antineoplásico, tanto na concomitância quanto em forma de terapia neoadjuvante (SZARVAS et al., 2012). Em caso de recorrência da doença, o tratamento irá depender do padrão da mesma: quando local pode-se abordar o tumor com cirurgia, seguida de radio-quimioterapia (CHAN et al, 2012), ou somente realizar nova seção de irradiação, quando não há possibilidade de ressecção, e/ou condições clínicas proibitivas (KOUTCHER et al., 2010). Porém a despeito dos tratamentos, ainda há morbidade e mortalidade em fração significativa dos casos, com uma taxa de falha de 20-40% e maior risco de metástases (LIN, 2013).

### **Fatores prognósticos**

A definição de fatores prognóstico mais acurados e compatíveis com desfecho clínico nesta neoplasia, tem gerado inúmeras investigações no CNF, dada sua agressividade local e poder de metastatização. Kanfir e col. (2007) estudaram a importância da disseminação metastática e sua detecção precoce nos pacientes com critérios iniciais de bom prognóstico. Nasr e col. (2007) demonstraram que a variabilidade genética para os genes que codificam a metaloproteinase-1 (MMP-1) pode representar um fator de risco para o CNF. As metaloproteinases são proteínas da matriz, com a capacidade de digerir o estroma normal e proporcionar a invasão e crescimento metastático das células tumorais (NASR et al, 2007). Wu e col. (2006) observaram que a fibronectina, uma das principais proteínas de matriz, estava em quantidade aumentada no sangue periférico de animais induzidos experimentalmente a apresentarem CNF. As galectinas



são proteínas intra e extracelulares envolvidas nos processos de diferenciação, proliferação e migração celular. Keier-Bibbens e col. (2006) citam que a presença da galectina-9 no interior das células tumorais estaria relacionada à presença do EBV. Esta modularia a resposta dos linfócitos T, induzindo a maior eficiência da infecção viral nas células epiteliais (KERYER-BIBENS et al., 2007). Em estudo anterior de nosso grupo, 30 amostras de CNF foram avaliadas quanto à expressão das proteínas de matriz supracitadas. Observou-se que laminina, fibronectina e galectina-3 apresentavam expressão aumentada nestes tumores quando comparada com grupo controle. A expressão isolada da fibronectina no estroma se associou a taxa reduzida de recidiva geral e precoce. A expressão associada da laminina e galectina 3 traduziu maior chance de recidiva local (Tagliarini et al, 2011). Portanto, como sugerido por CHOO e col. (2012), no CNF, as proteínas estromais e as metaloproteinases teriam um papel fundamental na progressão da doença.

Recentes avanços na biologia do câncer têm apontado a correlação da carcinogênese com o controle da expressão gênica em nível pós transcricional. Tal controle pode ser mediado por proteínas de ligação ao RNA (*RNA binding proteins* – RBP), RNAs longos não codificadores (*long non coding RNAs*), assim como pelos micro RNAs (miRNAs). Aponta-se que tais substâncias determinam o destino da célula tumoral, atuando como moduladores da expressão de genes implicados no controle da proliferação celular tumoral, bem como sua sobrevivência, quimio-resistência e poder de metástase (LEDERER et al, 2014).

Dada tal importância no papel de reflexo direto dos genes, as proteínas envolvidas neste processo podem desempenhar o papel de biomarcadores e possíveis candidatos a alvos terapêuticos (OLIVEIRA; RIBEIRO, 2011).

## O IMP3

A proteína de ligação ao RNA chamada IMP3 (*insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 – RBP3*), também conhecida como KOC (*KH domain containing protein overexpressed in cancer*), é uma proteína oncofetal, membro da família das proteínas de ligação ao RNA do fator de crescimento tipo insulina II, na qual foram primeiramente conhecidos o IMP1 e IMP2. Está presente nas fases iniciais da embriogênese humana, sendo expressa em epitélio primitivo, músculo e placenta, desempenhando seu papel na diferenciação e maturação celular (ZHENG et al, 2008). Em tal fase, o IMP3 é necessário para a migração celular e formação da placa de revestimento do tubo neural e posteriormente para migração da crista neural. Fora do período embrionário, contrapondo-se ao IMP2, que encontra-se ausente em todos os tecidos adultos, o IMP3 é indetectável em indivíduos normais, tendo sido observado em tumores malignos, associado a comportamento celular agressivo (CLAUDITZ et al, 2013). Sua expressão é relacionada à proliferação celular, adesão, invasão e migração, sendo encontrado em estádios avançados de diversas neoplasias (YANIV et al., 2013). Seu gene é alocado no cromossomo 7p11.5, um *locus* geralmente amplificado em diversas malignidades (LEDERER et al, 2014).

A regulação dependente de fosforilação é proposta como principal mecanismo da modulação em nível citoplasmático da atividade de ligação do IMP3. O mRNA relacionado à essa proteína de ligação mais estudado naturalmente é o mRNA do IGF2. Seu mecanismo de ação é basicamente ligar-se à região 5'- não transcrita do mRNA do IGF2, ativar sua tradução, promover a hiperexpressão desse fator de

crescimento, e conseqüentemente resultar na ativação das vias de oncogênese PI3-kinase e MAP-kinase(SUVASINI et al, 2011).

Adicionalmente, estudos sugerem que o IMP3 pode atuar na carcinogênese por outros caminhos. É descrita sua ação em conjunto com as ribonucleoproteínas de estabilização HNRNPMs (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) modulando dessa forma o destino final das ciclinas D1 e D3, e assim ocasionando a passagem da fase G1 para S da célula no ciclo celular, sem a devida checagem de possíveis erros no material genético (RIVERA et al, 2013). O IMP3 também pode agir ligando-se ao fator de transcrição HMGA2 - proteína de alta mobilidade que quando super-expressa é associada à neoformação tumoral. O IMP3 previne seu ataque pelo miRNA da família let-7, que silenciaria sua expressão e impediria o crescimento tumoral (JONSON et al, 2014). Há ainda a descrição da ação do IMP3 junto à proteína associada a membrana chamada ABCG2, o que a estabilizaria e permitiria seu papel na multirresistência aos quimioterápicos (SAMANTA et al, 2013).

Como exemplos da gama de tumores onde o IMP3 está presente, temos o mesotelioma (HUSAIN et al., 2009), carcinomas endometriais (ZHENG et al., 2008), adenocarcinoma esofágico (LU et al., 2009), carcinoma laríngeo (CHEN et., 2009), melanomas (PRYOR et al., 2008) e bexiga (SZARVAS et al., 2012). É utilizado como marcador prognóstico independente em carcinomas de células renais (JING et al., 2006), carcinomas uroteliais (SITNIKOVA et al., 2008), adenocarcinomas pulmonares (FINDEIS-HOSEY et al., 2010). Em relação aos carcinomas de cabeça e pescoço, dados apontam a possibilidade de seu uso como marcador prognóstico independente no subgrupo dos carcinomas escamosos orais (CLAUDITZ et al., 2013). A via como o IMP3 agiria nesses

casos seria através da estabilização do mRNA da proteína podoplanina (PDPN), visto que o principal papel dessa substância seria o de aumentar o poder de invasividade e metastatização tumoral (HWANG et al, 2012).

Este estudo pretende dar continuidade às pesquisas do grupo em relação ao conhecimento do CNF, estudando a expressão do biomarcador IMP3 nesta neoplasia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Banes L, Veson JW, Reichart Pet al. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics the Head and Neck Tumors. 1ª edição. Lyon: IARC Press, 2005.

Bergin M, Bird P, Pearson JF. Exploring the critical distance and position relation between the Eustachian tube and the internal carotid artery. *OtolNeurotol*. 2010; 31: 1511–15.

Breda E, Catarino R, Azevedo I, Fernandes T. Characterization of the clinical evolution of nasopharyngeal carcinoma in a Portuguese population. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2007; 58(5): 191-7.

Buell P. Race in place in the etiology of nasopharyngeal cancer: a study based on California death certificates. *Int. J. Cancer*. 1973; 11: 268-72.

