

HUGO LEITE DE FARIAS BRITO

**DETECÇÃO DO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) EM LESÕES
DISPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS DA LARINGE ATRAVÉS DA TÉCNICA
DA HIBRIDIZAÇÃO "IN SITU"**

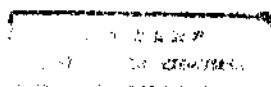
**Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas.**

Área de concentração: Anatomia Patológica

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a ALBINA MESSIAS DE ALMEIDA MILANI ALTEMANI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ VASSALO

**Campinas
1998**



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Es.
T.º	36494
PROD.	229/99
C	D
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/02/99
N.º CPD	

CM-00122003-7

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

B777d

Brito, Hugo Leite de Farias

Detecção do vírus do papiloma humano (HPV) em lesões displásicas e neoplásicas da laringe através da técnica da hibridização "in situ" / Hugo Leite de Farias Brito. Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientadores : Albina Messias de Almeida Milani Altemani, José Vassalo

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Displasia. 2. Carcinoma. 3. Laringe. 4. Hibridização de ácido nucleico. I. Albina Messias de Almeida Milani Altemani. II. José Vassalo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

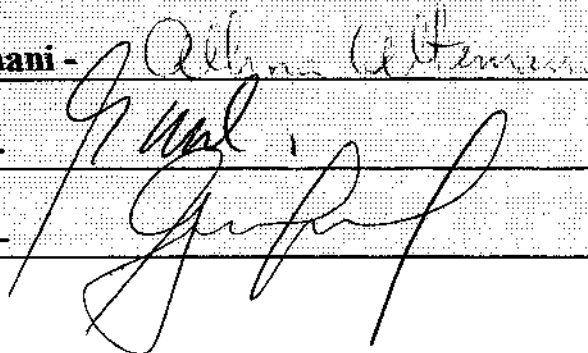
Orientador: Profa. Dra. Albina M.A.M. Altemani

Membros:

1. Profa. Dra. Albina M.A.M. Altemani -

2. Prof. Dr. Carlos Eduardo Bacchi -

3. Prof. Dr. Agrício Nubiato Crespo -

Handwritten signatures of the three members of the examination board: Albina M.A.M. Altemani, Carlos Eduardo Bacchi, and Agrício Nubiato Crespo.

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

Data: 18.12.1998

Aos meus pais, José e Vetúria, com quem aprendi que a busca do conhecimento deve ser um ideal de vida. A razão e a simplicidade, os vetores desse ideal.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^a. Albina Messias de Almeida Milani Altemani, por sua orientação competente, segura e objetiva, que foi essencial na construção desse trabalho e será uma referência definitiva nos estudos de amanhã .

Ao Prof. Dr. José Vassalo, pelo auxílio inestimável na elaboração e condução da parte metodológica desse trabalho, estando sempre disposto a resolver os eventuais problemas operacionais.

As biólogas Glauce Aparecida Pinto e Marisa de Almeida Matsura, que demonstraram com profunda paciência como conviver em harmonia com pipetas, cubas, estufas, sondas e todos esses objetos que compõem o pequeno mundo de um laboratório de hibridização.

A Fernanda, Rose, Tatiana e Wanda, funcionárias do Laboratório de Patologia Experimental – CAISM, pela acolhida carinhosa e prestativa.

A Giseli e Luzia, pela realização dos cortes histológicos de todo o material estudado.

Aos Profs. Drs. Athanase Billis, Liliana Andrade e Luciano Queiroz, pela avaliação crítica e sugestões.

A Maria do Carmo, secretária da Pós-Graduação, pela ajuda nos redemoinhos burocráticos.

Aos amigos Augusto Almeida, Cristiane Pereira, Gentil Galiza, Fernando Mariz, Moacir Martins e Rosângela Deliza, pela força nos momentos difíceis.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	03
3. REVISÃO DA LITERATURA	
3.1. CARCINOMA EPIDERMÓIDE DA LARINGE	04
3.1.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos	04
3.1.2. Anatomia Patológica	05
3.1.3. Etiopatogenia	06
3.1.3.1. Aspectos gerais	06
3.1.3.2. Fumo e Álcool	07
3.1.3.3. Refluxo gastro-esofágico	08
3.1.3.4. Fatores ocupacionais	09
3.1.3.5. Dieta alimentar	10
3.1.3.6. Irradiação	10
3.1.3.7. Fatores genéticos	11
3.1.3.8. Oncogenes e genes supressores de tumor	11
3.2. O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)	13
3.2.1. Aspectos gerais e classificação	13
3.2.2. Organização genômica	15
3.2.3. Patogênese	16
3.2.4. Alterações morfológicas	18

3.2.5. Técnicas especiais para detecção do HPV	19
3.2.5.1. Imunohistoquímica	19
3.2.5.2 Técnicas de hibridização molecular	20
3.2.5.3. Reação em cadeia da polimerase	23
3.2.5.4. Sistema de captura de híbridos	24
 3.3. PAPEL DO HPV NAS LESÕES EPITELIAIS DA LARINGE	 25
3.3.1. Papilomatose laringea	25
3.3.2. Verruga vulgar da laringe	27
3.3.3. Lesões displásicas	27
3.3.4. Carcinoma epidermóide	27
 4. MATERIAL E MÉTODOS	
 4.1. Material	 32
4.2. Métodos.....	33
 5. RESULTADOS	 37
 6. DISCUSSÃO	 54
 6.1. O HPV como agente etiológico dos carcinomas da região ano-genital	 54
6.2. O HPV e as lesões epiteliais da cabeça e pescoço	54
6.3. Detecção do HPV nos carcinomas da laringe: His X PCR	55
6.4. Frequência de positividade	75
6.5. Tipos de sondas	58
6.6. Intensidade das reações	60
6.7. Localização do sinal positivo	60
6.8. Positividade no epitélio normal	61
6.9. Alterações morfológicas sugestivas de infecção pelo HPV	62
6.10. Graduação histológica	63

6.11. Aspectos clínicos	64
6.12. Papel do HPV na etiopatogenia do carcinoma da laringe	64
7. CONCLUSÕES	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

RESUMO

O vírus do papiloma humano (HPV) tem sido considerado como um possível agente carcinogênico na laringe. A frequência de detecção de DNA do HPV, nesse tumor, varia de 5 a 90%. Tal variabilidade, provavelmente, está relacionada à fatores técnicos, metodológicos e geográficos. A frequência de associação do HPV com carcinomas da laringe, em nosso meio, ainda não foi determinada e existem raros raros trabalhos pesquisando esse vírus em lesões pré-cancerosas dessa região. Estudamos 65 biópsias ou peças cirúrgicas de laringe (45 carcinomas epidermóides e 20 lesões displásicas) do arquivo de patologia cirúrgica do Departamento de Anatomia Patológica da FCM- UNICAMP. As biópsias/peças foram fixadas em formalina a 10% e incluídas em parafina. A presença de DNA do HPV foi investigada pela técnica da hibridização "in situ" com amplificação do sinal, utilizando-se sondas biotiniladas de DNA (DAKO) específicas para os tipos 6/11, 16/18, 31/33 e Wide Spectrum (6, 11, 16, 30, 31, 33, 45, 51 e 52). O DNA do HPV foi identificado em 7 casos (10,7%): 4 (8,8%) carcinomas epidermóides e 3 (15%) displasias epiteliais (01 caso de displasia moderada e 02 casos de displasia grave/carcinoma "in situ"). Os carcinomas epidermóides foram positivos para os tipos 6/11 e 16/18 em 2 casos e apenas para a sonda Wide Spectrum em outros 02 casos. A displasia moderada foi positiva para o tipo 16/18, enquanto os 2 casos de carcinoma "in situ" mostraram positividade para as sondas 6/11 e Wide Spectrum respectivamente. Todos os casos apresentaram raros a vários núcleos corados com intensidade variando de leve a moderada. Não houve relação entre a presença de alterações morfológicas associadas ao HPV (atipia coilocitótica) e a positividade para o DNA viral, pela hibridização "in situ". Concluimos, que a baixa frequência de detecção do HPV observada não favorece uma relação etiológica entre esse vírus e as lesões pré-cancerosas e o carcinoma laríngeo, na população estudada.

SUMMARY

Human papillomavirus (HPV) has been proposed as a potential etiologic factor for squamous cell carcinoma of the larynx. In the literature, HPV DNA detection in this tumor ranges from 5 to 90%, probably due to technical and geographical reasons. The incidence of HPV in laryngeal carcinomas in Brazil has not been investigated and there are only few studies of laryngeal dysplastic lesions. We examined the presence of HPV DNA in 45 glottic squamous cell carcinomas and in 20 dysplastic lesions using in situ hybridization in paraffin sections. Hybridization was performed with biotinylated DNA probes (DAKO) for HPV 6/11, 16/18, 31/33 and Wide Spectrum (6, 11, 16, 30, 31, 33, 45, 51 e 52). DNA HPV was found in 7 cases (10.7%): 4 (8.8%) invasive carcinomas and 3 (15%) squamous dysplasias (1 moderate dysplasia and 2 severe dysplasia/ "in situ" carcinoma). Two cases of invasive carcinomas were positive for both HPV 6/11 and 16/18 and another 2 only with Wide Spectrum probe. The 3 cases of dysplasia showed positivity for types 16/18 (1 case of moderate dysplasia), 6/11(1 case of severe dysplasia) and Wide Spectrum only (1 case of severe dysplasia). In all cases there was small to moderate number of positive cells and intensity of nuclear staining was usually mild. Morphological signs associated with HPV infection (koilocytotic atypia) were not related to the presence of viral DNA detected by in situ hibridization. In conclusion, the low incidence of HPV DNA in dysplastic and carcinomatous lesions suggests that HPV probably plays little, if any role in laryngeal carcinogenesis among Brazilian population.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide é a neoplasia mais freqüente da laringe (BARNES & JOHNSON, 1986; MICHAELS, 1987a; KOUFMAN & BURKE, 1997), ocorrendo predominantemente em homens, entre a sexta e sétima décadas de vida. Ele é geralmente precedido pelas displasias epiteliais de alto grau, que são consideradas lesões pré-cancerosas (GILLIS et al, 1983; CRISSMAN, 1987; MICHAELS, 1987a; KAMBIK, 1997).

O fumo e o álcool são fatores epidemiológicos fortemente associados ao carcinoma epidermóide e lesões displásicas da laringe, havendo inclusive uma relação direta entre a intensidade e duração desses hábitos e a freqüência dessas lesões (BARNES & JOHNSON, 1986; DE STEFANI et al, 1987; MICHAELS, 1987a; BLITZER, 1988; BROWN et al, 1988; FALK et al, 1989; MUSCAT & WYNDER, 1992; VOKES et al, 1993; HART, 1997; KOUFMAN & BURKE, 1997; TRIZNA & SCHANTZ, 1997).

Além desses fatores, o vírus do papiloma humano (HPV), também tem sido considerado, por vários autores, como um possível agente carcinogênico na laringe (SYRJÄNEN et al, 1987; BRANDSMA & ABRAMSON, 1989; MORGAN et al, 1991; CLAYMAN et al, 1994). No colo uterino, a infecção pelo HPV é a principal causa, senão a única, das lesões displásicas e do carcinoma epidermóide (GARUTI et al, 1988; GUPTA et al, 1989; WRIGHT et al, 1994; PARK et al, 1995; GUPTA, 1997; MEISELS & MORIN, 1997a; WALBOOMERS & MEIJER, 1997; ZHEBE & WILANDER, 1997).

O HPV é um vírus de DNA epiteliotrópico, caracteristicamente associado a proliferação epitelial nos locais de infecção (WRIGHT, KURMAN, FERENCZY, 1994; PARK, FUJIWARA, WRIGHT, 1995; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995; GUPTA, 1997; MEISELS & MORIN, 1997a). Atualmente já foram descritos mais de setenta tipos diferentes de HPV, alguns deles relacionados com um alto risco de transformação maligna da célula infectada, como os vírus 16 e 18 (SYRJÄNEN, 1992; WRIGHT et al, 1994; MEISELS & MORIN, 1997a).

Na laringe, o HPV dos tipos 6 e 11 são agentes etiológicos do papiloma escamoso juvenil e do adulto, que são lesões benignas, geralmente recidivantes (MICHAELS, 1987b; LEVI et al, 1989; BRANDSMA et al, 1990; GALE et al, 1994; KIRCHNER & CARTER, 1994; KLOZAR et al, 1997).

Em relação ao carcinoma epidermóide, a frequência de detecção do HPV, particularmente o tipo 16, em diversos estudos, varia de 3 a 75% (SYRJÄNEN, SYRJÄNEN, PYRHÖNEN, 1982; SHEURLÉN et al, 1986; SYRJÄNEN et al, 1987; BRANDSMA & ABRAMSON, 1989; KIYABU et al, 1989; PEREZ-AYALA et al, 1990; MORGAN, ABDULLAH, MYNT, 1991; BRANDWEIN, NUOVO, BILLER, 1993; GOURGOLIS et al, 1994; SHIDARA et al, 1994; SIMON et al, 1994; CLAYMAN et al, 1994; SNIDJERS et al, 1996; ALMADORI et al, 1996; SHEN et al, 1996; CEROVAC et al, 1996; LIE, KARLSEN, HOLM, 1996; VOWLES, MYNT, CROFT, 1997). Tal variabilidade deve estar relacionada à técnica empregada, o tamanho da amostra e, possivelmente, a fatores geográficos.

A ausência de trabalhos em nosso meio apresentando a frequência de associação do HPV com o carcinoma da laringe, assim como a escassez de trabalhos na literatura relacionando esse vírus com as lesões pré-cancerosas dessa região, estimulou-nos a esse estudo, realizado em material retrospectivo de patologia cirúrgica, que foi fixado em formalina e incluído em parafina.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho são:

- a) Determinar através da técnica de hibridização "in situ" a frequência de positividade do HPV em casos de carcinoma epidermóide e displasia epitelial da laringe.
- b) Determinar a frequência de positividade do HPV dos tipos 6/11, 16/18 e 31/33 em casos de carcinoma epidermóide e displasia epitelial da laringe.
- c) Comparar histologicamente os casos positivos e negativos para verificar se há associação com alterações morfológicas reconhecidas como secundárias à infecção pelo HPV.

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. CARCINOMA EPIDERMÓIDE DA LARINGE

3.1.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos

O carcinoma epidermóide é a neoplasia maligna mais freqüente da laringe, representando ao redor de 29% dos carcinomas da região da cabeça e pescoço (BARNES & JOHNSON, 1986; MICHAELS, 1987a; KOUFMAN & BURKE, 1997). Estima-se que 12.500 novos casos são diagnosticados por ano, nos EUA, com taxa de mortalidade ao redor de 29% (KIRCHNER & CARTER, 1994).

A grande maioria dos casos ocorre no sexo masculino, entre a sexta e a sétima décadas de vida, em pacientes com história de tabagismo e/ou etilismo de longa duração (MICHAELS, 1987a; KOUFMAN & BURKE, 1997).

No período de 1988 a 1992, a taxa padrão de incidência por 100.000 habitantes, do câncer da laringe, em diferentes estados do Brasil, variou na população masculina de 5,87 a 11,29 e na feminina de 0,63 a 1,80 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

Os principais sintomas clínicos são: disfonia (tumores glóticos), disfagia, disfonia, sensação de corpo estranho no pescoço (tumores supra-glóticos) e dispnéia (tumores sub-glóticos) (BARNES & JOHNSON, 1986).

3.1.2. Anatomia Patológica

O carcinoma epidermóide da laringe ocorre mais freqüentemente na porção anterior da corda vocal verdadeira. Inicialmente a neoplasia apresenta-se como uma placa de

aspecto queratótico e espessura variável, que posteriormente pode evoluir para lesão úlcero-infiltrativa ou formar massa vegetante, exofítica, com superfície externa cruenta e friável (MICHAELS, 1987c)

O aspecto histológico não difere daquele descrito em outras regiões, apresentando células escamosas atípicas com vários graus de diferenciação, formando blocos sólidos com crescimento expansivo ou cordões irregulares infiltrativos (MICHAELS, 1987c; KIRCHNER & CARTER, 1994).

Freqüentemente os carcinomas da laringe estão associados ou são precedidos por lesões displásicas, que caracterizam-se por alteração na maturação e estratificação normal do epitélio, que contém células atípicas em quantidades variadas, com manutenção da integridade da membrana basal (CRISSMAN et al, 1987; MICHAELS, 1987a; KAMBIK, 1997).

De acordo com a WHO-OMS (1991), as lesões displásicas podem ser classificadas em :

- Displasia Leve: as alterações nucleares são leves, ocupando o terço basal do epitélio, havendo maturação e estratificação normal nas camadas superficiais.
- Displasia Moderada: as alterações nucleares são mais acentuadas, comprometendo os dois terços inferiores do epitélio. Presença de mitoses nas camadas parabasal e intermediária.
- Displasia Grave: alterações nucleares intensas com perda da maturação acima de dois terços da espessura do epitélio, embora havendo alguma estratificação nas camadas mais superficiais. O pleomorfismo nuclear é acentuado, com núcleos bizarros e figuras atípicas de mitose nas camadas altas.
- Carcinoma "in situ": toda a espessura do epitélio escamoso apresenta aspecto carcinomatoso, sem invasão do estroma. Predomina o tipo de grandes células queratinizantes, mas em alguns casos as células mostram escasso citoplasma e aspecto basalóide.

As lesões displásicas da laringe podem estar associadas a queratose ou hiperplasia escamosa (GILLIS et al; 1983; CRISSMAN et al, 1987; CARDESA et al, 1997; KAMBIK et al, 1997).

3.1.3. Etiopatogenia

3.1.3.1. Aspectos Gerais

A carcinogênese é um processo complexo que ocorre em múltiplas etapas, estando relacionada primariamente com a mutação do genoma celular em vários sítios, por fatores genéticos (hereditários) e/ou adquiridos (ambientais) (FIELD, 1992; ANWAR et al, 1993; COTRAM, KUMAR, ROBBINS, 1994; HART, 1997).

O fumo e o álcool são os principais agentes carcinogênicos na região da cabeça e pescoço (BARNES & JOHNSON, 1986; DE STEFANI et al, 1987; MICHAELS, 1987a; BLITZER, 1988; BROWN et al, 1988; FALK et al, 1989; MUSCAT & WYNDER, 1992; VOKES et al, 1993; HART, 1997; KOUFMAN & BURKE, 1997; TRIZNA & SCHANTZ, 1997), freqüentemente promovendo a formação de múltiplos focos independentes de mucosa susceptível à transformação neoplásica, um fenômeno conhecido como “cancerização em campo” (HART, 1997).

Outros fatores tais como: refluxo gastro-esofágico, infecção pelo HPV, exposição a substâncias ocupacionais, dieta alimentar e herança genética, parecem desempenhar algum papel complementar ou sinérgico, embora ainda não totalmente esclarecido, sugerindo um modelo multifatorial para a carcinogênese laríngea. De acordo com esse modelo, o aparecimento do câncer é o resultado da interação entre eventos espontâneos, fatores hereditários e agentes ambientais (KOUFMAN & BURKE, 1997; TRIZNA & SCHANTZ, 1997).

3.1.3.2. Fumo e Álcool

O fumo e o álcool são os mais importantes agentes carcinogênicos da laringe e mais de 90% dos pacientes com carcinoma na laringe são fumantes (BARNES & JOHNSON, 1986; DE STEFANI et al, 1987; MICHAELS, 1987a; BLITZER, 1988; BROWN et al, 1988; FALK et al, 1989; MUSCAT & WYNDER, 1992; VOKES et al, 1993; HART, 1997; KOUFMAN & BURKE, 1997; TRIZNA & SCHANTZ, 1997).

