

**TÍTULO : INVESTIGAÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)
POR IMUNO-HISTOQUÍMICA E HIBRIDIZAÇÃO “IN
SITU” EM BIÓPSIAS ENDOSCÓPICAS DE ESÔFAGO.**

DOUTORANDO: CHRISTIANE PIENNA SOARES DIAS

ORIENTADOR: PROF.DR. MIRIAM A.S.TREVISAN

CO-ORIENTADOR: PROF.DR. JOSÉ VASSALLO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIA MÉDICAS

DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA

1996

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - UNICAMP

D543f

Dias, Christiane Pienna Soares

Investigação do "Papilloma vírus Humano" (HPV) por imunohistoquímica e hibridização "in situ" em biópsias endoscópicas de esôfago/
Christiane Pienna Soares Dias. Campinas, SP: (s.n.), 1995.

Orientadores: Mirtam A. S. Trevisan, José Vassallo

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Esôfago. 2. Papilloma vírus humano. 3. Imunohistoquímica.
4. Hibridização in situ. I. Trevisan, Mirtam A. S. II. Vassallo,
José. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: PROFA.DRA. MIRIAM AP. DA SILVA TREVISAN

Co-orientador: PROF.DR. JOSÉ VASSALLO

Membros:

1. PROFA.DRA. MIRIAM AP. DA SILVA TREVISAN *M. Trevisan*

2. PROFA.DRA. LUISA LINA VILLA *L. Villa*

3. PROF.DR. SANDRO ROBERTO VALENTINI *S. Valentini*

4. PROF.DR. NELSON ARY BRANDALISE *Nelson Ary Brandalise*

5. PROF.DR. NELSON ADAMI ANDREOLLO *Nelson A. Andreollo*

Curso de pós-graduação em Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 11.01.1996

Este exemplar corresponde a versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do Título de Doutor em Ciências - Área de Anatomia Patológica pela Farmacêutica Bioquímica Christiane Pienna Soares Dias.

1

Campinas, 11 de janeiro de 1996

Profa. Dra. Miriam Ap. da Silva Trevisan
Orientadora

PROF. DR. MIRIAM A. S.
TREVISAN, com sua orientação objetiva,
honeste e competente, contribuiu de maneira
ímpar para minha formação científica e
moral, ensinando-me o significado do
profissionalismo sem vaidades.

PROF. DR. JOSÉ
VASSALLO, sou grata por sua
orientação na leitura e
acompanhamento dos casos
submetidos às reações de imuno-
histoquímica e hibridização “in situ”.

Ao meu marido ÁLVARO
CORDEIRO MENDES DIAS por
toda sua compreensão, apoio,
companheirismo e, sobretudo, amor,
transformando os dias tumultuados
em bálsamo encorajador.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mario José Soares e Dirce Pienna Soares, pelas horas inestimáveis de carinho e dedicação em minha formação, sem os quais todas as conquistas seriam difíceis e os obstáculos intransponíveis.

A amiga Erni M.Cicca pelo auxílio e amizade sinceros, abrindo-me as portas de sua casa e muito mais de sua alma.

As amigas, Terezinha Marques e Silvia Pierre por todos os momentos, na labuta das atividades da pós-graduação ou nos prazeres de uma boa refeição.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Experimental - CAISM pela presteza e solicitude, contribuindo de forma valorosa para o desenvolvimento deste trabalho.

As secretárias do Departamento de Anatomia Patológica, Maria do Carmo e Maria, pelo apoio acadêmico indispensável e o carinho e educação indescritíveis.

As amigas do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Fátima, Dona Gê e Lucinha, sempre prontas a oferecer uma palavra amiga e o auxílio em todas as horas.

As funcionárias da Secção de Pós-Graduação do HC/UNICAMP pelo atendimento prestimoso e competente.

As funcionárias do Gastrocentro-HC/UNICAMP, Neuza e Adriana, pelo auxílio na separação dos blocos e lâminas.

SUMMARY

Human Papillomavirus has been describe as a risk factor to benign and malign esophageal lesions. The HPVs commons in esophageal epithelium are 6, 11, 16, 18, 31, 33 and 35. We had select fourty nine endoscopic biopsies which histologic analysis had show koilocytotic atypia in different grades. We had use immunohistochemical and *in situ* hibridization reactions with commercially biotynilated probes 6/11, 16/18 and 31/33/35 (Viratype probe set - DIGENE). We couldn't find HPV's antigen or DNA in any fourty nine samples. Then, our studies suggest other factors to development of esophageal tissues alterations.

RESUMO

O papiloma vírus humano (HPV) tem sido descrito como um fator de risco para o desenvolvimento de lesões benignas e malignas no esôfago, sendo os tipos mais frequentes os HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35. No presente trabalho, selecionamos 49 casos de biópsias endoscópicas de esôfago coradas por hematoxilina-eosina que continham graus variados de atipia coilocitótica (coilocitose, discariose, bi ou multinucleação). Esses casos foram submetidos às reações de imuno-histoquímica e hibridização “ in situ ” com sondas biotiniladas 6/11, 16/18, 31/33/35 (Kit Viratype-DIGENE). Os resultados para os casos estudados foram negativos, com controles positivos de forte sinal, por ambos os métodos. Assim, é possível que as alterações morfológicas do epitélio escamoso do esôfago possam não ser de origem viral e outros fatores devem ser considerados como potencialmente responsáveis por essas alterações.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	11
1. Propriedades gerais do papilomavírus	11
2. Estrutura do virion	12
3. Estudo molecular do genoma viral	13
3.1. Genes E1	14
3.2. Genes E2	15
3.3. Genes E4	15
3.4. Genes E5	17
3.5. Genes E6/E7	17
3.6. Genes E8	19
3.7. Genes L1	19
3.8. Genes L2	20
4. Ciclo de vida do Papilomavírus Humano	20
5. Atipia coilocitótica - Aspecto ultraestrutural	22
6. Infecção pelo Papilomavírus Humano nos diversos sítios corporais	24
7. Infecção pelo Papilomavírus Humano no esôfago	25
OBJETIVO	28

MATERIAIS E MÉTODOS	29
1. Casuística	29
2. Reação de imuno-histoquímica	30
2.1. Desparafinação	33
2.2. Inibição da peroxidase endógena	33
2.3. Tampão citrato pH 6,0	33
2.4. Soro normal	33
2.5. Anticorpo primário	34
2.6. Lavagem com PBS	35
2.7. Anticorpo secundário	36
2.8. Complexo Estreptavidina-Biotina-Peroxidase	36
2.9. 3,3" tetra-hidrocloreto diamino-benzidina	36
2.10. Contra-coloração	37
2.11. Desidratação e Montagem	37
2.12. Leitura	37
3. Reação de hibridização "in situ"	39
3.1. Desparafinação	39
3.2. Digestão enzimática	39
3.3. Tampão Salino Citrato (SSC)	

	10
3.7. Tampão Salino Citrato (SSC)	41
3.8. Anticorpo anti-biotina	41
3.9. Anticorpo secundário	41
3.10. Complexo Estreptavidina-Biotina-Peroxidase	42
3.11. 3,3'' tetra-hidrocloroeto diamino-benzidina	42
3.12. Contra-coloração, desidratação e montagem	42
3.13. Leitura	42
3.14. Controles	44
RESULTADOS	46
DISCUSSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

INTRODUÇÃO

1. Propriedades gerais dos papilomavírus

Os papilomavírus compõem um grupo heterogêneo de vírus DNA cuja ocorrência é predominante em epitélios escamosos, causando hiperplasia papilomatosa e lesões verrucosas no homem e em grande número de animais (ABRAMSOM, 1985; CHANG et al, 1990c; BARNES et al, 1991). Cada vírus é nomeado de acordo com a espécie animal que podem infectar (coelhos, ovelhas, bovinos e o homem) e sub-classificados segundo a homologia da sequência nucleotídica dos diferentes tipos isolados (CHANG et al, 1990c; TENTI, 1992) Quando isolados das diferentes espécies, em experimentos com hibridização cruzada, os papilomavírus foram inicialmente classificados em subtipos. Assim, convencionou-se que o tipo viral em estudo com homologia inferior a 50%, comparado a um prototipo conhecido, deveria receber uma nova numeração (MC CANCE, 1986; DE VILLIERS, 1989; CHANG et al, 1990c). Com os avanços no sequenciamento de DNA, uma nova definição dos genótipos será requerida quando a concordância nucleotídica entre as sequências L1, E6 e E7 de dois tipos for menor que 90% (DE VILLIERS,

1994). As regiões mais conservadas entre os subtipos são E1, E2 e L1, enquanto a região mais divergente é a região não codificadora (CHAN et al, 1992). Com base na homologia das sequências nucleotídicas e na menor diferença de organização do genoma, os papilomavírus podem ser classificados em famílias, de acordo com seu tropismo pelas áreas genitais, pele e fibroblastos animais (COLE & DANOS, 1987). Dessa forma até o momento conhece-se cerca de 75 tipos de papiloma vírus humano diferentes, dos quais 69 tipos foram descritos (DE VILLIERS, 1989; ZUR HAUSEN, 1989; TENTI et al, 1992).

2. Estrutura do Virion

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus DNA dupla fita pequeno, circular, com 55 a 60 nm , um capsídeo de 72 subunidades (SEEDORF, 1985; MC CANCE, 1986; AMORTEGUI & MEYER, 1990; CHANG et al, 1990c; FIGUEIREDO & VELLUDO, 1990). O capsídeo tem arranjo em padrão icosaédrico, formando um envoltório de 2 nm de espessura em torno do DNA viral (BAKER et al, 1991). Sob o aspecto bioquímico, o capsídeo viral é composto por uma proteína principal (54 KDa) e outra menos representativa (76 KDa) responsáveis por sua antigenicidade (TOMITA, et al, 1987). Essas proteínas do capsídeo carregam determinantes antigênicos gênero-específico (JENSON et al, 1980).

Estudos com clivagem do DNA de papilomavírus bovino do tipo 1 (BPV-1) por enzimas de restrição inicialmente demonstraram, que o genoma dos papilomavírus possuiam dois longos domínios, denominados de “Open Reading Frames” (ORFs) precoce e tardio, para indicar suas expressões durante o ciclo viral, e uma região reguladora não codificadora (DANOS, 1983; MC CANCE, 1986; NASSERI, 1987; DE VILLIERS, 1989). Atualmente essas regiões genômicas dos papilomavírus são consideradas como genes. O domínio precoce representa 45% do genoma viral com oito genes codificadores para proteínas não estruturais associadas com a replicação e controle do genoma viral. A região tardia representa cerca de 40% do genoma do HPV, cuja função é codificar proteínas estruturais do capsídeo viral. Em cerca de 5% do genoma está contida a região não codificadora com sequência de nucleotídeos reconhecidas pelas RNA polimerases, as quais iniciam a síntese de mRNA (promotores) e outras modulam a transcrição de vários genes (“enhancers”) (LAZO, 1988; TENTI et al, 1992; PFISTER & FUCHS, 1994).

3. Estudo Molecular do Genoma Viral

Pela capacidade do papilomavírus bovino tipo 1 (BPV-1) de transformar fibroblastos de roedores em cultura tecidual, ele foi utilizado como modelo nos estudos sobre o mecanismo de replicação do DNA dos papilomavírus em geral (LAMBERT, 1991). Estudos comparativos entre vários papilomavírus animais e humanos têm identificado os produtos

envolvidos com a replicação do DNA, controle da transcrição, transformação celular e arranjo do capsídeo (FAVRE et al, 1975; HIRSCH-BEHNAM, DELIUS & DE VILLIERS, 1990; ENSSER & PFISTER, 1990).

3.1. Genes E1

O produto de gene E1 é uma proteína nuclear, fosforilada nas porções amino terminal (N-terminal) e carboxi terminal (C-terminal), com peso molecular de 68 a 72 KDa e parece ter vida curta (SANTUCCI, 1990; BLITZ & LAIMINS, 1991). Estudos comparativos entre a proteína E1 e o grande antígeno T do vírus SV40 mostraram que ambos compartilham regiões de similaridade entre seus aminoácidos, as quais contêm domínios para ligação de ATP, ATPase e DNA helicase associadas à replicação viral (CLERTANT & SEIF, 1984). Experimentos “in vitro” demonstraram a capacidade da proteína E1 em se agregar à proteína E2, formando um complexo estável, cuja função seria a de controlar a replicação viral (MOHR, 1990). Além da função primordial de replicação viral, um RNA mensageiro processado (“spliced”) entre o começo dos genes E1 e E4 codifica a proteína E1ΔE4 (proteína E4), com afinidade específica às citoqueratinas celulares e portanto, com função de conferir tropismo epitelial ao vírus (DOORBAR et al, 1991).

3.2. Genes E2

Os genes E2 do vírus BPV-1 codifica três proteínas nucleares responsáveis pela regulação da transcrição viral: E2TA, E2TR e E8/E2TR. A proteína E2TA é uma proteína transativadora transcricional de ampla extensão que ativa elementos responsivos “enhancers” (E2RE). Os outros transcritos, o repressor transcricional E2TR e o produto do mRNA processado (“spliced”) E8/E2TR, têm função de reprimir a atividade transcricional de E2TA através de ligação competitiva à sítios de ligação no DNA. Dessa forma a interação de E1/E2TA/E2TR promoveria a replicação viral e o aumento da concentração das proteínas E2TR ou E8/E2TR reprimiriam a atividade replicativa do vírus (LAMBERT, 1991).

3.3. Genes E4

A replicação e a transcrição do DNA viral aumentam com a diferenciação celular, com a expressão de proteínas tardias e subsequente arranjo do virion, restrito às células mais superficiais diferenciadas (ROBERTS et al, 1993). A proteína E4 é um produto do RNA mensageiro com dois exons acoplados entre o começo dos genes E1 e E4 (DOORBAR et al, 1986). Essa proteína, localiza-se no citoplasma sob a forma de grânulos de 2 a 5 µm de diâmetro, adjacente ao núcleo, observado em cultura de queratinócitos, 5 a 6 horas pós-infecção com o vírus recombinante da vaccínia

contendo os genes E1/E4 (DOORBAR et al, 1991). Apesar de ter função ainda pouco esclarecida, a proteína E4 teria papel na maturação viral em células epiteliais mais superficiais com ausência de diferenciação específica de citoqueratinas (BREITBURD, CROISSANT & ORTH, 1990; TENTI et al, 1992). A expressão de E1-E4 em cultura de células nas fases tardias do ciclo de vida viral, promove o desarranjo e bandeamento dos filamentos de queratina sem alterar outras estruturas do citoesqueleto, tais como, a lamina nuclear ou a vimentina (DOORBAR et al, 1991). Citoqueratinas são filamentos intermediários, formando heteropolímeros com cerca de 10 nm de diâmetro e estão contidos em exuberância nas células epiteliais (MILLER, KHUON & GOLDMAN, 1993). A interação entre a proteína E1-E4 e as citoqueratinas promoveria alteração a nível de citoesqueleto celular, podendo ser um mecanismo engenhoso do vírus para infectar e permanecer em um epitélio escamoso menos corneificado (DOORBAR et al, 1988). Essa forma de adaptação viral poderia também explicar a formação das células coilocitóticas, alteração esta mais comumente associada à infecção pelo HPV (DOORBAR et al, 1991).

ALBERS & FUCHS, (1989), em experimento com cDNAs mutantes para expressão de citoqueratinas K14 epidermal tipo I, deletando sequências codificadoras das porções amino terminal e carboxi terminal, observaram distúrbios na rede de filamentos intermediários do citoesqueleto. Esses autores concluem que as citoqueratinas sem porção C-terminal ficam agregadas ao

redor do citoplasma, enquanto mutantes de citoqueratinas defectivos na porção N-terminal, produziriam agregados na superfície nuclear. Portanto, poderíamos imaginar que a interação dos transcritos E1-E4 com a porção carboxi-terminal dos filamentos de citoqueratina impediriam o alongamento dos mesmos com padrão similar de agregação ao desse experimento. ROBERTS et al (1993), utilizando DNA E1-E4 de HPV1 e HPV16, estudaram o aspecto das diferentes citoqueratinas em cultura de células e verificaram o rompimento específico das citoqueratinas K8/K18 e K5/K14 induzido pela proteína E1/E4.

3.4. Genes E5

Os transcritos dos genes E5 estão associados à transformação celular e o controle do número de cópias virais. Um mutante de BPV1, cujos genes de transformação E5 possuíam mutações, foi encontrado integrado ao cromossomo hospedeiro (RABSON et al, 1986). Em animais, os genes E5 dos papilomavírus induzem o desenvolvimento de fibropapilomas e esses genes dos HPVs 6 e 16 codificam uma proteína hidrofóbica que toma parte nos eventos de transformação celular (BANKS & MATLASHEWSKI, 1993).

3.5. Genes E6/E7

Determinadas proteínas do papilomavírus são capazes de induzir transformação celular em sistemas “in vivo” e “in vitro” (SYRJÄNEN, 1992). Experimentos com células CaSKi e SiHa para estudo dos transcritos do

HPV16 revelaram uma fosfoproteína citoplasmática marcado com fósforo radiativo ($^{32}\text{PO}_4$) que comigrava com E7 marcada com enxofre radioativo (^{35}S). Esse trabalho confirmou a natureza fosfoproteica de E7, uma proteína livre no citoplasma ou núcleo sob a forma monomérica, que ao se associar à proteína E6 em HPV16 permite a manutenção e a progressão do câncer em hospedeiro natural (SMOTKIN & WETTSTEIN, 1987). A análise genética de BPV1, realizada para avaliação da função de E7 em células de retinoblastoma, verificou a formação de um complexo entre E7 e um gene supressor de tumor (p 105-RB), ocasionando hiperproliferação e/ou alteração da diferenciação celular "in vitro" (MÜNGER et al, 1989; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995). A proteína viral E6 pode ligar-se também à p53, um antioncogene regulador dos pontos de mutação genômica durante o ciclo celular. Tal interação degrada a p53, inativando-a e assim predispondo a célula aos eventos de transformação (FINLAY, HINDS & LEVINE, 1989; PAQUETTE et al, 1993; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995). HAWLEY-NELSON et al (1989), promovendo transfecção em queratinócitos de plasmídios contendo os genes E6 e E7 geraram linhagens celulares com um potencial de crescimento indefinido. COLE & DANOS (1987) em estudo das estruturas repetidas dos produtos dos genes E6 e E7 do HPV18, demonstraram que pequenas alterações nas sequências regulatórias ou súbitas alterações nas sequências codificadoras virais, com modificação no padrão de expressão de seus genes,

contribuiriam para a formação do tumor maligno. Todos esses experimentos confirmam a função das regiões E6 e E7 na transformação celular.