Chan JY, Chow VL, Wong ST, Wej WI. Surgical salvage for recurrent retropharyngeal lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck*. 2013; 35(11): 726- 31.

Chen K, Cornejo KM, Ye W, Wu Q, Liang J, Jiang Z. Oncofetal protein IMP3: a new diagnostic biomarker for laryngeal carcinoma. *Hum Pathol*. 2013; 135:1024-1031.

Clauditz TS, Wang CJ, Blessmann M, Gontarewicz A. Expression of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Pathol and Med*. 2013; 42:125-132.

Chin D, Boyle GM, Porcedu S, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Head and neck cancer: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006; 6(7):1111-8.

Choo JMS, LIN YC, KIM J. Nasopharyngeal carcinoma—review of the molecular mechanisms of tumorigenesis. *Head Neck*. 2008; 30(7): 946–63.

Chu AM, Cutler SJ, Young JL. Third National Cancer Survey: Incidence data *Natl Cancer Inst Monogr*. 1975; 411-454.

Davies L, Welch HG. Epidemiology of head and neck cancer in the United States. *Head Neck Surg*. 2006; 135(3):451-7.

Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17(6):1471-4.

Gabusi E, Lattes C, Fiorentino M, Derrico A, Grigionni WF. Expression of Epstein-Barr virus-encoded RNA and biological markers in Italian nasopharyngeal carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res*. 2001; 20(3): 371-6.

- Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF. The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;124:951–62.
- Hildesheim A, Dosemeci M, Chan CC, Chen CJ, Cheng YJ, Hsu MM, Chen IH. Occupational exposure to wood, formaldehyde, and solvents and risk of nasopharyngeal carcinomas. **Cancer Biomark Prev.** 2001; 10: 1145-53.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in peroxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981; 29: 577-580.
- Husain NA, Colby TV, Ordonez NG. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: a consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med.* 2009; 133:1317-31.
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. **Cancer J Clin.** 2010; 60:277–300.
- Jiang Z, Chu PG, Woda BA et al. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. *Lancet Oncol.* 2011; 07:553-564.
- Khanfir A, Frikha M, Gorbeal A, Drira MM, Daoud J. Prognostic factors in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Radiother.* 2007; 11(8):461-4.
- Findeis-Hosey JJ, Yang Q, Spauding BO et al. IMP3 expression is correlated with histologic grade of lung adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2010; 41:477-484.
- Keryer-Bibens C, Pioche-Durieu C, Villemant C, Souquère S, Nishi N, Hirashima M, Middeltorp J, Busson P. Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer.* 2007; 8(6) 283.
- Koutcher L, Lee N, Zelefsky M, Chan K, Cohen G, Pifister D, Wolden S. Reirradiation of locally recurrent nasopharynx cancer with external beam radiotherapy with or without brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010; 1(76): 130-7.
- Lamps LW. *Diagnostic Pathology: Normal Histology.* 1<sup>st</sup> ed. Canada: Amirsys, 2013.
- Landry D, Glastonbury M. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Radiol. Clin. Am. North.* 2015; 53: 81-97.
- Lin JC, Jan JS, Hsu CY, Liang WM, Jiang RS, Wang WY. Phase III Study of Concurrent Chemoradiotherapy Versus Radiotherapy Alone for Advanced Nasopharyngeal

Carcinoma: Positive Effect on Overall and Progression-Free Survival. *J Clin Oncol.* 2003; 21:631-637.

Lu D, Vohra P, Chu PG et al. An oncofetal protein IMP3: a new molecular marker for the detection of esophageal adenocarcinoma and high-grade dysplasia. ***Am J surg Pathol.***2009; 33: 521-525.

Nasr HB, Mestiri S, Chahed K, Bouaouina N, Gabbouj S, Jalbout M, Chouchane L. Matrix metalloproteinase-1 (-1607) 1G/2G and -9 (-1562) C/T promoter polymorphisms: Susceptibility and prognostic implications in nasopharyngeal carcinomas. *Clin Chim Acta.* 2007; 384(1-2): 57-63.

Niedobitek G, Herbst H, Young LS. Epstein-Barr virus and carcinomas. *Int J Clin Lab Res.* 1993; 23; 17-24.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer incidence in five continents. v. VIII, IARC Press: Lyon, 2003.

Peterson F. Nasopharyngeal Carcinoma: a review. ***Seminars in diagnostic pathology,*** 2015; 32: 54-73.

Pryor JG, Bourne PA, Yang Q et al. IMP3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod Pathol,* 2008; 21:431-437.

Sitnikova L, Mendese G, Liu G et al. IMP3 predicts aggressive superficial urothelial carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res.* 2008; 14:1701-06.

Sun X, Su S, Chen C, Han F, Zhao C, Xiao W, Deng X, Huang S. Long-term outcomes of intensity-modulated radiotherapy for 868 patients with nasopharyngeal carcinoma: analysis of survival and treatment toxicities. *Radiother Oncol.* 2014; 110(3):398-403.

Szarvas T, Von-Dorp T, Niedworok C. et al. High insulin-like growth factor mRNA-binding protein 3 (IMP3) expression. Is associated with poor survival in muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int.* 2012; 110:308-317.

Tagliarini JV, Nakajima V, Castilho CE, Domingues MAC. Carcinoma de nasofaringe: análise da importância prognóstica da imunexpressão da galectina-3 e proteínas de matriz. *Revista Brasileira de Cirurgia da Cabeça e Pescoço.* 2011; 40:125-132.

Terrell E, Ronis DL, Fowler KE. Clinical predictors of quality of life in patients with head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 130:401-408.

Tomokazu Y, Makoto I, Shiguekiuki M, Naohiro W, Satoru K, Kazuhira E. Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx.* 2012; 39:137-144.

Yang CR, Lin TC, Chang FH. Particle size distribution and PAH concentrations of incense, smoke in a combustion chamber. *Environ Pollut*. 2007; 145: 606–615.

Yang TS, Ng HT, Wang HM, Wang CH, Liaw CC, Lai GM. Prognostic factors of locoregionally recurrent nasopharyngeal carcinoma - a retrospective review of 182 cases. *Am J Clin Oncol*. 1996; 19(4): 337-43.

Yaniv K, Fainsod A, Kalshein C, Yisraeli JK. The RNA-binding protein is required for cell migration during early neural development. 2003; 130:5649-5661.

Yu MC, Yuan JM. Epidemiology of Nasopharyngeal Carcinoma. 2002; 12: 21-29.

Zheng W, Yi X, Fadare O et al. The oncofetal protein IMP3: a novel biomarker for endometrial serous carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2008; 32: 304-315.

Lederer M; Bley N, Schleifer C, Huttelmaier S. The role of the oncofetal IGF2 mRNA-binding protein 3 (IGF2BP3) in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2014; 29: 3–12.

Suvasini R, Shruti B, Thota B, Shinde SV, Friedmann-Morvinski D, Nawaz Z, Prasanna KV, Thennarasu K, Hegde AS, Arivazhagan A, Chandramouli BA, Santosh V, Somasundaram K. Insulin growth factor-2 binding protein 3 (IGF2BP3) is a glioblastoma-specific marker that activates phosphatidylinositol 3-kinase/mitogen-activated protein kinase (PI3K/MAPK) pathways by modulating IGF-2. *J Biol Chem*. 2011;286(29):25882-90.

Rivera Vargas T, Boudoukha S, Simon A, Souidi M, Cuvellier S, Pinna G, et al. Post-transcriptional regulation of cyclins D1, D3 and G1 and proliferation of human cancer cells depend on IMP-3 nuclear localization. *Oncogene*. 2013;33(22):2866–75.

Jonson L, Christiansen J, Hansen TV, Vikesa J, Yamamoto Y, Nielsen FC. IMP3 RNP safe houses prevent miRNA-directed HMGA2 mRNA decay in cancer and development. *Cell Rep*. 2014;7:539–51.

Samanta S, Pursell B, Mercurio AM. IMP3 protein promotes chemoresistance in breast cancer cells by regulating breast cancer resistance protein (ABCG2) expression. *J Biol Chem*. 2013;288:12569–73.