Os riscos relativos para o aparecimento desse tipo de neoplasia na população fumante variam de 5,6 a 34,4 em relação ao grupo controle, sendo proporcional à quantidade e tempo de fumo (De STEFANI et al, 1991; FALK et al, 1989; MUSCAT & WYNDER, 1991; KOUFMAN & BURKE, 1997).

MUSCAT & WYNDER (1991), observaram riscos relativos de 10,3 em fumantes classificados como leves (1-20 cigarros diários), chegando a 68 quando calculado isoladamente para a região supra-glótica nesse grupo. FALK et al (1989), demonstraram que os ex-fumantes com menos de dez anos livres do hábito ainda apresentavam um risco três vezes maior que a população não fumante para desenvolver câncer laríngeo. Segundo De STEFANI et al (1987), o risco também dependeria da qualidade do fumo usado, sendo duas vezes maior nos usuários do fumo escuro em relação ao fumo claro.

O consumo de todos os tipos de álcool é considerado um fator de risco importante e independente para o desenvolvimento de câncer da laringe. Os riscos relativos, ajustados em relação ao fumo, variam de 2,2 a 14,8 na população etilista (FALK et al, 1989; MUSCAT & WYNDER, 1991; KOUFMAN & BURKE, 1997).

A associação do fumo com o álcool resulta em riscos relativos superiores ao esperado para um simples modelo aditivo, sugerindo um efeito sinérgico quando ambos os fatores estão presentes (BLITZER, 1988; FALK et al, 1989; KOUFMAN & BURKE, 1997).

O efeito dessas substâncias parece ser mais acentuado na região supra-glótica, sugerindo um papel importante no contato direto com a mucosa, de forma semelhante ao que

ocorre na cavidade oral e faringe (BLITZER, 1988; FALK et al, 1989; MUSCAT & WYNDER, 1991; KOUFMAN & BURKE, 1997).

Uma pequena proporção de casos de carcinoma da laringe (ao redor de 5%) ocorre em pacientes sem história de tabagismo ou etilismo, estando constituída predominantemente por tumores localizados na região glótica (AGUDELO et al, 1997).

3.1.3.3. Refluxo Gastro-Esofágico

O refluxo gastro-esofágico é considerado um fator irritativo do trato aero-digestivo superior, estando relacionado a várias doenças e sintomas da região, tais como: laringo-faringite inespecífica, granuloma de contato, hipertrofia da comissura posterior, “globus histericus”, rouquidão, tosse crônica e asma brônquica (WARD & HANSON, 1988; WIENER et al, 1989; KOUFMAN, 1991).

Uma proporção significativa de pacientes com carcinoma da laringe apresentam testes laboratoriais e radiográficos positivos para refluxo gastro-esofágico, com ausência de sintomatologia em grande número de casos (WARD & HANSON, 1988; WIENER et al, 1989; KOUFMAN & BURKE, 1997).

WARD & HANSON (1988), estudando 19 pacientes com carcinoma da laringe, sem história de tabagismo ou etilismo, detectou refluxo gastro-esofágico em todos os casos, freqüentemente associados a hérnia hiatal.

O papel do refluxo gastro-esofágico na gênese do carcinoma laríngeo ainda não está totalmente esclarecido. Admite-se que a presença de ácido produzindo inflamação crônica torna a mucosa predisposta à transformação maligna, assim como ocorre no esôfago de Barrett (KOUFMAN, 1991).

Segundo KOUFMAN (1991), a alta incidência de carcinoma da laringe na população tabagista/etilista e a grande freqüência de refluxo gastro-esofágico nesse grupo, sugere

uma ação conjugada desses fatores no desenvolvimento de neoplasia maligna do trato respiratório superior.

3.1.3.4. Fatores Ocupacionais

A exposição ocupacional a diversas substâncias tem sido associada ao desenvolvimento de carcinoma da laringe, embora de forma inconclusiva, em uma pequena proporção de casos.

As principais substâncias relacionadas são: asbesto, pó da madeira, pó do cimento, derivados do petróleo (betume), níquel, gás mostarda e algumas fibras têxteis (BLITZER, 1988; BROWN et al, 1988; MUSCAT & WYNDER, 1992; KOUFMAN & BURKE, 1997).

O papel do asbesto como fator carcinogênico na laringe é controverso. BROWN et al (1988), encontrou um risco relativo não significativo (1,5) para a exposição crônica ao asbesto. MUSCAT & WYNDER (1992), apontam o asbesto como um fraco carcinogênico na laringe, sendo um fator de risco restrito ao carcinoma glótico e não existindo efeito sinérgico, quando associado ao tabaco.

3.1.3.5. Dieta Alimentar

O consumo regular de frutas e vegetais frescos parece conferir um efeito protetor em relação ao aparecimento de carcinoma no trato respiratório superior (De STEFANI et al, 1987; BROWN et al, 1988; La VECCHIA et al, 1990; MUSCAT & WYNDER, 1992; KOUFMAN & BURKE, 1997).

De STEFANI et al (1987), através de estudos do tipo caso-controle, encontrou uma relação inversa entre o consumo de frutas e câncer da laringe, havendo um risco de 2,7 para

o aparecimento da doença nos indivíduos com nenhum consumo diário de frutas. La VECCHIA et al (1990), demonstrou uma relação inversa entre câncer da laringe e dieta rica em peixes, vegetais frescos e frutas, sendo mais evidente nos dois últimos itens.

O efeito protetor da dieta rica em frutas e vegetais pode estar relacionado com a presença em grande quantidade, nesses alimentos, de vitaminas A e C, que atuam como agentes anti-oxidantes no metabolismo celular, limitando o dano ao material genético (KOUFMAN & BURKE, 1997).

3.1.3.6. Irradiação

O uso da irradiação no tratamento de lesões benignas ou malignas da região da cabeça e pescoço tem sido, em alguns casos, relacionado com o aparecimento de carcinoma laríngeo (BLITZER, 1988; KOUFMAN & BURKE, 1997).

3.1.3.7. Fatores Genéticos

Fatores genéticos parecem ser importantes na etiologia do carcinoma da laringe, uma vez que nem todos os indivíduos expostos aos agentes carcinogênicos externos (fumo e álcool) desenvolvem a doença (COPPER et al, 1995; FOULKES et al, 1995; HART, 1997; TRIZNA & SCHANTZ, 1997).

Alguns estudos epidemiológicos têm demonstrado a ocorrência familiar de câncer da cabeça e pescoço, sendo relatados vários casos da doença em dois ou três membros da mesma família. Os parentes em primeiro grau de pacientes com câncer da região da cabeça e pescoço, segundo vários autores, apresentam uma taxa maior de neoplasia nos tratos digestivo e

respiratório superior e pulmão do que os parentes de um grupo controle (COPPER et al, 1995; FOULKES et al, 1995; HART, 1997; TRIZNA & SCHANTZ, 1997).

A herança de uma maior susceptibilidade ao câncer provavelmente é multifatorial, envolvendo a variação genética de enzimas importantes no metabolismo de substâncias carcinogênicas e no reparo do DNA (COPPER et al, 1995; FOULKES et al, 1995; HART, 1997; TRIZNA & SCHANTZ, 1997).

3.1.3.8. Oncogenes e genes supressores de tumor

A principal alteração genômica associada à transformação maligna consiste na ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor (anti-oncogenes) (FIELD, 1992; ANWAR et al, 1993; COTRAM et al, 1994; OLINER, 1994; LEVINE, 1995; HART, 1997).

Os oncogenes são genes responsáveis pelo controle da proliferação celular normal, atuando através da codificação de várias proteínas envolvidas nesse mecanismo, tais como: fatores de crescimento, receptores de membrana, proteínas cinases e fatores transcricionais. Desta forma, um desarranjo quantitativo ou qualitativo em diversos oncogenes pode alterar várias etapas do ciclo celular normal, promovendo a proliferação contínua e descontrolada da célula (FIELD, 1992; COTRAM et al, 1994; OLINER, 1994; LEVINE, 1995; HART, 1997; TRIZNA & SCHANTZ, 1997).

Os carcinomas da região da cabeça e pescoço podem expressar vários oncogenes: c-myc, int-2, hst-1, bcl-1, tgfa, o receptor do fator de crescimento epidérmico e os oncogenes da família ras. Os principais mecanismos responsáveis pela ativação dos mesmos envolvem rearranjos cromossômicos (translocação, transposição, mutação) e amplificação gênica (FIELD, 1992; COTRAM et al, 1994; HART, 1997).

Os genes supressores de tumor constituem uma classe de genes que estão ausentes ou têm seus produtos inativados na célula neoplásica. Esses genes são responsáveis pelo controle negativo do ciclo celular, sendo freqüentemente expressos de forma recessiva, ou seja, é necessário a perda de ambos os alelos para ocorrer alteração fenotípica (COTRAM et al, 1994; LEVINE, 1995; HART, 1997).

O gene supressor de tumor p53, localizado no braço curto do cromossomo 17, é o que apresenta a maior freqüência de mutações em todos os tipos de neoplasia maligna (FIELD, 1992; COTRAM et al, 1994; OLINER, 1994; FOURET et al, 1995; LEVINE, 1995; SALAM, CROCKER, MORRIS, 1995; PRUNERI et al, 1996; HART, 1997).

O produto desse gene, a proteína p53, atua como um fator transcricional, sendo capaz de ativar seqüências gênicas específicas, regulando-as positivamente. O aumento no conteúdo citoplasmático da proteína p53 induz a produção da proteína p21, que tem a capacidade de ligar-se a proteínas cinases específicas (cdk2 e cdk4), neutralizando a ação do complexo ciclinas/cinases, que é responsável pela iniciação do ciclo de proliferação celular. Esse mecanismo é ativado sempre que ocorre dano ao genoma celular, permitindo a reparação da lesão molecular e prevenindo sua transmissão às células-filhas. Além de inibir o ciclo celular, a proteína p53 é capaz de induzir apoptose (morte celular programada) nas células em que não houve reparo do material genético danificado (COTRAM et al, 1994; LEVINE, 1995).

A expressão da forma mutante do p53 tem sido detectada em cerca de 60% dos carcinomas laríngeos, assim como na grande maioria das lesões displásicas de alto grau e carcinomas-in-situ dessa região, sugerindo que a perda desse gene tem consequência importante nos eventos iniciais da carcinogênese laríngea (DOLCETTI et al, 1992; BRACHMAN et al, 1992; ANWAR et al, 1993; FOURET et al, 1995; SALAM et al, 1995; MELHEN et al, 1995; RAYBAUD- DIOGÈNE et al, 1996; PAVELIC & GLUKMAN, 1997).

3.2. O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)

3.2.1. Aspectos gerais e classificação

Os vírus do papiloma são micro-organismos capazes de infectar a pele e mucosas, causando proliferação epitelial nesses sítios. Fazem parte da família Papovaviridae, que também inclui o SV40 (Simian Virus 40) e o Polyomavirus (HERRINGTON, 1994; WRIGHT et al, 1994; PARK et al, 1995; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995; GUPTA, 1997; MEISELS & MORIN, 1997a).

Os Papilomavirus estão distribuídos extensamente na natureza, com vários tipos e sub-tipos infectando espécies distintas. São classificados a partir da estrutura genômica, não havendo a sorotipagem porque as proteínas do capsídeo viral são antigênicamente indistintas. Para ser classificado como um novo genotipo, o vírus deverá apresentar uma homologia do seu DNA menor do que 50% em relação ao genoma dos outros tipos já descritos. Embora apresentem uma estrutura genômica similar, esses vírus são específicos para uma determinada espécie, não havendo infecção de diferentes espécies por um mesmo tipo de vírus (HERRINGTON, 1994; WRIGHT et al, 1994; PARK et al, 1995; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995; GUPTA, 1997; MEISELS & MORIN, 1997a).

Existem mais de setenta tipos de vírus do papiloma capazes de infectar a espécie humana, sendo denominados vírus do papiloma humano (HPV) e numerados pela ordem de descoberta, apresentando semelhanças estruturais e certa especificidade em relação aos sítios de infecção, assim como ao tipo de lesão produzida (HERRINGTON, 1994; WRIGHT et al, 1994; PARK et al, 1995; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995; GUPTA, 1997; MEISELS & MORIN, 1997a).

O HPV é capaz de causar lesões proliferativas nos epitélios escamosos da pele, conjuntiva, cavidade oral, laringe, árvore traqueobrônquica, esôfago, bexiga urinária e região ano-genital (SYRJÄNEN, 1992; WRIGHT et al, 1994). Na região ano-genital a infecção pelo

HPV está associada ao aparecimento de lesões condilomatosas (condiloma plano/acuminado), displasias de baixo e/ou alto grau e carcinoma epidermóide invasor (HERRINGTON, 1994; WRIGHT et al, 1994; PARK et al, 1995; GUPTA, 1997; MEISELS & MORIN, 1997a).

De acordo com o tipo de lesão associada são classificados como de baixo risco para transformação maligna (6 e 11); risco intermediário (31 e 33) e alto risco (16 e 18). Esses últimos, em geral, são identificados na maioria dos carcinomas e displasias de alto grau do colo uterino (SYRJÄNEN, 1992; HERRINGTON, 1994; WRIGHT et al, 1994; PARK et al, 1995; MEISELS & MORIN, 1997a).

O sítio inicial da infecção parece ser a célula basal primitiva do epitélio escamoso imaturo, onde pode assumir um padrão latente ou produtivo (WRIGHT et al, 1994). Na infecção latente o DNA viral permanece no núcleo da célula hospedeira constituindo uma forma livre não-integrada, denominada epissoma. A replicação do DNA episomal ocorre consoante com a replicação do DNA da célula hospedeira, não existindo produção de partículas virais completas.

Quando existe uma replicação do DNA viral independente da divisão do genoma do hospedeiro, produzindo grande quantidade de partículas virais, a infecção tem caráter produtivo. Nessa fase há a maturação das partículas virais nas camadas intermediárias e superficiais do epitélio, com síntese do DNA e produção de proteínas do capsídeo, resultando nos efeitos citopáticos característicos, que são vistos na cito-histologia: vacuolização citoplasmática (coilocitose), atipia nuclear e multinucleação (HERRINGTON, 1994; WRIGHT et al, 1994; PARK et al, 1995; MEISELS & MORIN, 1997a).

3.2.2. Organização genômica do HPV

O HPV apresenta um genoma constituído por uma fita dupla de DNA circular, contendo 7.800 a 7.900 pares de bases, um vírion não-encapsulado e um capsídeo icosaédrico composto por 72 capsômeros que medem 45-55 nanômetros de diâmetro (HERRINGTON, 1994;

WRIGHT et al, 1994; PARK et al, 1995; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995; MEISELS & MORINA, 1997a).

De acordo com WRIGHT (1994), PARK et al (1995) e TOMMASINO & CRAWFORD (1995), o genoma viral do HPV pode ser dividido em três regiões principais: a região URR (“Upstream Regulatory Region”), a região precoce e a região tardia.

a) Região “URR”:

Está constituída por 400 pares de bases situados próximos ao segmento de origem da replicação viral. Essa região não codifica proteínas, mas contém sítios de ligação para fatores ativadores e repressores da transcrição , tais como: proteína ativadora 1(AP1), fator transcricional-1 específico do queratinócito (KRF-1), fator nuclear e fatores transcricionais codificados pela região precoce do vírus. A região “URR” controla a produção de proteínas virais e partículas infecciosas.

b) Região Precoce:

Possue seis “Open Reading Frames”(ORF), denominados E1, E2, E4, E5, E6 e E7. “Open Reading Frames” são segmentos funcionais do DNA, capazes de codificar proteínas.

- Região E1: codifica duas proteínas necessárias para a replicação extra-cromossômica do DNA e finalização do ciclo viral.
- Região E2: codifica proteínas que regulam a expressão dos genes da região precoce.
- Região E4: responsável por uma série de proteínas importantes na maturação e replicação do vírus. No queratinócito humano, as proteínas codificadas pelo gene E4 alteram a matriz de citoqueratina, facilitando a liberação das partículas virais.
- Região E5: a proteína codificada pelo gene E5 tem ação na membrana celular, onde liga-se aos receptores do EGF e PDGF, podendo estimular a proliferação celular.
- Regiões E6 e E7: codificam as principais proteínas responsáveis pela ação oncogênica do HPV nas células infectadas, sendo também importantes na replicação viral.

c) Região Tardia:

Essa região é responsável pela codificação das proteínas estruturais do capsídeo viral, contendo dois segmentos distintos denominados L1 e L2. A região L1 codifica a proteína mais importante do capsídeo viral, sendo essa sequência gênica altamente conservada entre as várias espécies de Papilomavirus.

3.2.3. Patogênese do HPV

A ação oncogênica do HPV tem sido comprovada através de estudos “in vitro” usando cultura de células. Esses experimentos revelaram que a capacidade de imortalização e transformação maligna das células epiteliais pelo HPV dos tipos 16 e 18 estava relacionada a uma maior expressão dos genes E6 e E7 (ZUR HAUSEN, 1989; YEUDALL, 1992; WRIGHT et al, 1994; HERRINGTON, 1995; PARK et al, 1995; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995).

O controle da expressão das oncoproteínas E6/E7 está a cargo de proteínas codificadas pela "ORF" E2. A integração do genoma viral ao DNA hospedeiro ocorre nessa região, com quebra dessas sequências gênicas, resultando na transcrição aumentada dos genes E6/E7 (YEUDALL, 1992; WRIGHT et al, 1994; HERRINGTON, 1995; PARK et al, 1995; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995).

A região precoce E6 do HPV codifica uma proteína ligante do zinco de aproximadamente 150 aminoácidos, capaz de degradar a proteína p53 celular através de uma via proteolítica dependente da ubiquitina. Essa associação parece ser mediada por um fator celular, a proteína E6-AP, presente nos queratinócitos humanos (PARK et al, 1995; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995).

A degradação do p53 na célula infectada pelo HPV inativa um importante mecanismo de controle da proliferação celular, favorecendo sua divisão contínua e permitindo o aparecimento de mutações genéticas sucessivas que levariam à transformação neoplásica maligna

(OLIVER, 1994; WRIGHT et al, 1994; HERRINGTON, 1995; PARK et al, 1995 TOMMASINO & CRAWFORD, 1995).

TOMMASINO & CRAWFORD (1995), sugerem que essa ação da proteína E6, identificada “in vitro”, deve funcionar também “in vivo”, já que linhagens celulares derivadas de carcinomas cervicais (SiHa, CaSki, HeLa) apresentam níveis baixos de p53.

A região precoce E7 do HPV codifica uma fosfoproteína ligante do zinco, com cerca de 98 aminoácidos, que tem a capacidade de ligar-se ao produto do gene do Retinoblastoma (Rb) e proteínas relatas (YEUDALL, 1992; WRIGHT et al, 1994; HERRINGTON, 1995; PARK et al, 1995; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995).

O gene Rb, ao lado do p53, é um dos mais importantes genes supressores de tumor, sendo o primeiro deles a ser descrito (LEVINE, 1995). Na célula normal o produto do gene Rb interage com os fatores transcricionais E2F e DP1, responsáveis pela ativação do ciclo celular através da transcrição de várias proteínas envolvidas na replicação do DNA. A ligação da proteína Rb a esses fatores, tornando-os inativos, é regulada através da ação do complexo de proteínas ciclinas/cinases (CiclinaE/CDK2 e Ciclina D/CDK4). Quando o complexo ciclina/cdk é ativado, há fosforilação da proteína Rb, com liberação dos fatores transcricionais E2F e DP1, permitindo a entrada da célula na fase S do ciclo (HERRINGTON, 1995; PARK et al , 1995; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995).

A proteína E7 do HPV, ao inativar a proteína Rb, desregula esse mecanismo inibitório da divisão celular, favorecendo a imortalização da célula infectada (HERRINGTON, 1995; PARK et al , 1995; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995).