3.6. Genes E8

Em BPV1, verificou-se que os transcritos da região E8 tinham a capacidade de se complexar com a proteína E2TR, responsável pelo controle da região de replicação viral (LAMBERT, 1991). Assim, a região E8 auxiliaria a regulação da replicação viral, de forma repressiva, evitando a produção viral indefinida. No genoma de alguns papilomavírus (BPV tipo 3,4 e 6) não existem os genes E6 e na mesma posição existiriam genes E8 que codificariam uma proteína hidrofóbica similar à proteína E5 (PFISTER & FUCHS, 1994). Assim, esses autores concluem que ambos os genes são análogos ou refletem um rearranjo genômico recente na evolução.

3.7. Genes L1

Esta região do genoma do HPV é responsável pela codificação da proteína principal (54 KDa) do capsídeo viral, com 92% de homologia em seu conteúdo de aminoácidos, representando a região mais conservada entre todos os papilomavírus (CHEN et al, 1982; DARTMAN et al, 1986). Estudos “in vitro” da proteína L1 em papilomavírus bovino e humano demonstraram que

sua estrutura é parcialmente glicosilada e esta é capaz de sofrer arranjo molecular na ausência de L2 (ZHOU et al, 1990).

3.8. Genes L2

Seu produto de transcrição é a proteína menos abundante do capsídeo viral, com 72 KDa, menos conservada que a proteína L1 e suas funções ainda permanecem obscuras (TOMITA et al, 1987; FIGUEIREDO & VELLUDO, 1990; PFISTER & FUCHS, 1994). A porção amino-terminal da proteína L2 é capaz de se ligar ao DNA em uma sequência inespecífica. Essa capacidade sugere seu papel na atração do DNA viral durante o arranjo das partículas completas ou no posicionamento apropriado dos minicromossomos dentro do capsídeo (PFISTER & FUCHS, 1994; ZHOU et al, 1994).

4. Ciclo de vida do Papilomavírus Humano

As funções dos papilomavírus completos, tais como, síntese de DNA viral e expressão dos genes tardios na codificação do seu capsídeo, estão intimamente associadas à diferenciação das células epiteliais escamosas (HOWLEY & SCHLEGEL, 1988). A infecção ocorre nas células da camada basal do epitélio, em decorrência de abrasão ou microlesões da pele e mucosa, e a replicação viral efetiva começa, quando as células filhas contendo o vírus

sofrem maturação (BROKER et al, 1989; VILLA, 1995). O DNA do HPV é replicado em um grande número de cópias e posteriormente ocorre a inserção deste DNA no capsídeo proteico para formar partículas virais maduras (TENTI et al, 1992; VILLA, 1995). Por isso, a grande dificuldade de se estabelecer um sistema de cultura de células para a propagação destes vírus (CHANG et al, 1990c; VILLA, 1995). A proteína L2 complexar-se-ia à proteína L1 permitindo o perfeito arranjo do capsídeo viral (KIRNBAUER et al, 1993; ZHOU et al, 1993). Como anteriormente mencionado, a L2 poderia ter a função de atração do genoma viral e ou posicionamento dos minicromossomos no interior do capsídeo. Nas lesões benignas o padrão do DNA viral permanece sob a forma circular, não integrada ao genoma celular, denominada forma episomal (TENTI et al, 1992). Nesse tipo de lesão, embora ainda não se saiba o mecanismo, a produção viral declina em tempo ainda incerto e o vírus passa a ficar retido nos tecidos cervicais sobre forma latente (DE VILLIERS et al, 1992). Em neoplasias ditas malignas, cujas células sofrem característica transformação, o DNA viral aparece integrado ao genoma celular, induzindo a ruptura dos genes reguladores da replicação (E1/E2), deficiência na transcrição dos genes tardios e transcrição incontrolável dos genes E6/E7. Nesse caso, o ciclo viral é abortado, partículas virais completas não são produzidas e as células infectadas sofrem transformação maligna (BROKER et al, 1989; CHANG et al, 1990c; TENTI et al, 1992). Essas células sofrendo alteração de crescimento e diferenciação,

modificam o padrão de estratificação do epitélio nas camadas de células mais diferenciadas e as células superficiais passam a expressar citoqueratinas em quantidade e qualidade diferentes (VILLA, 1995). Os ciclos produtivos implicam na liberação de partículas virais, induzindo a formação de anticorpos específicos. ONDA et al (1993), em estudo de 73 pacientes com câncer cervical ou neoplasia intraepitelial, verificaram a presença de anticorpos anti-E4 e anti-E7 de HPV 16 em amostras de soro analisadas por ELISA e o DNA do HPV pela reação em cadeia da polimerase (PCR). O estudo desses autores aponta para a possibilidade de detecção do HPV economicamente acessível para a população, permitindo a utilização desses como marcadores em metástase (ONDA et al, 1993). Existe a possibilidade de que anticorpos contra proteínas E6 e E7 de HPVs 16 e 18 ocorram com maior frequência e em títulos maiores em pacientes com carcinoma de colo uterino quando comparado a mulheres normais (VILLA, 1995). De fato, a facilidade de detecção do HPV permitiria a prevenção dessa infecção viral por imunização ou por sua triagem em amostras citológicas através de técnicas mais sensíveis (FRANCO, 1995)

5. Atipia colicitótica e HPV-Aspecto ultraestrutural

O termo atipia colicitótica foi descrito como um padrão patológico do epitélio escamoso na cérvix uterina (RECHER & SREBNIK, 1981). Num trabalho com lesões condilomatosas da cérvix uterina e vagina foram

estabelecidos os principais padrões citológicos dessas lesões: alargamento celular, anofilia, disceratose, bi ou multinucleação, hipercromasia da cromatina e halo perinuclear, (MEISELS & FORTIN, 1976; RECHER & SREBNIK, 1981; BORGES et al, 1986). EVANDER et al (1992), em estudo de mulheres suecas, cujo Papanicolaou apresentava padrão citológico do tipo condilomatoso, inflamatório ou displásico, encontraram positividade para o HPV em 84,2% das amostras submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR). Em um outro estudo de condilomas da cérvix uterina, MEISELS et al (1979), detectaram partículas virais em lesões cervicais que apresentavam atipia coilocitótica. MEISELS et al (1979), HILLS & LAVERTY (1979), detectaram a presença de partículas virais agregadas à cromatina nuclear em lesões cervicais que apresentavam atipia coilocitótica. Estudos ultraestruturais dos coilocitos mostraram bandeamento dos elementos do citoesqueleto e glicogênio no halo perinuclear (HILLS & LAVERTY, 1979). Contudo, somente a análise morfológica não permite um diagnóstico seguro da infecção pelo HPV e outros testes confirmatórios são desejáveis (OBBARIUS-KÜHLER et al, 1994). SHROYER et al (1990) observaram ausência de HPV em células que possuíam os critérios clássicos (atipia coilocitótica e disceratose) da infecção viral em lesões na cérvix uterina .

O papilomavírus humano têm sido associado como agente etiológico no câncer cervical (TASE et al, 1989; VAN DEN BRULE et al, 1991; HIGGINS et al, 1992; PAO et al, 1991; BINDU & RADHAKRISHNA, 1992; CHEN et

al, 1993; DUGGAN et al, 1994; FRANCO, 1995). SCHIFFMAN et al (1993), realizaram um estudo com 500 mulheres portadoras de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) em diferentes graus, estabelecendo os fatores epidemiológicos de risco associados à infecção pelo HPV. Os fatores típicos foram: múltiplos parceiros sexuais, infecção pelo Herpes vírus, excesso de fumo e álcool, primeiro intercuro sexual em idade precoce e baixas condições sócio-econômicas (MADEN et al, 1992; SCHIFFMAN et al, 1993). ELUF-NETO et al (1994), em um estudo de 199 casos de carcinoma cervical invasivo no Brasil, concluíram que a presença do DNA do HPV está relacionado ao número de parceiros sexuais, idade precoce do primeiro intercuro sexual e duração no uso de contraceptivos orais. De fato, num trabalho utilizando a PCR para a detecção de HPV, mulheres com mais de 10 parceiros apresentavam maior porcentagem de infecção pelo papilomavírus (68,6%), enquanto aquelas com apenas um parceiro possuíam a infecção em 21.1% dos casos estudados (SCHIFFMAN et al, 1993).

6. Infecção pelo Papilomavírus Humano nos diversos sítios corporais

Os diferentes subtipos de HPV conhecidos infectam sítios corporais específicos, desenvolvendo lesões benignas ou malignas. Esse tropismo por determinadas localidades teciduais ainda é pouco conhecido porém, acredita-se que hajam receptores específicos em células epiteliais e ou fatores intracelulares predisponentes à replicação e transcrição virais (VILLA, 1995).

Os papilomavírus humanos 6, 11, 16, 18 e 42 estão associados a lesões mucosas, sendo os tipos 6, 11 e 42 encontrados com maior frequência em lesões benignas e o 16/18 em lesões malignas (DE VILLIERS, 1989). No trato anogenital, os HPVs considerados de baixo risco são também o 6, 11 e 42, enquanto aqueles ditos de alto risco são os tipos 16, 18, 31 e 33 (CHANG et al, 1990a; CHANG, 1990c; VILLA, 1995).

Os papilomavírus humanos subtipos 5 e 8 estão frequentemente relacionados com o câncer de pele, enquanto os subtipos 1 e 2 aparecem associados a lesões epiteliais benignas (CHANG, 1990c; VILLA, 1995).

No trato respiratório superior, os HPVs tipo 2, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 30 e 32 têm sido detectados em lesões benignas e malignas, sendo os tipos 11, 16, 18 e 30 encontrados em carcinomas francamente invasivos (CHANG et al, 1990a).

7. Infecção pelo Papilomavírus Humano no Esôfago

O mecanismo de infecção pelo HPV no esôfago é ainda pouco conhecido. KOSS (1992), sugere que o HPV seja ativado de sua forma latente e descarta a possibilidade de transmissão de pessoa para pessoa. HORDING et al (1989), detectaram o HPV 11 em lesão papilomatosa de esôfago e brônquios e sugerem a transmissão viral ou como foco secundário, através da laringe e secreções brônquicas (via perinatal), ou como foco primário por contato oro-genital. SEDLACEK et al (1989), detectaram a presença de HPV

na cavidade oral e no líquido amniótico, indicando um mecanismo de transmissão perinatal (intra-útero e ou transplacentário).

Apesar da substancial quantidade de dados sobre o câncer esofágico durante os últimos tempos, os fatores que ocasionam esta doença permanecem ainda desconhecidos (TOH et al, 1992; CHANG et al, 1993b). Observa-se surpreendente variação geográfica no mundo, onde a incidência é acentuadamente maior em certas regiões da China, Irã e África do Sul (CHANG, 1990a; CHANG, 1990b). Dessa forma, tem-se procurado investigar fatores de risco para o carcinoma epidermóide de esôfago nas populações onde esta doença ocorre com maior frequência. Estudos epidemiológicos na população chinesa demonstraram que a ingestão de alimentos condimentados, dieta pobre em nutrientes, hábitos de ingestão excessiva de álcool e fumo, oferecem a estes indivíduos maior probabilidade de apresentarem câncer de esôfago e menor sobrevida (BLOT, 1994; CHENG, 1994). Além desses fatores, exposições ocupacionais à produtos de combustão, radiação e outros irritantes da mucosa esofágica predis põem os indivíduos ao câncer (BLOT, 1994). Estudos recentes têm sugerido que a infecção pelo HPV 16, 18, 31, 33 e 35 possam ser fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas do esôfago (SYRJÄNEN, 1982; JANSON, BAILLE & POLLOCK, 1991; KULSKI et al, 1990; BENAMOUZIG et al, 1992; CHANG et al, 1992; CHANG et al 1993a). Porém, esta inferência deveria ser melhor avaliada. Apesar de sua associação com o câncer esofágico, os tipos de HPV 6

e 11 têm-se mostrado frequentes em lesões benignas (CHANG et al, 1990a; CHANG et al, 1990b; POLITOSKE et al, 1992).

Atualmente, têm-se utilizado reações de imuno-histoquímica e hibridização "in situ" para a detecção do HPV em lesões pré-malignas e malignas (KURMAN, 1981; AMORTEGUI & MEYER, 1990; CHANG et al, 1993b; DAS et al, 1993). O método de imuno-histoquímica é útil no diagnóstico diferencial dos tumores indiferenciados, porém limitações como interpretações errôneas ou problemas com a fixação do material podem falsear o resultado (VASSALLO, 1993). Para a identificação de vírus ou outros microrganismos menores em tecidos fixados, a imuno-histoquímica oferece uma alternativa factível. Porém, os anticorpos dirigidos aos antígenos desses microrganismos são incapazes de detectar subtipos virais (BACCHI, GOWN & BACCHI, 1994). As reações de hibridização "in situ", quer utilizando sondas biotiniladas ou radioativas, permitem a detecção de sequências de DNA ou RNA sem alterar a arquitetura do tecido. Apesar da maior sensibilidade dos métodos radioativos, BURNS et al (1987), demonstraram que os métodos não isotópicos permitem o diagnóstico eficaz de agentes virais em materiais fixados e embebidos em parafina. TRONCONE et al (1992) e HERRINGTON et al (1993), em estudo de HPVs de alto risco, comentam que a observação da positividade da reação de hibridização "in situ" dependem do número de cópias virais e a forma de interação com o genoma celular. HERRINGTON et al (1993), acreditam que as sequências virais com padrão de integração

fornece sinal composto, enquanto em seqüências episomais os sinais ficam dispersos por todo o núcleo porém, essa correlação ainda parece incerta. No esôfago, verificou-se que o sinal de hibridização "in situ" foi menor comparado ao observado na cérvix uterina, indicando um menor número de cópias em tecido esofágico (CHANG et al, 1993a; CHANG et al, 1993b).

OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo verificar a presença do Papilomavírus Humano (HPV) pelos métodos de imuno-histoquímica e hibridização "in situ" em biópsias endoscópicas de esôfago que apresentam atipia colicitótica em graus variados.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Casuística

Foram estudados 49 casos de biópsias endoscópicas do esôfago fixadas em formalina 10% e incluídas em parafina, retiradas dos arquivos do GASTROCENTRO/HC - UNICAMP dos anos de 1992 e 1993 . Constavam dessa casuística (TABELA 1) homens, mulheres e crianças com idade variando de 2 meses a 75 anos e possuindo, na análise morfológica dos cortes corados pela hematoxilina/eosina, alterações celulares sugestivas de infecção pelo papilomavírus humano: coilocitose com discariose, hipercromasia nuclear, bi ou multinucleação (atipia coilocitótica). Esses casos apresentaram atipia coilocitóticas intensas (caso n°4, Figura 1 e Figura 7), moderadas (caso n°32, Figura 2) e leve a moderadas (caso n° 10, Figura 3). Dois casos são representados por papilomas de mucosa esofageana com atipias coilocitóticas leves(caso n° 3) e discretas(caso n° 6, Figura 4).

TABELA 1. - Relação dos 49 casos de biópsias endoscópicas de esôfago selecionados para investigação do Papilomavírus humano por imuno-histoquímica e hibridização “in situ”.

CASO	BLOCO	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO
1	2007	FEM	2 anos	Atipia coilocitótica leve (Coilocitose difusa com discariose leve e rara bi-nucleação)
2	810	MASC	26 anos	Atipia coilocitótica leve e bi-nucleação
3	2596	MASC	27 anos	Papiloma com atipia coilocitótica leve
4	656	MASC	54 anos	Atipia coilocitótica intensa
5	543	FEM	47anos	Atipia coilocitótica moderada (Coilocitose leve, discariose moderada)
6	2650	MASC	65 anos	Atipia coilocitótica discreta
7	3735	MASC	30 anos	Atipia coilocitótica moderada difusa
8	1000	MASC	1 ano e 6 mese	Atipia coilocitótica leve (coilocitose difusa com discarios leve)
9	1003	MASC	2 meses	Coilocitose difusa sem discariose
10	1785	MASC	30 anos	Atipia coilocitótica leve a moderada (Coilocitose difusa com discariose leve moderada)
11	812	FEM	38 anos	Atipia coilocitótica moderada
12	2553	MASC	35 anos	Atipia coilocitótica moderada
13	2657	MASC	-	Atipia coilocitótica leve e bi-nucleação
14	1483	MASC	45 anos	Atipia coilocitótica moderada difusa e bi-nucleação

Continuação da TABELA 1.

CASO	BLOCO	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO
15	1080	MASC	-	Atipia coilocitótica moderada a intensa difusa
16	1414	MASC	21 anos	Atipia coilocitótica leve a moderada difusa
17	1280	FEM	43 anos	Atipia coilocitótica leve (Coilocitose difusa e discariose leve)
18	1509	MASC	28 anos	Atipia coilocitótica leve e bi-nucleação (coilocitose difusa)
19	2732	FEM	53 anos	Atipia coilocitótica moderada com disqueratose (Metaplasia epidermóide atípica similar a displasia moderada)
20	6488B2;B5;B6	-	-	-
21	150	FEM	60anos	Atipia coilocitótica leve difusa
22	220	MASC	65 anos	Atipia coilocitótica leve
23	1889	MASC	-	Atipia coilocitótica leve (Células esparsas)
24	831	-	-	Atipia coilocitótica leve (Células esparsas)
25	2423	FEM	60 anos	Atipia coilocitótica leve (Coilocitose difusa e discariose leve)
26	3793	FEM	59 anos	Atipia coilocitótica leve e bi-nucleação
27	683	MASC	72 anos	Atipia coilocitótica moderada
28	1919	MASC	49 anos	Atipia coilocitótica leve
29	3863	MASC	40 anos	Atipia coilocitótica leve (Células esparsas)

Continuação da TABELA 1.