Hwang YS, Xianglan Z, Park KK, Chung WY. Functional invadopodia formation through stabilization of the PDPN transcript by IMP-3 and cancer-stromal crosstalk for PDPN expression. *Carcinogenesis*. 2012;33:2135–46.



**OBJETIVOS**

---

## **1. Objetivo Geral**

Estudar a presença da proteína IMP3 nas amostras de pacientes com CNF obtidas no serviço.

## **2. Objetivos Específicos**

2.1 Correlacionar os dados da expressão do IMP3 com os dados clínicos dos pacientes.

2.2 Com os dados obtidos em análise, entender o papel do IMP3 na patogenia do CNF.

**ARTIGO**

---

Artigo escrito segundo as recomendações para publicação do Jornal *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* – ImpactFactor: 2,413 (<http://cebp.aacrjournals.org>)

## Manuscrito Autoral

# Determinação da relação de miRNAs e biomarcador (IMP3) no Carcinoma de Nasofaringe

B. L. C. Ferreira<sup>1</sup>; M. A. C. Domingues<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.

**Endereço para correspondência:**

Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

Departamento de Patologia

Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

Distrito de Rubião Júnior, s/n – Botucatu, São Paulo – Brasil

CEP: 18618-970 – Fone: 14 38801658

e-mail: [mdomingues@fmb.unesp.br](mailto:mdomingues@fmb.unesp.br)

Conflitos de interesse: não declarados

## RESUMO

**Introdução:** O Carcinoma de Nasofaringe (CNF) é uma neoplasia epitelial maligna agressiva, com principal incidência entre homens de 40-60 anos de idade, com distribuição geográfica e étnica variada. Está associado com infecção pelo *Epstein-Barr Virus* (EBV), e a presença deste nas células tumorais parece ter impacto no prognóstico. Porém, outros fatores que podem estar relacionados ao desfecho do CNF, têm sido pesquisados. O biomarcador IMP3, proteína de ligação ao mRNA que tem reconhecida função na ação das células tumorais, vem sendo analisado como um marcador factível correlacionado com a sobrevida global nos pacientes com câncer.

**Métodos:** Para explorar a expressão do IMP3 nas amostras tumorais de pacientes com CNF vistos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, foram compilados 35 prontuários e documentados de acordo com as características morfológicas e tempo de sobrevida. A expressão imuno-histoquímica foi mensurada e correlacionada com os diversos parâmetros clínico-patológicos.

**Conclusão:** mostrou-se elevado índice de recidiva e morbimortalidade, com grande número de casos avançados ao diagnóstico, e potencial correlação de melhor prognóstico com a alta expressão do marcador analisado.

**Impacto:** Um melhor entendimento do IMP3 como biomarcador, proporcionando novas perspectivas no prognóstico do carcinoma de nasofaringe.

**Palavras-chave:** carcinoma de nasofaringe, biomarcador, IMP3, prognóstico.

## ABSTRACT

**Background:** The nasopharyngeal carcinoma (NPC) is an aggressive malignant epithelial neoplasm, mainly prevalent among 40-60-year-old men, with varied geographic and ethnic distribution. It is associated with Epstein Barr Virus (EBV), whose presence in the tumor cell seems to impact the prognosis. However, other factors that may be related to NPC's clinical impact and have been studied. The IMP3 biomarker, a mRNA binding protein, which has a recognized role in the tumor cell formation, has been analyzed as a feasible marker correlated to the overall survival of cancer patients. Given this evidence, the object of this research is, and analyze possible correlation of this biomarker to the clinical outcome of these patients. **Methods:** To explore the IMP3 expression in the CNF patients' tumor samples seen at the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina in Botucatu-UNESP, were compiled 35 cases and documented in basis of their morphological features and status of life. The immunohistochemical expression was measured and correlated with the several clinic-pathologic parameters. **Results:** The analysis showed high rates of relapse and mortality, also a significant number of local advanced tumors at diagnosis, and potential correlation of better prognosis with the high expression of the biomarker analyzed.

**Impact:** A better understanding of IMP3 as a biomarker, providing new routes of prognosis in nasopharynx carcinoma.

**Key-words:** nasopharynx carcinoma, biomarker, IMP3.

## Introdução

A nasofaringe é conceituada como a parte exclusivamente respiratória da laringe. A neoplasia maligna mais comum nessa localização é o Carcinoma de Nasofaringe (CNF) [1,2,3], o qual possui uma distribuição geográfica e racial distinta dos demais carcinomas de cabeça e pescoço, com maior prevalência ao norte da África, Ásia e regiões do Pacífico, além de uma etiologia multi-fatorial [4].

Esta distribuição geográfica e demográfica reflete a ligação da suscetibilidade genética, infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e fatores ambientais (dietéticos e não dietéticos) como causas desta doença [5,6,7].

O subtipo mais comum é o carcinoma escamoso não-queratinizante indiferenciado (CENCI) que perfaz cerca de 92% dos casos. Nestes, a associação com EBV é de 100% [4,8].

O tratamento definitivo nos estádios iniciais do CNF é a radioterapia. Com essa modalidade de terapia, obtêm-se taxas de sobrevida global de 100% para estadios I e 94,3% para estadios II [9].

Já nos estádios mais avançados, III e IV, o tratamento preconizado é de quimioterapia e radioterapia concomitantes, combinação de eficácia comprovada, com aumento da sobrevida global em 5 anos quando comparado ao braço com radioterapia isolada [10,11].

Vários estudos tentam definir fatores prognósticos, além daqueles relacionados à classificação TNM, que possam ser mais acurados para esta neoplasia [12,14,15].

Recentes avanços na biologia do câncer têm apontado a correlação da carcinogênese com o controle da expressão gênica em nível pós transcricional (13). Tal controle pode ser mediado por proteínas de ligação ao RNA (RNA binding proteins – RBP), RNAs longos não codificadores (long non coding RNAs), assim como pelos micro RNAs (miRNAs). Aponta-se que tais substâncias determinam o destino da célula tumoral, atuando como moduladores da expressão de genes implicados no controle da proliferação celular tumoral, bem como sua sobrevivência, quimio-resistência e metástase [16].

Dada tal importância no papel de reflexo direto dos genes, as proteínas envolvidas neste processo podem desempenhar o papel de biomarcadores e possíveis candidatos a alvos terapêuticos [15].

A proteína de ligação ao RNA chamada IMP3 (*insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 – RBP3*), também conhecida como KOC (KH domain containing protein overexpressed in cancer), é uma proteína oncofetal, membro da família das proteínas de ligação ao RNA do fator de crescimento tipo insulina II, na qual foram primeiramente conhecidos o IMP1 e IMP2. Está presente nas fases iniciais da embriogênese humana, sendo expressa em epitélio primitivo, músculo e placenta, desempenhando seu papel na diferenciação e maturação celular (17). Em tal fase, o IMP3 é necessário para a migração celular e formação da placa de revestimento do tubo neural e posteriormente para migração da crista neural. Fora do período embrionário, contrapondo-se ao IMP2, que encontra-se presente em todos os tecidos adultos, o IMP3 é indetectável em indivíduos normais, tendo sido observado em tumores malignos, associado a comportamento celular agressivo [16,17]. Sua expressão é relacionada à proliferação celular, adesão, invasão e migração, sendo



encontrado em estadios avançados de diversas neoplasias. Seu gene é alocado no cromossomo 7p11.5, um *locus* geralmente amplificado em diversas malignidades [16].

A regulação dependente de fosforilação é proposta como principal mecanismo da modulação em nível citoplasmático da atividade de ligação do IMP3. O mRNA relacionado à essa proteína de ligação mais estudado naturalmente é o mRNA do IGF2 [18]. Seu mecanismo de ação é basicamente ligar-se à região 5' não transcrita do mRNA do IGF2, ativar sua tradução, promover a hiperexpressão desse fator de crescimento, e conseqüentemente resultar na ativação das vias de oncogênese PI3-kinase e MAP-kinase [19].