As proteínas E6 e E7 do HPV, em resumo, são capazes de induzir a proliferação descontrolada das células epiteliais através da inativação das proteínas p53 e pRb, que atuam no controle negativo da divisão celular (WRIGHT et al, 1994; HERRINGTON, 1995; LEVINE, 1995; PARK et al, 1995; TOMMASINO & CRAWFORD, 1995).

Segundo PARK et al (1995), esse modelo patogênético proposto para o HPV é incompleto e simplificado porque, embora a maioria dos carcinomas cervicais apresentem DNA viral detectável, uma parte deles contém apenas DNA extra-cromossômico (epissomal). Desta

forma, mecanismos alternativos, tais como, a amplificação gênica ou mutações na região "URR", poderiam ser os responsáveis pela expressão aumentada das oncoproteínas E6/E7 (HERRINGTON, 1996; CHEN, STORTHZ, SHILLITOE, 1997).

3.2.4. Alterações Morfológicas

A principal alteração morfológica identificada em lesões proliferativas epiteliais relacionadas com a infecção pelo HPV consiste na atipia coloitótica, que é caracterizada por vacuolização citoplasmática ao redor do núcleo, com hipercromatismo, irregularidade e aumento de volume nuclear. A membrana nuclear parece estar dobrada e amassada, conferindo ao núcleo aspecto comumente descrito como semelhante a uva passa (MEISELS & FORTIN, 1976; WRIGHT et al, 1994 ; GUPTA, 1997)

Outras alterações cito-histopatológicas associadas ao efeito citopático do HPV são: bi- ou multinucleação, disqueratose, parakeratose e hiperkeratose (WRIGHT et al, 1994; GUPTA, 1997).

O exame ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão, da célula epitelial infectada, demonstra partículas virais icosaédricas, não-encapsuladas, medindo 40-50nm, dispersas no núcleo difusamente ou agregadas em um padrão cristalino. A cromatina nuclear está condensada na periferia e o citoplasma mostra degeneração vacuolar, com acúmulo de tonofilamentos na membrana celular. Os vírions podem ser identificados nas lesões produtivas, sendo vistos mais facilmente nas verrugas cutâneas (FU & REAGAN, 1989; WRIGHT et al, 1994; GUPTA, 1997).

3.2.5. Técnicas especiais para a detecção do HPV

3.2.5.1. Imunohistoquímica

Essa técnica permite detectar a expressão de antígenos, geralmente proteínas, em material cito-histológico, através de uma reação imunológica envolvendo a formação de complexos antígeno-anticorpo (FENOGLIO-PREISER, LISTROM, BLUME, 1992; AZUMI & CZERNOBILSKY, 1994).

O complexo antígeno-anticorpo primário liga-se a um anticorpo secundário, o qual por sua vez, está associado a um sistema enzimático cromógeno que permite a visualização da reação positiva nas células ou tecido. O sistema de detecção mais utilizado é o método ABC (Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase), que usa anticorpos secundários biotinilados, a peroxidase como enzima e a Diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. Nas reações positivas a enzima peroxidase oxida o reagente cromógeno, tornando-o visível. No caso da DAB, a reação será visualizada por uma coloração acastanhada na célula alvo (FENOGLIO-PREISER et al, 1992; AZUMI & CZERNOBILSKY, 1994).

As proteínas do capsídeo do HPV, que são sintetizadas a partir do gene tardio L1, podem ser detectadas pela imunoperoxidase. Como as sequências gênicas dessa região são altamente conservadas entre as várias espécies de Papilomavirus, essa técnica não permite discriminar qual o tipo de vírus presente (BERGERON & FERENCZY, 1997).

A sensibilidade da técnica, quando comparada aos métodos de hibridização do DNA e amplificação gênica (PCR) parece ser menor, detectando o vírus principalmente nos núcleos dos ceratinócitos superficiais, que apresentam atipia coloitótica (BERGERON & FERENCZY, 1997).

AZUMI & CZERNOBILSKY (1994), comentam que apenas 30 a 40% das lesões epiteliais da região ano-genital, que apresentam achados morfológicos consistentes com infecção pelo HPV, serão positivas ao exame imunohistoquímico. A frequência da positividade, segundo

esses autores, diminui à medida que a alteração displásica e o grau da neoplasia intra-epitelial aumentam.

3.2.5.2. Técnicas de Hibridização Molecular

As técnicas de hibridização permitem o isolamento e detecção de segmentos específicos de DNA ou RNA por sondas complementares ao genoma alvo, que podem ser DNA endógeno, RNA mensageiro ou seqüências gênicas virais e bacterianas. A classificação do HPV em vários sub-tipos, só foi possível graças ao aparecimento dessa tecnologia (FENOGLIO-PREISER & WILLMAN, 1987; STOLER, 1993; NUOVO, 1994; WRIGHT et al, 1994; McNICOL & FARQUHARSON, 1997; BERGERON & FERENCZY, 1997).

Os métodos de hibridização podem detectar o material genético diretamente no tecido (hibridização "in situ") ou em filtro, nesse último após a extração do DNA da célula (métodos do "Southern-blot", "Northern-blot" e "Dot- blot"). Todas essas técnicas estão fundamentadas nas propriedades bioquímicas dos ácidos nucleicos, que são capazes de ligar-se a seqüências específicas de DNA ou RNA (sondas), após desnaturação e abertura de suas fitas, formando moléculas híbridas unidas entre si por pontes de hidrogênio, fenômeno conhecido como renaturação ou hibridização (FENOGLIO-PREISER & WILLMAN, 1987; NUOVO, 1994; BERGERON & FERENCZY, 1997; MEISELS & MORIN, 1997b).

A técnica da hibridização "in situ", descrita em 1969 por GALL & PARDUE, é a única que preserva a arquitetura do tecido, permitindo localizar o sinal positivo em determinada célula ou lesão histológica. Essa técnica confirmou a presença do HPV no núcleo das células infectadas (STOLER, 1993; WRIGHT et al, 1994; BERGERON & FERENCZY, 1997; McNICOL & FARQUHARSON, 1997; MEISELS & MORIN, 1997b).

As sondas (provas), que são segmentos de DNA ou RNA, podem ser produzidas através de clonagem gênica usando-se vetores bacterianos (plasmídios, bacteriófagos, etc.) ou sintetizadas quimicamente "in vitro" (provas oligonucleotídicas), sendo marcadas com

radioisótopos ou substâncias não radioativas, em geral a biotina. As sondas radiomarcadas, embora altamente específicas e sensíveis, apresentam várias desvantagens: custo financeiro alto, meia-vida curta dos radioisótopos, perigo de contaminação do pessoal do laboratório e tempo de exposição muito longo para a detecção do híbrido (FENOGLIO-PREISER & WILLMAN, 1987; MORRIS et al, 1990; NUOVO, 1994; BERGERON & FERENCZY, 1997, McNICOL & FARQUHARSON, 1997; MEISELS & MORIN, 1997b).

A maioria dos kits de hibridização "in situ" disponíveis comercialmente utilizam sondas não- isotópicas, marcadas com biotina. A hibridização com sondas biotiniladas é completada por uma reação imunocitoquímica, sendo visualizada como um precipitado colorido na célula (FENOGLIO-PREISER & WILLMAN, 1987; NUOVO, 1994; BERGERON & FERENCZY, 1997; MEISELS & MORIN, 1997b).

A detecção de DNA do HPV em cortes histológicos de tecido fixado em parafina, por sondas biotiniladas, depende da quantidade de cópias virais presentes, sendo necessário, em média, 20 cópias do vírus por célula para haver positividade da reação. Não obstante, esse valor mínimo pode variar de menos de 10 a 800 cópias, como mostram os resultados observados em diferentes estudos (BURNS et al, 1987; ARENDS, 1991; NUOVO, 1994). O uso da digoxigenina como marcador, associado a certas modificações técnicas, permitiria a detecção de até 1-2 cópias virais por célula (MORRIS et al, 1990; ARENDS, 1991).

A fixação prolongada e o uso de outros fixadores, além da formalina tamponada, comprometem a sensibilidade da técnica. A fixação do tecido em tempo hábil também é importante, pois os ácidos nucleicos são moléculas lábeis, facilmente degradadas por autólise (STOLER, 1994; NUOVO, 1994; McNICOL & FARQUHARSON, 1997).

Recentemente, tem sido descrito alguns procedimentos que aumentariam a sensibilidade das técnicas de hibridização "in situ" com sondas biotiniladas, entre os quais: o processamento do tecido em micro-ondas e o uso de tiramina biotinilada para amplificar o sinal positivo (PODDIGHE et al, 1996 ; McNICOL & FARQUHARSON, 1997).

Nas técnicas de hibridização em filtro, o DNA é extraído da célula e transferido para um filtro ou membrana de celulose, onde será hibridizado com a sonda marcada. Como há

destruição do tecido pesquisado, perde-se a correlação com a histologia (FENOGLIO-PREISER & WILLMAN, 1987; NUOVO, 1994; BERGERON & FERENCZY, 1997).

O método de hibridização pelo Southern blot submete o DNA extraído a digestão com enzimas de restrição, clivando-o em pontos específicos, com a produção de fragmentos de diferentes tamanhos, os quais serão separados por eletroforese em gel. Em seguida esses fragmentos são transferidos a uma membrana de nitrocelulose, hibridizados com sondas radioativas e identificados por auto-radiografia. Esse método é altamente específico e sensível, detectando 1 cópia viral por 100 células examinadas ou 0.1 cópia de DNA viral por 10µg de DNA total. Entretanto, requer o uso de material não fixado, além de ser dispendiosa e complicada, estando restrita a laboratórios especializados em técnicas de biologia molecular (FENOGLIO-PREISER & WILLMAN, 1987; NUOVO, 1994; WRIGHT et al, 1994; BERGERON & FERENCZY, 1997; MEISELS & MORIN, 1997b).

A técnica de hibridização pelo Dot blot é mais simples e rápida que a anterior, porém é menos sensível (1 cópia DNA viral/ 200 células) e menos específica, podendo ocorrer reações positivas falsas devido a hibridização cruzada entre a sonda e o DNA celular (FENOGLIO-PREISER & WILLMAN, 1987; NUOVO, 1994; BERGERON & FERENCZY, 1997; MEISELS & MORIN, 1997b).

3.2.5.3. Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR), permite a amplificação enzimática de uma única molécula de DNA, gerando até 100 milhões de cópias da mesma sequência. É uma técnica relativamente simples e extremamente valiosa na detecção de DNA viral (KYIABU et al, 1989; MULLIS, 1990; WRIGHT & WYNFORD-THOMAS, 1990; ARENDS, 1991; GREER et al, 1991, KIENE et al, 1992; NUOVO, 1994; PAN, DISS, ISAACSON, 1995; BERGERON & FERENCZY, 1997; MEISELS & MORIN, 1997b).

O método baseia-se no uso de oligonucleotídeos específicos ("primers"), que irão ligar-se a determinado segmento do DNA alvo ("template"), o qual será copiado por uma DNA polimerase (Taq polimerase). Esse processo é repetido diversas vezes, com amplificação dessa sequência gênica em milhares de cópias após 25 a 40 ciclos da reação. O DNA amplificado é revelado por eletroforese da amostra em gel de agarose com brometo de "ethidium" ou através das técnicas de hibridização em filtro (MULLIS, 1990; WRIGHT & WYNFORD-THOMAS, 1990; NUOVO, 1994; PAN et al, 1995; BERGERON & FERENCZY, 1997; MEISELS & MORIN, 1997b).

A técnica do PCR pode ser utilizada em esfregaços citológicos, células obtidas por micro-dissecção e tecido a fresco ou fixado e incluído em parafina, possibilitando a avaliação retrospectiva do material arquivado. Nos preparados histológicos os resultados serão melhores quando fixados em formalina neutra tamponada a 10% (GREER et al, 1991; PAN et al, 1995; BERGERON & FERENCZY, 1997, MEISELS & MORIN, 1997B).

Os oligonucleotídeos ("primers") disponíveis identificam sequências gênicas comuns a todos os tipos de HPV, tal como o gene L1 ("primers" de consenso) ou sequências específicas para um determinado tipo de HPV. Em geral, a caracterização do tipo de HPV é confirmada por técnicas de hibridização em filtro (BERGERON & FERENCZY, 1997; MEISELS & MORIN, 1997b).

Não é possível uma avaliação topográfica dos casos positivos obtidos com o PCR, pois há destruição do tecido examinado. Outra desvantagem reside na extrema sensibilidade da técnica, que pode detectar até 1 cópia viral/ 10.000 células, com grande possibilidade de ocorrer resultados positivos falsos devido à contaminação da amostra, uma vez que o HPV está amplamente distribuído na natureza (WRIGHT & WYNFORD-THOMAS, 1990; ARENDS, 1991; NUOVO, 1994; BERGERON & FERENCZY, 1997; MEISELS & MORIN, 1997b).

O desenvolvimento do PCR "in situ", que amplifica o DNA diretamente no tecido, pretende conciliar a vantagem da hibridização "in situ", onde há localização topográfica dos casos positivos, com a alta sensibilidade do PCR. Entretanto, essa técnica mostra-se menos sensível que o PCR convencional, além de apresentar problemas metodológicos que dificultam a sua aplicação

clínica (ARENDS, 1991; NUOVO, 1994; BERGERON & FERENCZY, 1997; MEISELS & MORIN, 1997b).

3.2.5.4. Sistema de captura de híbridos

O sistema de captura de híbridos, desenvolvido pela *Digene Diagnostics Inc*, representa uma nova geração de ensaios de hibridização molecular, especialmente projetados para laboratórios de patologia clínica (BERGERON & FERENCZY, 1997; MEISELS & MORIN, 1997b).

É uma técnica simples, semelhante a um imunoensaio, podendo ser realizada automaticamente em poucas horas. O DNA alvo hibridiza "in vitro" com várias provas de RNA do HPV, formando híbridos RNA-DNA. Esses são capturados na superfície de um tubo revestido com anticorpos, que os reconhece especificamente, reagindo com outro anticorpo conjugado a uma fosfatase alcalina e detectado por um substrato quimioluminescente. A intensidade da luz emitida pela clivagem desse substrato é medida, sendo proporcional à quantidade de DNA presente (BERGERON & FERENCZY, 1997; MEISELS & MORIN, 1997b).

Esse teste apresenta sensibilidade semelhante ao PCR, sem o inconveniente de contaminação, pois não há amplificação do material genético. É possível distinguir se o DNA identificado pertence a HPV de baixo ou alto risco, havendo 90% de concordância entre esse método e a hibridização pelo Southern blot (FARTHING et al, 1994; HERRINGTON, 1994; BERGERON & FERENCZY, 1997; MEISELS & MORIN, 1997b).

3.3. PAPEL DO HPV NAS LESÕES EPITELIAIS DA LARINGE

3.3.1. Papilomatose Laríngea

Os papilomas escamosos são os tumores benignos mais freqüentes da laringe, podendo ocorrer em crianças ou adultos. Diversos estudos usando técnicas de hibridização e amplificação do DNA, confirmaram o HPV dos tipos 6 e 11 como agentes etiológicos dessas lesões (MICHAELS, 1987b; LEVI et al, 1989; BRANDSMA et al, 1990; GALE et al, 1994; KIRCHNER & CARTER, 1994; SHEN et al, 1996; KLOZAR et al, 1997).

A forma juvenil caracteriza-se por lesões múltiplas, com alto índice de recorrência após tratamento. Devido ao pequeno tamanho das vias aéreas na criança, há maior possibilidade de ocorrer obstrução e insuficiência respiratória grave nessa faixa etária. Muitas vezes os tumores comprometem também a traquéia, brônquios e pulmões (MICHAELS, 1987b; GALE et al, 1994; KIRCHNER & CARTER, 1994; RIMELL et al, 1997).

O papiloma no adulto geralmente apresenta-se como uma lesão solitária, embora formas múltiplas e recorrentes sejam descritas (MICHAELS, 1987b; KIRCHNER & CARTER, 1994).

A transformação maligna é uma complicação tardia rara dos casos tratados com irradiação, porém também é descrita em papilomas não submetidos à radioterapia, principalmente naqueles de longa duração. A interação entre o vírus e substâncias carcinógenas, tais como o fumo e o álcool, poderia desempenhar algum papel nesses casos (ZAROD, RUTHERFORD, CORBITT, 1988, KASHIMA et al, 1988; LEVI et al, 1989; LINDEBERG et al, 1989; DOYLE et al, 1994; LIN et al, 1997).

A presença de HPV de alto risco é relatada em papilomas com transformação maligna. LIN et al (1997), demonstram a co-infecção por HPV dos tipos 11 e 16 em um papiloma com displasia grave associada. DOYLE et al (1994), descrevem um caso de papilomatose juvenil

recorrente positivo para HPV dos tipos 6 e 11, em que há detecção do tipo 16, com a progressão da lesão para carcinoma.

3.3.2. Verruga Vulgar da Laringe

FECHNER & MILLS (1982) e BARNES et al (1991), descrevem uma lesão histologicamente idêntica à verruga vulgar cutânea comprometendo a região glótica. Apesar da semelhança morfológica, nos casos estudados com hibridização do DNA, os tipos de HPV encontrados, 6 e 11, diferem daqueles associados com as lesões cutâneas, usualmente os tipos 1, 2 e 4 (BARNES et al, 1991; SYRJÄNEN, 1992).

3.3.3. Lesões Displásicas

A detecção de HPV em lesões displásicas da laringe de diferentes graus (displasia leve, moderada e grave/carcinoma "in situ") tem variado de 0 a 33% em vários trabalhos que utilizam as técnicas de imunoperoxidase, hibridização "in situ" e PCR (Tabela 1).

3.3.4. Carcinoma Epidermóide

Os índices de detecção de material genético do HPV em biópsias de carcinoma da laringe, por meio de várias técnicas distintas, variam de menos de 3% a mais de 60% dos casos examinados (Tabela 2).

BRANDSMA & ABRAMSON (1989), usando a técnica do Southern blot, estudaram carcinomas da região da cabeça e pescoço, com os seguintes índices de positividade

para o HPV dos tipos 11 e 16 : 29% na região tonsilar, 18% na língua, 13% na faringe e apenas 5% na laringe.

SNIDJERS et al (1996), estudando sessenta e três carcinomas da região da cabeça e pescoço, detectou HPV do tipo 16, através do PCR, em 28,6% das lesões da orofaringe, 26,7% da laringe, 20% da cavidade oral e 12,5% da hipofaringe.

SYRJÄNEN et al (1987), estudando 116 casos de carcinoma da laringe através da técnica de hibridização "in situ", encontrou 15 casos positivos para o HPV (12,9%), sendo a maioria constituída por HPV dos tipos 11 e 16, alguns com dupla positividade. Através da mesma técnica, GOURGOLIS et al (1994), detectou 18% de positividade em 40 biópsias, todos do tipo 16, enquanto CEROVAC et al (1996) encontrou 42% de positividade estudando 26 casos, sendo os tipos 6 e 16, os mais frequentes.

Através da técnica do PCR, PÉREZ-AYALA (1990), detectou 54% de positividade para o HPV em 48 biópsias de carcinoma epidermóide e 100% de positividade em três casos de carcinoma verrucoso, todos do tipo 16. MORGAN, ABDULLAH, MYNT (1991) encontrou HPV dos tipos 6, 11, 16 e 33 em 44% dos carcinomas estudados e em 60% das biópsias de tecido normal adjacente à lesão. ALMADORI et al (1996), também demonstra a presença de HPV dos tipos 16 e 6 em 14% das biópsias de mucosa normal adjacente ao epitélio carcinomatoso, com 20% de positividade nesse último.

Os mecanismos de infecção do HPV na região da cabeça e pescoço são controversos, sendo descrito na literatura as seguintes possibilidades: transmissão perinatal, transmissão por contato sexual oral-genital ou auto-infecção por contato oral-genital através das mãos (PAKARIAN et al, 1994; McCAIG, BARIC, OLSHAN, 1998).

