

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas

**“Antígenos Leucocitários Humanos Não- Clássicos HLA-G e HLA-E
em lesões benignas, pré-malignas e malignas de laringe associadas à
infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV).”**

Mestranda: Tarsia Giabardo Alves Silva
Orientadora: Profa. Dra. Christiane Pienna Soares

Araraquara

2009

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas

**“Antígenos Leucocitários Humanos Não- Clássicos HLA-G e HLA-E
em lesões benignas, pré-malignas e malignas de laringe associadas à
infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV).”**

**Dissertação apresentada ao curso de Pós -
graduação em Biociências e Biotecnologia
Aplicados à Farmácia da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas – UNESP –
Araraquara como pré-requisito para
obtenção do título de mestre.**

Mestranda: Tarsia Giabardo Alves Silva
Orientadora: Profa. Dra. Christiane Pienna Soares

Araraquara

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Silva, Tarsia Giabardo Alves

S586a Antígenos leucocitários humanos não- clássicos HLA-G e HLA-E em lesões benignas, pré-malignas de laringe associadas à infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). / Tarsia Giabardo Alves Silva. – Araraquara, 2009.
134 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Christiane Pienna Soares

.
1.HLA-G. 2.HLA-E. 3.HPV. 4.Lesões de laringe. 5.Imunohistoquímica.
6. PCR. I.Soares, Christiane Pienna, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Christiane Pienna Soares (orientadora e presidente)

Profa. Dra. Rubens Rodrigues dos Santos Junior (membro titular)

Profa. Dr. Luis Carlos Spolidorio (membro titular)

Prof. Dra. Janaína Critiana de Oliveira Crispim Freitas (membro suplente)

Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi (membro suplente)

Araraquara, 17 de Fevereiro de 2009

*“Foi o tempo que dedicastes a tua rosa,
que fez a tua rosa tão importante.”*

Antoine Saint Exupéry

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha mãe **Marlei** e ao meu irmão **Raphael**, que não só estiveram sempre ao meu lado, mas nos bastidores deste trabalho, onde só os mais íntimos podem estar, vivenciando toda a trajetória, incentivando, consolando, aplaudindo. Foram meu leme e minha bússola. **Amo muito vocês.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a minha orientadora, **Profa. Dra. Christiane Pienna Soares**, por ter aceitado me orientar e desenvolver comigo este trabalho, por seu exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa.

À **Dra. Janaina Cristiana de Oliveira Crispim Freitas**, por sua disponibilidade irrestrita, sua forma crítica e criativa de argüir as idéias apresentadas, facilitando o alcance dos objetivos deste trabalho. *“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.” Albert Einstein.*

Ao **Prof. Dr. Edson Garcia Soares**, pela atenção e disponibilidade com a qual sempre me atendeu em seu laboratório, e que teve um papel fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

Aos **Membros da Banca Examinadora**, pela disponibilidade de análise deste trabalho, enriquecendo-o com suas críticas e sugestões.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Pizzolitto**, o meu primeiro modelo de professor, por lições que não podem ser aprendidas em livros. *“Genialidade é esforço.” Johann Goethe.*

Aos meus tios **Luis Antônio** e **Mariângela**, que me estimulam a crescer científica, ética, profissional e pessoalmente, desde sempre. Meus sinceros agradecimentos.

Aos meus avós **Aloísio** e **Antônia**, e ao meu pai, **Vlamir**, pelo ininterrupto estímulo à minha vida acadêmica e por todo carinho de vocês.

Aos meus **grandes amigos do laboratório de Citologia e Biologia Celular**, pela convivência extremamente amigável, pelos ensinamentos e pelas alegrias que marcaram estes anos. Angélica, Camila, Elaine, Heloísa, Isabel, Júlia, Juliana, Maria Isabel, Mauro, Renata e Roberta. Meus afetivos agradecimentos.

Ao **peçoal do laboratório de Patologia do Campus da USP de Ribeirão Preto**, Fabiana, Márcia, Marcela e Ana, pelo carinho com o qual me atenderam, me auxiliando sempre de forma atenciosa e solícita.

Aos meus ternos e eternos amigos, **Ana, Andréa, Fábio, Messias**, pelo apoio moral e pelas alegrias que me proporcionaram, marcando estes últimos anos. “*A amizade é um amor que nunca morre.*” *Mário Quintana.*

Ao meu valioso amigo Jair pelo grande incentivo e amparo, sempre torcendo por mim até o final desta jornada, auxiliando-me em todos os momentos em que precisei.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro possibilitando o desenvolvimento desta dissertação.