CASO	BLOCO	SEXO	IDADE	DIAGNOSTICO
30	2675	FEM	75 anos	Atipia coilocitótic leve
31	1534	FEM	1 ano e 10 meses	Atipia coilocitótic leve
32	1743	FEM	11 anos	Atipia coilocitótic moderada
33	844	MASC	39 anos	Atipia coilocitótic leve a moderada
34	2002	FEM	8 anos	Atipia coilocitótic leve (Células esparsas)
35	3133	MASC	62 anos	Atipia coilocitótic leve (Células esparsas)
36	2758	MASC	26 anos	Atipia coilocitótic leve e bi-nucleaçã (Coilocitose difusa)
37	2522	MASC	28 anos	Atipia coilocitótic leve (Células esparsas)
38	3186	MASC	7 anos	Atipia coilocitótic leve (Células esparsas)
39	1673	MASC	29 anos	Atipia coilocitótic leve
40	969	MASC	28 anos	Atipia coilocitótic leve e bi-nucleaçã
41	2757	MASC	43 anos	Atipia coilocitótic leve (Coilocitose difusa)
42	825	MASC	66 anos	Atipia coilocitótic leve
43	1242	MASC	-	Atipia coilocitótic leve (Células esparsas)
44	1167	MASC	33 anos	Atipia coilocitótic leve
45	2801	FEM	9 meses	Atipia coilocitótic leve (Coilocitose difusa)
46	2499	FEM	73 anos	Coilocitose sem discariose
47	288	FEM	2 anos	Atipia coilocitótic leve (Células esparsas)
48	2314	MASC	27 anos	Atipia coilocitótic moderada e bi-nucleaçã
49	380	MASC	59 anos	Atipia coilocitótic moderada e bi-nucleaçã (Coilocitose difusa)

Os blocos foram selecionados, cortados e esses cortes submetidos às reações de imuno-histoquímica e hibridização “in situ” no Laboratório de Patologia Experimental - CAISM - UNICAMP.

2. Reação de Imuno-histoquímica

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes de 5 µm de espessura e os fragmentos foram aderidos às lâminas de vidro pré-tratadas com solução de organossilano a 2% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano - SIGMA cód. A3648- USA). Os cortes permaneceram à temperatura ambiente e foram colocados em estufa à 56°C três dias antes de serem submetidos aos procedimentos para reação de imuno-histoquímica. O material foi submetido a:

2.1. Desparafinação

As lâminas sofreram três banhos em xilol, dois banhos em álcool absoluto, um banho em álcool 80% , um banho em álcool 50%, lavagem em água corrente e passagem em água destilada.

3.2.2. Inibição da peroxidase endógena

Os cortes foram submetidos a um banho em uma solução 3% de peróxido de hidrogênio em metanol à temperatura ambiente, lavagem em água corrente e passagem em água destilada.

2.3. Tampão Citrato pH 6,0

As lâminas foram incubadas em tampão citrato e levadas ao forno de microondas, potência máxima (700 W) à temperatura de 70°C por 5 minutos (2 vezes). Deixar esfriar por 10 minutos.

2.4. Soro Normal

Os cortes foram cobertos com soro de porco, diluição 1: 60, (Kit Vector - USA) e incubados em câmara úmida por 20 minutos à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, retirou-se o excesso de soro normal sem lavagem posterior.

2.5. Anticorpos Primário

O Anticorpo policlonal anti-HPV (Biogenex - USA) pronto para o uso foi colocado sobre as lâminas à temperatura ambiente em câmara úmida por 2 horas. O excesso de anticorpo primário foi retirado sem lavagem posterior.

2.6. Lavagem -“phosphate buffer saline” (PBS)

As lâminas foram submetidas à três lavagens de 5 minutos cada com tampão PBS à temperatura ambiente.

2.7. Anticorpo Secundário

Foi colocado sobre os cortes o anticorpo biotilado (anti-
imunoglobulinas de camundongo, coelho e cabra produzidos em porco - Kit
DAKO - USA) e incubou-se em câmara úmida à temperatura ambiente por 30
minutos. As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS à temperatura ambiente
por 5 minutos cada.

2.8. Complexo Estreptavidina-biotina-peroxidase (S-ABC)

Colocou-se sobre os cortes o complexo S-ABC e incubou-se em câmara
úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. A lavagem das lâminas foi
realizada em tampão PBS.

2.9. 3,3'' tetra-hidrocloroeto diamino-benzidina (DAB)

As lâminas foram mergulhadas no substrato para reação
imunoperoxidase, a solução do cromógeno (DAB - SIGMA D5637 - USA) em
peróxido de hidrogênio até que os cortes tomassem uma coloração castanha
clara, observada de forma subjetiva no momento da reação. As lâminas foram
lavadas em água corrente.

Preparo DAB: 40 mg de DAB em 100ml de tampão PBS e 40µl de
peróxido de hidrogênio 30%.

2.10. Contra-coloração

As lâminas foram submetidas a coloração com Hematoxilina de Meyer por 30 a 60 segundos à temperatura ambiente, lavadas em água corrente e passadas em água amoniacal.

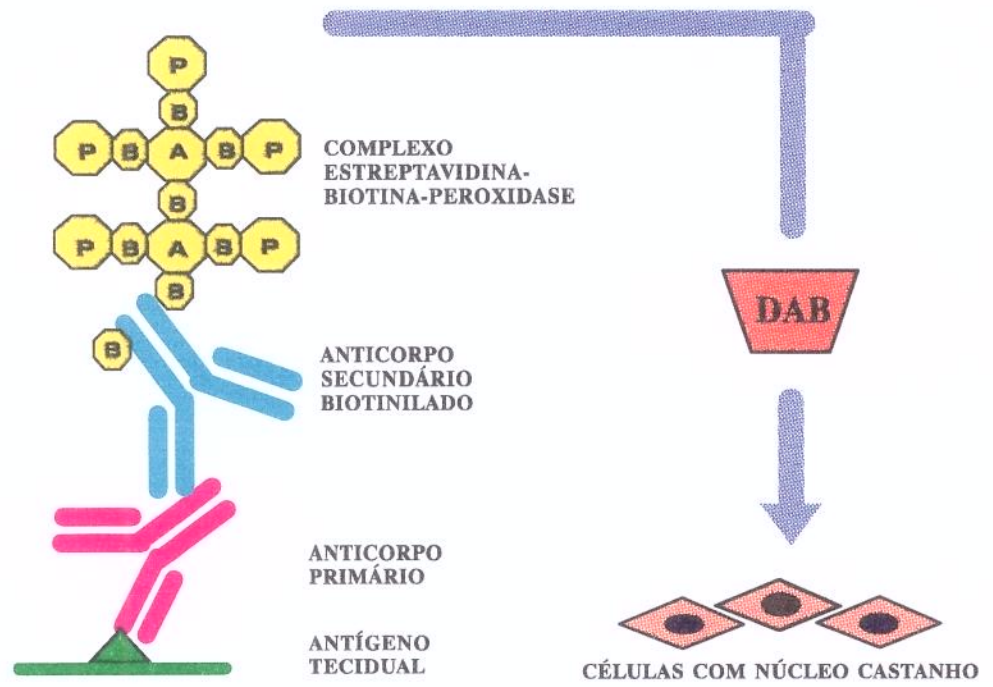
2.11. Desidratação e Montagem

As lâminas foram lavadas em três banhos de álcool absoluto, passadas em três banhos de xilol e montadas em resina. A resina utilizada foi Entellan (Merck, nº 7961).

2.12. Leitura

Considerou-se a reação de imuno-histoquímica positiva, quando foi observada coloração acastanhada depositada no núcleo das células ao microscópio óptico comum.

IMUNO-HISTOQUÍMICA



3. Reação de Hibridização “in situ”

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes de 5 μm de espessura e dispostos sobre lâminas de vidro pré-tratadas com organossilano a 2% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano - SIGMA cod. A3648 - USA). O material foi submetido a:

3.1. Desparafinação

As lâminas contendo os cortes selecionados foram submetidas a dois banhos sucessivos em xilol, dois banhos em álcool absoluto, um banho em álcool 70% e água corrente.

3.2. Digestão Enzimática

Submeteu-se as lâminas à digestão enzimática com proteinase K (20 mg/ml), tampão TRIS/HCl 1M, CaCl_2 1M e água destilada q.s.p. 100ml, por 40 minutos à 37°C.

3.3. Tampão Salino Citrato (SSC)

As lâminas foram mergulhadas em dois banhos de tampão SSC duas vezes concentrado, cinco minutos cada e sob agitação constante.

Solução Trabalho (20 vezes concentrado):

Citrato de Sódio	88,23 g
Cloreto de Sódio	175,32 g
Água destilada q.s.p	1000 ml

3.4. Acetilação

As lâminas foram lavadas em trietanolamina 0,1 M por 10 minutos colocando-se 1 ml de anidrido acético à cada 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em dois banhos de tampão SSC duas vezes concentrado, por 5 minutos cada.

3.5. Desidratação

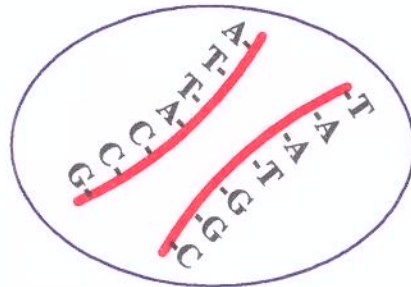
Os cortes foram submetidos a banhos sucessivos em álcool 70% e álcool absoluto por 5 minutos cada e deixadas para secar ao ar.

3.6. Desnaturação e Hibridização

As sondas biotiniladas obtidas comercialmente (*Vira Type in situ Probe Set* - DIGENE Diagnostic Inc. Maryland/USA) 6/11, 16/18 e 31/33/35 foram colocadas sobre os cortes, cobertos com lamínula e submetidos a um aquecimento em placa por 10 minutos à temperatura entre 93 e 95°C. Em seguida as lâminas foram colocadas em câmara pré-resfriada em freezer e incubadas a 37°C “overnight”, em câmara úmida.

HIBRIDIZAÇÃO "IN SITU"

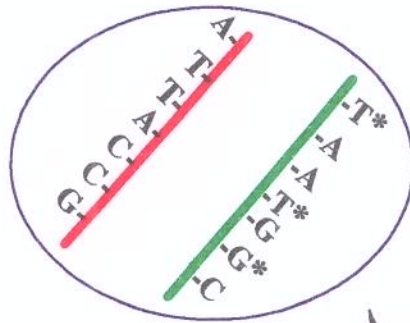
1. Desnaturação



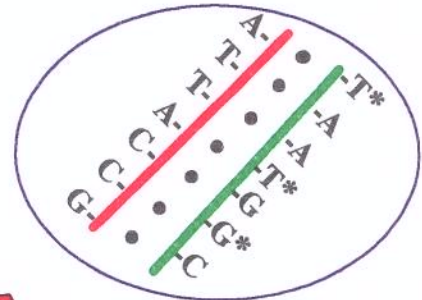
- Núcleo
- Sequência nucleotídica
- Sonda marcada



2. "Anealling"



3. Hibridização



3.7. Tampão Salino Citrato (SSC)

Os cortes foram submetidos a um banho em tampão SSC duas vezes concentrado, à temperatura de 60°C, quatro banhos em tampão SSC em concentração de 0,2%, à temperatura ambiente e um banho em tampão SSC duas vezes concentrado, à temperatura ambiente, 5 minutos cada.

3.8. Anticorpo anti-biotina

As lâminas foram cobertas com anticorpo anti-biotina (cod. M743/1ml/DAKO - USA), diluição 1/20 em PBS com azida e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas em três banhos de tampão PBS por 5 minutos cada.

3.9. Anticorpo secundário

As lâminas foram incubadas em anticorpo secundário biotilado (anti-imunoglobulinas de camundongo, coelho e cabra produzidas em porco-cod.E453/1ml/DAKO - USA), diluição 1/50 em Tris/HCL 0,05N, por 30 minutos a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em três banhos de tampão PBS decorridos os 30 minutos de incubação.

3.10. Complexo Estreptavidina-biotina-peroxidase (S-ABC)

As lâminas foram incubadas com o complexo S-ABC (cod. K0377A;K0377B/1ml/DAKO - USA), diluição de 1/150 em TRIS/HCl 0,05N, por 2 horas à 37°C e mergulhadas em PBS, decorrido o tempo de incubação.

3.11. 3,3''-tetra-hidrocloro-diamino-benzidina (DAB)

Os cortes foram colocados em solução com 40 mg de DAB (cod. D5637 - SIGMA - USA) em 100 ml de PBS e acrescentar, 40 µl de peróxido de hidrogênio 3% até observação de coloração acastanhada clara visível.

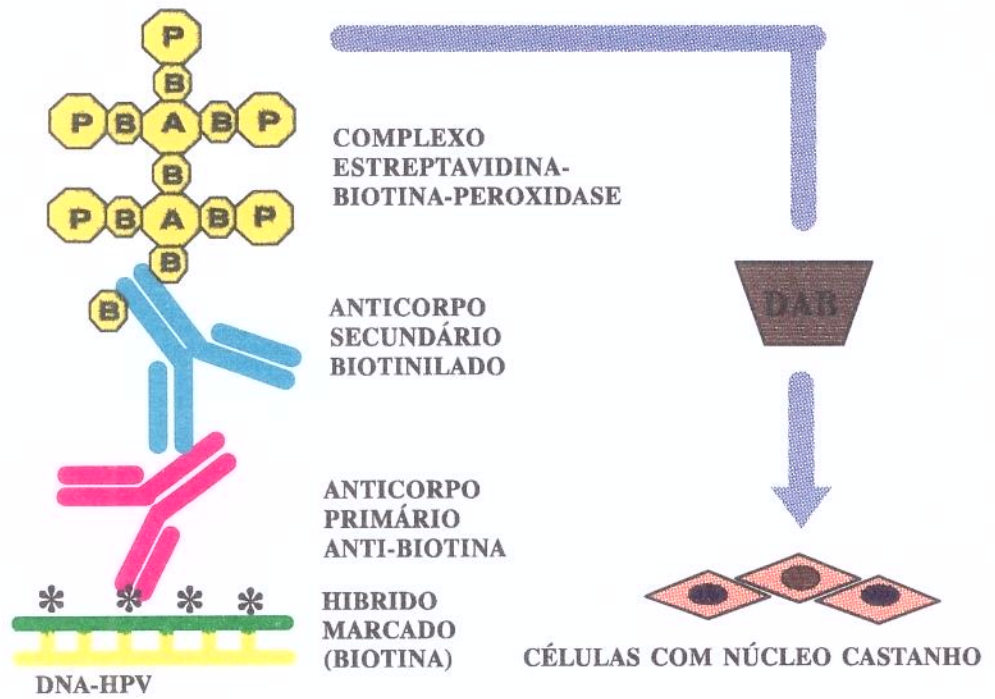
3.12. Contra-coloração desidratação e montagem.

As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Meyer (30 a 60 segundos), desidratadas em três banhos de álcool e três banhos de xilol e montadas em resina. A resina utilizada foi a Entellan (Merck cod.7961).

3.13. Leitura

Foram considerados positivos para a presença de sequências nucleotídicas homólogas ao vírus HPV, os cortes que apresentassem coloração acastanhada no núcleo das células ao microscópio óptico comum.

HIBRIDIZAÇÃO "IN SITU"



3.14. Controles

Para as reações de imunohistoquímica e de hibridização “in situ” foram utilizados controles positivos, constituindo de casos previamente conhecidos como reativos com os anticorpos e sondas utilizadas, em material fixado em formalina a 10% e incluídos em parafina. As reações executadas foram devidamente padronizadas e, em particular, para o método de hibridização “in situ”, foram testados os melhores tempos de digestão, concentração da enzima e temperatura de aquecimento da placa.

RESULTADOS

A leitura dos 49 casos mostrou-se negativa (Figuras 8 e 9) com controles positivos de forte sinal (Figuras 5 e 6), o que nos garante a correta execução das metodologias propostas.

Alguns dos 49 casos em estudo suscitaram interpretações duvidosas, entretanto, os controles positivos apresentavam forte sinal para ambos os métodos. Para os cortes com positividade suspeita, necessitou-se executar algumas repetições a fim de evitar-se interpretações errôneas. Nessas repetições, utilizamos novos controles para garantir a eficiência das reações.