TABELA 1**DETECÇÃO DE HPV EM LESÕES DISPLÁSICAS DA LARINGE**

AUTOR	TÉCNICA	TIPO DE HPV	POSITIVIDADE
KASHIMA et al (1986)	IPX		20/60 (33%)
ÉLÖ et al (1993)	HIS		0/14
GALLO et al (1994)	HIS		0/28
GOURGOLIS et al (1994)	HIS		0/28
FOURET et al (1995)	PCR	16	6/57(10,5%)
LINDEBERG & KROGDAHL (1997)	PCR	Indeterminado	1/30(3,5%)
POLJAK,GALE, GAMBIK (1997)	HIS e PCR		0/39

IPX= Imunoperoxidase, His=Hibridização "in situ", PCR=Reação em cadeia da polimerase

TABELA 2**DETECÇÃO DE HPV EM CARCINOMAS DA LARINGE**

AUTOR	TÉCNICA	TIPOS DE HPV	POSITIVIDADE
SYRJÄNEN et al (1982)	IPX		36%
SHEURLEN et al (1986)	SOUTHERN BLOT	16	2,7%
SYRJÄNEN et al (1987)	HIS	11, 16, 6	12,9%
BRANDSMA & ABRAMNISON (1989)	SOUTHERN BLOT	11, 16	10%
KIYABU et al (1989)	PCR	16	40%
HOSHIKAWA et al (1990)	PCR	16, 11	20,5% +
KULSKI et al (1990)	FISH	16	10%
PÉREZ-AYALA et al (1990)	PCR	16	54%
MORGAN et al (1991)	PCR	6/11, 16/33	44%
BRANDWEIN et al (1993)	PCR	16	8%
GOURGOLIS et al (1994)	PCR	16, 18	28%

IPX = Imunoperoxidase; HIS= Hibridização "in situ"; PCR = Reação em cadeia da polimerase;
 FISH = Hibridização "in situ" em filtro; + = Metástase ganglionar.

TABELA 2 (continuação)**DETECÇÃO DE HPV EM CARCINOMAS DA LARINGE**

AUTOR	TÉCNICA	TIPOS DE HPV	POSITIVIDADE
SHIDARA et al (1994)	PCR	16, 18	24%
SIMON et al (1994)	SOUTHERN BLOT	18, 33	Relato de caso *
CLAYMAN et al (1994)	PCR	Indeterminado	46%
SALAM, ROCKETT, MORRIS (1995)	PCR	6, 11, 16	22,2%
SNIDJERS et al (1996)	PCR	16	26,7%
ALMADORI et al (1996)	PCR	16, 6	20%
SHEN et al (1996)	PCR	6, 11, 18	9,4%
CEROVAC et al (1996)	HIS	6, 16, 16/18	42%
LIE et al (1996)	PCR	16, 6/11	9%
POLJAK et al (1997)	PCR	16	3,5%
VOWLES et al (1997)	PCR	16	66%

HIS= Hibridização "in situ"; PCR = Reação em cadeia da polimerase; * = Carcinoma em criança sem história de papiloma.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Foram selecionados de forma retrospectiva, a partir dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas (UNICAMP), 69 pacientes com lesões epiteliais escamosas pré-neoplásicas e neoplásicas da laringe, atendidos no período de 1992 a 1996. Os dados clínicos (idade, história de tabagismo ou etilismo) foram obtidos dos prontuários dos pacientes no arquivo médico do hospital. Foi possível localizar 62 prontuários, com informações satisfatórias em relação à idade e história pregressa de tabagismo ou etilismo.

A partir desses 69 pacientes foram identificadas 76 biópsias ou peças cirúrgicas, sendo possível a localização do bloco de parafina em 73 casos. Porém, durante a realização da parte experimental do trabalho, vários casos foram descartados da amostra, devido a problemas técnicos (material insuficiente ou inadequado para análise).

A amostra final está constituída por 57 pacientes e 65 biópsias ou peças cirúrgicas com material satisfatório para análise (09 pacientes contribuíram com 02 biópsias), sendo 45 casos de carcinoma epidermóide da região glótica e 20 lesões displásicas das cordas vocais. O grupo de lesões displásicas engloba 05 casos de displasia leve, 05 casos de displasia moderada e 10 casos de displasia grave/ carcinoma in situ".

4.2. MÉTODOS

Todo o material examinado foi fixado em formalina a 10%, tamponada ou não, e incluído em parafina. Os diagnósticos e a graduação histológica das neoplasias e lesões pré-

cancerosas foram revistos nas secções histológicas de 6µ, coradas pela hematoxilina-e-eosina, por dois observadores (HLB e AMA). Os casos de carcinoma invasor foram graduados de acordo com o esquema de Broders em bem, moderadamente e pouco diferenciado. As lesões displásicas foram classificadas em displasia leve, moderada, grave e carcinoma "in situ", seguindo a proposta da OMS, levando-se em consideração como parâmetro diagnóstico o maior grau de displasia presente.

A pesquisa do HPV foi realizada pela técnica da hibridização "in situ", em cortes de parafina (5-6µ) apostos em lâminas de vidro submetidas a tratamento prévio com organosilano a 2% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano – SIGMA código A3648-USA). Todas as lâminas com os cortes histológicos permaneceram por uma hora em estufa aquecida a 100°C.

Foram utilizadas as seguintes sondas biotiniladas com sequências de DNA complementares ao DNA viral: Wide Spectrum (DAKO, código Y1404), 6/11 (DAKO, código Y1411), 16/18 (DAKO, código Y1412) e 31/33 (DAKO, código Y1413). A sonda Wide Spectrum detecta DNA dos HPVs tipos 6, 11, 16, 30, 31, 33, 45, 51 e 52.

Em todas as reações constavam casos de controle positivo e negativo, selecionados a partir de biópsias de lesões displásicas da região ano-genital, previamente estudadas pela técnica da hibridização "in situ" e demonstrando positividade para o HPV dos tipos 6/11, 16/18 e 31/33. Os controles positivos receberam a sonda contendo o DNA viral e os controles negativos apenas solução tampão.

O protocolo usado nas reações de hibridização "in situ" consta das seguintes etapas:

Desparafinização: os preparados histológicos são desparafinizados através de sucessivos banhos em xilol e álcoois de diferentes concentrações (xilol, álcool a 99%, álcool a 95% e álcool a 70%).

Digestão Enzimática: o material é submetido à digestão enzimática em uma solução contendo 0,08g de pepsina diluída em 100ml de HCl a 0,2N, durante dez minutos, em estufa aquecida a 37°C. O tempo de digestão é reduzido para cinco minutos nos casos em que o material mostra-se

escasso. O processo de digestão enzimática tem como objetivo o desmascaramento do DNA alvo, permitindo o acesso da sonda nucleotídica ao mesmo.

Lavagem com agitação em água destilada por cinco minutos.

Aplicação da sonda: após secagem cuidadosa das lâminas, aplica-se aproximadamente 1 gota (15µl) da sonda biotinizada sobre o corte de tecido, sendo o mesmo coberto com lâmina.

Placa de aquecimento: as lâminas são depositadas em uma placa pré-aquecida a 90°C, onde permanecem por seis minutos, com o objetivo de promover a abertura das fitas de DNA, permitindo a formação do híbrido.

Estufa "overnight": após o aquecimento, as lâminas são transferidas a uma câmara úmida, sendo incubadas em estufa a 37°C, durante 18 a 30 horas.

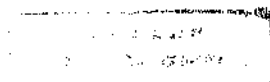
Lavagem em solução estrigente: completado o período de incubação as lâminas são retiradas da estufa e colocadas em solução estrigente (cinco minutos em agitação e dez minutos em banho maria a 42°C). A solução estrigente é preparada diluindo-se 2ml da solução estrigente concentrada (DAKO, código 53500) em 98ml de água destilada deionizada estéril (diluição de 1:50).

Lavagem em solução tampão: são realizadas três lavagens de cinco minutos cada, com agitação. A solução tampão usada é constituída por Tris-HCl a 0,05 M e NaCl a 9,3 M (diluição de 1:10), adicionando-se 1 ml de Tween 20 (Monolaeureato de Polioxietilenosorbitano, SIGMA – P 9416) a cada 1 litro da solução diluída em água destilada.

Aplicação do complexo Estreptavidina-Peroxidase: aplica-se a estreptavidina e a biotina conjugadas a peroxidase que fazem parte do sistema de amplificação de sinal da DAKO (Reagentes 5, 6 e 7 – DAKO CSA System, HRP).

Lavagem em solução tampão (Tris-HCl): são realizadas três lavagens de cinco minutos cada, com agitação.

Reagente de amplificação: após secagem das lâminas aplica-se sobre o corte algumas gotas do reagente de amplificação, que consiste em tiramina biotinizada e peróxido de hidrogênio



(Reagente 8 – DAKO CSA System, HRP), permanecendo o material em câmara úmida coberta por cinco minutos, à temperatura ambiente.

Lavagem em solução tampão (Tris-Hcl): são realizadas três lavagens de cinco minutos cada, com agitação.

Aplicação do complexo estreptavidina-peroxidase: após secagem das lâminas aplica-se a solução contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (reagente 9 – Dako CSA System, HRP), permanecendo em câmara úmida coberta por quinze minutos, à temperatura ambiente.

Lavagem em solução tampão (Tris-Hcl): são realizadas três lavagens de cinco minutos cada, com agitação.

Reagente cromógeno: as lâminas são imersas em uma solução contendo 60 mg de DAB (3' 3" – tetra- hidrocloreto-diaminobenzidina- SIGMA, código D5637), 100 ml de tampão PBS, 500µl de peróxido de hidrogênio a 30% e 1 ml de DMSO, sendo retiradas quando adquirem uma coloração acastanhada.

Contra-coloração: realizada em hematoxilina de Mayer por 60 segundos, seguindo-se lavagens em água corrente, água amoniacal e água destilada.

Desidratação: são realizados banhos sucessivos em álcoois e xilol.

Montagem das lâminas em resina Entellan (Merck, código 7961).

Leitura das lâminas: a reação foi classificada como positiva na presença de uma coloração acastanhada restrita ao núcleo da célula, com vários matizes de intensidade, sendo considerada a positividade dos controles como o sinal padrão. Além da intensidade da reação, observou-se a quantidade aproximada de núcleos positivos e a localização dos mesmos no tecido. Os casos com intensa reação de fundo, em que havia concomitante coloração do núcleo e citoplasma, foram considerados inconclusivos e submetidos a uma nova reação de hibridização.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

A maioria dos pacientes estudados pertence ao sexo masculino (86%) e apresentam história de tabagismo (87%) e etilismo (55,5%). A idade variou de 34 a 85 anos, com média de 56 anos. Nos casos positivos para o HPV, a idade variou de 52 a 85 anos, com média de 65,4. A maioria (85,7%) era do sexo masculino, sendo todos fumantes. Em 03 casos (42,9%) havia história de etilismo.

Os 45 casos de carcinoma epidermóide foram obtidos de biópsias laringoscópicas (24 casos) ou de espécimens de laringectomias (21 casos). Destes carcinomas, 22,2% foram classificados em bem diferenciados, 68,9% em moderadamente diferenciados e 8,9% em pouco diferenciados. Os 20 casos de lesões displásicas foram distribuídos em três grupos: displasia leve - 05 casos, displasia moderada - 06 casos e displasia grave/carcinoma "in situ" - 09 casos.

Sete casos (10,7 %), dos sessenta e cinco estudados, revelaram positividade para o DNA do HPV através da técnica de hibridização "in situ", sendo 01 de displasia moderada, 02 de carcinoma "in situ" e 04 de carcinoma invasor. As 05 biópsias com o diagnóstico de displasia leve foram negativas. Desta forma, 8,8% (4/45) dos carcinomas invasores foram positivos para o HPV, enquanto 15% (3/20) das lesões displásicas demonstraram tal positividade (Tabela 3).

Em 04 casos houve detecção de DNA viral dos tipos 6/11 e 16/18 e em 03 apenas a sonda WS foi positiva, não permitindo determinar o tipo de HPV presente. No grupo de lesões displásicas, houve positividade para os tipos 6/11 - 01 caso, WS e 16/18 - 01 caso e apenas WS - 01 caso. No grupo dos carcinomas invasivos encontramos positividade apenas para a sonda WS em 02 casos, sendo os demais positivos para as sondas WS, 6/11 e 16/18 em conjunto. Nenhum caso foi positivo para os tipos 31/33. Não foi possível avaliar as sondas 6/11 e 31/33 em 01 caso de displasia moderada e 02 casos de carcinoma invasor, devido a escassez ou inadequação do material (Tabelas 4, 5 e 6).

A intensidade das reações positivas variou de leve a moderada, com isolados a vários núcleos positivos, predominantemente localizados nas camadas superficiais e

intermediárias do epitélio. Áreas de epitélio normal e displásico (displasia leve a moderada) adjacentes ao carcinoma invasor também foram positivas em dois casos (Tabelas 7 e 9).

Alterações morfológicas semelhantes as descritas nas lesões associadas ao HPV na região ano-genital, tais como atipias coilocitóticas e binucleações, foram identificadas em 35,9% dos casos (24/65), predominando nos carcinomas invasivos (26,1%). A maioria da amostra estudada (64,1%) não apresentou sinais morfológicos sugestivos de infecção pelo HPV. As atipias coilocitóticas foram detectadas nas camadas superficiais do epitélio carcinomatoso, que em geral apresentava aspecto bem diferenciado, com padrão espiculado ou papilífero e no epitélio displásico adjacente ao tumor. Em 03 casos (12,5%) encontramos positividade para o HPV nas áreas com atipias coilocitóticas, porém na maioria das lesões (87,5%), não foi possível demonstrar a associação do DNA do HPV, através da hibridização "in situ", com tais alterações morfológicas. Ao analisar a relação entre a presença de atipia coilocitótica e positividade para o HPV, por meio do teste exato de Fisher, encontramos um $p > 0,05$, que não é significativo (Tabela 8).

Os casos positivos estão relacionados abaixo:

Caso 1 (B-73/94): Material constituído por biópsia laringoscópica, com o diagnóstico de carcinoma "in situ". Apenas a sonda 6/11 foi positiva, corando levemente poucos núcleos nas camadas superficiais e intermediárias do epitélio. Ausência de alterações morfológicas associadas ao HPV.

Caso 2 (B-5254/95): Material constituído por biópsia laringoscópica com o diagnóstico de carcinoma "in situ". Apenas a sonda WS foi positiva corando moderadamente raros núcleos nas camadas superficiais do epitélio. Ausência de alterações associadas ao HPV

Caso 3 (B-9969/96): Material constiuído por biópsia laringoscópica com o diagnóstico de displasia moderada apresentando positividade para as sondas WS e 16/18, com esparsos núcleos corados nas camadas superficiais da área carcinomatosa e epitélio normal adjacente. Presença de atipias coilocitóticas positivas (WS e 16/18), nessas mesmas áreas. Observamos também pequeno foco de displasia grave, o qual foi negativo para o HPV.

Caso 4 (B-67069): Material constituído por biópsia laringoscópica, com o diagnóstico de carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado. Apenas a sonda WS foi positiva no epitélio neoplásico, corando levemente esparsos núcleos. Presença de atipias coilocitóticas focais no epitélio displásico adjacente, que foram negativas para o HPV.

Caso 5 (B-71527): Material constituído por produto de laringectomia total, com o diagnóstico de carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado (Figura 1). Apenas a sonda WS foi positiva no epitélio neoplásico, corando moderadamente raros núcleos nas camadas superficiais, em áreas com atipias coilocitóticas (Figuras 2 e 3). Entretanto, essa área positiva não está presente nos cortes das outras sondas.

Caso 6 (B-7954/95): Material constituído por produto de laringectomia parcial, com o diagnóstico de carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado. As sondas WS, 6/11 e 16/18 foram positivas no epitélio neoplásico e no epitélio displásico adjacente à lesão. Raros a vários núcleos apresentaram coloração com leve a moderado grau de intensidade (Figuras 4 e 5). Não houve coincidência de áreas positivas. Ausência de alterações morfológicas associadas ao HPV.

Caso 7 (B-7878/93): Material constituído por produto de laringectomia total, com o diagnóstico de carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado. As sondas WS e 16/18 foram positivas no epitélio carcinomatoso e no epitélio displásico adjacente, com isolados núcleos leve a moderadamente corados. A sonda 6/11 apresentou positividade no epitélio normal e displásico adjacente ao carcinoma, com raros a vários núcleos leve a moderadamente corados, localizados predominantemente em suas camadas superficiais e intermediárias (Figuras 6 e 7). Essas mesmas áreas também apresentavam atipias coilocitóticas e binucleações. O epitélio carcinomatoso não foi positivo para a sonda 6/11.

Todos os controles positivos apresentaram núcleos fortemente corados (+++) nas camadas superficiais do epitélio, geralmente nas áreas de coilocitose (Figura 8). Entretanto, também era possível detectar núcleos com positividade leve a moderada, localizados nas camadas intermediárias do epitélio controle, de forma semelhante aos vistos nos casos positivos da amostra (Figura 9). Nenhum dos 07 casos positivos apresentou núcleos corados com a mesma intensidade dos núcleos superficiais do grupo controle. Nenhum caso dos controles negativos apresentou núcleos corados.

TABELA 3**Distribuição dos casos em relação a positividade para o HPV**

<i>LESÃO</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>HPV +</i>	<i>HPV –</i>
Lesões displásicas	20	30,8	03 (15%)	17 (85%)
- Displasia leve	05	7,6	0	05 (100%)
- Displasia moderada	06	9,2	01 (16,6%)	05 (83,4%)
- Displasia grave/ Ca "in situ"	09	13,8	02 (22,2%)	07 (77,8%)
Carcinoma invasor	45	69,2	04 (8,8%)	41 (91,2%)
Total	65	100	07 (10,7%)	58 (89,3%)

TABELA 4**Frequência de positividade das sondas**

Sonda	N	% do total	% dos casos +
WS	6	9,2 (6/65)	85,7 (6/7)
16/18	3	4,6 (3/65)	42,8 (3/7)
6/11	3	4,8 (3/62)*	42,8 (3/7)
31/33	0	0	0

* Material insuficiente para análise em 3 casos

TABELA 5**Distribuição das sondas em relação aos casos positivos**

Sonda	Número de casos	% do total	% dos casos +	Lesão
WS	3	4,6	42,8	Ca "in situ" (01) Carc. Inv. (02)
6/11	1	1,5	14,2	Ca "in situ"
WS +16/18	1	1,5	14,2	Displasia Moderada
WS + 6/11+ 16/18	2	3	28,5	Carcinoma inv.