Adicionalmente, estudos sugerem que o IMP3 pode atuar na carcinogênese por outros caminhos. É descrita sua ação em conjunto com as ribonucleoproteínas de estabilização HNRNPMs (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) modulando associadamente e garantindo o destino final das ciclinas D1 e D3, assim ocasionando a passagem da fase G1 para S da célula no ciclo celular, sem a devida checagem de possíveis erros no material genético [20]. O IMP3 também pode agir ligando-se ao fator de transcrição HMGA2 - proteína que quando super-expressa é associada à neoformação tumoral, prevenindo seu ataque pelo miRNA da família let-7, que silenciaria sua expressão e impediria o crescimento tumoral [21]. Há ainda a descrição da ação do IMP3 junto à proteína associada a membrana chamada ABCG2, o que a estabilizaria e permitiria seu papel na multirresistência aos quimioterápicos [22].

Como exemplos da gama de tumores onde o IMP3 está presente, temos o mesotelioma [23], carcinomas endometriais [24], adenocarcinoma esofágico [25], carcinoma laríngeo [26], melanomas [27], e bexiga [28]. É utilizado como marcador prognóstico independente em carcinomas de células renais [29], carcinomas uroteliais

[30] eadenocarcinomas pulmonares [31]. Em relação aos carcinomas de cabeça e pescoço, dados apontam a possibilidade de seu uso como marcador prognóstico independente no subgrupo dos carcinomas escamosos orais [32]. A via como o IMP3 agiria nesses casos seria através da estabilização do mRNA da proteína podoplanina (PDPN), visto que o principal papel dessa substância seria o de aumentar o poder de invasividade e metastatização tumoral [33].

O objetivo deste trabalho foi pesquisar a expressão do IMP3 e a possível relação deste com o comportamento tumoral, com possível relevância para futuras terapias alvo. É um trabalho cujos resultados podem ter retorno na prática médica.

## **Materiais e Métodos**

### **População do estudo**

Foram selecionadas 35 lâminas e blocos parafinados, arquivados no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, contendo amostras tumorais cujos laudos anatomo-patológicos foram de Carcinoma de Nasofaringe, classificado como C11, segundo o Código Internacional de Doenças/ CID 10. Tais lâminas foram revisadas por um único patologista e reclassificadas segundo a Classificação da Organização Mundial de Saúde de 2005. Os dados clínicos dos pacientes envolvidos foram reunidos em tabela contendo item de idade, sexo, procedência, fatores ambientais, estadiamento segundo o sistema TNM, características clínicas, anatomopatológicas, tratamentos realizados e tempo de sobrevida.

Foram utilizadas 30 amostras parafinadas de nasofaringe normal, analisadas como grupo controle. Tais amostras são produtos de biópsias de *cavum* que resultaram em ausência de neoplasia.

Este estudo/subprojeto tem aprovação do CEP da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP (CONEP: parecer número 482/2007 – processo nº 30).

### **Estudo imuno-histoquímico:**

O estudo imuno-histoquímico foi realizado em secções histológicas do bloco de TMA, utilizando o polímero EnVisionR (Dako, California, USA) como sistema de detecção. O método de recuperação antigênica foi realizado utilizando módulo de pré-tratamento PTLINK R (Dako, California, USA). Para a interpretação do IMP3 foi considerada positiva qualquer coloração citoplasmática. A imuno-expressão foi graduada de acordo com a intensidade e extensão em 0 (ausente), 1+ (fraca), 2+ (moderada) e 3+ (forte). Controles positivos e negativos foram utilizados para atestar a fidelidade das imuno-colorações.

### **Método da análise:**

Após a coleta dos dados, os mesmos foram armazenados em um banco de dados, criado no Excel – MICROSOFT<sup>R</sup> OFFICE 2007. Foi inicialmente realizada análise descritiva da população proveniente da coleta, sendo calculadas as medidas de posição (média e mediana). Para avaliar a relação entre os resultados da análise de expressão do IMP3 com os parâmetros clínico-patológicos, foram usados testes estatísticos, como o de Fischer e o teste T de Student.

A análise da sobrevida foi realizada usando método de Kaplan-Meier, comparando a diferença entre as curvas via *log-rank test*.

## Resultados

A população amostral levantada foi de 35 pacientes diagnosticados com carcinoma de nasofaringe (CID 10 C11), entre 1999 e 2013, com idades que variaram de 15 a 88 anos, tendo a maioria entre 40 a 60 anos (37,1%; 13/35), perfazendo idade média de 50 anos. Vinte e dois pacientes eram do sexo masculino (62,9%) e treze pacientes do sexo feminino (37,1%). A maioria foi procedente de abrangência regional, com cidades adjacentes a Botucatu, atendidas pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – HCFMB UNESP.

O tipo histológico mais prevalente entre os casos acometidos foi o carcinoma escamoso do tipo indiferenciado ou linfoepitelioma (CENCI) (74,3%; 26/35). A grande maioria dos casos revisados mostrou doença localmente avançada na abordagem inicial, nos estadios AJCC III e IV (85,7%) (tabela 1).

Na apresentação inicial da doença, 85,7% (30/35) dos pacientes foi diagnosticada com a presença de linfonomegalia cervical. O sintoma relacionado à agressividade local mais incidente foi a obstrução nasal, presente em 15 pacientes (42,8%) ao diagnóstico, seguido pelo sangramento nasal (12 pacientes, 34,2%), e comprometimento de pares cranianos (5 pacientes, 14,2%). Como tratamento de primeira linha, a maioria recebeu quimioterapia e radioterapia combinados.

Ao que diz respeito à recidiva de doença, 17 dos pacientes compilados (48,5%) evoluíram com recidiva, sendo 01 com recidiva a distância (pulmonar).

Os dados sobre a sobrevida global estavam disponíveis em 34 casos, sendo que destes, dez pacientes encontravam-se vivos ao momento de última revisão, realizada em abril de 2015. Dentre aqueles pacientes que evoluíram a óbito, 68,6% foram secundários à neoplasia. A estimativa de sobrevida geral foi de 2,37 anos.

As curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida geral foram calculadas (figura 2Ae 2B). Os resultados dos gráficos indicam um declínio acentuado na sobrevida dos pacientes até o quarto e quinto anos. Quando analisada a curva de mortalidade em relação aos sintomas apresentados, notou-se maior tempo de sobrevida em relação àqueles pacientes com apresentação inicial de epistaxe (figura 2C), e aos pacientes classificados com estadios III (figura 2D).

A positividade do IMP3 foi observada em 86% dos casos (27 pacientes), com maior prevalência da intensidade de 3+ (34%, 12 pacientes), e da extensão 2+ (37%, 13 pacientes) (tabela 1). Não verificou-se diferença estatisticamente significativa de sua distribuição entre os sexos, histologia e estadios. Porém houve tendência a uma maior concentração de imuno-positividade do IMP3 nos pacientes com linfonodomegalia, comprometimento de nervos cranianos e média mais jovem de idade, como descrito na tabela 2. Exemplos dos resultados imunofenotípicos são apresentados na figura 1.

Quando analisada conjuntamente com a mortalidade, a positividade da proteína de ligação também apresentou a maior correlação com o prognóstico: em 100% dos casos que evoluíram com sobrevida maior a 2 anos, a expressão do IMP3 foi positiva, em diferentes graus de intensidade, nas células tumorais (tabela 3). A curva de sobrevida em relação à expressão do IMP3 é apresentada na figura 2E.

## Discussão

O CNF é uma neoplasia eminentemente de alto índice de proliferação, e por tal motivo, considerada classicamente responsiva aos tratamentos instituídos [34]. Entretanto na prática clínica, é observada como determinante de agressividade sintomatológica e mortalidade de potencial elevado [4], tendo sido objeto de vários estudos, conseqüentemente com abordagem em constante transformação nas últimas décadas.

Com os manejos terapêuticos modernos, houve melhora substancial nos índices de desfecho dos pacientes, tendo a sobrevida em 5 anos nos estadios iniciais aumentado de 50% nos anos 80 para 70% nos anos 90, com índices atuais em torno de 80% [35].