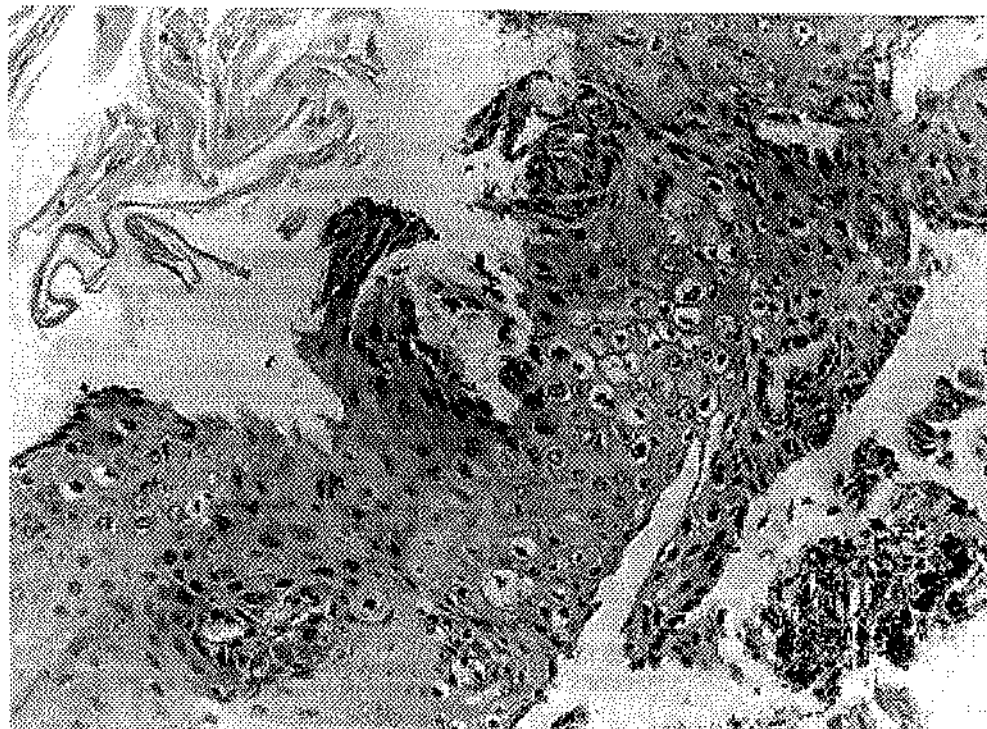


Figura 1. - Caso n° 4. Mucosa esofageana com atipia colocitótica intensa (HE, x200).

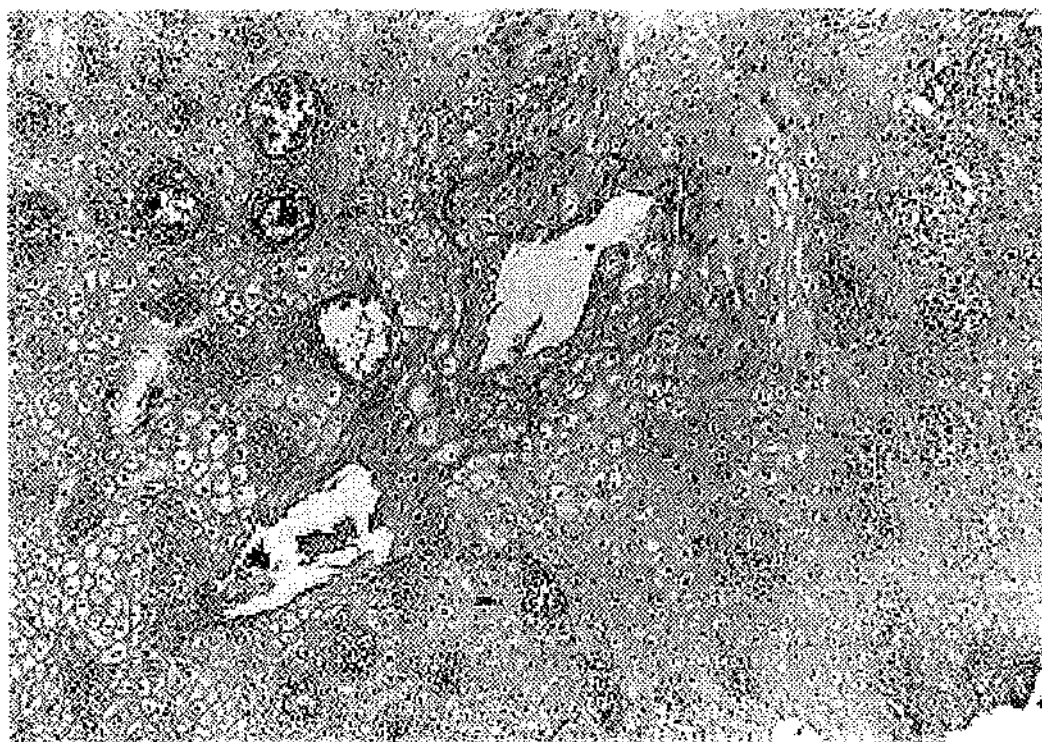


Figura 2. - Caso nº 32. Mucosa esofageana com atipia colocitótica moderada e bi-nucleação (HE, x100).

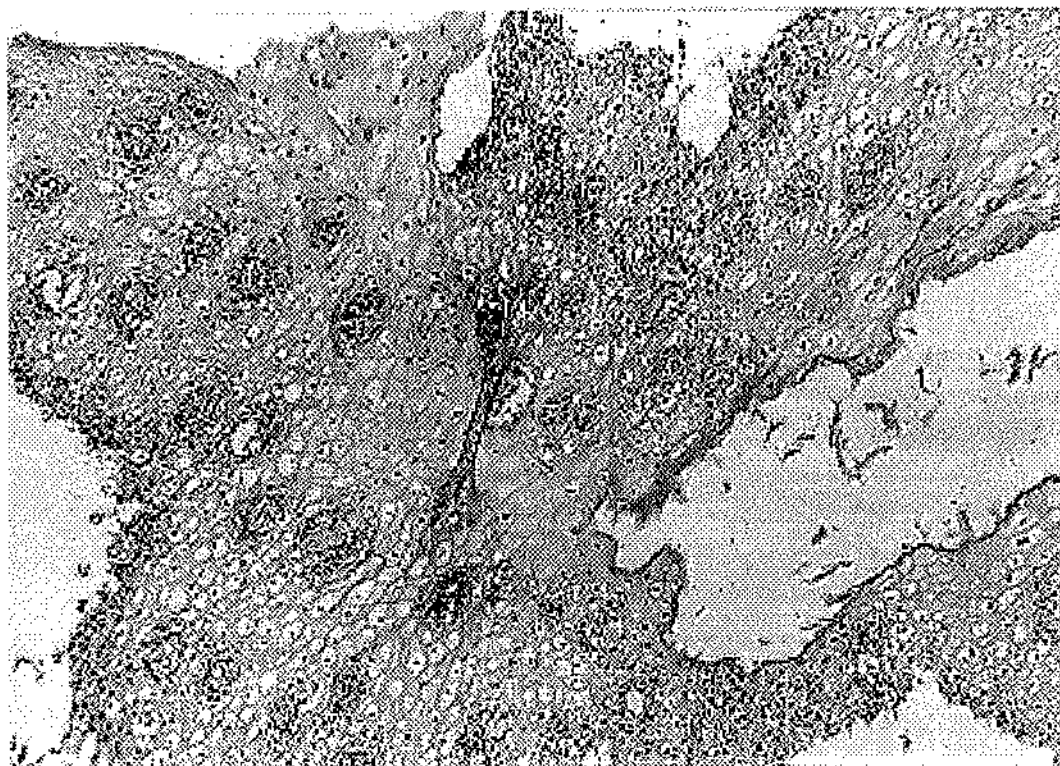


Figura 3. - Caso n° 10. Mucosa esofageana com coilocitose leve a moderada
(HE, x100).



Figura 4. - Caso n° 6 - Papiloma da mucosa esofageana mostrando atipia
coilocitótica em poucas células (HE, x100).

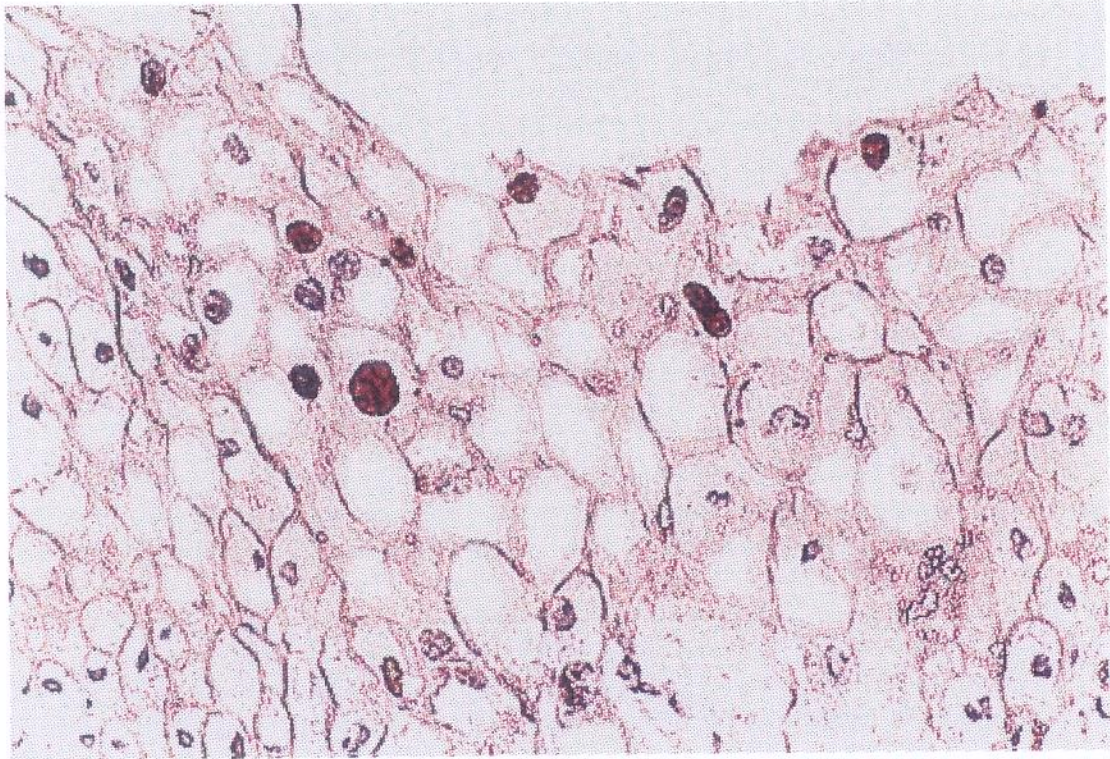


Figura 5. - Controle Positivo da Reação de Imuno-histoquímica (x 400).

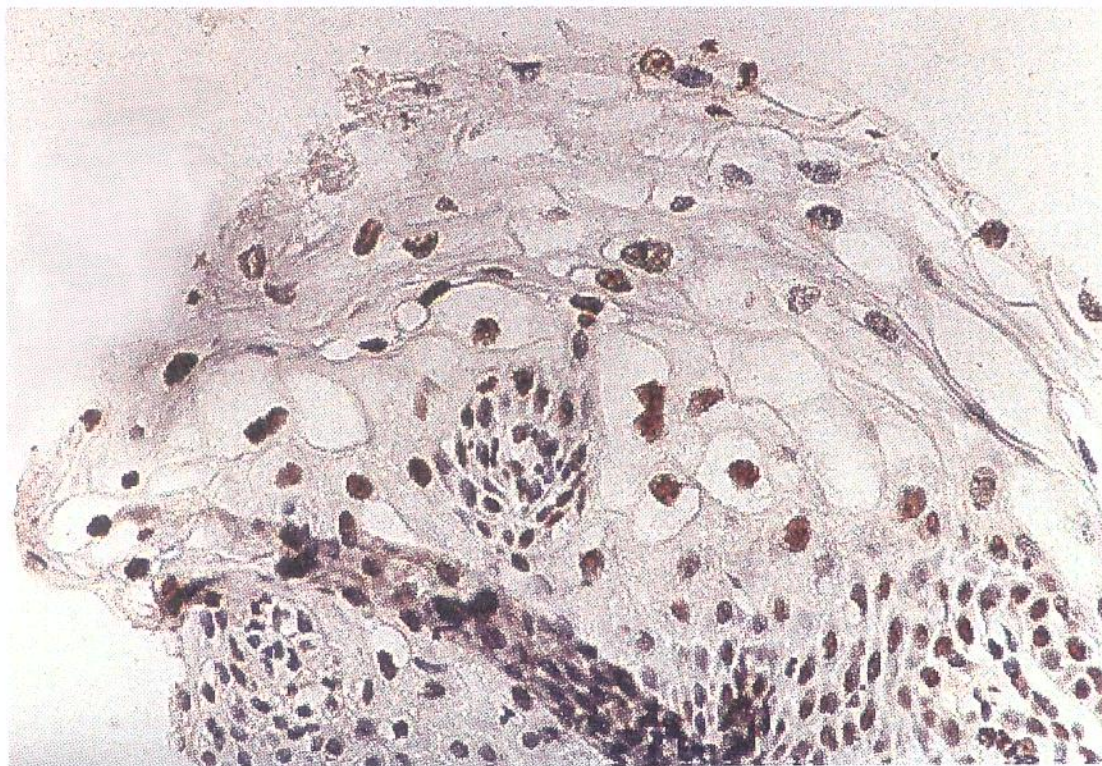


Figura 6. - Controle Positivo da Reação de Hibridização "in situ", utilizando sonda controle positivo (x 400).

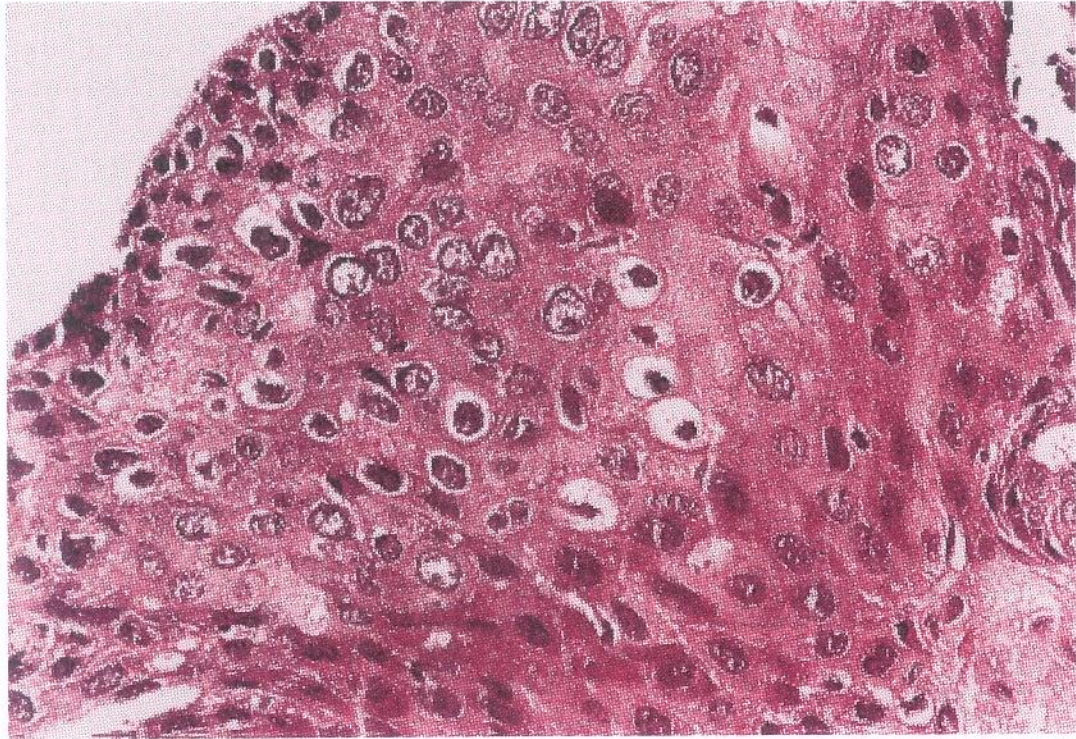


Figura 7. - Caso n° 4. Mucosa Esofageana com atipia colilocitótica intensa
(HE, x400)

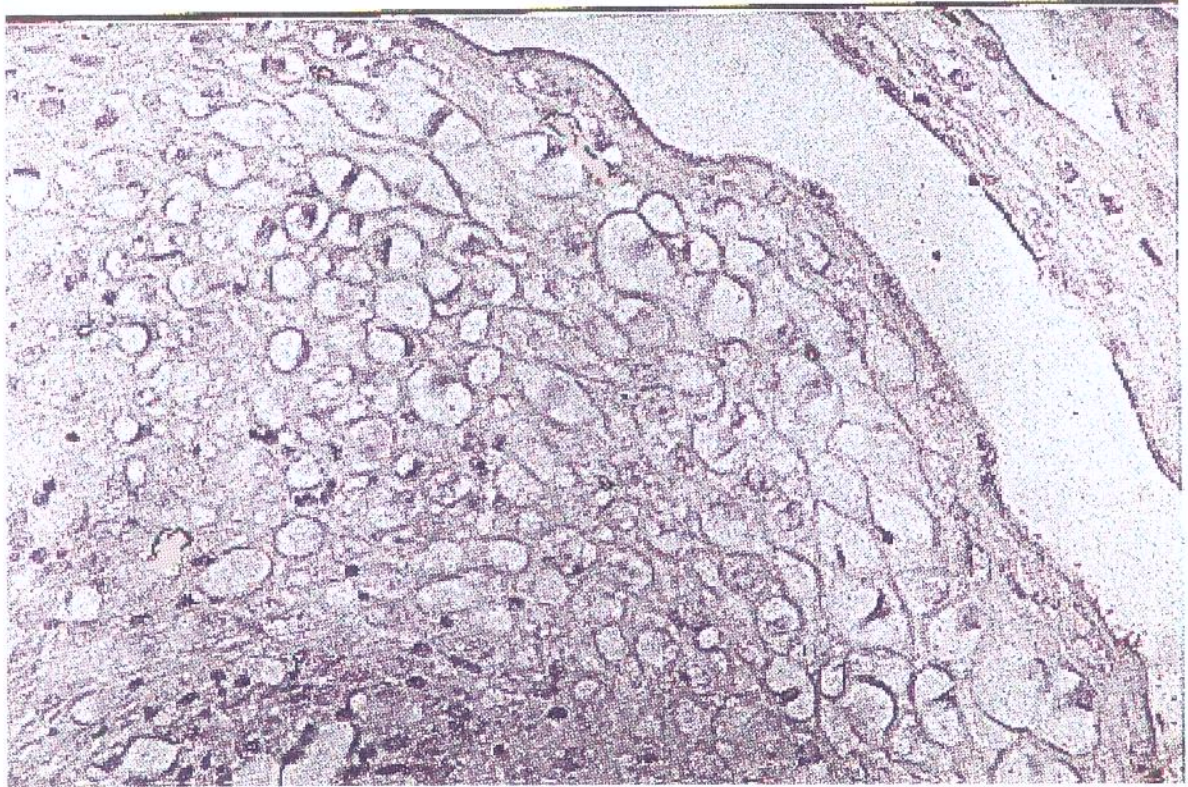


Figura 9. - Caso nº 4. Reação de hibridização in situ negativa em biópsia endoscópica de esôfago (x400).