Carcinoma inv. = Carcinoma invasor; Ca "in situ" = carcinoma "in situ"

TABELA 6**Distribuição das sondas em relação ao tipo de lesão**

SONDA	DISPLASIA LEVE	DISPLASIA MODERADA	DISPLASIA GRAVE/ CA "IN SITU"	CARCINOMA INVASOR
Wide Spectrum				
Positivo	0	1(16,6%)	1(11,1%)	4(8,6%)
Negativo	5(100%)	5(83,4%)	8(88,8%)	41(91,1%)
16/18				
Positivo	0	1(16,6%)	0	2(4,4%)
Negativo	5(100%)	5(83,4%)	9(100%)	43(95,6%)
6/11				
Positivo	0	0	1(11,1%)	2(4,4%)
Negativo	5(100%)	5(100%)	8(88,8%)	43(95,6%)
31/33				
Positivo	0	0	0	0
Negativo	5(100%)	5(100%)	10(100%)	45(100%)

TABELA 7

Distribuição dos casos positivos em relação a idade, sexo, tabagismo, etilismo, tipo de sonda e tipo de epitélio

Caso	Idade	Sexo	Tab.	Etil.	WS	16/18	6/11	31/33	N	D	C
1	66	M	+	-	-	-	+	-	-	+	-
2	85	M	+	-	+	-	-	-	-	+	-
3	59	M	+	+	+	+	-	-	+	+	-
4	70	M	+	+	+	-	-	-	-	-	+
5	62	M	+	+	+	-	-	-	-	-	+
6	52	M	+	-	+	+	+	-	-	+	+
7	50	F	+	-	+	+	+	-	+	+	+

M = Masculino; F= Feminino; Tab. = Tabagismo; Etil. = Etilismo; N = Epitélio Normal; D = Epitélio Displásico (Displasia leve a Ca "in situ"); C = Epitélio carcinomatoso

TABELA 8

Relação entre a presença de atipia coilocitótica e His positiva para o HPV

	Atipia coilocitótica +	Atipia coilocitótica -	Total
His +	3	3	6
His -	21	38	59
Total	24	41	65

Probabilidade de Fisher = 0, 9999; $p > 0,05$

Tabela 9

Distribuição das sondas em relação ao tipo de epitélio

Caso/Sonda/Ep.	Intensidade	Núcleos +	Localização	Coilocitose
1 (6/11) D	+	+	S/I	-
2 (WS) D	++	+	S	-
3 (WS) N	++	+	S	+
3 (WS) D	++	+	S	+
3 (16/18) N	+	+	S	+
3 (16/18) D	+	+	S	+
4 (WS) C	+	+	S	-
5 (WS) C	++	+	S	+
6 (WS) D	+	++	S/I	-
6 (WS) C	+	++	S	-
6 (16/18) D	+	+	S/I	-
6 (16/18) C	+	+	S/I	-
6 (6/11) D	++	++	S	-
6 (6/11) C	++	++	S	-
7 (WS) D	+	+	S	-
7 (WS) C	++	+	S	-
7 (16/18) D	+	+	S	-
7 (16/18) C	++	+	S	-
7 (6/11) N	++	++	S/I	+
7 (6/11) D	++	++	S/I	+

Ep. = epitélio; N = epitélio normal; D = epitélio displásico; C = epitélio carcinomatoso; S = camada superficial; I = camada intermediária. Intensidade: + = leve, ++ = moderada. Núcleos: + = raros, ++ = vários.

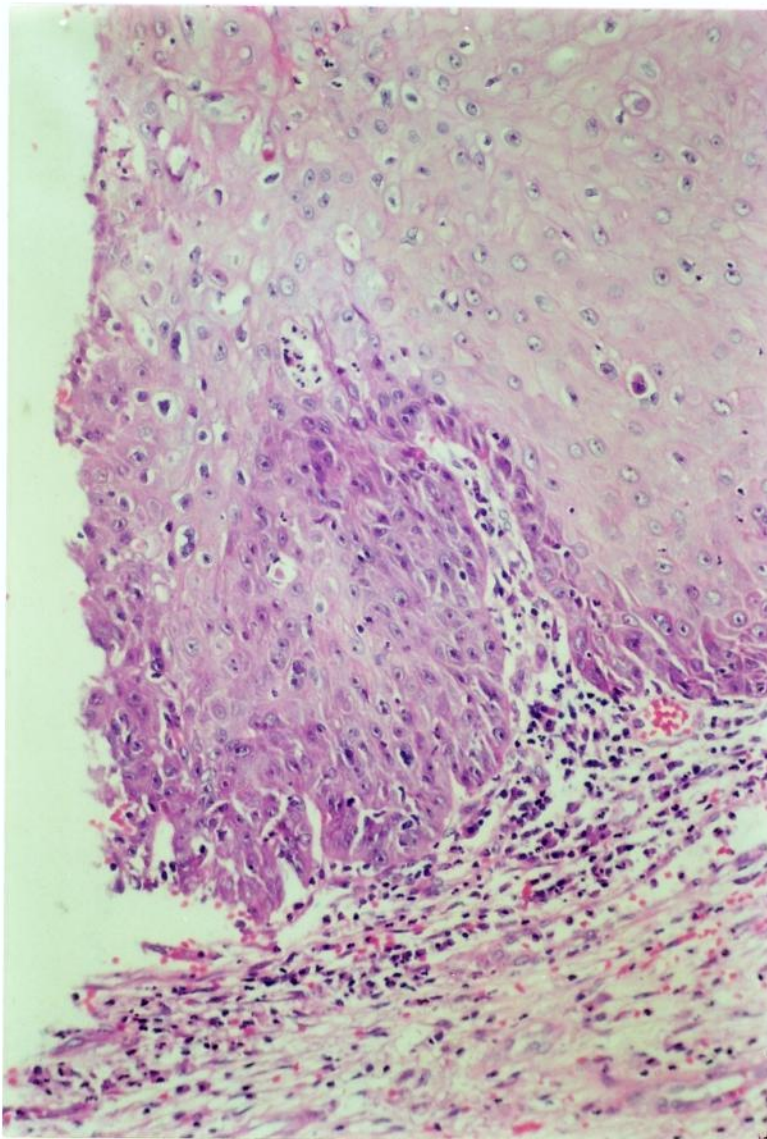


FIGURA 1- Carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado da laringe (B-71527-Caso 5). Presença de alterações morfológicas sugestivas de infecção pelo HPV (atipias coilocitóticas e binucleações) nas camadas superficiais e intermediárias (HE-165X).



FIGURA 2- Caso anterior apresentando positividade para o HPV pela hibridização "in situ" (sonda WS) em raros núcleos localizados nas camadas superficiais do epitélio (HIS, 330X).

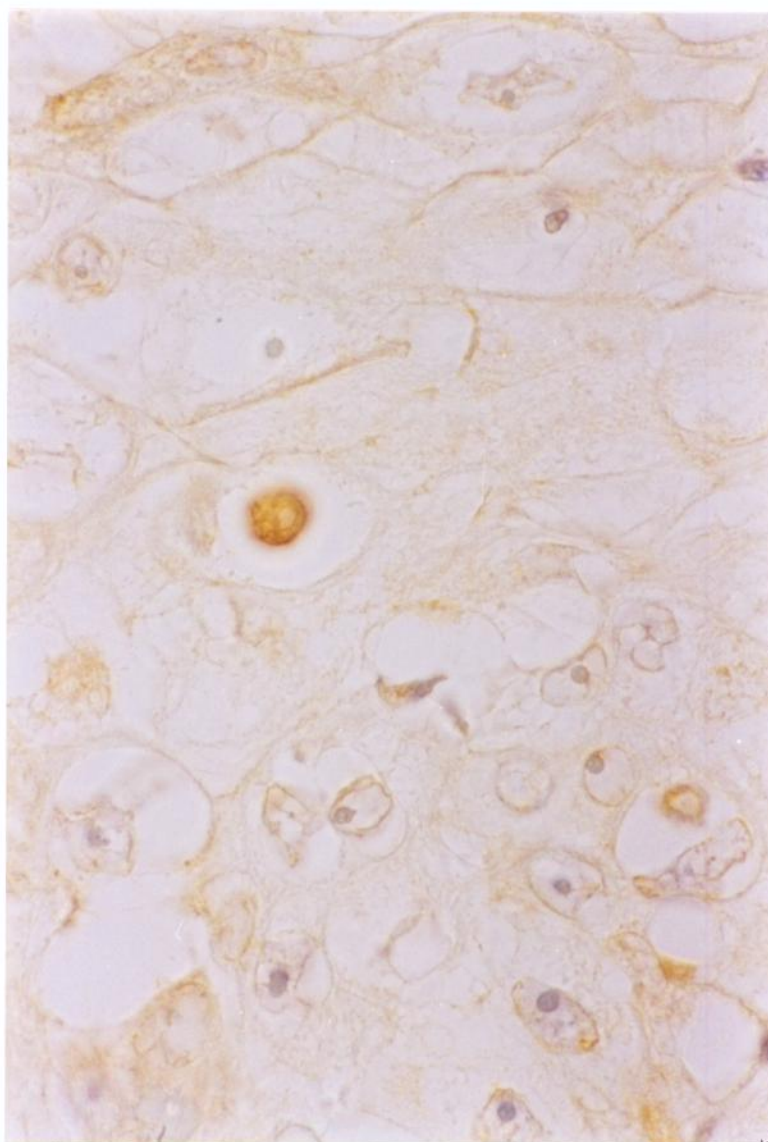


FIGURA 3 – Detalhe da figura anterior mostrando o sinal positivo restrito ao núcleo (comparar com os núcleos adjacentes negativos) (HIS, 825X).

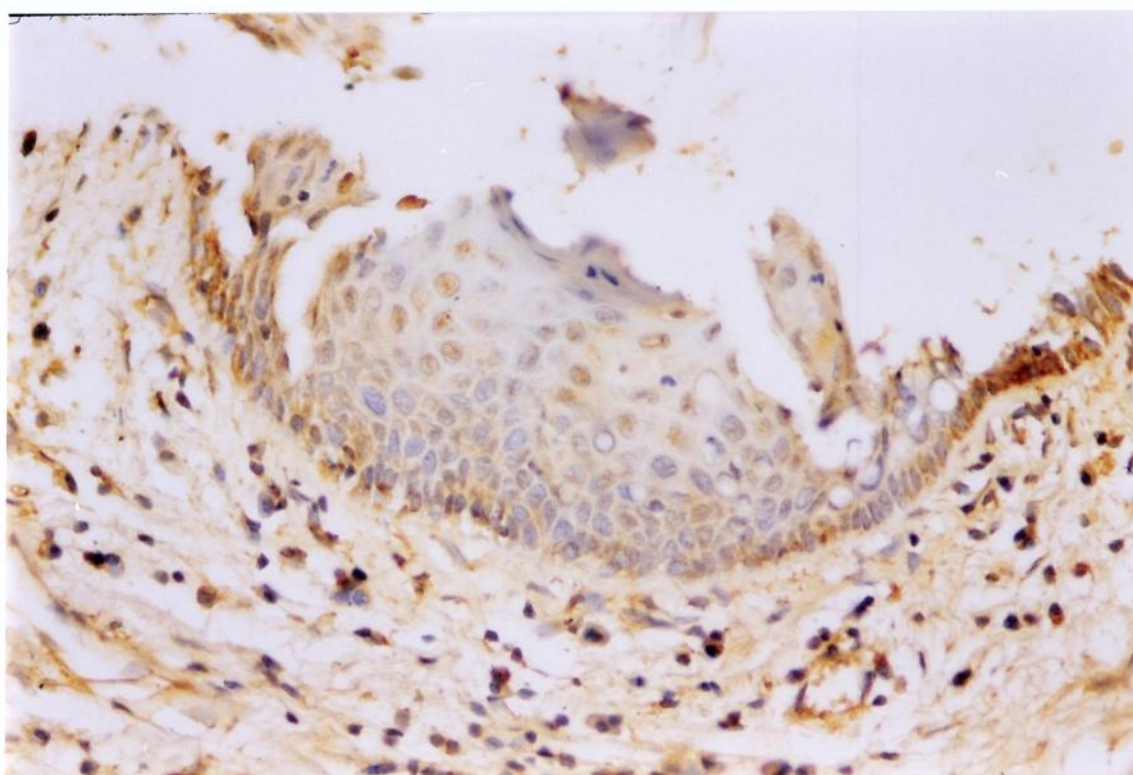


FIGURA 4 – Epitélio displásico adjacente à área de carcinoma invasivo da laringe (B-7954/95-Caso 6) exibindo núcleos positivos para o HPV dos tipos 16/18 através da hibridização "in situ" (HIS, 330X).

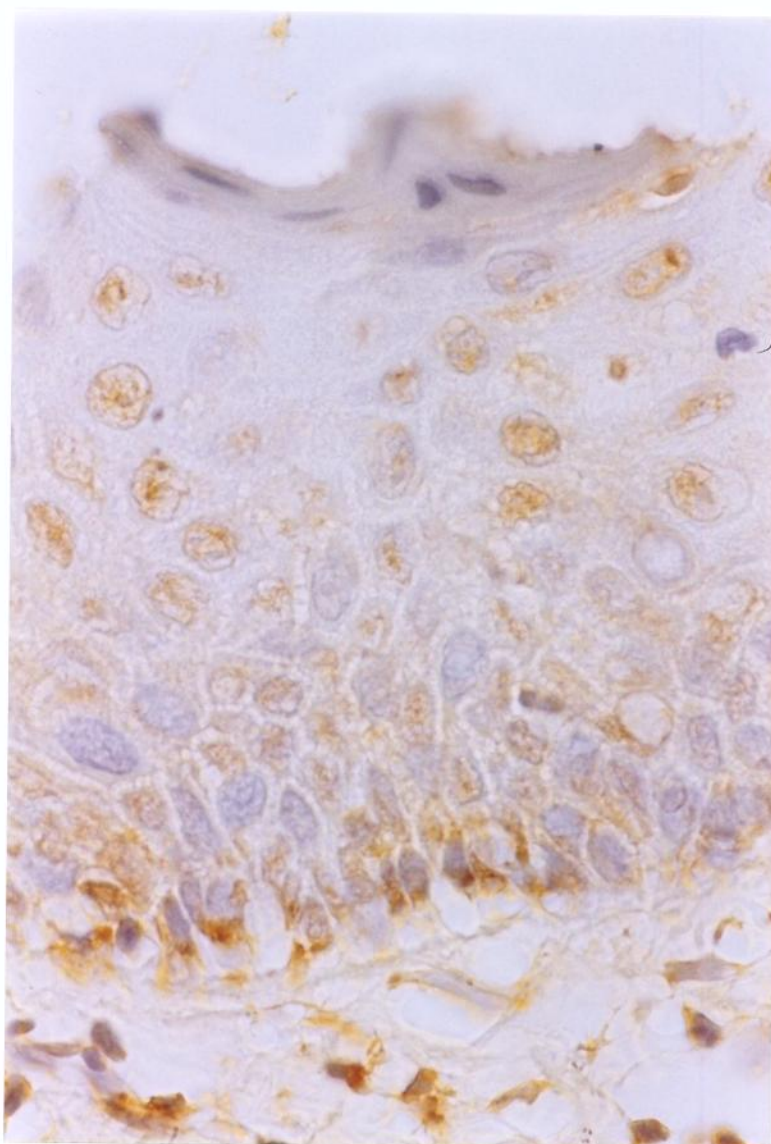


FIGURA 5 – Detalhe da figura anterior. Os núcleos positivos estão localizados nas camadas superficiais e intermediárias do epitélio, com intensidade do sinal variando de leve a moderada (HIS, 825X).

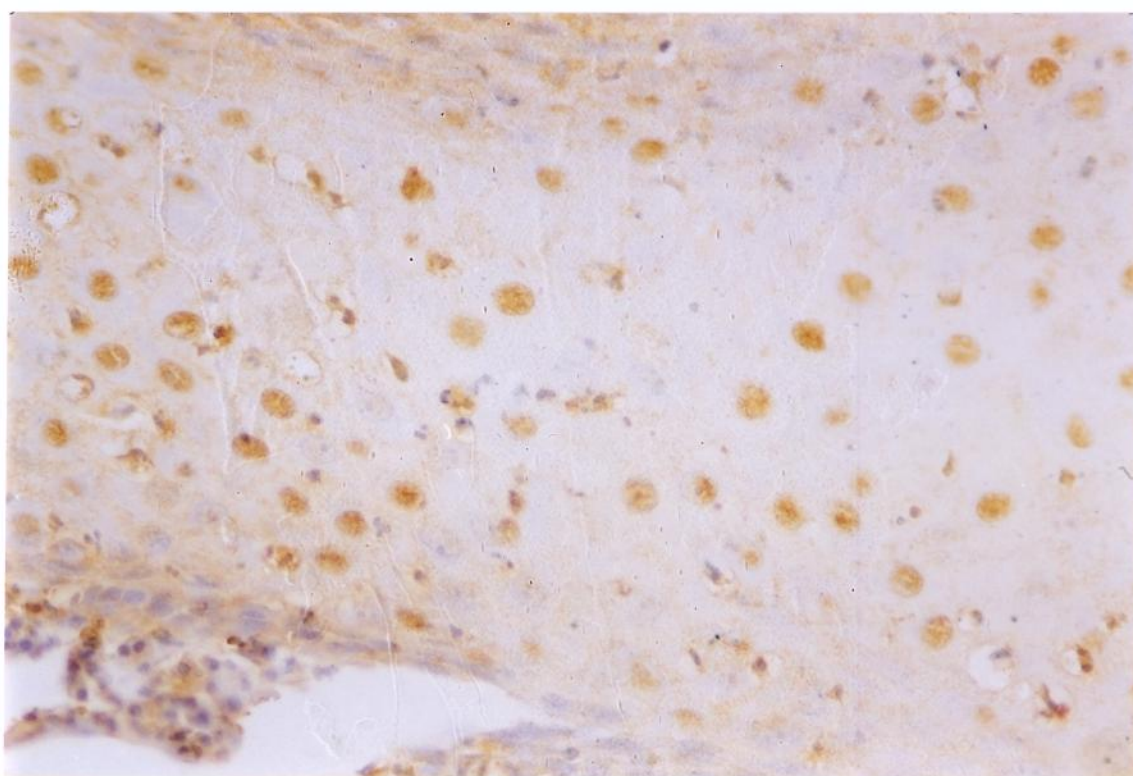


FIGURA 6 – Epitélio escamoso normal da laringe, próximo a uma área de carcinoma invasivo (B7878/95- Caso 7), mostrando vários núcleos positivos para o HPV dos tipos 6/11 através da hibridização "in situ"(HIS, 330X).

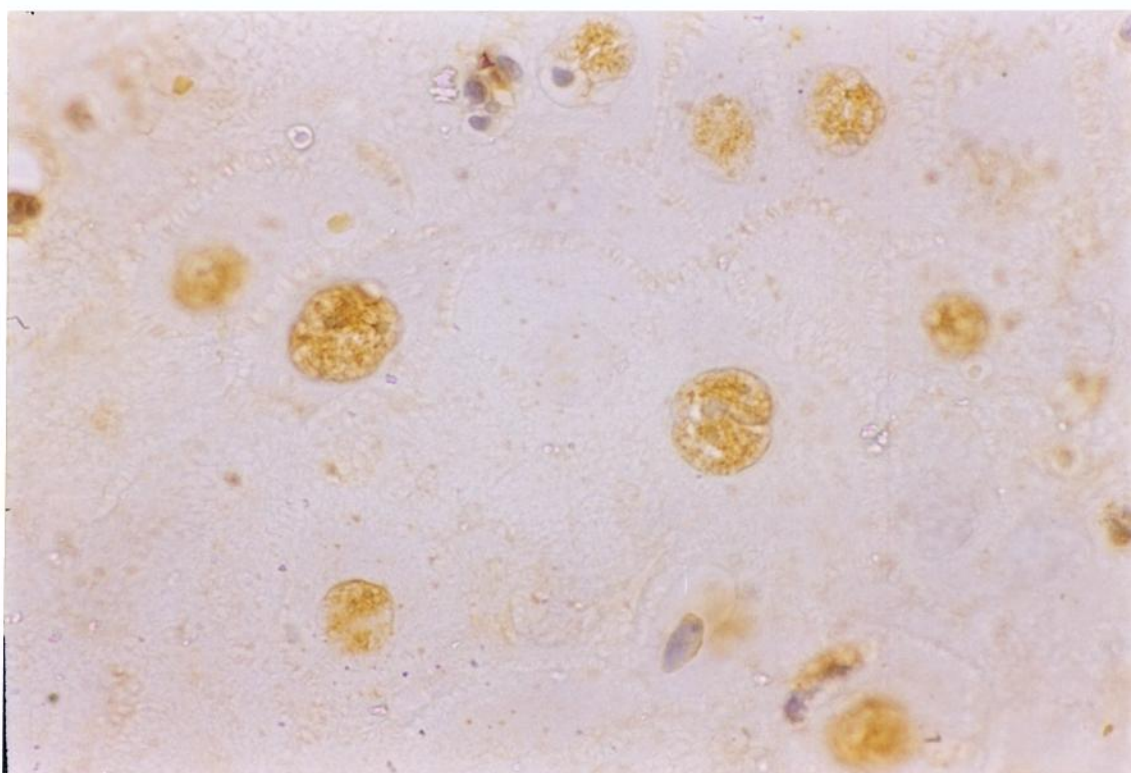


FIGURA 7- Detalhe da figura anterior, com núcleos moderadamente corados (HIS, 825X).