Porém, devido ao perfil biológico agressivo, natureza inespecífica dos sintomas, como distúrbios auditivos, otites, epistaxe, entre outros, e muitas vezes a dificuldade de realização do exame de nasofaringe fora dos grandes hospitais terciários, a maioria dos pacientes com a neoplasia é diagnosticada somente em estágios avançados (estadios III e IV), contribuindo para aumento da morbidade e mortalidade em fração ainda significativa dos casos, com uma taxa de falha de 20-40% e maior risco de metástases [10].

Ademais, há de se salientar que a cirurgia geralmente não realizada (devido à incapacidade de aquisição adequada das margens cirúrgicas negativas) faz com que a recorrência ou persistência regional sejam eventos comuns, podendo levar a curso clínico fatal [36]. Por esse motivo, há grande gama de propostas elencadas na literatura

na tentativa de refinar as classificações prognósticas, almejando permitir o desenvolvimento de terapias personalizadas, e assim obter real impacto na sobrevivência desses pacientes.

No presente trabalho, foram avaliadas as características anatomoclínicas de uma série de casos com CNF, sendo dispensada maior ênfase à pesquisa de curso clínico dos mesmos, a fins de comparação com a expressão do IMP3.

Foi observado em relação à caracterização clínica de tal amostragem, o perfil classicamente descrito nas séries mundiais de CNF, com predomínio do sexo masculino (62,9%; 22/35) e acometimento em faixa etária típica entre 40 a 60 anos (37,1%; 13/35) [2,5,35]. Na apresentação clínica da doença ao diagnóstico, nossos dados corroboram com literatura, tendo sinais frequentemente relatados de obstrução nasal (42,8%; 14/35), seguido pelo sangramento nasal (34,2%; 12/35), e comprometimento de pares cranianos (14,2%; 5/35), o que correlaciona o CNF à infiltração maligna extensa e precoce [35].

Como fator predisponente, Xue e colaboradores, através de metanálise, correlacionou associação entre tabagismo e CNF, obtendo risco de 60% de surgimento da neoplasia em relação ao hábito de fumar [7], dado algo maior que o observado na presente amostra (53,3%; 16/35). A exposição ocupacional (à fumaças químicas, formoldeido) também foi avaliada, sendo encontrada em porção não significativa dos casos (6,7%; 2/35). Tal resultado pode ser ligado a falta de um interrogatório dirigido ao momento da anamnese, ou a não obtenção de dados completos em alguns prontuários.

A compilação evidenciou outra característica marcante no CNF, que é a linfonodomegalia na ocasião do diagnóstico inicial. De todos os casos, em 85,7% (30/35) foi observada a presença de linfonodos regionais aumentados, dado

semelhante ao reportado por Francis e colaboradores, em estudo sobre padrões de acometimento linfonodal no CNF [37]. Quanto ao subtipo histológico, houve predomínio do carcinoma não ceratinizado indiferenciado (74,3%;26/35), o que infere concordância com outras séries demográficas, que demonstram maior prevalência do chamado linfoepitelioma até mesmo em regiões não endêmicas para o EBV [38].

No estudo em questão, foi nítida a grande prevalência de casos recidivados de CNF (48,5%; 17/35), demonstrando o comportamento biológico agressivo em detrimento de grande parte dos pacientes terem sido submetidos à terapia oncológica padrão, com radio-quimioterapia.

Em relação à mortalidade, vemos que parcela abrangente da amostra evoluiu ao óbito por razões secundárias à neoplasia (68,6%; 24/35). Tal perfil denota o impacto da doença em termos de saúde pública.

Quando comparadas as curvas relacionadas ao estadiamento, foi observada total independência da sobrevida em relação à classificação pelo sistema TNM, análise díspar daquela usualmente observada e relatada na literatura [39]. Primeiramente tal achado pode ser resultado de desvio aleatório devido ao baixo tamanho amostral, mas que todavia pode sinalizar baixa correlação da sobrevida com a classificação mais usada nos tumores sólidos.

Realizadas as mensurações de expressão do IMP3, observou-se que sua positividade foi ampla dentre os casos analisados, não verificando-se diferenças significativas de sua distribuição em relação ao sexo, idades, ocorrência ou não de recidiva e estadiamento. Uma possível explicação para esse achado abrangente e não relacionável pode ser pela inferida influência do sistema imune na expressão do IMP3 na nasofaringe, com seu estroma rico em tecido linfóide [40], como apontam os



experimentos realizados por Mizukami et al [41], observando que conjuntamente alta expressão de IMP3 e células TIL (*tumor infiltrating lymphocytes*) foram vistas em carcinomas escamocelulares de esôfago. Houve adicionalmente, forte correlação entre a positividade proteica e a sobrevida dos pacientes ultrapassando os 24 meses, sinalizando uma tendência da ação desta proteína em prol de um melhor prognóstico. Marcadamente um único paciente dentre aqueles com maior sobrevida encontrava-se em estadiamento precoce em contraponto ao restante, 17 casos com estadio III/IV. A análise reforça a visão geral de que o CNF necessita prementemente de mais classificadores iniciais de tratamento e prognóstico, além do TNM.

O resultado ainda é singular à maioria dos estudos das proteínas de ligação ao mRNA, que ligam a hiperexpressão do IMP3 ao comportamento tumoral agressivo, porém é concordante com os estudos desse biomarcador nos linfomas [42] e com o achado de Noske et al [43], que observou nos carcinomas ovarianos uma associação da proteína com melhor sobrevida nos pacientes avaliados. Tais discrepâncias denotam que, a despeito de uma relação conhecida e estreita do IMP3 com os processos que cercam a tumorigênese, seu exato papel permanece a ser explorado. O indício estatístico apontado por este estudo abre espaço para futuras compilações de maior tamanho amostral, na tentativa de consolidação desse biomarcador como preditor de melhor prognóstico no CNF.

## Referências

1. Davies L, Welch HG. Epidemiology of head and neck cancer in the United States. *Head Neck Surg.* 2006; 135(3):451-7.
2. Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF. The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;124:951-62.
3. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: MINISTÉRIO DA SAÚDE, Instituto Nacional do Câncer, 2009.
4. Chin D, Boyle GM, Porcedu S, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Head and neck cancer: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006; 6(7):1111-8.
5. Neel HB et al. Nasopharyngeal Cancer. *Otolaryngology - Head in Neck Surgery.* 2001; 2:1413-24.
6. Gabusi E, Lattes C, Fiorentino M, Derrico A, Grigionni WF. Expression of Epstein-Barr virus-encoded RNA and biological markers in Italian nasopharyngeal carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res.* 2001; 20(3):371-6.
7. Xue WQ, Qin HD, Ruan HL, Shugart YY, Jia WH. Quantitative association of tobacco smoking with the risk of nasopharyngeal carcinoma: a comprehensive meta-analysis of studies conducted between 1979 and 2011. *Am J Epidemiol.* 2013; 178:235-38.
8. Terrell E, Ronis DL, Fowler KE. Clinical predictors of quality of life in patients with head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 130:401-408.
9. Sun X, Su S, Chen C, Han F, Zhao C, Xiao W, Deng X, Huang S. Long-term outcomes of intensity-modulated radiotherapy for 868 patients with nasopharyngeal carcinoma: analysis of survival and treatment toxicities. *Radiother Oncol.* 2014; 110(3):398-403.
10. Lin JC, Jan JS, Hsu CY, Liang WM, Jiang RS, Wang WY. Phase III Study of Concurrent Chemoradiotherapy Versus Radiotherapy Alone for Advanced Nasopharyngeal Carcinoma: Positive Effect on Overall and Progression-Free Survival. *J Clin Oncol.* 2003; 21:631-637.
11. Tsou YA, Hua CH, Tseng HC, Lin MH. Survival study and treatment strategy for second primary malignancies in patients with head and neck squamous cell carcinoma and nasopharyngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2007; 127(6):651-7.

12. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17(6):1471-4.
13. Khanfir A, Frisha M, Gorbeal A, Drira MM, Daoud J. Prognostic factors in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Radiother*. 2007; 2 [Epub ahead of print].
14. Tagliarini JV, Nakajima V, Castilho CE, Domingues MAC. Carcinoma de nasofaringe: análise da importância prognóstica da imunoposição da galectina-3 e proteínas de matriz. *Revista Brasileira de Cirurgia da Cabeça e Pescoço*. 2011; 40:125-132.
15. Oliveira LR, Ribeiro SA. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011; 40:510-6.
16. Gong Y, Woda BA, Jiang Z. Oncofetal protein IMP3, a new cancer biomarker. *Adv Anat Pathol*. 2014; 21:191-200.
17. Yaniv K, Fainsod A, Kalshein C, Yisraeli JK. The RNA-binding protein is required for cell migration during early neural development. 2003; 130:5649-5661.
18. Lederer M; Bley N, Schleifer C, Huttelmaier S. The role of the oncofetal IGF2 mRNA-binding protein 3 (IGF2BP3) in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2014; 29: 3–12.
19. Suvasini R, Shruti B, Thota B, Shinde SV, Friedmann-Morvinski D, Nawaz Z, Prasanna KV, Thennarasu K, Hegde AS, Arivazhagan A, Chandramouli BA, Santosh V, Somasundaram K. Insulin growth factor-2 binding protein 3 (IGF2BP3) is a glioblastoma-specific marker that activates phosphatidylinositol 3-kinase/mitogen-activated protein kinase (PI3K/MAPK) pathways by modulating IGF-2. *J Biol Chem*. 2011; 286(29):25882-90.
20. Rivera Vargas T, Boudoukha S, Simon A, Souidi M, Cuvelier S, Pinna G, et al. Post-transcriptional regulation of cyclins D1, D3 and G1 and proliferation of human cancer cells depend on IMP-3 nuclear localization. *Oncogene*. 2013; 33(22):2866–75.
21. Jonson L, Christiansen J, Hansen TV, Vikesa J, Yamamoto Y, Nielsen FC. IMP3 RNP safe houses prevent miRNA-directed HMGA2 mRNA decay in cancer and development. *Cell Rep*. 2014; 7:539–51.
22. Samanta S, Pursell B, Mercurio AM. IMP3 protein promotes chemoresistance in breast cancer cells by regulating breast cancer resistance protein (ABCG2) expression. *J Biol Chem*. 2013; 288:12569–73.
23. Husain NA, Colby TV, Ordonez NG. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: a consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med*. 2009; 133:1317-1331.

24. Zheng W, Yi X, Fadare O, Liang SX, Martel M, Schwartz PE, Jiang Z. The oncofetal protein IMP3: a novel biomarker for endometrial serous carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2008; 32:304-315.
25. Lu D, Voha P, Chu PG, Woda B. An oncofetal protein IMP3: a new molecular marker for the detection of esophageal adenocarcinoma and high-grade dysplasia. *Am J Surg Pathol*. 2009; 33:521-525.
26. Chen K, Cornejo KM, Ye W, Wu Q, Liang J, Jiang Z. Oncofetal protein IMP3: a new diagnostic biomarker for laryngeal carcinoma. *Hum Pathol*. 2013; 44:1024-1031.
27. Pryor JG, Bourne PA, Yang Q et al. IMP3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod Pathol*, 2008; 21:431-437.
28. Szarvas T, Von-Dorp T, Niedworok C. et al. High insulin-like growth factor mRNA-binding protein 3 (IMP3) expression. Is associated with poor survival in muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int*. 2012; 110:308-317.
29. Jiang Z, Chu PG, Woda BA et al. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. *Lancet Oncol*. 2011; 12:553-564.
30. Sitnikova L, Mendese G, Liu G et al. IMP3 predicts aggressive superficial urothelial carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res*, 2008; 14:1701-1706.
31. Findeis-Hosey JJ, Yang Q, Spaulding BO et al. IMP3 expression is correlated with histologic grade of lung adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2010; 41:477-484.
32. Clauditz TS, Wang CJ, Blessmann M, Gontarewicz A. Expression of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Pathology and Medicine*. 2013; 42:125-132.
33. Hwang YS, Xianglan Z, Park KK, Chung WY. Functional invadopodia formation through stabilization of the PDPN transcript by IMP-3 and cancer-stromal crosstalk for PDPN expression. *Carcinogenesis*. 2012; 33:2135-46.
34. Galbiatti ALS, Padovani JJA, Maníglia JV, Rodrigues CDS et al. Câncer de cabeça e pescoço: causas, prevenção e tratamento. *Braz J Otorhinolaryngol*. [Internet]. 2013 Apr [cited 2015; 79(2): 239-247. Available from: <http://www.scielo.br/scielo>.
35. Tomokazu Y, Makoto I, Shiguekiuki M, Naohiro W, Satoru K, Kazuhira E. Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx*. 2012; 39:137-144.

36. Chan JY, Chow VL, Wong ST, Wej WI. Surgical salvage for recurrent retropharyngeal lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck*. 2013; 35(12):726-31.
37. Francis CH, Tham IW, Lu JJ. Patterns of regional lymph node metastasis of nasopharyngeal carcinoma: A meta-analysis of clinical evidence. *BMC Cancer*. 2012; 21:12-28.
38. Breda E, Catarino R, Azevedo I, Fernandes T. Characterization of the clinical evolution of nasopharyngeal carcinoma in a Portuguese population. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2007; 58(5):191-7.
39. Kalogera-Fountzila A, Karanikolas D, Katodritis N, Samantas E, Sarafopoulos A, Ikonomidou I, Zamboglou N, Tselis N, Dimitriadis AS, Fountzilas G; AJCC (American Joint Committee on Cancer). Prognostic factors and significance of the revised 6th edition of the AJCC classification in patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Strahlenther Onkol*. 2006; 182(8):458-66.
40. LAMPS, Laura Webb. *Diagnostic Pathology: Normal Histology*. 1ª edição. Canada: Amirsys, 2013.
41. Mizukami Y, Kono K, Daigo Y, et al. Detection of novel cancer-testis antigen-specific T-cell responses in TIL, regional lymph nodes, and PBL in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2008; 99: 1448-54.
42. Tang H1, Wei Q, Ge J, Jian W, Liu J, Zhong L, Fu B, Zhao T. IMP3 as a supplemental diagnostic marker for Hodgkin lymphoma. *Hum Pathol*. 2013 Oct; 44(10):2167-72.
43. Noske A, Faggad A, Wirtz R, et al. IMP3 expression in human ovarian cancer is associated with improved survival. *Int J Gynecol Pathol*. 2009; 28: 203-10.

Tabela 1. Análise descritiva da frequência das variáveis estudadas

<b>VARIÁVEIS</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>VARIÁVEIS</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>SEXO</b>			<b>LINFONODOMEGALIA</b>		
Feminino	13	37,1	SIM	30	85,7
Masculino	22	62,9	NÃO	5	14,3
<b>Faixa-etária</b>			<b>SANGRAMENTO NASAL</b>		
menos de 20	4	11,4	SIM	13	37,1
20 --- 40	6	17,1	NÃO	22	62,9
40 --- 60	13	37,1	<b>OBSTRUÇÃO NASAL</b>		
maior igual a 60	12	34,3	SIM	20	57,1
MÉDIA	50,14		NÃO	15	42,9
DESVIO-PADRÃO	18,18		<b>COMPROMETIMENTO NERVOS CRANIANOS</b>		
<b>ÓBITO PELA DOENÇA</b>			SIM	11	31,4
sim	24	68,6	NÃO	24	68,6
não	11	31,4	<b>IMP3 intensidade</b>		
<b>EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL</b>			0	8	22,9
sim	2	6,7	1	8	22,9
não	28	93,3	2	7	20,0
<b>HISTORIA ETILISMO</b>			3	12	34,3
sim	21	70,0	<b>IMP3 extensão</b>		
não	9	30,0	0	8	22,9
<b>HISTORIA TABAGISMO</b>			1	8	22,9
sim	14	46,7	2	13	37,1
não	16	53,3	3	6	17,1
<b>ESTADO</b>			<b>MEMBRANA</b>		
I	2	5,7	continua	7	31,8
II	3	8,6	descontinua	15	68,2
III	3	8,6	<b>TEMPO RECIDIVA (mês)</b>		
IVA	11	31,4	N	17	
IVB	16	45,7	MÉDIA	4,51	
<b>GRAU</b>			MEDIANA	3,83	
CEC G1	2	5,7	<b>TEMPO ÓBITO (mês)</b>		
CEC G2	5	14,3	N	24	
CEC G3	2	5,7	MÉDIA	2,37	
CENCI	26	74,3	MEDIANA	1,59	