RESUMO

O câncer de laringe é a segunda neoplasia mais comum da região de cabeça e pescoço em todo o mundo. Além dos fatores de risco como fumo e consumo de álcool, o desenvolvimento do câncer de laringe parece estar associado à infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). As moléculas HLA-G e HLA-E são moléculas HLA de classe I não- clássicas, que desempenham um papel no estabelecimento da manutenção da tolerância imunológica através da inibição de funções de células imunocompetentes. O presente estudo tem como objetivo avaliar a expressão de HLA-G e HLA-E pela técnica imunohistoquímica em biópsias laríngeas de 109 pacientes, 27 lesões benignas (papiloma laríngeo), 17 lesões pré- malignas (displasia leve, moderada ou acentuada), 10 carcinomas *in situ* de laringe, 27 carcinomas invasores sem metástase, 28 carcinomas invasores com metástase. Além das biópsias avaliadas, também foram analisadas 28 linfonodos cervicais dos pacientes com metástases. A molécula de HLA-G foi detectada em 45% das biópsias analisadas. Dentre os diferentes graus histológicos, a expressão da molécula HLA-G aparece aumentada nas lesões benignas, lesões pré- malignas e carcinomas *in situ* de laringe, e essa expressão diminui nos carcinomas invasores sem metástase, carcinomas invasores com metástase e nos linfonodos. HLA-E foi detectado em 62,04% das lesões como um todo, havendo um aumento da expressão de HLA-E nas lesões invasivas e nos linfonodos. Esta molécula parece estar associada com a instalação do carcinoma laríngeo. A frequência do DNA do HPV foi baixa, sugerindo que o câncer de laringe esteja associado a outros fatores de risco.

Palavras-chave: HLA-G, HLA-E, HPV, lesões de laringe, imunohistoquímica, PCR.

ABSTRACT

Laryngeal carcinoma is a second common malignant tumor of the head and neck around the world. Besides well-established risk factors like smoking and alcohol abuse, the development of laryngeal carcinoma is associated with human papillomavirus (HPV) infection. HLA-G and HLA-E are two non-classical class I molecules. Their antigens play a role in the establishment and maintenance of immune tolerance by inhibiting the functions of immunocompetent cells. The aim of the present retrospective study was to determine the expression of HLA-G and HLA-E immunoperoxidase in laryngeal biopsies from 109 patients, 27 in benign lesions (laryngeal papillomas), 17 premalignant lesions (low, moderate or severe dysplasia), 10 in situ laryngeal carcinomas, 27 laryngeal carcinomas without metastases, 28 laryngeal carcinomas with metastases. Besides all biopsies evaluated, were also analyzed 28 biopsies of patients with cervical lymph node metastases. The HLA-G molecule was detected in 45% of biopsies analyzed. Among the different histological grades, the expression of HLA-G molecule is increased in benign lesions, premalignant lesions and in situ laryngeal carcinomas, and this expression decreases in invasive carcinoma without metastasis, invasive carcinoma with metastasis and lymph nodes. HLA-E was detected in 62.04% of the lesions as a whole, with increased expression of HLA-E in invasive lesions and lymph nodes. This molecule seems to be associated with the installation of laryngeal carcinoma. The frequency of HPV DNA was low, suggesting that cancer of the larynx is associated with other risk factors.

Key Words: HLA-G, HLA-E, HPV, laryngeal lesions, immunohistochemistry, PCR.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática do Genoma do Papilomavírus Humano.....	27
FIGURA 2. Representação esquemática do Ciclo de Vida do HPV.....	30
FIGURA 3. Representação esquemática do efeito das oncoproteínas E6 e E7 do HPV em células de mamíferos.....	37
FIGURA 4. Representação esquemática do transcrito primário de HLA-G e das múltiplas isoformas.....	45
FIGURA 5. Representação esquemática da atuação de HLA-G através de sua ligação aos receptores inibitórios.....	48
FIGURA 6. Representação esquemática da supressão imune local de emergência: um possível impacto de trogocitose de HLA-G sobre as respostas imunes.....	51
FIGURA 7. Estratificação dos subgrupos de lesões de laringe segundo o seu diagnóstico histopatológico	69
FIGURA 8. Reação de imunoperoxidase para HLA-G com marcação castanha no citoplasma em lesões de laringe.....	76