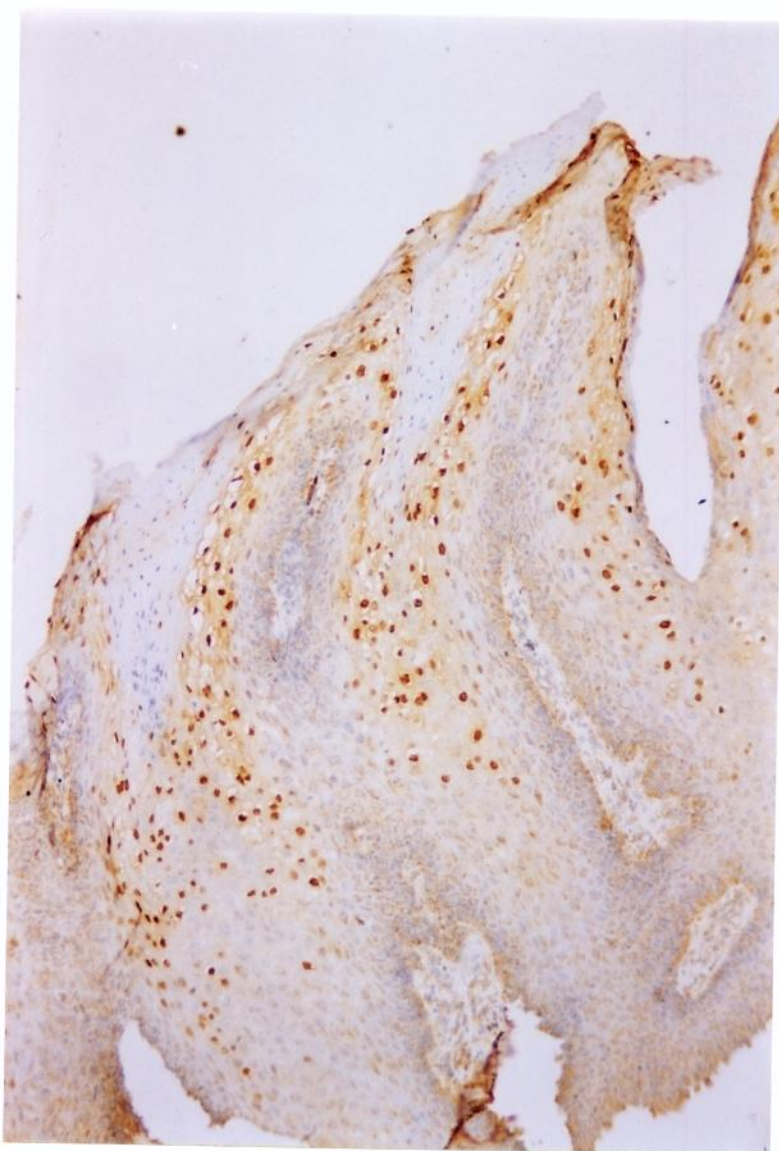


FIGURA 8 – Controle positivo constituído por condiloma acuminado da região genital mostrando intensa positividade para o HPV dos tipos 6/11 por meio da hibridização 'in situ' (HIS, 330X).

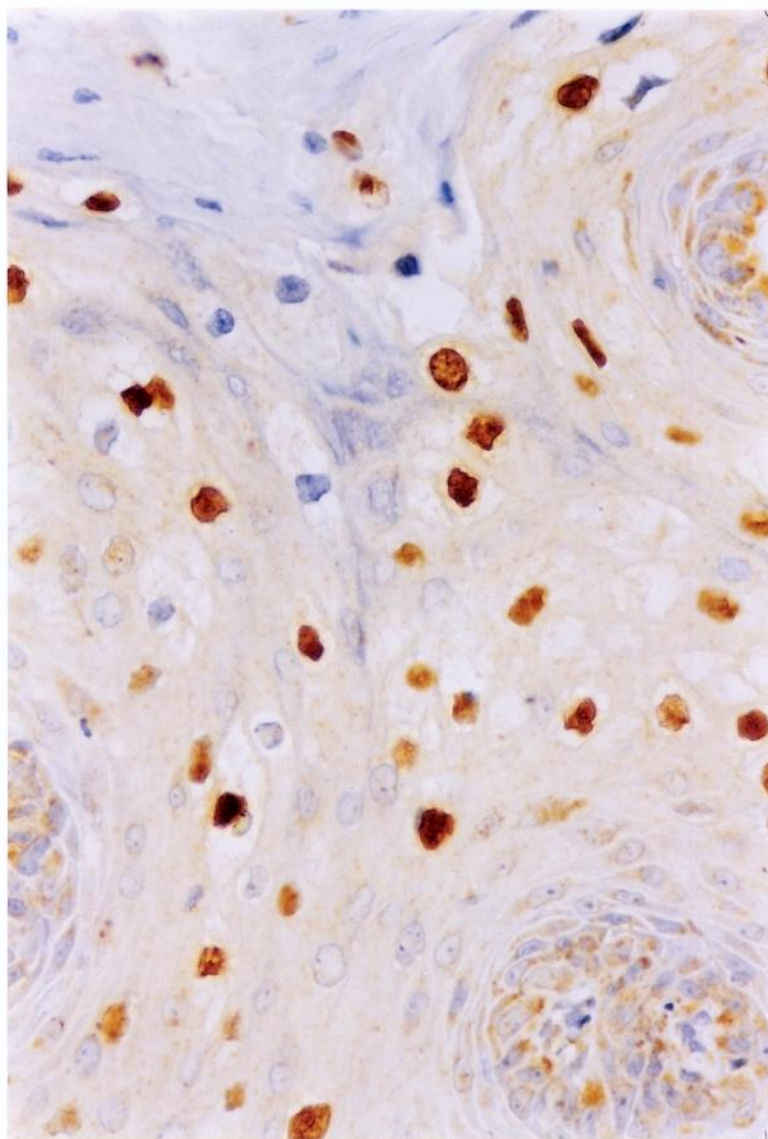


FIGURA 9 – Detalhe da figura anterior, mostrando núcleos com intensidade de coloração semelhante ao encontrado nas lesões da laringe do presente estudo, ao lado de núcleos fortemente positivos (HIS, 330X).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. O HPV como agente etiológico dos carcinomas da região ano-genital

O vírus do papiloma humano (HPV) é considerado o principal agente etiológico do carcinoma epidermóide do colo uterino. O papel fundamental do HPV no mecanismo de carcinogênese do epitélio escamoso cervical, está baseado nos resultados de vários trabalhos que demonstram a presença de material genético desse vírus, por meio de técnicas de biologia molecular, na grande maioria dos carcinomas e lesões displásicas dessa região (WILBUR, REICHMAN, STOLER, 1988; GARUTI et al, 1989; GUPTA et al, 1989; WRIGHT et al, 1994; PARK et al, 1995; ZUR HAUSEN, 1995; GUPTA, 1997; LIE et al, 1997; MEISELS & MORIN, 1997a; WALBOOMERS & MEIJER, 1997; ZHEBE & WILANDER, 1997). Segundo WALBOOMERS & MEIJER (1997), os dados provenientes de diversos estudos epidemiológicos sustentam o HPV como um fator central no desenvolvimento do carcinoma cervical, sendo os demais fatores de menor importância.

6.2. O HPV e as lesões epiteliais da cabeça e pescoço

Na região da cabeça e pescoço, o fumo e o álcool são os principais fatores associados ao desenvolvimento do carcinoma epidermóide. Entretanto, a presença de DNA do HPV em lesões proliferativas epiteliais benignas e malignas dessa região também tem sido descrita, sugerindo uma possível participação desse vírus na carcinogênese do trato aerodigestivo superior (DEKMEZIAN, BATSAKIS, GOEPFERT, 1987; BRANDSMA & ABRAMSON, 1989; BRACHMAN et al, 1992; YEUDALL, 1992; OSTWALD et al, 1994; SNIDJERS et al, 1996; CHEN et al, 1997; KOUFMAN & BURKE, 1997; McCAIG et al, 1998; WILCZYNSKI et al, 1998).

McKAIG et al (1998), revisando extensamente a literatura relacionada a detecção do HPV em carcinomas da cabeça e pescoço, através da técnica do PCR, relatam uma positividade global de 34,5%(416/1205). Os maiores índices de prevalência foram na cavidade oral (59%), sendo de 77% nas tonsilas palatinas, 44% no assoalho da boca, 42,8% no palato e 35% na língua. Na faringe, a prevalência obtida dos dados da literatura compilados por esses autores, foi de 43% e na laringe 33%. O HPV do tipo 16 foi o mais freqüentemente identificado.

Na laringe, a papilomatose juvenil e do adulto e o carcinoma verrucoso são consideradas lesões associadas ao HPV. Nos papilomas, os tipos 6 e 11 são freqüentemente detectados, de forma semelhante ao que ocorre nas displasias de baixo grau da região ano-genital, embora os tipos 16/18 também sejam descritos nos casos em que há transformação maligna. A grande maioria dos carcinomas verrucosos, uma variante extremamente bem diferenciada do carcinoma epidermóide, alberga DNA do HPV 16 (KASHIMA et al, 1988; ZAROD et al, 1988; LEVI et al, 1989; LINDEBERG et al, 1989; BRANDSMA et al, 1990; DOYLE et al, 1994; GALE et al, 1994; SIMON et al, 1994; LIE et al, 1996; KLOZAR et al, 1997; LIN et al, 1997; RIMMEL et al, 1997).

6.3. Detecção do HPV nos carcinoma da laringe: His x PCR

A presença de DNA do HPV em carcinomas epidermóides da laringe tem sido demonstrada através de várias técnicas, com índices de positividade variando de 3 a quase 70% dos casos (SHEURLLEN et al, 1986; SYRJÄNEN et al, 1987; BRANDSMA & ABRAMSON, 1989; KIYABU et al, 1989; HOSHIKAWA et al, 1990; KULSKI et al, 1990; PÉREZ-AYALA et al, 1990; MORGAN et al, 1991; BRANDWEIN et al, 1993; GOURGOLIS et al, 1994; SHIDARA et al, 1994; SIMON et al, 1994; CLAYMAN et al, 1994; SNIDIJERS et al, 1996; ALMADORI et al, 1996; SHEN et al, 1996; CEROVAC et al, 1996; LIE et al, 1996; POLJAK et al, 1997; VOWLES et al, 1997).

A maioria desses trabalhos usou a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Embora o PCR seja considerado o método mais sensível, houve uma grande variação nos

índices de positividade entre os trabalhos que usaram essa técnica (3,5 a 66%). Tal variação deve-se, provavelmente, a diferenças geográficas, amostrais e metodológicas. BRANDSMA et al (1989), investigaram a variação na frequência de detecção do HPV, por meio do Southern blot, em diferentes laboratórios. Esses autores concluíram que essa disparidade de resultados entre laboratórios estava relacionada com a padronização dos métodos de identificação do HPV e explicaria as diferentes taxas de prevalência publicadas.

Um grande inconveniente do PCR é a possibilidade de resultados falso positivos, devido a altíssima sensibilidade da técnica, capaz de amplificar quantidades ínfimas de DNA viral. WRIGHT & WYNFORD-THOMAS (1990), recomendam a não inclusão de grupos controles positivos nos estudos que pesquisam DNA viral, como uma forma de evitar a contaminação da amostra por material genético proveniente dos mesmos. Todos os trabalhos que pesquisaram a presença de DNA do HPV em carcinomas da laringe, pelo PCR, usaram controles positivos. Em que pese o rigor metodológico dos mesmos, inclusive com a inclusão de controles negativos, é válido considerar a possibilidade de contaminação da amostra, pelo menos em alguma parcela de casos, causando resultados positivos falsos, como aventado por WRIGHT & WYNFORD-THOMAS (1990).

A técnica da hibridização "in situ", utilizada no presente trabalho, apesar de menos sensível do que o PCR e as técnicas de hibridização em membranas (Southern blot, Dot blot), é a única que permite localizar o sinal positivo no tecido estudado. Além disso, parece ser menos susceptível aos efeitos da fixação prolongada do que o PCR. No tecido fixado em formalina não tamponada, segundo LIE et al (1996), a hibridização "in situ" é o método ideal para a detecção de DNA do HPV.

Há grande controvérsia em relação ao limiar de detecção de DNA do HPV, através da hibridização "in situ", com valores mínimos variando de 10 a até 800 cópias virais por célula (BURNS et al, 1987; ARENDS, 1991; NUOVO, 1994). Recentemente, uma técnica de amplificação do sinal positivo aplicada em imunoenaios e reações imuno-histoquímicas, baseada na deposição catalítica de compostos fenólicos (tiramina) biotinilados, foi adaptada para reações de hibridização "in situ" (BOBROW et al, 1989; PODDIGHE et al, 1996). Com essa modificação, PODDIGHE et al (1996), conseguiram aumentar consideravelmente a sensibilidade

da hibridização "in situ", na detecção do HPV, mesmo quando uma quantidade pequena de cópias virais está presente no tecido. De acordo com esses autores, o uso dessa técnica poderia substituir o PCR, como método de identificação do HPV, nos carcinoma cervicais.

6.4. Frequências de positividade

Em nosso trabalho, encontramos 8,8% (4/45) de positividade para o HPV nos casos de carcinoma epidermóide estudados através da técnica da hibridização "in situ", com amplificação do sinal por deposição de tiramina biotinizada. Esse resultado está próximo aos demonstrados por SYRJÄNEN et al (1987), com 12,9% de casos positivos estudados através da hibridização "in situ" com sondas radiomarcadas e BRANDSMA & ABRAMSON (1989), com 10% de casos positivos, usando a técnica do Southern blot. Nosso índice de positividade praticamente sobrepuja-se aos verificados por BRANDWEIN et al (1989), LIE et al (1996) e SHEN et al (1996), que trabalharam com o método do PCR. Entretanto está bem abaixo do demonstrado por CEROVAC et al (1997), que por meio da hibridização "in situ" com sondas marcadas pela digoxigenina, conseguiram detectar DNA do HPV em 42% dos casos estudados. É possível que o uso da digoxigenina, ao invés da biotina, como marcador das sondas, tenha contribuído no encontro dessa frequência maior, ao aumentar a sensibilidade do método (MORRIS et al, 1990).

Em relação às lesões displásicas, identificamos DNA do HPV em 15% (3/20) dos casos, sendo 01 caso de displasia moderada e 02 de carcinoma "in situ". Houve positividade também em trechos de epitélio displásico (displasia leve a moderada) adjacentes a carcinomas invasivos (casos 6 e 7). Esse resultado está próximo ao relatado por FOURET et al (1995), com 10,5% de casos positivos. Esses autores, que estudaram lesões queratóticas das cordas vocais, identificaram HPV em apenas um caso de displasia grave ou carcinoma "in situ", sendo os demais casos positivos constituídos por lesões sem nenhum grau de displasia ou com displasia leve/moderada. LINDEBERG & KROGDAHL (1997), estudando lesões displásicas pelo PCR encontrou positividade para o HPV em 1/30 (3,5%) casos. O único caso positivo estava

representado por uma displasia leve, proveniente de uma paciente com história de papilomatose laríngea recorrente. ÉLÖ et al (1993), GALLO et al (1994), GOURGOLIS et al (1994) e POLJAK et al (1997) não conseguiram demonstrar a presença do HPV em lesões displásicas da laringe, através das técnicas de hibridização "in situ" e PCR. Esses últimos autores, porém, detectaram HPV do tipo 6, pelo PCR, em 1/19 (5,2%) casos de hiperplasia simples das cordas vocais, sem sinais de displasia. Curiosamente, KASHIMA et al (1986), conseguiram demonstrar positividade para o capsídeo do HPV, por meio da imunoperoxidase, em 33% (20/60) dos carcinomas "in situ" estudados, sendo essa a maior frequência descrita na literatura, para esse grupo de lesões.

6.5. Tipos de sondas detectadas

O HPV dos tipos 16, 6 e 11 são os mais frequentemente detectados nos carcinomas da laringe. No presente trabalho, três casos foram positivos para uma sonda mista que detecta DNA dos tipos 16 e 18. Como o índice de positividade para o HPV do tipo 18 descrito na literatura é muito pequeno (GOURGOLIS et al, 1994; SHIDARA et al, 1994; SHEN et al, 1996), provavelmente nesses casos houve detecção apenas de DNA do HPV 16.

No grupo dos carcinomas invasivos, identificamos dupla positividade para as sondas 6/11 e 16/18 em dois casos. Não houve coincidência de áreas positivas, sendo que em um caso a sonda 6/11 foi positiva apenas no epitélio displásico adjacente ao carcinoma. SYRJÄNEN et al (1987) encontraram dupla positividade em 33,3% dos casos positivos para o HPV, com o seguinte padrão: 6 e 11 em um caso, 6 e 16 em dois casos, 11 e 16 em dois casos. CEROVAC et al (1996) também apresentam três casos de carcinoma laríngeo com dupla positividade para os tipos 6 e 16. SIMON et al (1994) descrevem um caso de carcinoma da laringe em uma adolescente de 12 anos, com dupla positividade para os tipos 18 e 33, sem história prévia de papilomatose. Esses autores propõem que a co-infecção por dois tipos distintos de HPV poderia substituir os agentes carcinogênicos normalmente presentes no carcinoma da laringe do adulto.

No grupo das lesões displásicas, observamos um caso positivo para a sonda 6/11 e um caso positivo para a sonda 16/18. FOURET et al (1995) detectou apenas o tipo 16 nas lesões displásicas positivas para o HPV. LINDEBERG & KROGDAHL (1997), não conseguiram especificar o HPV presente no único caso de displasia positivo. A análise do DNA viral por técnicas de biologia molecular ("Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis") sugeria um tipo ainda não conhecido.

Ao todo, obtivemos índices de positividade idênticos para as sondas 6/11 e 16/18, ou seja, 42,8% dos casos positivos para o HPV. Não obstante existir uma associação etiológica entre os tipos 6/11 e os papilomas escamosos da laringe, nenhum dos casos positivos para o HPV possuía história prévia de papilomatose. Não encontramos nenhum caso positivo para a sonda 31/33, o que pode representar uma baixa incidência desses tipos na laringe. Contudo, em três casos não foi possível especificar o tipo de HPV presente, pois apenas a sonda "Wide Spectrum" resultou positiva. Desta forma, como essa sonda é capaz de detectar além dos tipos 6, 11 e 16, também os tipos 30, 31, 33, 45, 51 e 52, não podemos descartar a possibilidade de positividade para os mesmos, nesses casos. No caso 5, a área corada pela sonda WS não aparecia nos demais cortes, justificando a negatividade das sondas restantes. De forma análoga, a presença de reação positiva para uma determinada sonda, com ausência de positividade nas demais, pode ocorrer devido a concentração do material genético do vírus em apenas um espaço limitado do tecido, o qual foi totalmente representado em um único corte do material emblocado em parafina. Esse fenômeno poderia explicar, por exemplo, a falta de positividade para a sonda WS no caso 1, cuja reação para a sonda 6/11 foi positiva.