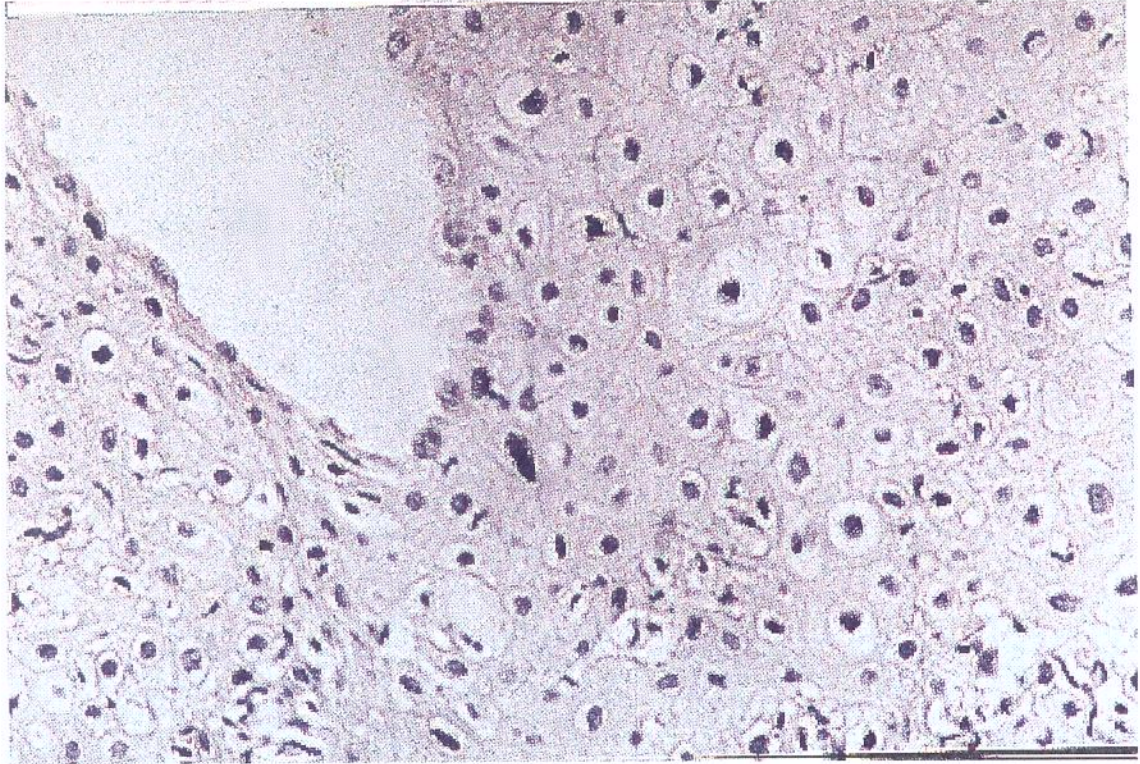


Figura 8. - Caso nº 4. Reação de imno-histoquímica negativa em biópsia endoscópica de esôfago (x400)

DISCUSSÃO

1. Atipia coilocitótica e o Papilomavírus humano

As atipias coilocitóticas têm sido alvo de vários estudos, em particular no colo do útero, e correlacionadas com infecção pelo papilomavírus humano (HPV). O termo atipia coilocitótica foi primeiro proposto por KOSS & DURFEE em 1956 para designar alterações do epitélio escamoso da cérvix uterina, cujas células possuíam núcleo pequeno, irregular e hipercromático, circundado por um halo citoplasmático claro. MEISELS & FORTIN (1976), analisando lesões intraepiteliais cervicais e vaginais, propuseram padrões celulares para os condilomas: bi e multinucleação, hipercromasia da cromatina, anofilia, disceratose e halo perinuclear. Quanto à característica vacuolização desses elementos celulares, tais autores denominaram-nas de células “balonizadas”, considerando esse critério como patognomônico dos condilomas cervicais.

Nota-se, então, o interesse no meio científico em explicar o conteúdo das áreas citoplasmáticas mais claras, bem como, o agente causal dessas alterações. RECHER & SREBNIK (1981), em estudo de biópsias cervicais com atipias coilocitóticas, utilizaram a reação de PAS e PAS com diastase para verificar o conteúdo de glicogênio nos coilócitos. Esses autores concluíram que as células coilocitóticas possuíam menor depósito de glicogênio localizado

nas porções citoplasmáticas mais densas e raramente nos espaços vacuolares. OKAGAKI et al (1978), em estudo por microscopia eletrônica de oito casos de displasias e atipias reativas com coilocitose, verificaram que tais células possuíam bandas de tonofilamentos condensados grosseiramente nas porções citoplasmáticas mais externas; as áreas claras adjacentes apresentavam poucos ribossomos e menor conteúdo glicogênico. Essas alterações celulares têm sido consideradas como lesões induzidas por vírus (AYRE, 1960). Alguns trabalhos em microscopia eletrônica demonstraram partículas virais de 40 a 50 nm de diâmetro, dispersas no núcleo de células superficiais com cromatina mais condensada e membrana nuclear irregular (HILLS & LAVERTY, 1979; CASAS-CORDERO et al, 1981). Esses vírus estavam espalhados de forma esparsa no nucleoplasma independente da cromatina (HILLS & LAVERTY, 1979). Em relação aos componentes citoplasmáticos observados à microscopia eletrônica, verificou-se perda parcial ou completa, algumas vezes apresentando poucas organelas, material granular, transparente e homogêneo e tonofilamentos bandeados na periferia celular (OKAGAKI et al, 1978; HILLS & LAVERTY, 1979; CASAS-CORDERO et al, 1981).

2. Papilomavírus humano e o citoesqueleto

Para o maior entendimento da participação viral no processo de bandeamento do citoesqueleto, foram realizados alguns trabalhos utilizando seqüências dos diferentes tipos de HPV expressas em plasmídios e cultivadas

em cultura de células.(NASSERI et al, 1987; ROMANI, ABRAMSON & STEINBERG, 1987; DOORBAR et al, 1991; ROBERTS et al, 1993). ALBERS & FUCHS (1989), estudando a expressão de mutantes com deleção do cDNA de citoqueratina K14 do tipo 1 em cultura de células notaram que a ausência da porção carboxi-terminal resultava no agrupamento desses filamentos na periferia citoplasmática, enquanto a ausência da porção amino-terminal produzia agregados de citoqueratina na superfície nuclear. Pode-se inferir, dessa forma, que a alteração molecular dos filamentos intermediários possam interferir em seu alongamento do núcleo até a membrana citoplasmática (ALBERS & FUCHS, 1989). Torna-se possível supor que os transcritos virais E1/E4 liguem-se a porção carboxi-terminal dos filamentos de citoqueratina, impedindo o alongamento dos mesmos, que ficam, então, agrupados na periferia citoplasmática. DOORBAR et al (1991), em estudo de proteína “spliced” E1^{E4} de HPV 16 em cultura de queratinócitos mostraram que embora o mecanismo de ligação entre proteína E4 e citoqueratinas ainda seja desconhecido, essa interação promove o colapso da rede de queratina sem interferir com as demais estruturas do citoesqueleto. Essa condensação de filamentos de citoqueratina poderia ser uma adaptação viral que ao infectar células menos corneificadas teriam maior chance de permanência nesse epitélio (DOORBAR, CONERON & GALLIMORE, 1989). Assim, o vírus codificaria a proteína E4, cuja interação com elementos do citoesqueleto, essencialmente as citoqueratinas, promoveria mudanças na distribuição,

composição e diferenciação desses filamentos intermediários, alterando a estrutura do citoesqueleto (ROMANI, ABRAMSON & STEINBERG, 1987; ROBERTS et al, 1993).

3. Epidemiologia do câncer esofágico

Vários estudos moleculares e histológicos têm demonstrado diferente distribuição do HPV de acordo com as diferenças geográficas e/ou sensibilidade do método de detecção (BINDU & RADHAKRISHNA, 1992). O carcinoma epidermóide de esôfago tem interessante distribuição geográfica, localizada a noroeste do Irã, nordeste da China, entre os chineses de Singapura e no sudeste da África (MAHBOUBI & ARAMESH, 1980; KOSS, 1992; BLOT, 1994; CHENG, 1994). Os fatores de risco para o câncer esofágico são: excesso de álcool e fumo, deficiência vitamínica e hábitos alimentares agressores da mucosa (MAHBOUBI & ARAMESH, 1980; BLOT, 1994; CHENG, 1994; STEMMERMANN et al, 1994). Quanto à distribuição geográfica peculiar, a associação entre diferentes agentes causais e uma predisposição genética poderiam ser responsáveis pelas variações regionais e alterações genéticas moleculares do câncer esofágico (STEMMERMANN et al, 1994). No Irã, o hábito do uso de ópio como medicamento, a ingestão de chá em temperatura elevada, a deficiência vitamínica devido a uma alimentação a base de pão feito em casa são fatores típicos da alta incidência de carcinomas de esôfago nesta região (MAHBOUBI & ARAMESH, 1980).

Entre a população chinesa, o hábito de beber Samsu (tipo de liquor chinês), ingerir “pickles” e comida mofada favorecem o desenvolvimento do câncer esofágico (CHENG, 1994). Esses alimentos contaminados por fungos, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Aspergillus* e outros, contribuiriam para a decomposição das proteínas e a formação de nitratos, nitritos e nitrosaminas, as quais possuem caráter carcinogênico no trato gastrointestinal (MINGXIN, PING & BAORONG, 1980). Nos Estados Unidos, os maiores determinantes do carcinoma epidermóide do esôfago são o excesso de álcool e fumo (BLOT, 1994). Fatores genéticos podem estar associados aos fatores epidemiológicos de risco no desenvolvimento do câncer de esôfago. A expressão de oncogenes relacionados à fatores de crescimento, produtos de proto-oncogenes *ras* e super expressão de receptores do fator de crescimento epitelial (EGFR) podem induzir a progressão e a clonalidade do carcinoma epidermóide esofágico (STEMMERMANN et al, 1994).

4. Câncer esofágico e o Papilomavírus humano

Entre os fatores de risco, o HPV tem sido considerado de grande relevância no desenvolvimento do câncer na mucosa esofágica (ODZE et al, 1993; CHEN, HONG & DHURANDHAR, 1994). Os conhecimentos da interação entre os produtos virais e do gene celular na carcinogênese têm alterado o conceito sobre o comportamento e a patogênese das lesões causadas pelo HPV (BINDU & RADHAKRISHNA, 1992). O ponto central da

sobrevivência intracelular do HPV está no padrão de integração do DNA viral aos cromossomos do hospedeiro (ZUR HAUSEN, 1989). Em trabalho com transformação celular pelo BPV-1 (papillomavírus bovino), o mecanismo de transformação não foi elucidado porém, a presença contínua do genoma viral inserido ao genoma celular parece necessário para a manutenção do estado transformado (HOWLEY, 1983). Hoje em dia está claro, que o padrão de integração dos HPVs ditos de alto risco, levam a alterações de certos eventos protetores de transformação maligna durante o ciclo celular (VILLA, 1995). ZUR HAUSEN (1989), propôs um modelo da interação vírus/hospedeiro em células normais e malignas. Nas células normais não infectadas pelo HPV, fatores humorais combinar-se-iam a receptores específicos, ativando genes celulares, cujos transcritos impediriam a ação dos fatores transformantes virais. Por outro lado, nas células carcinomatosas, tais fatores humorais não teriam ação sobre os genes (ausência de receptores ou receptores previamente ocupados), não permitindo a produção de transcritos protetores e por conseguinte os fatores de transformação viral poderiam atuar. Nos experimentos em cultura de células, observou-se que os fatores transformantes estavam relacionados as proteínas E6 e E7 do Papilomavírus Humano (SMOTKIN & WETTSTEIN, 1987; HAWLEY-NELSON et al, 1989; MÜNGER et al, 1989; WERNESS, LEVINE & HOWLEY, 1990; HÜBREGTSE, SCHEFFNER & HOWLEY, 1991; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995). Entretanto, os mecanismos pelos quais os transcritos

virais transformantes atuam na malignização celular ainda estão sob investigação. As regiões E6 e E7 do HPV 16 transfectada em queratinócitos induzem a imortalização e geração de aneuploidia celular devido a introdução do DNA exógeno ao genoma dessas células (HAWLEY-NELSON et al, 1989; VILLA, 1995). SMOTKIN & WETTSTEIN (1987), em trabalho com transcritos E6 e E7 do HPV 16 em células CaSKi e SiHa concluíram que E6 seria capaz de transformar células na ausência de E7 porém, far-se-iam necessários ambos os transcritos (E6/E7) para a progressão do estado maligno em hospedeiro natural. Esses transcritos estariam também relacionados com a proliferação de células basais dos epitélios infectados pelo HPV (WERNESSE, LEVINE & HOWLEY, 1990). TOMMASINO & CRAWFORD (1995), em estudo das regiões E6 e E7 em cultura de células, concluíram que as proteínas codificadas por esses genes interagiriam com, respectivamente, proteínas celulares p53 e da família Rb. A proteína E7 associada a Rb, induziria o aumento da síntese do DNA celular e conseqüente perda da fidelidade de duplicação. A associação das proteínas E6 e p53, resultaria na degradação dessa última, impedindo o reparo do DNA e morte celulares (TOMMASINO & CRAWFORD, 1995).

5. Métodos de detecção do Papilomavírus humano

Métodos laboratoriais, como a imuno-histoquímica, hibridização de ácidos nucleicos e a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm permitido o proficuo diagnóstico das infecções pelo HPV.

A imuno-histoquímica é atualmente uma técnica muito empregada, com aplicação relevante na confirmação da presença de microrganismos (MYERS J, 1989). Para o diagnóstico do papilomavírus humano, a utilização do método da imunoperoxidase têm tornado possível a detecção do antígeno viral gênero-específico em tecidos (KURMAN et al, 1981), onde os sistemas do complexo avidina-biotina (ABC) ou estreptavidina-biotina (S-ABC) possuem maior sensibilidade e menor coloração de fundo, quando comparado ao método peroxidase-antiperoxidase (HSU, RAINE & FANGER, 1981; FENOGLIO-PREISER, WOLF & RILKE, 1992). Um fato importante é a relativa simplicidade de execução da imuno-histoquímica, garantindo ao anatomopatologista a associação das alterações teciduais ao agente causal no mesmo mesmo corte histológico (VASSALLO, 1993). Contudo, os processos de fixação e desparafinação podem ser fatores limitantes da sensibilidade do método. A fixação é de extrema importância na preservação de determinantes antigênicos e variável para cada um deles (ALVES et al, 1992). Os fixadores, formalina e etanol, são capazes de preservar a morfologia celular, mas não podem manter a imunoreatividade antigênica ideal (MYERS, 1989; FENOGLIO-PREISER, WOLF & RILKE, 1992). Em nosso trabalho, o tempo

de fixação e ou o fixador utilizado pode ter interferido na imunoreatividade do antígeno do HPV, impossibilitando-nos a sua detecção pelo método imuno-histoquímico. Os resultados negativos para imuno-histoquímica podem estar relacionados com a expressão antigênica. ALVES et al (1988) e CAVALIERI et al (1990), em estudo de codilomas uterinos, sugerem que a ausência de imunoreatividade possa estar associada as fases da infecção com diferentes expressões antigênicas. Em fase inicial de infecção, haveria multiplicação viral ativa, com maior quantidade de antígenos, enquanto nas infecções persistentes ocorreria menor quantidade antigênica devido a baixa infectividade ou integração viral (ALVES et al, 1988). Com relação aos nossos resultados, poder-se-ia supor que nas lesões esofágicas analisadas havia baixa expressão antigênica em decorrência de uma multiplicação viral menos acentuada.

Dentre as técnicas de hibridização de ácidos nucleicos, a hibridização “in situ” têm-se mostrado eficaz na detecção de seqüências nucleotídicas de HPV em conjunto com a análise histológica do material investigado (SCHNEIDER et al, 1987; OSTROW et al, 1987; STOLER, 1993). As técnicas de hibridização em suportes sólidos, apesar de sensíveis, rápidas e baratas, necessitam da extração do DNA celular para o diagnóstico (MEINKOTH & WHAL, 1984; RAKOCZY et al, 1990; MOSCICKI, 1993). Parece evidente que a maior vantagem da hibridização “in situ” é a facilidade da localização de um sinal de determinado microrganismo, permitindo análise célula por célula (STOLER, 1993). No estudo por nós realizado, foi utilizado

um kit comercial (*Vira Type in situ HPV probe set* - DIGENE), cujas sondas eram biotinizadas. SYRJÄNEN et al (1990), avaliando a sensibilidade do mesmo kit, em comparação com o dot blot, concluem que esse possui forte sinal porém, com tendência a resultados falsos positivos. FAULKNER-JONES et al (1990) obtiveram sinal positivo para HPV 16 e 18, utilizando o mesmo kit em células CaSKi e HeLa. Esses autores detectaram 500 a 600 cópias de HPV 16 e cerca de 10 a 50 cópias de HPV 18, sendo o sinal positivo mais fraco em células HeLa. As sondas não radioativas têm sensibilidade igual ou superior às aquelas marcadas com enxofre radioativo (^{35}S), com uma capacidade de detecção em torno de 800 cópias virais (SYRJÄNEN et al, 1988; COLLINS et al, 1988; CUBIE & NORVAL, 1989; NUOVO & RICHART, 1989). Outro aspecto relevante é seu custo financeiro reduzido em comparação às sondas radioativas (LEWIS et al, 1987; CUBIE & NORVAL, 1989; CLAVEL et al, 1991). Os kits comerciais disponíveis no mercado possuem sensibilidade e especificidade adequadas, possibilitando confiável detecção e tipagem do HPV em espécimes clínicos (AMORTEGUI & MEYER, 1990; CHIMERA et al, 1991; BARTHOLOMA, ADELSON & FORBES, 1991). GERGELY, CZEGLÉDY & HERNÁDY (1987), analisando 42 esfregaços de colo uterino normais à coloração de Papanicolaou encontraram positividade de 57% para HPV 6, 11, 16, 18, através do método de hibridização “in situ”, resultado este surpreendente para tecidos considerados normais. O processo de fixação também é importante para a sensibilidade do método de hibridização “in situ”.