Tabela 2. Análise da expressão do IMP3 em relação às variáveis estudadas

	IMP3				odds	Total
	POSITIVO	%	NEGATIVO	%		
<b>SEXO</b>						
			<i>p</i> -valor = 0,999			
FEMININO	10	76,9	3	23,1	0,98	13
MASCULINO	17	77,3	5	22,7	(0,150 -- 7,69)	22
<b>LINFONODOMEGALIA</b>						
			<i>p</i> -valor = 0,567			
SIM	24	80,0	6	20,0	2,57	30
NÃO	3	60,0	2	40,0	(0,178 -- 28,49)	5
<b>SANGRAMENTO NASAL</b>						
			<i>p</i> -valor = 0,999			
SIM	10	76,9	3	23,1	0,98	13
NÃO	17	77,3	5	22,7	(0,150 -- 7,69)	22
<b>OBSTRUÇÃO NASAL</b>						
			<i>p</i> -valor = 0,999			
SIM	15	75,0	5	25,0	0,756	20
NÃO	12	80,0	3	20,0	(0,097 -- 4,85)	15
<b>COMPROMETIMENTO NERVOS CRANIANOS</b>						
			<i>p</i> -valor = 0,386			
SIM	10	90,9	1	9,1	3,98	11
NÃO	17	70,8	7	29,2	(0,407 -- 203,6)	24
<b>GRAU</b>						
			<i>p</i> -valor = 0,999			
CENCI	20	76,9	6	23,1	0,95	26
CEC	7	77,8	2	22,2	(0,077 -- 7,22)	9
<b>ESTADIO</b>						
1	1	50,0	1	50,0		2
2	2	66,7	1	33,3	<i>p</i> -valor = 0,999	3
3	2	66,7	1	33,3		3
4	20	80,0	5	20,0		25
<b>IDADE</b>						
N		27		8		
MÉDIA		48,2		56,8	<i>p</i> -valor = 0,247*	
MEDIANA		50,0		65,5		
DESVIO-PADRÃO		18,3		17,3		

Tabela 3. Análise da sobrevida em relação à expressão do IMP3 e ao estadiamento

Sobrevida Global	≤ 2 anos <i>n</i> =16	≥ 2 anos <i>n</i> =17
IMP3 negativo	6 (37%)	0 (zero)
IMP3 positivo	10 (68%)	17 (100%)
Estadio I/II	6 (37%)	1 (6%)
Estadio III/IV	10 (68%)	16 (94%)

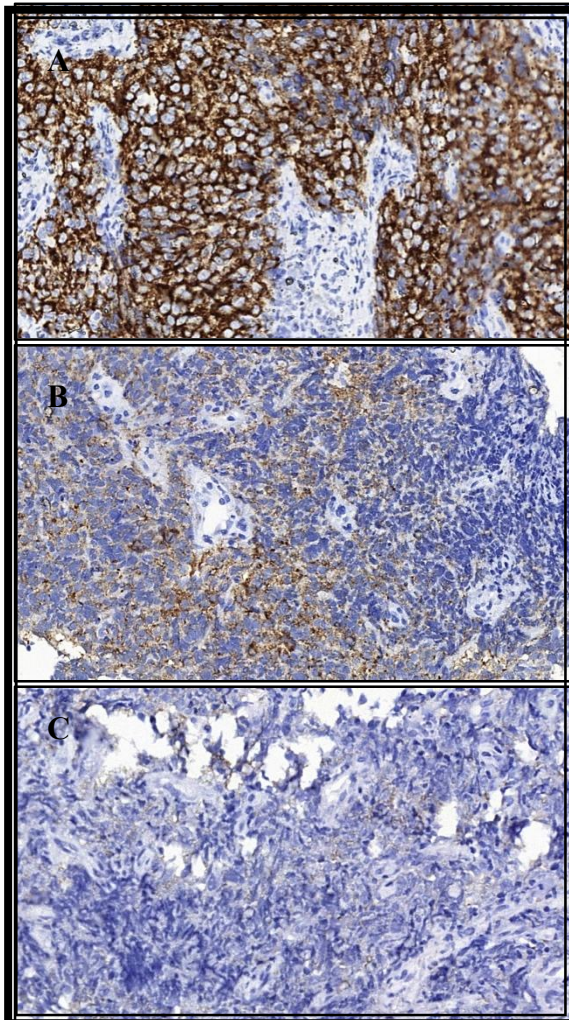


Figura 1. Painel de exemplos dos resultados imunofenotípicos de expressão do IMP3. Intensidade/extensão 3+ (A). Intensidade/extensão 2+(B). Intensidade/extensão 1+ (C).