6.6. Intensidade das reações

A intensidade das reações positivas variou de leve a moderada, enquanto os controles positivos, constituídos por lesões condilomatosas da região ano-genital mostraram núcleos fortemente corados em suas camadas superficiais. CEROVAC et al (1996), relatam um padrão semelhante de intensidade nos casos de carcinoma da laringe positivos pela hibridização

"in situ" e sugerem que o encontro de núcleos leve a moderadamente corados é consequência do baixo número de cópias virais presente. Ao contrário, nos controles positivos, que são lesões associadas à produção de grande quantidade de partículas virais, há intensa reação positiva nos núcleos superficiais com coilocitose. A presença de um sinal fracamente positivo pode representar também uma reação cruzada com outro tipo de HPV não pesquisado ou ainda desconhecido (GARUTI et al, 1989). Finalmente, o processamento do material em formalina não tamponada e a falta de padronização do tempo de fixação pode ter tido alguma influência nos resultados verificados, seja diminuindo os índices de positividade ou prejudicando a intensidade do sinal positivo (STOLER, 1994; NUOVO, 1994; McNICOL & FARQUHARSON, 1997).

6.7. Localização do sinal positivo

A maioria dos núcleos positivos estavam localizados focalmente nas camadas superficiais do epitélio displásico ou carcinomatoso, não sendo observado positividade nas camadas basais ou nos blocos carcinomatosos invasivos. Em dois casos, o epitélio displásico adjacente ao carcinoma invasivo também exibia núcleos positivos nas camadas superficiais.

SYRJÄNEN et al (1982), através da imunoperoxidase, identificaram positividade para o capsídeo viral do HPV predominantemente localizada no terço superior do epitélio displásico adjacente ao carcinoma, em áreas com aspecto de coilocitose. Ocasionalmente, segundo esse mesmo trabalho, núcleos positivos também foram identificados no componente invasivo dos carcinomas. SYRJÄNEN et al (1987), usando a técnica da hibridização "in situ", apresentam casos com positividade limitada às camadas superficiais do epitélio carcinomatoso, porém não especificam se esse padrão esteve presente em toda a amostra estudada. CEROVAC et al (1996) e LIE et al (1996), que pesquisaram a presença do HPV pela hibridização "in situ", não relataram a localização do sinal positivo no tecido neoplásico.

Esse padrão de distribuição topográfica do HPV também é descrito na maioria das lesões epiteliais de baixo grau da região ano-genital, onde há progressivo aumento na intensidade do sinal positivo a partir das camadas profundas, em direção as camadas superficiais (WILBUR

et al, 1988; GARUTI et al, 1989; GUPTA et al, 1989; SCHNEIDER et al, 1991). De acordo com GARUTI et al (1989), reflete a relação entre a replicação viral e a diferenciação da célula escamosa. No entanto, a maioria das lesões de alto grau do colo uterino exibem um padrão difuso, com distribuição uniforme do sinal positivo em todas as camadas do epitélio (GUPTA et al, 1989; SCHNEIDER et al, 1991).

6.8. Positividade no epitélio normal

Em dois casos da nossa amostra, o epitélio normal adjacente apresentou positividade para o HPV. No caso 3, o epitélio normal adjacente ao carcinoma "in situ" mostrou núcleos corados pelas sondas WS e 16/18. O caso 7, por sua vez, exibia um pequeno segmento de epitélio normal, adjacente ao carcinoma invasivo, positivo para a sonda 6/11. Esses achados sugerem a possibilidade de infecção latente pelo HPV na mucosa normal da laringe. O significado biológico desse fato, porém, ainda não está esclarecido. Seria o HPV um vírus comensal do epitélio laríngeo? O encontro de HPV dos tipos 6 e 11, agentes etiológicos dos papilomas, representaria formas histológicas frustras e sub-clínicas dessas lesões? A presença do HPV 16 tornaria esse epitélio mais propenso à transformação neoplásica?

A presença do HPV no epitélio laríngeo normal próximo ou distante da área de carcinoma, nos casos positivos para o mesmo, é descrita na literatura, com índices de detecção variando de 14 a 62% (PÉREZ-AYALA et al, 1990; MORGAN et al, 1991; ALMADORI et al, 1996). BRANDSMA & ABRAMSON (1989), observaram positividade para o HPV dos tipos 11 e 16 em 4% dos casos controles, constituídos por mucosa laríngea proveniente de pacientes com lesões benignas. NUNEZ et al (1994), pesquisaram a presença do HPV em laringes obtidas de autópsias, por meio do PCR, encontrando 25% (3/12) de positividade para o tipo 11. RIIKANEN, PELTOMAA, SYRJÄNEN (1994), trabalhando com biópsias obtidas de pacientes com laringite crônica ou nódulos das cordas vocais, identificaram HPV dos tipos 6 e 11, através do PCR, em 19% (6/32) dos casos.

ALMADORI et al (1996), levantam a hipótese de que a presença do HPV por longo tempo na mucosa laríngea normal, representaria um fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma. BRANDSMA & ABRAMSON (1989), RIIKANEN et al (1994) e POLJAK et al (1997), ao contrário, acreditam que a detecção do HPV no epitélio normal indica que não é possível inferir uma relação causal entre o vírus e o carcinoma da laringe, apenas pelo encontro do mesmo nessa lesão.

6.9. Alterações morfológicas sugestivas de infecção pelo HPV

A idéia de que o HPV poderia estar associado ao carcinoma da laringe foi lançada inicialmente por SYRJÄNEN & SYRJÄNEN (1981), ao detectarem alterações histológicas supostamente atribuídas ao vírus (coilocitose e multinucleação) em uma proporção significativa de casos de carcinoma laríngeo estudados (49/116). Posteriormente, SYRJÄNEN et al (1982), conseguiram demonstrar a expressão do capsídeo viral, por meio da imunoperoxidase, em 36,1% dos casos com essas alterações, que foram classificadas em três grupos: lesão do tipo condiloma plano, lesão papilomatosa e lesão invertida. SYRJÄNEN et al (1987), relatam a presença de alterações morfológicas sugestivas de infecção pelo HPV em 40% dos casos positivos para o vírus através da hibridização "in situ". Contudo, esses autores não descrevem a frequência de tais alterações nos casos negativos, nem analisam estatisticamente os resultados encontrados.

No presente trabalho, verificamos que 35,9% da amostra estudada apresentava alterações morfológicas indistinguíveis daquelas descritas nas lesões condilomatosas da região ano-genital. Alguns casos exibiam um aspecto papilífero, semelhante ao descrito por SYRJÄNEN et al (1981). Entretanto, 87,5% dos casos com tais sinais histológicos não demonstraram DNA do HPV pela hibridização "in situ". Mais ainda, não houve relação estatisticamente significativa entre a presença dessas alterações e a positividade para o HPV. Assim, essas alterações morfológicas, classicamente associadas à infecção pelo HPV na região ano-genital, quando presentes no epitélio escamoso da laringe, normal ou neoplásico, devem ser interpretadas como inespecíficas.

BRANDWEIN et al (1992), descrevem um caso de carcinoma laríngeo com aspecto histológico fortemente sugestivo de infecção pelo HPV mas com pesquisa negativa para o vírus através do PCR. GALLO et al (1994), estudando 115 lesões hiperplásicas das cordas vocais (queratoses) pela hibridização "in situ", não encontraram nenhum caso positivo para o HPV, não obstante a presença de alterações semelhantes à coilocitose, em 5,2% da amostra. Os resultados desses autores corroboram os nossos e favorecem a hipótese de que tais alterações histológicas não são específicas para o HPV, quando identificadas na laringe.

6.10. Graduação histológica

Todos os casos de carcinoma invasivo positivos para o HPV, em nosso trabalho, foram graduados em bem ou moderadamente diferenciados. Nenhum carcinoma pouco diferenciado apresentou positividade. HOSHIKAWA et al (1990), também verificaram um predomínio de carcinomas graduados em bem a moderadamente diferenciados, entre os casos positivos para o HPV. PÉREZ-AYALA et al (1990) e CEROVAC et al (1996), por outro lado, observaram uma maior frequência de HPV nos carcinomas pouco diferenciados.

6.11. Aspectos clínicos

Em relação ao presente estudo, as características clínicas dos casos positivos correspondem ao esperado para esse grupo de pacientes, ou seja, predomínio do sexo masculino, idade média de 65,4 anos, história pregressa de tabagismo e etilismo. O encontro de 100% de fumantes, no grupo positivo para o HPV, não confirma os achados de FOURET et al (1997), que relataram uma frequência significativamente maior de HPV em carcinomas da cabeça e pescoço no grupo de não fumantes, em relação ao grupo com história de tabagismo.

6.12. Papel do HPV na etiopatogenia do carcinoma da laringe

Fundamentados no encontro de material genético de HPV de alto grau em carcinomas da laringe, vários autores advogam a idéia de que esse vírus atua como um cofator, ao lado do fumo e álcool, no processo de transformação maligna desse órgão. O HPV poderia estar presente desde os eventos iniciais da carcinogênese ou seria apenas um promotor, facilitando a manutenção do estado transformado. Na opinião desses autores, a hipótese de uma ação coadjuvante do HPV na carcinogênese laríngea, está de acordo com o paradigma atual de que esse processo desenvolve-se em múltiplas etapas e requer a participação sinérgica de vários fatores (SYRJÄNEN et al, 1987; PÉREZ-AYALA et al, 1990; MORGAN et al, 1991; GOURGOLIS et al, 1994; SALAM et al, 1995; ALMADORI et al, 1996; CEROVAC et al, 1996; SNIDJERS et al, 1996). De fato, KIM et al (1993), realizaram experimentos "in vitro", comprovando que a transformação maligna de ceratinócitos da mucosa oral, pode ser causada através do efeito combinado de substâncias carcinogênicas derivadas do tabaco e HPV de alto grau. GOURGOLIS et al (1994), verificaram uma relação inversa, no carcinoma laríngeo, entre a expressão da proteína p53 e a positividade para o HPV, sugerindo uma participação do vírus no mecanismo de transformação neoplásica nesses casos, via degradação do p53 pela oncoproteína E6.

Os nossos resultados, assim como os de BRANDWEIN et al (1992), LIE et al (1996), SHEN et al (1996), LINDEBERG & KROGDAHL (1997) e POLJAK et al (1997), não favorecem uma relação causal entre o HPV e o carcinoma da laringe. Entretanto, uma vez que houve detecção de material genético do HPV 16, o qual está associado a transformação maligna do epitélio escamoso na região ano-genital, não podemos descartar totalmente a possibilidade desse vírus atuar, eventualmente, como um cofator de menor importância no mecanismo da carcinogênese laríngea.

Dessa forma, compartilhamos o pensamento de POLJAK et al (1997) e McKAIG et al (1998), de que faz-se necessário estudos epidemiológicos multicêntricos, com uma amostragem representativa, usando técnicas de detecção padronizadas, para um maior

esclarecimento sobre o papel do HPV na carcinogênese laríngea e qual o seu significado biológico quando presente na mucosa normal.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- 7.1. Através da técnica da hibridização "in situ" com amplificação do sinal foi possível detectar DNA do HPV em 8,8% dos casos de carcinoma epidermóide e 15 % dos casos de displasia epitelial da laringe estudados. Essa baixa frequência observada, não favorece o HPV como um fator etiológico importante das displasias epiteliais e do carcinoma epidermóide da laringe, na população estudada.
- 7.2. No grupo positivo para o HPV, a frequência de detecção dos tipos 6/11 e 16/18 foi de 26,5% nos carcinomas epidermóides e de 14,2% nas displasias epiteliais. Os tipos 31/33 não foram encontrados em nenhum caso.
- 7.3. Não houve relação estatisticamente significativa entre alterações morfológicas sugestivas de infecção pelo HPV e positividade para o DNA viral, através da hibridização "in situ". Tais alterações, nas displasias epiteliais e no carcinoma epidermóide da laringe, são provavelmente inespecíficas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- AGUDELO, D.; QUER, M.; LEÓN, X.; DÍEZ, S.; BURGÚÉS, J. – Laryngeal carcinoma in patients without a history of tobacco and alcohol use. **Head Neck**, **19**:200-204, 1997.
- ALMADORI, G.; CADONI, G.; CATTANI, P.; POSTERARO, P.; SCARANO, E.; OTTAVIANI, F.; PALUDETTI, G.; MAURIZI, M. – Detection of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinoma by polymerase chain reaction. **Eur. J. Cancer**, **32A**:783-788, 1996.
- ANWAR, K.; NAKAKUKI, K.; IMAI, H.; NAIKI, H.; INUSUKA, M. – Over-expression of p53 protein in human laryngeal carcinoma. **Int. J. Cancer**, **53**:952-956, 1993.
- ARENDS, M.J. Identification of HPV: in situ hybridization or polymerase chain reaction ? **J. Pathol.**, **164**:191-193, 1991. [Editorial]
- AZUMI, N. & CZERNOBILSKY, B. – Immunohistochemistry. In: KURMAN, R.J. – **Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract**. 4 ed. New York. Springer-Verlag, 1994. p. 1131-59.
- BARNES, L.; YUNIS, E.J.; KREBS, F.J.; SONMEZ-ALPAN, E. - Verruca vulgaris of the larynx. Demonstration of human papillomavirus types 6/11 by in situ hybridization. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **115**:895-899, 1991.
- BERGERON, C. & FERENCZY, A. – Molecular techniques. In: BIBBO, M. – **Comprehensive Cytopathology**. 2. Ed. Philadelphia. W. B. Saunders Company, 1997. p.1075-1084.
- BLITZER, P.H. – Epidemiology of head and neck cancer. **Sem. Oncol.**, **15**:2-9, 1988.
- BOBROW, M.N.; HARRIS, T.D.; SHAUGHNESSY, K.J.; LITT, G.J. – Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. **J. Immunol. Methods**, **125**:279-285, 1989.

- BRACHMAN, D.G.; GRAVES, D.; VOKES, E.; BECKETT, M.; HARAF, D.; MONTAG, A.; DUNPHY, E.; MICK, R.; YANDELL, D.; WEICHSELBAUM, R.R. – Occurrence of p53 deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. **Cancer Res.**, **52**:4832-4836, 1992.
- BRANDSMA, J.; BURK, R.D.; LANCASTER, W.D.; PFISTER, H.; SCHIFFMAN, M.H. – Inter-laboratory variation as an explanation for varying prevalence estimates of human papillomavirus infection. **Int. J. Cancer**, **43**:260-262, 1989.
- BRANDSMA, J.L. & ABRAMSON, A.L. - Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, **115**:621-625, 1989.
- BRANDSMA, J.L.; LEWIS, A.J.; ABRAMSON, A.; MANOS, M. – Detection and typing of papillomavirus DNA in formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissue. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, **116**:844-848, 1990.
- BRANDWEIN, M.S.; NUOVO, G.J.; BILLER, H. – Analysis of prevalence of human papillomavirus in laryngeal carcinomas. Study of 40 cases using polymerase chain reaction and consensus primers. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, **102**:309-313, 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Programas de Controle de Câncer – Pro-onco. **Câncer no Brasil – dados dos registros de base populacional: Rio de Janeiro, Pro-Onco, 1995. 88p.**
- BROWN, L.M.; MASON, T.J.; PICKLE, L.W.; STEWART, P.A.; BUFFLER, P.A.; BURAU, K.; ZIEGLER, R.G.; FRAUMENI, J.F. – Occupational risk factors for laryngeal cancer on the Texas gulf coast. **Cancer Res.**, **48**:1960-1964, 1988.
- BURNS, J.; GRAHAM, A.K.; FRANK, C.; FLEMING, K.A.; EVANS, M.F.; McGEE, J.O.D. – Detection of low copy human papillomavirus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic in situ hybridisation. **J Clin. Pathol.**, **40**:858-864, 1987.
- CEROVAC, Z.; SARCEVIC, B.; KRALJ, Z.; BAN, J. – Detection of human papillomavirus (HPV) type 6, 16 and 18 in head and neck squamous cell carcinomas by in situ hybridization. **Neoplasma**, **43**:185-194, 1996.

- CHEN, Z.; STORTHZ, K.A.; SHILLITOE, J. E. – Mutations in the long control region of human papillomavirus DNA in oral cancer cells, and their functional consequences. **Cancer Res.**, **57**:1614-1619, 1997.
- CLAYMAN, G.L.; STEWART, M.G.; WEBER, R.S.; EL-NAGAR, K.; GRIMM, E.A - Human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, **120**:743-748, 1994.
- COPPER, M.P.; JOVANOVIC, A.; NAUTA, J.J.P.; BRAAKHUIS, B.J.M.; DE VRIES, N.; WAAL, I. V. D.; SNOW, G.B. – Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, **121**:157-160, 1995.
- COTRAM, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. – Neoplasia. In: _____ - **Robbins Pathologic Basis of Disease**. 5. Ed. Philadelphia. W.B. Saunders Company, 1994. p.241-303.
- DE STEFANI, E.; CORREA, P.; OREGGIA, F.; LEIVA, J.; RIVERO, S.; FERNANDEZ, G.; DENEOPPELLEGRINI, H.; ZALAVA, D.; FONTHAM, E. – Risk factors for laryngeal carcinoma. **Cancer**, **60**:3087-3891, 1987.
- DEKMEZIAN, R. H.; BATSAKIS, J.G.; GOEPFERT, H. – In situ hybridization of papillomavirus DNA in head and neck squamous cell carcinoma. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, **113**:819-821, 1987.
- DOYLE, D.J.; HENDERSON, L.A.; LEJEUNE, F.E.; MILLER, R.H. – Changes in human papillomavirus typing of recurrent respiratory papillomatosis progressing to malignant neoplasm. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, **120**: 1273-1276, 1994.
- ÉLÖ, J.; BALATONI, Z.S.; VARGA, L.; BATJAI, A.; HÍDVÉGI, J. – Investigation of premalignant lesions of the larynx epithelium with histoautoradiography and HPV-assay. **Acta Otolaryngol. (Stockh)**, **113**:459-462, 1993.

- FALK, R.T.; PICKLE, L.W.; BROWN, L.M.; MASON, T.J.; BUFFLER, P.A.; FRAUMENI, J.F. – Effect of smoking and alcohol consumption on laryngeal cancer risk in coastal Texas. **Cancer Res.**, **49**:4024-4029, 1989.
- FARTHING, A.; MASTERSON, P.; MASON, W.P.; VOUSDEN, K.H. – Human papillomavirus detection by hybrid capture and its possible clinical use. **J. Clin. Pathol.**, **47**:649-652, 1994.
- FECHNER, R.E. & MILLS, S.E. – Verruca vulgaris of the larynx: a distinctive lesion of probable viral origin confused with verrucous carcinoma. **Am. J. Surg. Pathol.**, **6**:357-362, 1982.
- FENOGLIO-PREISER, C.M.; WILLMAN, C.L. – Molecular biology and the pathologist. General principles and applications. **Arch. Patol. Lab. Med.**, **111**:601-619, 1987.
- FIELD, J.K. – Oncogenes and tumor-suppressor genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Eur. J. Cancer**, **28B**:67-76, 1992.
- FOULKES, W.D.; BRUNET, J.S.; KOWALSKI, L.P.; FRANCO, E.L.; NAROD, S.A. – Family history of cancer is a risk factor for squamous carcinoma of the head and neck: a case-control study from Brazil. **Am. J. Hum. Genet.**, **57**: A63-334, 1995.
- FOURET, P.; DABIT, D.; SIBONY, M.; ALIILI, D.; COMMO, F.; SAINT-GUILY, J.L.; CALLARD, P. – Expression of p53 protein related to the presence of human papillomavirus infection in precancer lesions of the larynx. **Am. J. Pathol.**, **146**:599-604, 1995.
- FOURET, P.; MONCEAUX, G.; TEMAM, S.; LACOURREYE, L.; GUYLI, J.L.S. – Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in nonsmokers. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, **125**:513-516, 1997.
- FU, Y.S. & REAGAN, J.W. – Infectious and inflammatory diseases of the lower female genital tract. In: _____ - **Pathology of the Uterine Cervix, Vagina and Vulva**. Philadelphia. W. B. Saunders Company, 1989. p.61-118.