FIGURA 9. Reação de imunoperoxidase para HLA-E com marcação castanha no citoplasma em lesões de laringe.....	80
FIGURA 10. Análise quantitativa da expressão de HLA-G e HLA-E em lesões de laringe segundo o diagnóstico histopatológico.....	81
FIGURA 11. Reação de polimerização em cadeia (PCR) em gel de poliacrilamida 10%.....	84
FIGURA 12. Expressão qualitativa de HLA-G entre as lesões de laringe em biópsias positivas para os tipos de HPV encontrados.....	86
FIGURA 13. Expressão qualitativa de HLA-E entre as lesões de laringe em biópsias positivas para os tipos de HPV encontrados.....	87
FIGURA 14. Expressão qualitativa de HLA-G e HLA-E em relação à presença de HPV.....	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Característica das regiões regulatórias (ORFs) do Papilomavírus Humano.....	28
TABELA 2. Parâmetros clínico- epidemiológicos de 109 pacientes com lesões de laringe estratificadas segundo seu diagnóstico histológico.....	71
TABELA 3. Expressão qualitativa e quantitativa de HLA-G entre as lesões de laringe estratificadas segundo o diagnóstico histológico.....	74
TABELA 4. Características clínico- epidemiológicas dos 109 pacientes, estratificadas de acordo com a expressão qualitativa da molécula de HLA-G em biópsia.....	75
TABELA 5. Expressão qualitativa e quantitativa de HLA-E entre as lesões de laringe estratificadas segundo o diagnóstico histológico.....	78
TABELA 6. Características clínico- epidemiológicas dos 109 pacientes, estratificadas de acordo com a expressão qualitativa da molécula de HLA-E em biópsia.....	79
TABELA 7. Detecção do DNA do HPV (GP5+/GP6+) e tipificação (primers específicos) em 125 biópsias (*) com lesões de laringe estratificadas segundo diagnóstico histológico.....	83

TABELA 8. Expressão qualitativa e quantitativa de HLA-G entre as lesões de laringe em biópsias positivas para os tipos de HPV encontrados.....85

TABELA 9. Expressão qualitativa e quantitativa de HLA-E entre as lesões de laringe em biópsias positivas para os tipos de HPV encontrados.....87

ABREVIATURAS

CLIS – carcinoma *in situ*

CLM – carcinoma invasor com metástase

CLS – carcinoma invasor sem metástase

DNA – ácido desoxirribonucléico

E – *early*

EGFR – receptor de fator de crescimento epidermal

G – Gravidade

GM-CSF - fator estimulante de colônia de granulócitos- macrófagos

HCl – Ácido clorídrico

HLA-E – Antígeno Leucocitário Humano-E

HLA-G – Antígeno Leucocitário Humano-G

HPV – Papiloma vírus humano

IFN – *Interferon*

IL - interleucina

LIF - fator inibitório de leucócitos

L – *late*

LB – lesão benigna

LCR – *Long control region*

LPM – lesão pré- maligna

LN – linfonodo cervical

ml – mililitros

mg – miligrama

MHC - *Major Histocompatibility Complex*

OFR – *Open reading frames*

pb – pares de base

PBS – Solução salina tamponada

PBS/BSA - Solução salina tamponada com solução de albumina bovina

PCR – Reação de polimerase em cadeia

PRR - Papilomatose Respiratória Recorrente

Rb - Retinoblastoma

URR - *Upstream Regulatory Region*

SUMÁRIO

Resumo.....	9
Abstract.....	10
Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas.....	13
Abreviaturas.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Câncer de Laringe.....	19
1.1.1. Fatores de Risco.....	21
1.2. HPV e o Câncer de Laringe.....	22
1.3. Biologia do HPV.....	25
1.4. Ciclo de Vida do HPV.....	29
1.5. Integração Viral e Risco Oncogênico.....	33
1.6. HPV e o Descontrole do Ciclo Celular.....	35
1.7. Evasão da Resposta Imunológica do HPV e do Câncer.....	38
1.8. Complexo Principal de Histocompatibilidade.....	41
1.8.1. Molécula de CPH não-clássica - HLA-G.....	43
1.8.1.1. Isoformas de HLA-G.....	45
1.8.1.2. Molécula HLA-G - Evasão da Resposta Imune Tumoral	46
1.8.2. Molécula de CPH não-clássica - HLA-E.....	52
2. OBJETIVOS.....	54
2.1. Objetivo Geral.....	55
2.2. Objetivos Específicos.....	55

3. MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1. Casuística.....	57
3.1.1. Pacientes Estudados.....	57
3.1.2. Biópsias de Laringe.....	57
3.2. Metodologias.....	58
3.2.1. Reação de Imunohistoquímica (HLA-G e HLA-E).....	58
3.2.1.1. Controles.....	59
3.2.1.2. Análise Qualitativa da Expressão de HLA-G e HLA-E... ..	60
3.2.1.3. Análise Quantitativa da Expressão de HLA-G e HLA-E.....	60
3.2.2. Detecção e Tipagem do HPV.....	61
3.2.2.1. Controles.....	61
3.2.2.2. Extração de DNA Genômico de Tecido Parafinizado.....	61
3.2.2.3. Amplificação do Gene e Betaglobina e do HPV (Região Consenso).....	62
3.2.2.4. Amplificação com Iniciadores Tipo Específicos (HPV 6, HPV 11, HPV 16, HPV 18, HPV 31 e HPV 33).....	63
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
5. RESULTADOS	68
5.1. Análise da Biópsias Laríngeas dos Pacientes Estudados.....	69
5.2. Expressão da Molécula HLA-G.....	73
5.3. Expressão da Molécula HLA-E.....	77
5.4. Métodos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	81
6. DISCUSSÃO	89
7. CONCLUSÕES	99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER DE LARINGE

Mundialmente considerado como um problema de saúde pública, o câncer representa a terceira causa de morte no Brasil e segundo dados do Ministério da Saúde as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 novos casos de câncer. Anualmente, mais de 900.000 pessoas recebem o diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço (CHIN et al., 2006) e aproximadamente 350.000 pacientes morrem desta doença (FERLAY et al., 2004). Devido a estes números, este tipo de câncer é considerado o sexto mais comum no mundo (ST JOHN et al., 2006).

O câncer de cabeça e pescoço é caracterizado por neoplasias malignas que acometem as regiões da cavidade oral, faringe e laringe. A laringe é o segundo sítio mais suscetível desta região, representando cerca de 25% dos tumores malignos de cabeça e pescoço e 2% de todas as doenças malignas (FERLAY et al., 2004; DOBROSSY, 2005).

Mais de 90% de todos os cânceres de laringe são carcinomas de células escamosas com variados graus de diferenciação histológica (EUROCIM, 1997; GOODWIN et al., 2008). Em um estudo realizado na região metropolitana de São Paulo - Brasil, 93,7% dos cânceres encontrados foram classificados como carcinoma de células escamosas, 0,8%e como carcinoma “não específico”, 0,8% como carcinoma verrucoso, 0,8% como adenocarcinoma tubular e 0,8% como carcinoma neuroendócrino (SARTOR, 2007).

Na Europa, Ferlay e colaboradores (2004) estimaram para ano de 2006 mais de 42.100 novos casos de câncer de laringe entre homens e 3.800 casos entre mulheres e

destes, 19.200 homens e 1.800 mulheres irão ao óbito em decorrência da doença. Em relação ao caráter epidemiológico da doença, estudos em diversos países demonstraram uma alta incidência de câncer de laringe entre o sexo masculino e negros (POLEDNAK, 2007; GOODWIN et al., 2008).

No Brasil, um estudo realizado na cidade de Goiânia - GO entre 1995 e 1998 demonstrou uma taxa de 6,4 casos de câncer de laringe por 100.000 homens, enquanto outro estudo na cidade de São Paulo apresentou 14,9 por 100.000 homens; em relação às mulheres as taxas foram de 1,5 em Goiânia e 1,8 em São Paulo (PARKIN et al., 2002; MIRRA et al., 2001). Este tipo de câncer é raro em pacientes jovens, sendo predominantemente encontrado em pacientes com idade entre 50-70 anos (WÜNSCH-FILHO, 2004). Entre a população masculina européia, a incidência de câncer de laringe aumenta com a idade com a maior parte dos carcinomas sendo diagnosticados em indivíduos com 65 anos ou mais (cerca de 45% de todos os casos), e um pico de incidência na sexta e sétima décadas com cerca de 50 novos casos por ano a cada 100.000 indivíduos (FERLAY et al., 2004).

O prognóstico do câncer de laringe varia consideravelmente de acordo com o sítio anatômico de origem do tumor, sendo que este afeta o aparecimento dos primeiros sintomas e, por conseguinte, o diagnóstico e a viabilidade cirúrgica (LICITRA et al., 2003). Aproximadamente 2/3 dos cânceres de laringe surgem na corda vocal verdadeira e 1/3 acomete a laringe supraglótica. O câncer supraglótico apresenta o sinal de odinofagia (dor de garganta) e o glótico e subglótico apresentam os sinais de rouquidão. O câncer supraglótico geralmente é acompanhado de outros sinais e sintomas como a alteração na qualidade da voz, disfagia leve (dificuldade de engolir) e sensação de um nódulo na garganta. Nas lesões avançadas das cordas vocais, além da rouquidão pode ocorrer dor na garganta, disfagia e dispnéia (INCA, 2008); estes são todos sinais e

sintomas presentes na fase inicial ou moderadamente avançada do tumor (LICITRA et al., 2003).