MOENCH et al (1985), analisando a eficiência da hibridização “in situ” com sondas radioativas, em função da técnica de fixação, concluíram a maior eficácia da fixação pela formalina tamponada e paraformaldeído-glutaraldeído na amplificação do sinal viral detectável por este método.

A reação em cadeia da polimerase (PCR), capaz de amplificar sequências de DNA específicas, tem sido considerada o método mais sensível para a detecção dos tipos de HPV ainda desconhecidos (SHIBATA, ARNHEIM & MARTIN, 1988; CHARLOTTE et al, 1991; MANOS et al, 1989). CAUSSY et al (1990) em estudo com 92 homossexuais portadores do vírus HIV, obtiveram positividade pela PCR para os HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35 em 35 casos com citologia anal normal. Com o método da PCR, tornou-se possível a detecção de quantidades de HPV entre 0,035 a 3,5 cópias por célula em 100 ng de DNA fornecido, possuindo uma sensibilidade superior e maior facilidade de execução que o southern blot (SNIDJERS et al, 1990). Além disso, a tipagem do HPV pela PCR pode ser uma ferramenta útil na distinção entre lesões cervicais de alto e baixo grau (DALLAS et al, 1989; TIDY, MASON & FARRELL, 1989; YOSHIKAWA et al, 1990; CORNELISSEN et al, 1992). Devido a sua alta sensibilidade, a PCR não executado de maneira criteriosa permite amplificações contaminadas indesejáveis, em especial quando se trata de espécimes clínicos, pois estes contêm uma variedade de seqüências nucleotídicas outras que aquela investigada. Entretanto, sua utilização cuidadosa fornece o diagnóstico do

HPV de modo sensível e válido (SCHIFFMAN et al, 1991). BINNINGER et al (1992), estudando sessenta casos de condilomas cervicais, estabeleceram boa correlação entre os casos positivos por hibridização “in situ” (HIS) e PCR, sendo que 35% dos casos negativos por HIS foram positivos pela PCR.

6. O Papilomavírus humano na laringe

O Papilomavírus Humano tem sido demonstrado em vários sítios corporais, e alguns trabalhos demonstram a positividade viral em mucosas do trato gastrointestinal. Em papilomatoses e carcinoma de células escamosas de laringe, os tipos virais mais comuns são o 6 e 11 (TERRY et al, 1987; LINDENBERG et al, 1989; TSUTSUMI et al, 1989; QUINEY et al, 1989; LEVI et al, 1989; CAUSSY et al, 1990; WRIGHT et al, 1990; HOSHIKAWA et al, 1990; MORGAN et al, 1991; BARNES et al, 1991; POPPER et al, 1992). Porém, foram detectados HPVs do tipo 16, 30 e 33 associados à tecidos tumorais de laringe (KAHN, SCHWARZ & ZUR HAUSEN, 1986; HOSHIKAWA et al, 1990; MORGAN et al, 1991; POPPER et al, 1992). Dos métodos empregados no estudo do HPV em laringe, a hibridização “in situ” e a PCR têm-se mostrado ferramentas mais eficazes na detecção e tipagem virais. LEVI et al (1989), em estudo com papilomatose de laringe em adultos, demonstraram positividade para HPV 6 e 11 por PCR em 7 casos onde a hibridização “in situ” e a imuno-histoquímica mostraram-se negativas. Nesse trabalho, a positividade do HPV nas amostras analisadas por PCR foi de

100%. A imuno-histoquímica, apesar de apresentar menor sensibilidade, contribui como auxílio diagnóstico do HPV em laringe (TSUTSUMI et al, 1989; LEVI et al, 1989). LINDENBERG et al (1989), não foram capazes de detectar o HPV em 14 amostras analisadas por imuno-histoquímica e obtiveram positividade para HPV 11 por hibridização “in situ” em apenas 2 casos. TSUTSUMI et al (1989), atribuíram uma baixa positividade às reações de imuno-histoquímica e a falência da reação de hibridização “in situ” em alguns casos. Esses autores aventam a possibilidade de que na laringe haja pequena expressão do gene tardio, baixa antigenicidade do capsídeo viral, níveis diminutos de DNA do HPV e ou baixa sensibilidade do método de hibridização “in situ” devido ao baixo conteúdo genômico do vírus.

7. O Papilomavírus humano no esôfago

No esôfago, alguns trabalhos têm relacionado os HPV 6, 11, 16 e 18 como os tipos mais frequentes em lesões benignas e malignas. Em estudos com papiloma de células escamosas e carcinoma esofágicos, observou-se a negatividade ou a baixa positividade antigênica do HPV analisada por imuno-histoquímica (SYRJÄNEN et al, 1982; WINKLER et al, 1985; KULSKI et al, 1986). A detecção do HPV por hibridização “in situ” no esôfago tem-se mostrado variável, estando presente nesse epitélio entre 4 a 72% dos casos estudados (CHANG et al, 1990a; CHANG et al, 1990b; CHANG et al, 1992; BENAMOUZIG et al, 1992; CHANG et al, 1993b; CHANG, SYRJÄNEN &

SYRJÄNEN K, 1993a; FURIHATA et al, 1993; CARR et al, 1994). Em análise de lesões benignas de esôfago por hibridização “in situ”, alguns trabalhos relatam a ausência do DNA viral nas amostras estudadas (CHANG et al, 1991; CARVALHO, FIGUEIREDO & SOUZA, 1995). CARR et al (1994), encontraram positividade de 4,34% nas 23 lesões benignas analisadas por hibridização “in situ” e PCR. Outros autores sugerem uma alta positividade (58,3%) em tecidos hiperplásicos e displásicos (CHANG et al, 1990a; CHANG et al, 1992). Nessas lesões benignas, os tipos 6 e 11 aparecem com maior frequência porém, os tipos 16 e 18 podem também ocorrer nas mesmas (CHANG et al, 1990a; CHANG et al, 1992; CARR et al, 1994). Esse fato evidencia talvez a necessidade de acompanhamento dos indivíduos portadores de lesões benignas infectados pelos HPVs 16 e 18. Nas lesões malignas esofágicas, a positividade para o DNA do HPV variou de 17,5 a 33,8% (BENAMOUZIG et al, 1992; CHANG et al, 1993a; CHANG et al, 1993b; FURIHATA et al, 1993). KULSKI & DEMETER (1986) e LOKE et al (1990), não obtiveram positividade para o HPV por hibridização “in situ” ao analisarem carcinomas de células escamosas de esôfago. Os tipos de HPV considerados mais frequentes em lesões malignas são o 16 e 18. Entretanto, alguns trabalhos detectaram o tipo 30 em carcinomas de esôfago, sugerindo que o epitélio esofágico possa ser o foco primário para esse tipo viral. (CHANG et al, 1993a; CHANG et al, 1993b). BENAMOUZIG et al (1992), em estudo de 12 casos de carcinoma de células escamosas do esôfago,

detectaram a presença do HPV por hibridização “in situ” em apenas 2 amostras. Nesse trabalho, os autores sugerem a co-participação do HPV no desenvolvimento das lesões esofágicas em íntima associação a outros fatores de risco. CARR et al (1994), ao analisarem por PCR e hibridização “in situ” 23 lesões esofágicas do tipo papilomatoso verificaram a presença do DNA viral, por ambos os métodos, em somente um caso. Os autores sugerem a interferência da fixação e ou idade dos blocos na detecção do HPV pela PCR e concluem que a coilocitose e outras alterações do epitélio esofágico possam estar relacionados aos mecanismos de lesão e reparo teciduais e, somente em última instância, poderiam ser de origem viral. No presente estudo, não nos foi possível a detecção do HPV pelos métodos propostos e tais resultados são coerentes com alguns trabalhos da literatura (LOKE et al, 1990; CHANG et al, 1991). CARVALHO & FIGUEIREDO (1995), em estudo de 37 casos de papiloma de células escamosas de esôfago por hibridização “in situ” com sondas comerciais (*Vira Type OMINE PROBE*) 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52 e 56, não puderam detectar o vírus em nenhuma das amostras. Os autores apontam a ausência do HPV nessas lesões para o baixo número de cópias virais ou a destruição de seu DNA no processamento histológico. Nestes experimentos, os autores não puderam determinar a presença do HPV em lesões esofágicas benignas e malignas, utilizando os métodos da PCR e hibridização “in situ”. No trabalho de CARR et al (1994), os autores não puderam detectar o DNA do HPV pela PCR. Devido ao método da PCR ser

capaz de detectar baixo número de cópias virais, esses autores concluem que o HPV possa não ser o responsável pelas alterações celulares no esôfago. Cabe-nos ressaltar, que muito embora nossas amostras tenham -se mostrado negativas pela imuno-histoquímica e hibridização “in situ”, os controles positivos apresentaram forte sinal, evidenciando o correto desenvolvimento das metodologias em questão.

Por fim, a confirmação da ausência de HPV em novo material merece a utilização posterior da técnica mais sensível da PCR. No que nos foi possível averiguar com os presentes métodos, a ausência de HPV em esôfago com atipias colilocitóticas pode dever-se a:

1) baixa expressão antigênica e ou a um pequeno número de cópias virais.

Assim, os HPVs em estudo talvez não puderam ser detectados pelos métodos propostos;

2) os tipos de HPV estudados poderiam não corresponder àqueles prevalentes no esôfago, e se isso for verdadeiro não foi possível detectá-los pelo método de hibridização “in situ” com as sondas utilizadas.

3) as atipias colilocitóticas no esôfago poderiam não ser devidas à infecção pelo HPV, podendo ser uma manifestação reacional do epitélio pelos mecanismos de lesão e reparo teciduais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMSOM, A.L.; BRANDSMA, J.; STEINBERG, B.; WINKLER, B.
Verrucous Carcinoma of the Larynx. Possible Human Papillomavirus Etiology. Arch.Otolaryngol., 111: 709-15, 1985.
2. ALBERS, K & FUCHS, E. Expression of Mutants cDNAs in Epithelial Cells Reveals Possible Mechanisms for Initiation and Assembly of Intermediate Filaments. J.Cell.Biol., 108: 1477-93, 1989.
3. ALVES, V.A.F.; WAKAMATSU, A.; KANAMURA, T.C.; MAGALHÃES, E.S.; SIQUEIRA, S.A.C. A Importância de Fixação em Imuno-histoquímica: A Distribuição de Vimentina e Citoqueratina em Amostras Fixadas em Álcool e Formol. Rev.Hosp.Clin.Fac.Med.S.Paulo. 47(1): 19-24, 1992.
4. ALVES, V.A.F.; YAMAMOTO, L.S.U.; PEREIRA, E.A.G.; SOUEN, J.S. Condilomas do Colo Uterino - Correlação de Dados Colposcópicos, Histológicos e Imuno-histoquímicos. J.Bras.Ginecol. 98(5): 257-61, 1988.
5. AMORTEGUI, A.J. & MEYER, M.P. In Situ Hybridization for The Diagnosis and Typing of Human Papillomavirus. Clin.Biochem., 23: 301-6, 1990.

6. AYRE, J.E. Role of the halo cell in cervical cancerigenesis. Obstet.Gynecol. 15: 481-491, 1960.
7. BACCHI, C.E; GOWN, A.M & BACCHI M.M. Detection of Infectious Disease Agents by Immunocytochemistry. Brazilian J.Med.Biol.Res. 27: 2803-20, 1994.
8. BAKER, T.S.; NEWCOMB, W.W.; OLSON, N.H.; COWSERT, L.M.; OLSON, C.; BROWN, J.C. Structures of Bovine and Human Papillomaviruses: Analysis of Cryelectron Microscopy and Three-Dimension-Al Image Reconstruction. Biophys.J. 60: 1445-1456, 1991.
9. BANKS, L. & MATLASHEWSKI, G. Cell Transformation and the HPV E5 Gene. Papillomavirus Report. 4: 1-4, 1993.
10. BARNES, L.; YUNIS, E.J.; KREBS III, F.J.; SOMMEZ-ALPAN. Verruca Vulgaris of the Larynx. Demonstration of Human Papillomavirus Type 6/11 by In Situ Hybridization. Arch.Pathol.Lab.Med. 115: 895-99, 1991.
11. BARTHOLOMA, N.Y.; ADELSON, M.D. & FORBES, N.Y. Evaluation of Two Commercially Available Nucleic Acid Hybridization Assays for the Detection and Typing of Human Papillomavirus in Clinical Specimens. Am.J.Clin.Pathol. 95:21-29, 1991
12. BENAMOUZIG, R; PIGOT, F.; QUIROGA, G.; VALIDIRE, P.; CHAUSSADE, S.; CATALAN, F.; COUTURIER, D. Human

- Papillomavirus Infection in Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Western Countries. Inf.J.Cancer, 50: 549-552, 1992.
13. BINDU, N.S & RADHAKRISHNA, A.P. Oncogenesis of Squamous Carcinoma of Uterine Cervix. Int.Gynecol.Pathol.11: 47-57, 1992.
14. BINNINGER, I.; CLAVEL, C.; POLETTE, M.; BOUTTERIN, M.C.; CHYPRE, C.; ALPHA, B.; BIREMBAUT, P. A New Nonisotopic Detection of Human Papillomavirus DNA Using Polymerase Chain Reaction. Diagn.Mol.Pathol. 1(4): 239-45, 1992.
15. BLITZ, I.L. & LAIMINS, L. The 68 kilodaltons E1 protein of bovine papillomavirus in DNA-binario phosphoprotein which associates with E2 transcriptional ativator in vitro. J. Virol., 65: 649-56, 1991.
16. BLOT, W.J. Esophageal Cancer Trends and Risk Factors. Seminars in Oncology. 21(4): 403-10, 1994.
17. BORGES, R.J.; ACEVEDO, F.; MIRALLES, E.; MIJARES, P. Squamous Papilloma of the Esophagus Diagnosed by Cytology: Report a Case with Concurrent Occult Epidermoid Carcinoma. Acta Cytol. 30(5): 487-90, 1986.
18. BREITBURD, F.; CROISSANT, O. & ORTH, G. Cancer cells., 5: 115-22, 1990.
19. BROKER, T.R.; CHOW, L.T.; CHIN, M.T.; RODHE, C.R.; WOLINSKY, S.M.; WITHBECK, A.; STOLER, M.H. A molecular portrait of human papillomavirus carcinogenesis. Cancer cell, 7: 197-206, 1989.

- 20 BURNS, J.; GRAHAM, A.K.; FRANK, C.; FLEMING, K.A.; EVANS, M.F.; MC GEE, J.O.D. Detection of Low Copy Human Papillomavirus DNA and mRNA in Routine Paraffin Sections of Cervix by Non-isotopic In Situ Hybridization. J.Clin.Pathol. 40: 858-64, 1987.
21. CARR, N.J.; BRATTHAUER, G.L.; LICHY, J.H.; TAUBENBERGER, J.K.; MONIHAN, J.M.; SOBIN, L.H. Squamous Cell Papillomas of Esophagus: A Study os 23 lesions for Human Papillomavirus In Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction. Hum.Pathol. 25(5): 536-40, 1994.
22. CARVALHO, A.A.; FIGUEIREDO, J.J.A & SOUZA, F.S. Papiloma de células escamosas de esôfago.Estudo clínico patológico de 37 casos. Rev.Med.Minas Gerais. 5(2), supl 2, 1995.
23. CASAS-CORDERO, M.; MORIN, C.; ROY, M.; FORTIER, M.; MEISELS, A. Origin of the Koilocytein Condylomata Human Cervix: Ultrastructural Study. Acta Cytol. 25(4): 383-92, 1981.
24. CAUSSY, D.; GOEDERT, J.J.; PALEFSKY,J.; GONZALES, J.; RABKIN, C.S.; DIGIOIA, R.A; SANCHEZ, W.C.; GROSSMAN, R.J.; COLCLOUGH, G.; WIKTOR, S.Z.; KRÄMER, A.; BIGGAR, R.J.; BLATNER, W.A. Interaction of Immunodeficiency and Papilloma Viruses: Association with Anal Epithelial Abnormality in Homosexual Men. Int.J.Cancer. 46: 214-19, 1990.

25. CAVALIERI, M.J.; PEREIRA, G.M.C.; DE LIMA, M.A.N.; PEREIRE, S.M.M.; MAEDA, M.Y.S.; SANTOS, R.T.M. Alterações Coilocitóticas em Esfregaços Cérvico-Vaginais: Inter-relações entre os Aspectos Citológicos, Imunocitoquímicos para Papilomavirus e Morfométrico. J.Bras.Ginecol. 100(9): 275-9, 1990.
26. CHANG, F; SYRJÄNEN, S & SYRJÄNEN, K. Demonstration of Human Papillomavirus (HPV) Type 30 in Esophageal Squamous-Cell Carcinomas by In Situ Hybridization [LETTER]. Int.J.Cancer. 55: 171-3, 1993a.
27. CHANG, F.; SYRJÄNEN, S.; SHEN, Q.; WANG, L.; SYRJÄNEN, K. Screening for Human Papillomavirus Infections in Esophageal Squamous Cell Carcinomas by In Situ Hybridization. Cancer. 72: 2525-30, 1993b.
28. CHANG, F.; SHEN, Q.; WANG, L.; WANG, D.; SYRJÄNEN, K. Human Papillomavirus Involvement in Esophageal Precancerous Lesions and Squamous Cell Carcinomas as Evidence by Microscopy and Different DNA techniques. Scand.J.Gastroenterol. 27: 553-63, 1992.
29. CHANG, F.; JANATUINEN, E.; PIKKARAINEN, P.; SYRJÄNEN, S.; SUYRJÄNEN, K. Esophageal Squamous Cell Papillomas. Failure to Detect Human Papillomavirus DNA by In Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction. Scand. J. Gastroenterol. 26: 535-43, 1991.