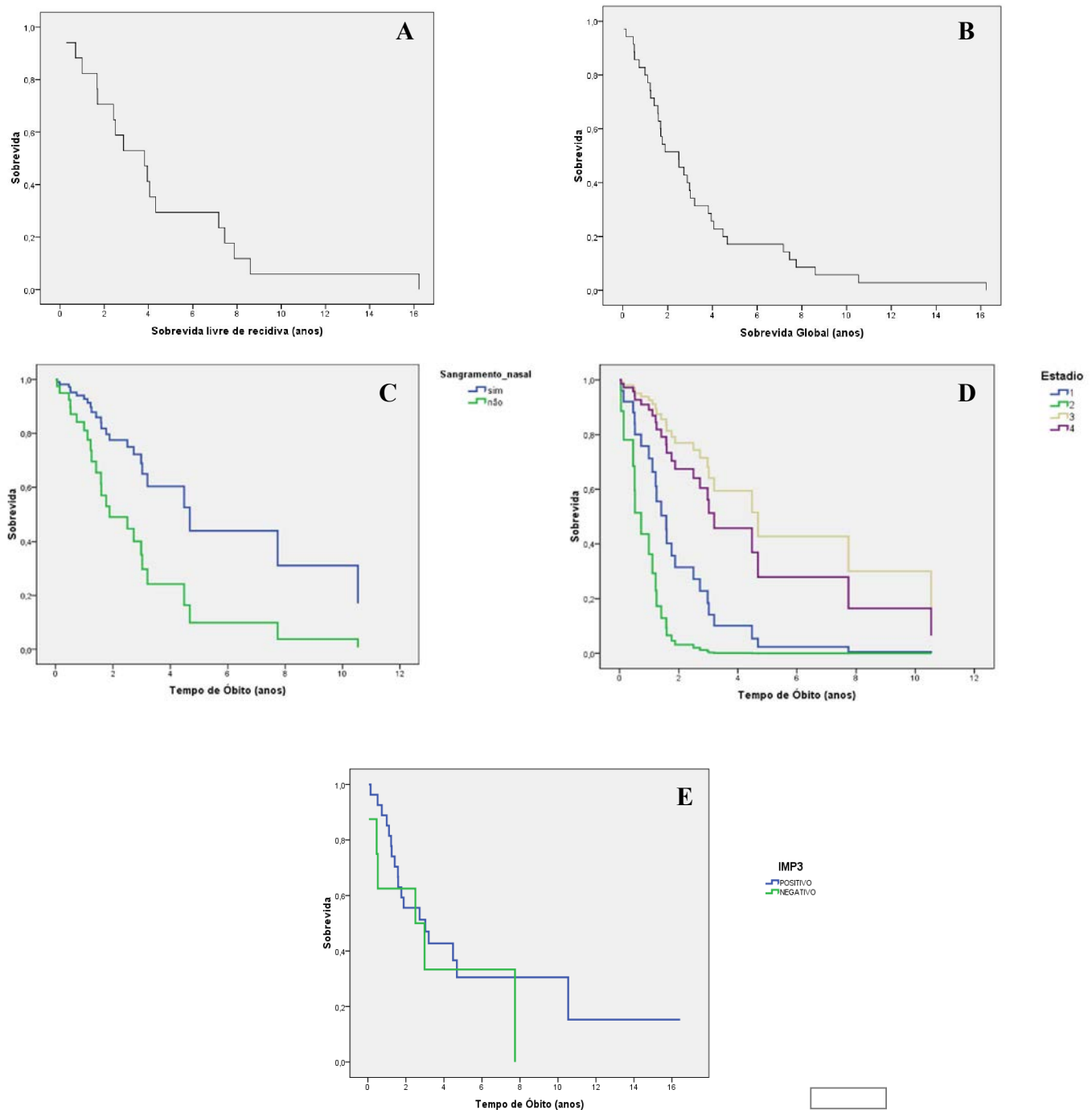


Figura 2. Curvas de sobrevida livre de doença e de sobrevida global nos pacientes com CNF através do estimador de Kaplan Meier, mostrando um declínio acentuado na sobrevida dos pacientes até o quarto ano (2A e 2B). Curva de sobrevida relacionada à apresentação de sangramento nasal (2C). Curva de sobrevida em relação ao estadiamento TNM ao diagnóstico (2D). Curva de sobrevida relacionada à positividade ou não da expressão de IMP3 (2E).



Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- O diagnóstico do CNF foi realizado predominantemente em estágios avançados;
- Houve, entre os pacientes avaliados, elevada taxa de recidiva;
- Sobrevida livre de recidiva e a sobrevida global foram baixas entre a população avaliada.
- Houve grande indício da correlação da positividade do biomarcador IMP3 com os casos de maior sobrevida global.



## ANEXO I

---

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O presente trabalho intitulado “**Determinação da relação de novo biomarcador (IMP3) no Carcinoma de Nasofaringe**” visa identificar potenciais ferramentas de utilidade diagnóstica que possam contribuir para melhorar o tratamento das neoplasias de nasofaringe, e dessa forma aumentar a expectativa de vida dos pacientes acometidos. O material previamente coletado através de biópsia, armazenado em nossos arquivos e utilizado no diagnóstico de sua doença, será novamente encaminhado sem qualquer necessidade de novas abordagens ou coletas.

Tomaremos todos os cuidados para que não ocorra qualquer dano ao material de estudo (bloco de parafina contendo amostra da neoplasia), no entanto existe a possibilidade de desgaste desta amostragem no momento da confecção de novos cortes histológicos. Esse risco é mínimo e se justifica, uma vez que a presente pesquisa poderá determinar um novo parâmetro de abordagem para sua doença. Certificamos que, caso o estudo identifique algum fator prognóstico que possa determinar mudança ou readequação de seu tratamento/acompanhamento, você e seu médico assistente serão avisados.

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar, sendo livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. Sua contribuição é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O pesquisador irá tratar sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada junto ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e outra será fornecida a você.

A participação no estudo não acarretará custos a você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DO(A) PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELO(A) PARTICIPANTE: Eu, \_\_\_\_\_, fui informado(a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. A professora orientadora Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também em caso de gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a estudante Brenna Luize Cunha Ferreira ou a professora orientadora Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues no telefone (14) 38801656 ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) no telefone (14) 38601609.

Declaro que concordo em participar deste estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Botucatu, ..... de ..... de .....

---

ENTREVISTADO PESQUISADOR

## ANEXO 2



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de  
abril de 1997

Botucatu, 03 de dezembro de 2.007

OF. 482/2007-CEP

Ilustríssimo Senhor  
Prof. Dr. Jair Cortez Montovani  
Departamento de Oftalmo/Otorrino  
da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezado Dr. Jair,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP informo que o Projeto de Pesquisa "**Carcinoma de nasofaringe: análise da importância prognóstica da imuno-expressão da galectina-3 e proteínas de matriz**", a ser conduzida pelo Dr. Victor Nakajima, orientado por Vossa Senhoria com a colaboração dos Drs. José Vicente Tagliarini, Maria Aparecida Custódio Domingues e Emanuel Celice Castilho, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 03/12/2007.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP.

## ANEXO 3



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone: (14) 3880-1608 / 3880-1609  
e-mail secretaria: [capellup@fmb.unesp.br](mailto:capellup@fmb.unesp.br)  
[kleber@fmb.unesp.br](mailto:kleber@fmb.unesp.br)  
e-mail coordenadoria: [smolina@fmb.unesp.br](mailto:smolina@fmb.unesp.br)



Registrado no Ministério da Saúde  
em 20 de abril de 1997

Botucatu, 16 de Julho de 2015

OF. 90/2015-CEP

Ilustríssima Senhora  
Profª Drª Maria Aparecida Custódio Domingues  
Departamento de Patologia da  
Faculdade de Medicina de Botucatu

Cara Dra Maria Aparecida,

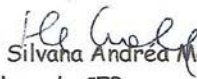
Com referência ao Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 2643-2007) "Carcinoma de nasofaringe: análise da importância prognostica da imuno-expressão da galectina-3 e proteínas de matriz", que foi conduzido pelo Dr. Victor Nakajima, orientado pelo Prof. Titular Jair Cortez Montovani, com a colaboração dos Drs. José Vicente Tagliarini, Maria Aparecida Custódio Domingues e Emanuel Celice Castilho, aprovado por este colegiado em 03/12/2007, informo que o mesmo conta um **Sub-Projeto** a saber:

**Sub-Projeto I: (Protocolo CEP 2643-2007-A) "Determinação da relação de novo biomarcador (IMP3) no carcinoma de nasofaringe"** que foi conduzido por Brena Luize Cunha Ferreira, orientada pela Profª Drª Maria Aparecida Custódio Domingues, Co-orientada pelo Prof. Dr. Victor Nakajima, cujo objetivo será Dissertação de Mestrado.

O CEP solicita aos pesquisadores envolvidos, que sejam enviados os respectivos "Relatórios Finais de Atividades de cada Estudo" em separado.

O modelo para elaborar o Relatório Final está disponível no site: [www.fmb.unesp.br](http://www.fmb.unesp.br) -> pesquisa -> comitê de ética em pesquisa -> informações -> documentos - Relatório Final de Atividades

Atenciosamente,

Profª Drª  Silvana Andréa Molina Lima  
Coordenadora do CEP.

## ANEXO 4

### ESTADIAMENTO CNF (AJCC, 2010)

<b>DEFINICAO</b>
<b>T1:</b> tumor confinado à nasofaringe ou com invasão de orofaringe e/ou cavidade nasal sem extensão para faríngea (infiltração posterolateral além da fascia faringobasilar);
<b>T2:</b> extensão para faríngea (infiltração posterolateral além da fascia faringobasilar);
<b>T3:</b> invasão de estruturas ósseas da base de crânio e/ou seios paranasais;
<b>T4:</b> invasão de crânio e/ou pares cranianos, fossa infratemporal, hipofaringe, órbita ou espaço mastigatório.
<b>N1:</b> linfonodo(s) unilateral(is) ou na linha média $\leq 6$ cm, acima da fossa supraclavicular;
<b>N2:</b> linfonodos bilaterais $\leq 6$ cm, acima da fossa supraclavicular;
<b>N3:</b> linfonodo(s) $> 6$ cm ( <b>N3a</b> ) ou extensão para a fossa supraclavicular ( <b>N3b</b> ).
<b>M1:</b> metástases à distância.
<b>AGRUPAMENTO (TNM)</b>
<b>I:</b> T1N0M0;
<b>II:</b> T1N1M0 ou T2N0-1M0;
<b>III:</b> T1-2N2M0 ou T3N0-2M0;
<b>IVA:</b> T4N0-2M0;
<b>IVB:</b> qqTN3M0;
<b>IVC:</b> qqTqqNM1.