- GALE, N.; POLJAK, M.; KAMBIC, V.; FERLUGA, D.; FISCHINGER, J. – Laryngeal papillomatosis: molecular, histopathological, and clinical evaluation. **Virchows Archiv.**, **425**:291-295, 1994.
- GALL, J.G.; PARDUE, M.L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **63**:378-383, 1966.
- GALLO, O.; BIANCHI, S.; GIANNINI, A.; BOCCUZZI, S.; CALZOLARI, A.; FINI-STORCHI, O. – Lack of detection of human papillomavirus (HPV) in transformed laryngeal keratoses by in situ hybridization (ISH) technique. **Acta Otolaryngol. (Stockh)**, **114**:213-217, 1994.
- GARUTI, G.; BOSELI, F.; GENAZZANI, A.R.; SILVESTRI, S.; RATTI, G. – Detection and typing of human papillomavirus specimens by in situ hybridization with biotinylated DNA probes. **Am. J. Clin. Pathol.**, **92**:604-612, 1989.
- GILLIS, T.M.; INCZE, J.; STRONG, M.S.; VAUGHAN, C.W.; SIMPSON, G.T. – Natural history and management of keratosis, atypia, carcinoma in-situ and micro-invasive cancer of the larynx. **Am. J. Surg.**, **146**:512-516, 1983.
- GOURGOLIS, V.; RASSIDAKIS, G.; KARAMERIS, A.; GIATROMANOLAKI, A.; BARBATIS, C.; KITTAS, C. – Expression of p53 protein in laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia: possible correlation with human papillomavirus infection and clinicopathological findings. **Virchows Arch. A. Pathol. A**:481-489, 1994.
- GREER, C.E.; PETERSON, S.L.; KIVIAT, N.B.; MANOS, M. – PCR amplification from paraffin-embedded tissues: effects of fixative and fixation time. **Am. J. Clin. Pathol.**, **95**:117-124, 1991.
- GUPTA, J.W.; SAITO, K.; SAITO, A.; FU, Y.S.; SHAH, K.V. – Human papillomaviruses and the pathogenesis of cervical neoplasia. A study by in situ hybridization. **Cancer**, **64**:2104-2110, 1989.

- GUPTA, K.P. – Microbiology, inflammation, and viral infections. In: BIBBO, M. – **Comprehensive Cytopathology**. 2. ed. Philadelphia. W. B. Saunders Company, 1997. p.125-160.
- HART, T.C.- Applications of molecular epidemiology to head and neck cancer. **Otolaryngol. Clin. North. Am.**, **30**:21-33, 1997.
- HERRINGTON, C.S. – Control of HPV replication: implications for squamous neoplasia. **J. Pathol.**, **178**:237-238, 1996. [Editorial]
- HERRINGTON, C.S. – Human papillomaviruses and cervical neoplasia. I. Classification, virology, pathology, and epidemiology. **J. Clin. Pathol.**, **47**:1066-1072, 1994.
- HERRINGTON, C.S. – Human papillomaviruses and cervical neoplasia. II. Interaction of HPV with other factors. **J. Clin. Pathol.**, **48**:1-6, 1995.
- 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 carcinoma by polymerase chain reaction. **Laryngoscope**, **100**:647-650, 1990.
- KAHN, T.; SCHWARZ, E.; ZUR HAUSEN, H. – Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. **Int. J. Cancer**, **37**:61-65, 1986.
- KASHIMA, H.; MOUNTS, P.; KUHAJDA, F.; LOURY, M. – Demonstration of human papillomavirus capsid antigen in carcinoma in situ of the larynx. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, **95**:603-607, 1986.
- KASHIMA, H.; WU, T.C.; MOUNTS, P.; HEFFNER, D.; CACHAY, A.; HYAMS, V. – Carcinoma ex-papiloma: histologic and virologic studies in whole-organ sections of the larynx. **Laryngoscope**, **98**: 619-624, 1988.

- KIENE, P.; MILDE-LANGOSCH, K.; RUNKEL, M.; SCHULZ, K.; LÖNIG, T. - A simple and rapid technique to process formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for the detection of viruses by the polymerase chain reaction., **Virchows Arch. A. Pathol. A**:420: 269-273, 1992.
- KIERCHNER, J.A.; CARTER, D. - The larynx. In: STERNBERG, S.S. - **Diagnostic Surgical Pathology**. 2.ed. New York. Raven Press, 1994. p.893-916.
- KIM, M.S.; SHIN, K.; BAEK, J.; CHERRICK, H.M.; PARK, N. - HPV-16, Tobacco-specific N-nitrosamine, and N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in oral carcinogenesis. **Cancer Res.**, **53**:4811-4816, 1993.
- KIYABU, M.T.; SHIBATA, D.; ARNHEIN, N.; MARTIN, W.J.; FITZGIBBONS, P.L. - Detection of human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. **Am. J. Surg. Pathol.**, **13**:221-224, 1989.
- KLOZAR, J.; TAUDY, M.; BETKA, J.; KANA, R. - Laryngeal papilloma - Precancerous condition ? **Acta Otolaryngol. (Stockh)**, (suppl 527) : 100-102, 1997.
- KOUFMAN, J.A. & BURKE, A.J. - The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. **Otolaryngol. Clin. North. Am.**, **30**:1-19, 1997.
- KOUFMAN, J.A.- The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease (GERD): a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24-hour pH monitoring and an experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury. **Laryngoscope** **101**(suppl 53), 1991.
- 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 types 6/11/16/18 by filter in situ hybridization. **Am J. Clin. Pathol.**, **94**:566-570, 1990.
- LA VECCHIA, C.; NEGRI, E.; D'AVANZO, B.; FRANCESCHI, S.; DECARLI, A.; BOYLE, P. - Dietary indicators of laryngeal cancer risk. **Cancer Res.**, **50**:4497-4500, 1990.

- 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 the polymerase chain reaction. **Am. J. Pathol.**, **135**:1179-1184, 1989.
- LEVINE, A.J. – Tumor supressor genes. **Scient. Am. Science and Medicine**, **02**:28-37, 1995.
- LIE, A.K.; SKJELDESTAD, F.E.; JOHANNESSEN, E.; SKARSVAG, S.; HAUGEN, O.A. – Comparison of light microscopy, in situ hybridization and polymerase chain reaction for detection of human papillomavirus in histological tissue of cervical intraepithelial neoplasia. **APMIS**, **105**:115-120, 1997.
- LIE, E.S.; HEYDEN, A.; JOHANNESSEN, M.K.; BOYSEN, M.; BRANDTZAEG, P. – Detection of human papillomavirus in routinely processed biopsy specimens from laryngeal papillomas: evaluation of reproducibility of polymerase chain reaction and DNA in situ hybridization procedures. **Acta Otolaryngol (Stockh)**, **116**:627-632, 1996.
- LIE, E.S.; KARLSEN, F.; HOLM, R. – Presence of human papillomavirus in squamous cell laryngeal carcinomas. A study of thirty-nine cases using polymerase chain reaction and in situ hybridization. **Acta Otolaryngol (Stockh)**, **116**:900-905, 1996.
- LIN, K.Y.; WESTRA, W.H.; KASHIMA, H.K.; MOUNTS, P.; WU, T.C. – Coinfection of HPV-11 and HPV-16 in a case of laryngeal squamous papillomas with severe dysplasia. **Laryngoscope**, **107**:942-947, 1997.
- LINDEBERG, H. & KROGDAHL, A. – Laryngeal dysplasia and the human papillomavirus. **Clin. Otolaryngol.**, **22**:382-386, 1997.
- LINDEBERG, H.; SYRJÄNEN, S.; KÄRJÄ, J.; SYRJÄNEN, K. – Human papillomavirus type 11 DNA in squamous cell carcinomas and pre-existing multiple laryngeal papillomas. **Acta Otolaryngol. (Stockh)**, **107**:141-149, 1989.
- McKAIG, R.G.; BARIC, R.S.; OLSHAN, A.F. – Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular pathology. **Head Neck**, **20**: 250-265, 1998.

- McNICOL, A.M. & FARQUHARSON, M.A. – In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. **J. Pathol.**, **182**:250-261, 1997.
- MEISELS, A. & FORTIN, R. – Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. **Acta Cytol.**, **20**:505-509, 1976.
- MEISELS, A. & MORIN, C. – Technical considerations. In: _____ - **Cytopathology of the uterus**. 2 ed. Chicago. ASCP Press, 1997b. p. 403-483.
- MEISELS, A. & MORIN, C. – The human papillomavirus and cancer of the uterine cervix. In: _____ - **Cytopathology of the uterus**. 2 ed. Chicago. ASCP Press, 1997a. p.185-226.
- MICHAELS, L. - The larynx and hypopharynx. Squamous cell carcinoma: epidemiology, early lesions, biopsy diagnosis. In: _____ - **Ear, Nose and Throat Histopathology**. London. Springer-Verlag, 1987a. p. 371-384.
- MICHAELS, L. – The larynx and hypopharynx. Pathology of squamous cell carcinoma. In: _____ - **Ear, Nose and Throat Histopathology**. London. Springer-Verlag, 1987c. p. 385-404.
- MICHAELS, L. – The larynx and hypopharynx. Squamous cell papilloma. In: _____ - **Ear, Nose and Throat Histopathology**. London. Springer-Verlag, 1987b. p. 361-369.
- MORGAN, D.W.; ABDULLAH, V.; QUINEY, R.; MYNT, S. - Human papillomavirus and carcinoma of the laryngopharynx. **J. Laryngol. Otol.**, **105**:288-290, 1991.
- MORRIS, R.G.; ARENDS, M.J.; BISHOP, P.E.; SIZER, K.; DUVALL, E.; BIRD, C.C. – Sensitivity of digoxigenin and biotin labelled probes for detection of human papillomavirus by in situ hybridization. **J. Clin. Pathol.**, **43**:800-805, 1990.
- MULLIS, B.K. – The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scient. Am.**, **262**:56-65, 1990.

- MULTHAUPT, H.A.B.; FESSLER, J.N.; WARHOL, M.J. – Detection of human papillomavirus in laryngeal lesions by in situ hybridization. **Hum. Pathol.**, **25**: 1302-1305, 1994.
- MUSCAT, J.; WYNDER, E.L. – Tobacco, alcohol, asbestos, and occupational risk factors for laryngeal cancer. **Cancer**, **69**:2244-2251, 1992.
- NUNEZ, D. A.; ASTLEY, S.M.; LEWIS, F.A.; WELLS, M. – Human papilloma viruses: a study of their prevalence in the normal larynx. **J. Laryngol. Otol.**, **108**:319-320, 1994.
- NUOVO, G.J. – Molecular biology for the pathologist. In: _____ - **Cytopathology of the Lower Female Genital Tract: an integrated approach**. Baltimore. Williams & Wilkins, 1994. p. 133-154.
- OLINER, J.D.- The role of p53 in cancer development. **Scient. Am. Science and Medicine**, **01**:16-25, 1994.
- OSTWALD, C.; MÜLLER, P.; BARTEN, M.; RUTSATZ, K.; SONNENBURG, M.; MILDE-LANGOSCH, K.; LÖNIG, T. – Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. **J. Oral Pathol. Med.**, **23**:220-225, 1994.
- PAKARIAN, F.; KAYE, J.; CASON, J.; KELL, B.; JEWERS, R.; DERIAS, N.W.; RAJU, K.S.; BEST, J.M. – Cancer associated human papillomaviruses: perinatal transmission and persistence. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, **101**:514-517, 1994.
- PAN, L.X.; DISS, T.C.; ISAACSON, P.G. – The polymerase chain reaction in histopathology. **Histopathology**, **26**:201-217, 1995.
- PARK, T.W.; FUJIWARA, H.; WRIGHT, T. – Molecular biology of cervical cancer and its precursors. **Cancer**, **76**:1902-1913, 1995.
- PAVELIC, Z.P. & GLUCKMAN, J.L. – The role of p53 tumor supressor gene in human head and neck tumorigenesis. **Acta otolaryngol. (Stockh.)**, (suppl. **527**):21-24, 1997.

- PÉREZ-AYALA, M.; RUIZ-CABELLO, F.; ESTEBAN, F.; CONCHA, A.; REDONDO, M.; OLIVA, M.R.; CABRERA, T.; GARRIDO, F. – Presence of HPV sequences in laryngeal carcinomas. **Int. J. Cancer**, **46**:8-11, 1990.
- PODDIGHE, P.J.; BULTEN, J.; KERSTENS, H.M.J.; ROBBEN, J.C.M.; MELCHERS, W.J.G.; HANSELAAR, A.G.J.M. - Human papilloma virus detection by in situ hybridization signal amplification based on biotinylated tyramine deposition. **J. Clin. Pathol: Mol. Pathol.**, **49**:M340-344, 1996.
- POLJAK, M.; GALE, N.; KAMBIC, V. – Human papillomaviruses: a study of their prevalence in the epithelial hyperplastic lesions of the larynx. **Acta Otolaryngol. (Stockh.)**, (suppl.527) : 66-69, 1997.
- RAYBAUD-DIOGÈNE, H.; TÉTU, B.; MORENCY, R.; FORTIN, A.; MONTEIL, R.A. – p53 Overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. **Eur. J. Cancer**, **32B**:143-149, 1996.
- RIHKANEN, H.; PELTOMAA, J.; SYRJÄNEN, S. – Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in vocal cords without laryngeal papillomas. **Acta Otolaryngol. (Stockh.)**, **114**:348-351, 1994.
- RIMMEL, F.L.; SHOEMAKER, D.L.; POUL, A.M.; JORDAN, J.A.; POST, J.C.; EHRLICH, G.D. – Pediatric respiratory papillomatosis: prognostic role of viral typing and cofactors. **Laryngoscope**, **107**:915-918, 1997.
- SALAM, M.A.; CROCKER, J. MORRIS, A. – Over-expression of tumor suppressor gene p53 in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic significance. **Clin. Otolaryngol.**, **20**:49-52, 1995.
- SALAM, M.A.; ROCKETT, J.; MORRIS, A. – General primer-mediated polymerase chain reaction for simultaneous detection and typing of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinomas. **Clin. Otolaryngol.**, **20**:84-88, 1995.

- SCHEURLLEN, W.; STREMLAU, A.; GISSMANN, L.; HÖHN, D.; ZENNER, H.P.; ZUR HAUSEN, H. – Rearranged HPV 16 molecules in an anal and in a laryngeal carcinoma. **Int. J. Cancer**, **38**:671-676, 1986.
- SHEN, J.; TATE, J.E.; CRUM, C.P.; GOODMAN, M.L. – Prevalence of human papillomaviruses (HPV) in benign and malignant tumors of the upper respiratory tract. **Mod. Pathol.**, **09**:15-20, 1996.
- SHIDARA, K.; SUSUKI, T.; HARA, F.; NAKAJIMA, T. – Lack of association between human papillomavirus and ras gene point mutation in laryngeal carcinomas. **Laryngoscope**, **104**:1008-1012, 1994.
- SIMON, M.; KAHN, T.; SCHNEIDER, A.; PIRSIG, W. – Laryngeal carcinoma in 12-year-old child. Association with human papillomavirus 18 and 33. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, **120**:277-282, 1994.
- SNIDJERS, P.J.F.; SCHOLEN, A.G.M.; HART, C.A.; JONES, A.S.; VAUGHAN, E.D.; WOOLGAR, J.A.; MEIJER, C.J.L.M.; WALBOOMERS, J.M.M.; FIELD, J.K. – Prevalence of mucosotropic human papillomaviruses in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Int. J. Cancer**, **66**:464-469, 1996.
- STOLER, H.M. – In situ hybridization: a research technique or routine diagnostic test? **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **117**: 478-481, 1993.
- SYRJÄNEN, K.J. – Genital human papillomavirus (HPV) infections and their associations with squamous cell cancer: reappraisal of the morphologic, epidemiologic and DNA data. In: FENOGLIO-PREISER, C.M.; WOLFF, M.; RILKE, F. eds. - **Progress in Surgical Pathology**. USA, Field & Wood, 1992. p. 217-39. V. XII.
- SYRJÄNEN, S.; SYRJÄNEN, K.; MÄNTYJÄRVI, R.; COLLAN, Y.; KÄRJÄ, J. – Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinomas of the larynx demonstrated by in situ DNA hybridization. **ORL**, **49**:175-186, 1987.
- TOMMASINO, M. & CRAWFORD, L. – Human papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. **BioEssays**, **17**:509-518, 1995.

- TRIZNA, Z. & SCHANTZ, S.P. – Hereditary and environmental factors associated with risk and progression of head and neck cancer. **Otolaryngol. Clin. North. Am.**, **25**:1089-1103, 1992.
- VOKES, E.E.; WEICHSELBAUM, R.R.; LIPPMAN, S.M.; HONG, W.K. – Head and neck cancer. **N. Engl. J. Med.**, **328**:184-192, 1993.
- VOWLES, R.H.; MYNT, S.; CROFT, C.B. – The incidence and detection of HPV in the upper aerodigestive tract using brush and biopsy techniques. **J. Laryngol. Otol.**, **111**:215-217, 1997.
- WALBOOMERS, J.M.M. & MEIJER, C.J.L.M.- Do HPV-negative cervical carcinomas exist ? **J.Pathol.**, **181**:253-254,1997. [Editorial]
- WARD, P.H. & HANSON, D.G. – Reflux as an etiological factor of carcinoma of the laryngopharynx. **Laryngoscope**, **98**:1195-1199, 1988.
- WICZYNSKY, S.P.; LIN, B.T.Y.; XIE, Y.; PAZ, B. – Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. **Am. J. Pathol.**, **152**:145-156, 1998.
- WIENER, G.J.; KOUFMAN, J.A.; WU, W.C.; COOPER, J.B.; RICHTER, J.E.; CASTELL, D.O. – Chronic hoarseness secondary to gastroesophageal reflux disease: documentation with 24-H ambulatory pH monitoring. **Am. J. Gastroenterol.**, **84**:1503-1508, 1989.
- WILBUR, D.C.; REICHMAN, R.C.; STOLER, M.H. – Detection of infection by human papillomavirus in genital condylomata: a comparison study using immunocytochemistry and in situ nucleic acid hybridization. **Am. J. Clin. Pathol.**, **89**:505-510, 1988.
- WRIGHT, P.A. & WYNFORD-THOMAS, D. – The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. **J. Pathol.**, **162**:99-117, 1990.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – International Histological Classification of Tumors. Histological Classification of Tumors of the Upper Respiratory Tract and Ear.Berlin, Springer-Verlag, 1991. 200p.

WRIGHT, P.A. & WYNFORD-THOMAS, D. – The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. **J. Pathol.**, **162**:99-117, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – International Histological Classification of Tumors. Histological Classification of Tumors of the Upper Respiratory Tract and Ear. Berlin, Springer-Verlag, 1991. 200p.

YEUDALL, W.A. – Human papillomaviruses and oral neoplasia. **Eur. J. Cancer**, **28B**:61-66, 1992.

ZAROD, A.P.; RUTHERFORD, J.D.; CORBITT, G. – Malignant progression of laryngeal papilloma associated with human papilloma virus type 6 (HPV-6) DNA. **J. Clin. Pathol.**, **41**:280-283, 1988.

ZEHBE, I. & WILANDER, E. – Human papillomavirus infection and invasive cervical neoplasia: a study of prevalence and morphology. **J. Pathol.**, **181**:270-275, 1997.

ZUR HAUSEN, H. – Are human papillomavirus infections not necessary or sufficient causal factors for invasive cancer of the cervix ? **Int. J. Cancer**, **63**:315-316, 1995. [Letter]

ZUR HAUSEN, H. – Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. **Cancer Res.**, **49**:4677-4681, 1989.

* HERANI, M.L.G. – Normas para apresentação de dissertações e teses. São Paulo, BIREME, 1990. 45p.