30. CHANG, F.; SYRJÄNEN, S.; SHEN, Q.; HONGXIU, J.L.; SYRJÄNEN, K. Human Papillomavirus (HPV) DNA in Esophageal Precancer Lesions and Squamous Cell Carcinomas from China. Int.J.Cancer. 45: 21-5, 1990a.
31. CHANG, F.; SHEN, Q.; ZHOU, J.; WANG, S.; SYRJÄNEN, S.; SYRJÄNEN, K. Detection of Human Papillomavirus DNA in Cytologic Specimens Derived from Esophageal Precancer Lesions and Cancer. Scand.J.Gastroenterol. 25: 383-88, 1990b.
32. CHANG, F. et al. Role of Papillomaviruses. J.Clin. Pathol. 43: 269-76, 1990c.
33. CHAN, S.Y.; BERNARD, H.U.; ONG, C.K.; CHAN, S.P.; HOFMANN, B.; DELIUS, H. Phylogenetic Analysis of 48 Papillomavirus Types and 28 Subtypes and Variants: A Show Case for the Molecular Evolution of DNA Viruses. J.Virol. 66: 5714-5725, 1992.
34. CHARLOTTE, F.; OLIVIER, J.L.; CHYPRE, C.; SADOUL, G.; CHATELET, F.; LUBOINISKI, J.; MARCHAND, J.; BEREZIAT, G. Detection and Typing of Human Papillomavirus in Cervical Smears by an Original Application of the Polymerase Chain Reaction. Mol.Cell.Probes. 5: 445-50, 1991.
35. CHENG, K.K. The Etiology of Esophageal Cancer in Chinese. Sem.Oncology. 21 (4): 411-5, 1994.

36. CHEN, B; HONG, Y & DHURANDHAR, N. Detection of Human Papillomavirus DNA in Esophageal Squamous Cell Carcinomas by Polymerase Chain Reaction Using General Consensus Primers. Hum.Pathol. 25 (9): 920-23, 1994.
37. CHEN, S.L.; HAN, C.P.; TSAO, Y.P.; LEE, J.W.; YIN, C.S. Identification and Typing of Human Papillomavirus in Cervical Cancers in Taiwan. Cancer. 72: 1939-45, 1993.
38. CHEN, E.Y.; HOWLEY, P.M.; LEVINSON, A.D.; SEEBURG, P.M. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. Nature (London), 299: 529-34, 1982.
39. CHIMERA, T.A.; ANDERSON; S.M.; NOELL, H.; RIZK, V. Comparison of Nucleic Acid Hybridization and Cytologic Examination for Detection of Human Papillomavirus Infection with Evaluation of Two Commercially Available Hybridization Kits. Clin.Chem. 37(2): 260-262, 1991.
40. CLAVEL, C.; BINNINGER, I.; BOUTTERIN, M.C.; POLETTE, M.; BIREMBAUT, P. Comparison of Four Non-radioactive and ³⁵S-Based Method for Detection of Human Papillomavirus DNA by In Situ Hybridization. J.Virol.Methods. 33: 253-66, 1991.
41. CLERTANT, P. & SEIF, I. A common function for polyomavirus large T and papillomavirus E1 protein ? Nature (London). 311: 276-9, 1984.

42. COLE, S.T. & DANOS, O. Nucleotide Sequence and Comparative Analysis the Human Papillomavirus Type 18 genome. Phylogeny of Papillomaviruses and Repeated Structure of E6 and E7 Gene Products. J.Mol.Biol. 193: 599-608, 1987.
43. COLLINS, J.E.; JENKINS, D. & MAC CANCE, D.J. Detection of Human Papillomavirus DNA Sequences by In Situ Hybridization In Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Carcinoma: Retrospective Study. J.Clin.Pathol. 41: 289-295, 1988.
44. CORNELISSEN, M.T.E.; BOTS, T.; BRIËT, M.A.; JEBBINK, M.F.; STRUYK, A.P.H.B.; VAN DEN TWEEL, J.; GREER, C.E.; SMITS, H.L.; TER SCHEGGETT, J. Detection of Human Papillomavirus Types by Polymerase Chain Reaction and the Differentiation Between High-Risk and Low-Risk Cervical Lesions. Virch.Arch.B.Cell Pathol. 62: 167-71, 1992.
45. CUBIE, H.A & NORVAL, M. Detection of Human Papillomavirus in Paraffin Wax Sections With Biotinylated Synthetic Oligonucleotide Probes and Immunogold Staining. J.Clin.Pathol. 42: 988-991, 1989.
46. DALLAS, P.B.; FLANAGAN, J.L.; NIGHTINGALE, B.N.; MORRIS, B.J.. Polymerase Chain Reaction for Fast Nonradioactive Detection of High and Low-Risk Papillomavirus Types in Routine Cervical Specimens and in Biopsies. J.Med.Virol. 27: 105-111, 1989.

47. DANOS, O. et al. A comparative analysis of the human type 1a and bovine type 1 papillomavirus genomes. J.Virol. 46: 557-66, 1983
48. DARTMAN, K.; SCHWARZ, E.; GISSMANN, L.; ZUR HAUSEN, H. The Nucleotide Sequence and Genome Organization of Human Papillomavirus Type 11. Virology. 151: 124-30, 1986.
49. DAS, B.C.; GOPALKRISHNA, V.; DAS, D.K.; SHARMA, J.K.; SINGH, V.; LUTHRA, U.K. Human Papillomavirus DNA Sequences in Adenocarcinoma of the Uterine Cervix in Indian Women. Cancer. 72: 147-53, 1993.
50. DE VILLIERS, E.M. Human Pathogenic Papillomaviruses Types: A Update In Zur Hausen H (ed): Human Pathogenic Papillomaviruses. Berlin, Springer, 1994, p 1-12.
51. DE VILLIERS, E.M.; WAGNER, D.; SCHNEIDER, A.; WESCH, H.; MUNZ, F.; MIKLAW, H.; ZUR HAUSEN, H. Human Papillomavirus DNA in Women Without and With Cytological Abnormalities: Results of a 5-Year Follow-up Study. Gynecol.Oncol. 44: 33-39, 1992.
52. DE VILLIERS, E.M. Heterogeneity of Human Papillomavirus Group. J.Virol. 63(11): 4898-903, 1989.
53. DOORBAR, J.; CAMPBELL, D.; GRAND, R.J.A.; GALLIMORE, P.A. Identification of the human papillomavirus 1a E4 gene products. Embo.J., 5: 355-362, 1986.

54. DOORBAR, J.; EVANS, H.S.; CONERON, I.; CRAWFORD, L.; GALLIMORE, P.H. Analysis of HPV1 E4 gene expression using epitope-defined antibodies. Embo.J., 7: 855-833, 1988.
55. DOORBAR J, CONERON I & GALLIMORE P.H. Sequence divergence yet conserved physical characteristics among the E1^{E4} proteins of cutaneous human papillomavirus. Virology. 172: 51-62, 1989.
56. DOORBAR, J. ELY, S.; STERLING, J.; MC LEAN C.; CRAWFORD, L. Specific Interaction Between HPV 16 E1-E4 and Cytokeratins Results in Collapse of Epithelial Cell Intermediate Filament Network. Nature.352: 824-827, 1991.
57. DUGGAN, M.A.; BENOIT, J.L.; MC GREGOR, E.S.; INOUE, M.; NATION, J.G.; STUART, G.C.E. Adenocarcinoma In Situ of Endocervix: Human Papillomavirus Determination by Dot Blot Hybridization and Polymerase Chain Reaction Amplification. Int.J.Gynecol.Pathol. 13(2): 143-49, 1994.
58. ELUF-NETO, J.; BOOTH, M.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; MEIJER, C.J.L.M.; WALBOOMERS, J.M.M. Human Papillomavirus and Invasive Cervical Cancer in Brazil. Br.J.Cancer. 69: 114-19, 1994.
59. ENSSER, H. & PFISTER, H. Epidermodysplasia Verruciformis Associated Human Papillomaviruses Present a Subgenus-Specific Organization of the Regulation. Nucleic Acids Res. 18: 3919-3922, 1990.

60. EVANDER, M.; EDLUND, K.; BODÉN, E.; GUSTAFSSON, A.; JONSSON, M.; KARLSSON, R.; RYLANDER, E.; WANDELL, G. Comparison of a One-Step and Two-Step Polymerase Chain Reaction with Degenerate General Primers in a Population-Based Study of Human Papillomavirus Infection in Young Swedish Women. J.Clin.Microbiol. 30(4): 987-992, 1992.
61. FAULKNER-JONES, B.E.; BELLOMARINO, V.M.; BORG, A.J.; ORZESZKO; GARLAND, S.M. Detection and typing of human papillomavirus using Vira Type "in situ" hybridization kit: comparison with a conventional dot blot technique. J.Clin.Pathol. 43:913-917, 1990.
62. FAVRE, M.; BREITBURD, F. CROISSANT, O.; ORTH, G. Structural Polypeptides of Rabbit, Bovine and Human Papilloma Viruses. J.Virol. 15: 1239-1247, 1975.
63. FENOGLIO-PREISER, M; WOLF, M & RILKE, F. Progress in Surgical Pathology. Cap. 1; Vol XII; Fields & Wood Medical Publishers Inc., New York, 1992.
64. FIGUEIREDO, N.M. & VELLUDO, M.A.L. Papilomavírus Humano. Características Biológicas e Patogênicas. Med.Rib.Preto, 23(4): 246-64, 1990.
65. FINLAY, C.A; HINDS, P.W & LEVINE, A.J.The p53 Proto-oncogene Can Act as a Supressor of Transformation. Cell. : 1083-1093, 1989.

66. FRANCO, E.L. Cancer Causes Revisited: Human Papillomavirus and Cervical Neoplasia. J.Nat.Cancer Inst. 87(11): 779-780, 1995.
67. FURIHATA, M.; OHTSUKI, Y.; OGOSHI, S.; TAKAHASHI, A.; TAMIYA, T.; OGATA, T. Prognostic Significance of Human Papillomavirus Genomes (Type 16,18) and Aberrant Expression of p53 Protein in Human Esophageal Cancer. Int. J.Cancer. 54: 226-30, 1993.
68. GERGELY, L.; CZEGLÉDY, J & HERNÁDY, Z. Human Papillomavirus Frequency in Normal Cervical Tissue. Lancet. 29: 513, 1987.
69. HAWLEY-NELSON, P.; VOUSDEN, K.H.; HUBBERT, N.L.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. HPV 16 E6 and E7 Proteins Cooperate to Immortalize Human Foreskin Keratinocytes. Embo J. 8(12): 3905-10, 1989.
70. HERRINGTON, C.S.; ANDERSON, S.M.; GRAHAM, A.K.; MC GEE, J.O.D. The Discrimination of High-Risk HPV Types by In Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction. Histochem.J. 25: 191-98, 1993.
71. HIGGINS, G.P.; PHILIPS, G.E.; SMITH, L.A.; UZELIN, D.M.; BURRELL, C.J. High Prevalence of Human Papillomavirus Transcripts in All Grades of Cervical Intraepithelial Glandular Neoplasia. Cancer. 70: 136-146, 1992.

72. HILLS, E. & LAVERTY, C.R. Electron Microscopic Detection of Human Papillomavirus Particles in Selected Koilocytotic Cells in a Routine Cervical Smears. Acta Cytol. 23: 53-6, 1979.
73. HIRSCH-BEHNAM, A.; DELIUS, H. & DE VILLIERS, E.M. A Comparative Sequence Analysis of Two Human Papillomavirus (HPV) Types 2a and 57. Virus Res. 18: 81-98, 1990.
74. HORDING, M.; HORDING, U.; DUGAARD, S.; NORRILD, B.; FABER, V. Human Papillomavirus Type 11 In a Fatal Case of Esophageal and Bronchial Papillomatosis. Scand.J.Infect.Dis. 21: 229-31, 1989.
75. HOSHIKAWA, T.; NAKAJIMA, T.; UHARA, H.; GOTOH, M.; SHIMOSATO, Y.; TSUTSUMI, K.; ONO, I.; EBIHARA, S. Detection of Human Papillomavirus DNA in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas by Polymerase Chain Reaction. Laryngoscope. 100: 647-50, 1990.
76. HOWLEY, P.M. & SCHLEGEL, R. The Human Papillomaviruses. Am.J.Med., 85: 155-8, 1988.
77. HOWLEY, P.M. The Molecular Biology of Papillomavirus Transformation. Am.J.Pathol. 113: 414-21, 1983
78. HSU, S.M; RAINE, L & FANGER, H. Use of Avidin-Biotin- Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A Comparison Between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures. J.Histochem.Cytochem.29: 577-80, 1981.

79. HÜBREGTSE, SCHEFFNER & HOWLEY. A cellular Protein Mediates Association of p53 With E6 oncoprotein of Human Papillomavirus Types 16 or 18. EMBO J. 10: 4129-4135, 1991.
80. JANSON, J.A.; BAILLE, J. & POLLOCK, M. Removal of Esophageal Condylomata Acuminatum Containig Human Papillomavirus. Gastrointest. Endo. 37: 367-79, 1991.
81. JENSON, A.B.; ROSENTHAL, L.D.; OLSON, C.; PASS, F.; LANCASTER, W.D.; SHAH, K. Immunologic Relatedness of Papillomaviruses from Different Species. J.Natl.Cancer Inst. 64: 495-500, 1980.
82. KAHN, T; SCHWARZ, E & ZUR HAUSEN, H. Molecular Cloning and Characterization of the DNA of a New Human Papillomavirus (HPV 30) fro Laryngeal Carcinoma. Int.J.Cancer. 37: 61-65, 1986.
83. KIRNBAUER, R.; TAUB, J.; GREENSTONE, H.; RODEN, R.; DÜRST, M.; GISSMANN, L.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Efficient Self-Assembly of Human Papillomavirus Type 16 L1 and L1-L2 into Virus-Like Particles. J.Virol. 67: 6929-6936, 1993.
84. KOSS, L. Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases., JB Lippincott Company Philadelphia. Vol 2, 4 ed, 1992.
85. KOSS, L.G. & DURFEE, G.R. Unusual Patterns of Squamous Epithelium of the Uterine Cervix: Cytologic and Pathologic Study of Koilocytotic Atypia. Ann.N.y.Acad.Sci. 63: 1245-1261, 1956.

86. KULSKI, J.; DEMETER, T.; STERRETT, G.F.; SHILKIN, K.B. Human Papillomavirus DNA in Oesophageal Carcinoma. LANCET. 20: 683-684, 1986
87. KULSKI, J.K.; DEMETER, T.; MUTAVDZIC, S.; STERRETT, G.F.; MITCHELL, K.M.; PIXLEY, E.C.. Survey of Histologic Specimens of Human Cancer for Human Papillomavirus Type 6/11/16/18 by Filter Hybridization. Am.J.Clin.Pathol. 94(5): 566-70, 1990.
88. KURMAN, R.; SHAH, K.H.; LANCASTER, W.D.; JENSON, A.B. Immunoperoxidase Localization of Papillomavirus Antigens in Cervical Dysplasia and Vulvar Condylomas Am.J.Obstet.Gynecol., 140: 931-35, 1981.
89. LAMBERT, P.E. Papillomavirus DNA Replication. J.Virol. 65(7): 3417-3420, 1991.
90. LAZO, P.A. Human Papillomaviruses in Oncogenesis. Bioassays, 9: 168-172, 1988.
91. LEVI, J.E.; DELCELO, R.; ALBERTI, V.N.; TORLONI, H.; VILLA, L.L. Human Papillomavirus DNA in Respiratory Papillomatosis Detected by In Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction. Am.J.Pathol. 135(6): 1179-83, 1989.
92. LEWIS, F.A.; GRIFFITHS, S.; DUNNICLIFF, R.; WELLS, M.; DUDDING, N.; BIRD, C.C. Sensitive In Situ Hybridization Using

- Biotin-Streptavidin-Polyalkaline Phosphatase Complex. J.Clin.Pathol. 40: 163-166, 1987.
93. LINDEBERG, H.; SYRJÄNEN, S.; KÄRJA, J.; SYRJÄNEN, K. Human Papillomavirus Type 11 DNA in Squamous Cell Carcinomas and Pre-existing Multiple Laryngeal Papillomas. Acta Otolaringol.(Stockh). 107: 141-149, 1989.
94. LOKE, S.L.; MA, L.; WONG, M.; SRIVASTAVA, G.; LO, I.; BIRD, C.C. Human Papillomavirus in Esophageal Squamous-Cell Carcinoma J.Clin.Pathol., 43: 909-912, 1990.
95. MADEN, C.; BECKMANN, A.M.; THOMAS, D.B.; MC KNIGHT, B.; SHERMAN, K.J.; ASHLEY, R.L.; LAWRENCE, C.; DALING, J.R. Human Papillomaviruses, Herpes Simplex Virus and The Risk of Oral Cancer in Men. Am.J.Epidemiol. 135: 1093-1102, 1992.
96. MAHBOUBI, E.O & ARAMESH, B. Epidemiology of Esophageal Cancer in Iran with Special Reference to Nutritional and Cultural Aspects. Prev.Med. 9: 613-21, 1980.
97. MANOS, M.M.; TING, Y.; WRIGHT, D.K.; LEWIS, A.J.; BROKER, T.R.; WOLINSKY, S.M. Use the Polymerase Chain Reaction Amplification for the Detection of Genital Human Papillomavirus. Cancer Cells. 7: 209-214, 1989.
98. MC CANCE, D.J. Human Papillomaviruses and Cancer. Biochem Biophys. Acta. 823: 195-205, 1986.

99. MEINKOTH, J. & WAHL, G. Hybridization of Nucleic Acids Immobilized on Solid Supports. Ann.Biochem. 138: 267-284, 1984.
100. MEISELS, A. & FORTIN, R. Condylomatous Lesions of Cervix and Vagina. I. Cytologic Patterns. Acta Gynecol. 20(6): 505-9, 1976.
101. MEISELS, A.; ROY, M.; FORTIER, M.; MORIN, C. Condylomatous Lesions of the Cervix. Am.J.Diagn.Obstet., 1: 109-16, 1979.
102. MILLER, R.K; KHUON, S & GOLDMAN, R.D. Dynamics of Keratin Assembly: Exogenous Type I Keratin Rapidly Associates with Type II Keratin In Vivo. J.Cell Biol. 122: 123-35, 1993.
103. MINGXIN, L; PING, L & BAORONG, L. Recent Progress in Research on Esophageal Cancer in China. Adv.Cancer Res. 33: 173-247, 1980.
104. MOENCH, T.R.; GENDELMAN, H.E.; CLEMENTS, J.E.; NARAYAN, O.; GRIFFIN, D.E. Efficiency of In Situ Hybridization as a Function of Probe Size and Fixation Technique. J.Virol.Meth. 11: 119-30, 1985.
105. MOHR, I.J.; CLARK, R.; SUN, S.; ANDROPHY, E.J.; MC PHERSON, P.; BOTCHAN, M. Targeting the E1 Replication Protein to the Papillomavirus Origin of Replication by Complex Formation with E2 Transactivator. Science. 250: 1694-99, 1990.
106. MORGAN, D.W.; ABDULLAH, V.; QUINEY, R.; MYINT, S. Human Papilloma virus and Carcinoma of the Laryngopharynx. J.Laryngol.Otol. 105: 288-90, 1991.

107. MOSCICKI, A.B. Comparison Between Methods for Human Papillomavirus DNA Testing: A Model for Self-Testing in Young Women. J.Infect.Dis. 167: 723-5, 1993.
108. MÜNGER, K.; WERNESS, B.A.; DYSON, N.; PHELPS, W.C.; HARLOW, E.; HOWLEY, P.M. Complex Formation of Human Papillomavirus E7 Proteins with the Retinoblastoma Tumor Suppressor Gene Product. Embo J. 8(13): 4099-105, 1989.
109. MYERS, J.D. Development and Application of Immunocytochemical Staining Techniques: A Review. Diagn.Cytopathol. 5(3): 318-29, 1989.
110. NASSERI, M.; HIROCHIKA, R.; BROKER, T.R.; CHOW, L.T. A Human Papillomavirus Type 11 Transcript Encoding an E1[^]E4 Protein. Virology. 159: 433-9, 1987.
111. NUOVO, G.J & RICHART, R.M. A Comparison of Biotin - and ³⁵ S- Based In Situ Hybridization Methodologies for Detection of Human Papillomavirus DNA. Lab.Invest. 61(4): 471-6, 1989.
112. OBBARIUS-KÜHLER, C.; LONGOSCH-MILDE, K.; LÖNING, T.; STEGNER, H.E. Polymerase Chain Reaction-Assisted Evaluation of Low and High Grade Squamous Intraepithelial Lesion Cytology and Reappraisal the Bethesda System. Acta Cytol. 38: 681-686, 1994.
113. ODZE, R.; ANTONIOLI, D.; SHOCKET, D.; TOPHAM-NOBLE, S.; GOLDMAN, H.; UPTON, M. Esophageal Squamous Papillomas. A clinicopathologic Study of 38 Lesions and Analysis for Human

- Papillomavirus by Polymerase Chain Reaction. Am.J.Surg.Pathol. 17(8): 803-12, 1993.
114. OKAGAKI, T.; CLARK, B.A.; BROOKER, D.C.; WILLIAMS, P.P. Koilocytosis in Dysplastic and Reactive Cervical Squamous Epithelium. An Ultrastructural Study. Acta Cytol. 22(2): 95-98, 1978.
115. ONDA, T.; KANDA, T.; ZANMA, S.; YASUGI, T.; WATANABE, S.; KAWANA, T.; UEDA, K.; YOSHIKAWA, H.; TAKETANI, Y.; YOSHIKE, K. Association of Antibodies Against Human Papillomavirus 16 E4 and E7 Proteins with Cervical Cancer Positive for Human Papillomavirus DNA. Int.J.Cancer. 54: 624-28, 1993.
116. OSTROW, R.S.; MANIAS, D.A.; FONG, W.J.; ZACHOW, K.R.; FARAS, A.J. A survey of Human Cancers for Human Papillomavirus DNA by Filter Hybridization. Cancer. 59: 429-34, 1987.
117. PAO, C.C. ; LIN, C.Y.; CHANG, Y.L.; TSENG, C.J.; HSUEH, S. Human Papillomavirus and Small Cell Carcinoma of Uterine Cervix. Gynecol.Oncol. 43: 206-10, 1991.
118. PAQUETTE, R.L.; LEE, Y.Y; WILCZYNSKI, S.P.; KARMAKAR, A.; KIZAKI, M.; MILLER, C.W.; KOEFFLER, P.H. Mutations of p53 and Human Papillomavirus Infection in Cervical Carcinoma. Cancer. 72: 1272-80, 1993.
119. PFISTER, H. & FUCHS, P.G. Anatomy, Taxonomy and Evolution of Papillomaviruses. Intervirolgy. 37: 143-149, 1994.

120. POLITOSKE, E.J. Squamous Papilloma of the Esophagus Associated with the Human Papillomavirus. Gastroenterology. 102: 668-73, 1992.
121. POPPER, H.H.; WIRNSBERGER, G.; JÜTTNER-SMOLLE, F.M.; PONGRATZ, M.G.; SOMMERSGUTTER, M. The Predictive Value of Human Papillomavirus (HPV) Typing in the Prognosis of Bronchial Squamous Cell Papillomas. Histopathology. 21: 323-30, 1992.
122. QUINEY, R.E.; WELLS, M.; LEWIS, F.A.; TERRY, R.M.; MICHAELS, L.; CROFT, C.B. Laryngeal Papillomatosis: Correlation Between Severity of Disease and Presence of HPV 6 and 11 Detected by In Situ DNA Hybridization. J.Clin.Pathol. 42: 694-698, 1989.
123. RABSON, M.S.; YEE, C.; YANG, C.Y.; HOWLEY, P.M. Bovine Papillomavirus Type 1 Early Region Transformation and Replication Functions J.Virol. 60: 626-34, 1986.
124. RAKOCZY, P.; HUTCHINSON, L.; KULSKI, J.K.; STERRET, G.F.; PIXLEY, E.C. Detection of Human Papillomavirus in Reprocessed Routine Papanicolaou Smears by DNA Hybridization. Diagn.Cytopathol. 6: 210-214, 1990.
125. RECHER, L. & SREBNIK, E. Histopathologic Features of Koilocytotic Atypia. A Detailed Description. Acta Cytol. 25: 377-82, 1981.
126. ROBERTS, S.; ASHMOLE, I.; JOHNSON, G.D.; KREIDER, J.W.; GALLIMORE, P.H. Cutaneous and Mucosal Human Papillomavirus E4

Proteins Form Intermediate Filament-Like Structures in Epithelial Cells.

Virology. 197: 176-87, 1993.

127. ROMANI, V.G; ABRAMSON, A.L & STEINBERG, B.M. Laryngeal Papilloma Cells in Culture Have an Altered Cytoskeleton. Acta Otolaryngol. (Stockh). 103: 345-352, 1987.
128. SANTUCCI, S.; ANDROPHY, E.J.; BONNE-ANDREA, C.; CLERTANT, P. Protein Encoded by the Bovine Papillomavirus E1 Open Reading Frame: Expression in Heterologous System and Virally Transformed Cell. J.Virol. 64: 6027-39, 1990.
129. SCHIFFMAN, M.H.; BAUER, H.M.; HOOVER, R.N.; GLASS, A.G.; CADELL, D.M.; RUSH, B.B.; SCOTT, D.R.; SHERMAN, M.E.; KURMAN, R.J.; WACHOLDER, S.; STANTON, C.K.; MANOS, M.M. Epidemiologic Evidence Showing that Human Papillomavirus Infection Causes Most Cervical Neoplasia. J.Natl.Cancer Inst. 85: 958-64, 1993.
130. SCHIFFMAN, M.H.; BAUER, H.M.; LORINCZ, A.T.; MANOS, M.M.; BYRNE, J.C.; GLASS, A.G.; CADELL, D.M.; HOWLEY, P.M. Comparison of Southern Blot Hybridization and Polymerase Chain Reaction Methods for the Detection of Human Papillomavirus DNA. J.Clin.Microbiol. 29(3): 573-77, 1991.
131. SCHNEIDER, A.; MEINHARDT, G.; DE VILLIERS, E.M.; GISSMANN, L. Sensitivity of Cytologic Diagnosis of Cervical

- Condyloma in Comparison with HPV-DNA Hybridization Studies. Diagn.Cytopathol. 3(3): 250-55, 1987.
132. SEDLACEK, T.V.; LINDHEIM, S.; EDER, C.; HASTY, L.; WOODLAND, M.; LUDOMIRSKY, A.; RANDO, R.F. Mechanism for Human Papillomavirus Transmission at Birth. Am.J.Obstet.Gynecol. 161: 58-59, 1989.
133. SEEDORF, K.; KRÄMMER, G.; DÜRST, M.; SUHAI, S.; RÖWEKAMP, W.G. Human Papillomavirus Type 16 DNA Sequence. Virology. 145: 181-9, 1985.
134. SHIBATA, D.K; ARNHEIM, N & MARTIN, J. Detection of Human Papilloma Virus in Paraffin-Embedded Tissue Using the Polymerase Chain Reaction. J.Exp.Med. 167:225-30,1988.
135. SHROYER, K.R.; HOSEY, J.; SWANSON, L.E.; WOODARD, W.D.; FENNELL, R.H. Cytologic Diagnosis of Human Papillomavirus Infection: Spindled Nuclei. Diagn.Cytopathol. 6: 178-83, 1990.
136. SMOTKIN,D. & WETTSTEIN, F.O. The Major Human Papillomavirus Protein in Cervical Cancer is a Cytoplasmatic Phosphoprotein. J.Virol. 61(5): 1686-9, 1987.
137. SNIDJERS, P.J.F.; VAN DEN BRULE, A.J.C.; SCHRIJNEMAKERS, H.F.J.; SNOW, G.; MEIJER, C.J.L.M.; WALBOOMERS, J.M.M. The Use of General Primers in the Polymerase Chain Reaction Permits the

- Detection of a Broad Spectrum of Human Papillomavirus Genotypes. J.Gen.Virol. 71: 173-181, 1990.
138. STEMMERMANN, G.; HEFFELFINGER, S.C.; NOFFSINGER, A.; HUI, W.Z.; MILLER, M.A.; FENOGLIO-PREISER, C.M. The Molecular Biology of Esophageal and Gastric Cancer and Their Precursors Oncogenes Tumor Suppressor Genes and Growth Factors. Hum.Pathol. 25: 968-981, 1994.
139. STOLER, M.H. In Situ Hybridization. A Research Technique or Routine Diagnostic Test ? Arch.Pathol.Lab.Med. 117: 478-81, 1993.
140. SYRJÄNEN, K.J. Progress in Surgical Pathology. Cap 9, p. 217-39, v.XII. Field & Wood Medical Publishers Inc., New York, 1992.
141. SYRJÄNEN, S.M. Basic Concepts and Pratical Applications of Recombinant DNA Techniques in Detection of Human Papillomavirus (HPV) Infections. APMIS. 98: 95-110, 1990
142. SYRJÄNEN, S.; PARTANEN, P.; MÄNTYJÄRVI, R.; SYRJÄNEN, K. Sensitivity of In Situ Hybridization Techniques Using Biotin and ³⁵ S-Based Human Papillomavirus (HPV) DNA Probes. J.Virol.Meth. 19: 225-38, 1988.
143. SYRJANEN, K.; PYHÖNEN, S.; AUKEE, S.; KOSKELA, E. Squamous Cell Papilloma of the Esophagus:A Tumor Probably Caused by Human Papillomavirus (HPV). Diagn.Histopathol. 5: 291-6, 1982.

144. TASE, T.; OKAGAKI, T.; CLARK, B.A.; TWIGGS, L.B.; OSTROW, R.S; FARAS, A.J. Human Papillomavirus DNA in Adenocarcinoma In Situ, Microinvasive, Adenocarcinoma of the Uterine Cervix and Coexisting Cervical Squamous Intraepithelial Neoplasia. Int.J.Gynecol.Pathol.8: 8-17, 1989.
145. TENTI, P.; ZAPPATORE, R; CARNEVALI, L.; SILINI, E.; ROMAGNOLI, S.; GIANATTI, A. HPV Strain-Specific Probes. Liver. 12: 262-7, 1992.
146. TERRY, R.M.; LEWIS, F.A.; GRIFFITHS, S.; WELLS, M.; BIRD, C.C. Demonstration of Human Papillomavirus Types 6 and 11 in Juvenile Laryngeal Papillomatosis by In Situ DNA Hybridization. J.Pathol. 153: 245-248, 1987.
147. TIDY, J.A; MASON, P.W & FARRELL, P.J. A New Sensitive Method for Human Papillomavirus Infection. Obstet.Gynecol. 74: 410-14, 1989.
148. TOH, Y.; KUWANO, H.; TANAKA, S.; BABA, K.; MATSUDA, H.; SUGIMACHI, K.; MORI, R. Detection of Human Papillomavirus DNA in Esophageal Carcinoma in Japan by Polymerase Chain Reaction. Cancer. 70: 2234-38, 1992.
149. TOMMASINO, M.& CRAWFORD, L. Human Papillomavirus E6 and E7 Proteins Which Deregulated the Cell Cycle. BioEssays 17(6): 509-518, 1995.

150. TOMITA, Y.; SHIRASAWA, H.; SEKINE, H.; SIMIZU, B. Expression of the Human Papillomavirus Type 6b L2 Open Reading Frame in *Escherichia coli*: L2-Beta-Galactosidase Fusion Proteins and their Antigenic Properties. Virology. 158: 8-14, 1987.
151. TRONCONE, G.; HERRINGTON, C.S.; COOPER, K.; DE ANGELIS, M.L.; MC GEE, J.O.D. Detection of Human Papillomavirus in Matched Cervical Smears and Biopsy Specimens by Non-Isotopic In Situ Hybridization. J.Clin.Pathol. 45: 308-13, 1992.
152. TSUTSUMI, K.; NAKAJIMA, T.; GOTOH, M.; SHIMOSATO, Y.; TSUNOKAWA, Y.; TERADA, M.; EBIHARA, S.; ONO, I. In Situ Hybridization and Immunohistochemical Study of Human Papillomavirus Infection in Adult Laryngeal Papillomas. Laryngoscope. 99: 80-85, 1989.
153. VAN DEN BRULE, A.J.C.; WALBOOMERS, J.M.M.; DU MAINE, M.; KENEMANS, P.; MEIJER, C.J.L.M. Difference in Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes in Cytopathologically Normal Cervical Smears is Associated with a History of Cervical Intraepithelial Neoplasia. Int.J.Cancer. 48: 404-408, 1991.
154. VASSALO, J. Avanços Técnicos no Diagnóstico Histopatológico das Neoplasias: Imuno-histoquímica. Rev. Unicamp. 4(1): 31-34, 1993.
155. VILLA, L.L. Papilomavírus Humano e Câncer do Colo do Útero. LAES & HAES. (in press), 1995.

156. WERNESS, B.A; LEVINE, A.J & HOWLEY, P.M. Association of Human Papillomavirus Types 16 and 18 E6 Proteins with p53. Science. 248: 76-79, 1990.
157. WINKLER, B.; CAPO, V.; REUMANN, W.; MA, A.; LA PORTA, R.; REILLY, S.; GREEN, P.M.R.; RICHART, R.M.; CRUM, C.P. Human Papillomavirus Infection of the Esophagus. A Clinicopathologic Study with Demonstration of Papillomavirus Antigen by the Immunoperoxidase Technique. Cancer. 55: 149-155, 1985.
158. WRIGHT, R.G.; MURTHY, D.P.; GUPTA, A.C.; COX, N.; COOKE, R.A. Comparative In Situ Hybridization Study of Juvenile Laryngeal Papillomatosis in Papua New Guinea and Australia. J.Clin.Pathol. 43: 1023-25, 1990.
159. YOSHIKAWA, H.; KAWANA, T; KITAGAWA, K.; MIZUNA, M.; YOSHIKUNA, H.; IWAMOTO, A. .Amplification and Typing of Multiple Cervical Cancer Associated Human Papillomavirus DNAs Using a Single Pair of Primers. Int.J.Cancer. 45:990-992, 1990.
160. ZHOU, J.; SUN, X.Y; LOUIS, K.; FRAZER, I.H. Interaction of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 Capsid Proteins with HPV DNA Requires an Intact L2 N-Terminal Sequence. J.Virol. 68: 619-625, 1994.

161. ZHOU, J.; STENZEL, D.J.; DUN, X.Y.; FRAZER, I.H. Synthesis and Assembly of Infectious Bovine Papillomavirus Particles In Vitro. J.Gen.Virol. 74: 763-768, 1993.
162. ZHOU, J.; CRAWFORD, L.; MC LEAN, L.; SUN, X.Y.; STANLEY, M.; ALMOND, N.; SMITH, G.L. Increased Antibody Responses to Human Papillomavirus Type 16 L1 Protein Expressed by Recombinant Vaccinia Virus Lacking Serine Protease Inhibitor Genes. J.Gen.Virol. 71: 2185-2190, 1990.
163. ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus in Anogenital Cancer as a Model to Understand the Role of viruses in Human Cancer. Cancer Res. 49: 4677-81, 1989.