A probabilidade de reincidência da doença também está fortemente associada ao sítio anatômico do tumor. Na glote a probabilidade de reincidência é de 4%, na supraglote é de 16%, na subglote é de 11%, nas pregas ariepiglóticas aproximadamente 22%, enquanto que o risco de metástase distante é de 4% no caso de tumores glóticos e supraglóticos, e 15% para tumores subglóticos e de pregas ariepiglóticas (SPECTOR et al., 2001).

1.1.1. FATORES DE RISCO

Há uma marcante heterogeneidade do desenvolvimento e agravamento do câncer de laringe entre as regiões geográficas não só brasileira como no mundo todo. Essas diferenças estão relacionadas principalmente ao desenvolvimento econômico, à dieta, ao tabagismo, ao álcool, às viroses e a exposições ambientais e ocupacionais, que de alguma forma estão ligados também às desigualdades sociais (OTERO et al., 2007).

Os principais fatores de riscos relacionados ao câncer de laringe são o consumo de álcool e o hábito tabagista (HASHIBE et al., 2007; FREEDMAN et al., 2007; LA VECCHIA et al., 2008), sendo que a associação destes fatores pode multiplicar os riscos para a doença (TUYNS et al., 1988; STURGIS et al. 2004; SHANGINA et al., 2006). O cigarro contém uma mistura de pelo menos 50 componentes, incluindo carcinógenos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, nitrosaminas, aldeídos e aminas aromáticas (SCULLY et al., 2000). Muitos desses componentes formam aductos com o DNA, sendo que fumantes apresentam uma maior quantidade de aductos e de quebras no DNA em tecidos de laringe do que não-fumantes (SZYFTER et al., 1994;

PHILLIPS, 2002). Por sua vez, a bebida alcoólica contém carcinógenos e pró-carcinógenos, incluindo o etanol, que quando metabolizado produz o acetaldeído, cujas propriedades citotóxicas levam à produção de radicais livres e bases hidroxiladas do DNA (SCULLY et al., 2000).

Um recente estudo também mostrou evidências de que a carcinogenicidade, não só a de laringe mas de outros órgãos, pode surgir da exposição ocupacional a agentes tóxicos, tais como: o gás mostarda, corantes capilares, níquel, pó de madeira, produtos de borracha, fumaça de diesel/gasolina, formaldeído, amianto, solventes orgânicos, óleo mineral e carvão em pó (SHANGINA et al., 2006).

Outros fatores de risco têm sido associados ao câncer de laringe, como a deficiência de micronutrientes (GARAVELLO et al., 2008), o refluxo (GALLI et al., 2002) e a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) (POETKER et al., 2002; XAVIER et al., 2005; RAGIN et al., 2007).

1.2. HPV E O CÂNCER DE LARINGE

A prevalência epidemiológica da infecção pelo HPV na população em geral varia de acordo com diferentes fatores. A ligação existente entre HPV e cânceres de cabeça e pescoço de células escamosas foi primeiramente estudada a pouco mais de 20 anos (SYRJANEN et al., 1987). Recentemente, muitos estudos têm abordado a presença e a prevalência de HPV nestes tipos de tumores (HOBBS et al., 2006; TRAN et al., 2007; PSYRRI et al., 2008), sendo então o HPV considerado como um potencial fator de risco para carcinomas do trato respiratório superior, afetando desta forma a laringe (PINTOS et al., 1999; MANJARREZ et al., 2006; ERICH et al., 2007).

As formas de contaminação da laringe e transmissão do vírus são algumas vezes especulativas. As infecções na laringe, faringe e esôfago podem ocorrer principalmente no parto, quando o recém-nascido atravessa o canal vaginal e entra em contato com o fluido local contaminado. A contaminação puerperal é uma das explicações para a presença viral na cavidade oral, laringe e esôfago. Além disso, a transmissão orogenital é outra hipótese plausível e que explicaria a presença dos tipos anogenitais de HPV na orofaringe (ZUR HAUSEN, 1996).

A importância dos tipos de HPVs de baixo potencial oncogênico para o desenvolvimento de papilomas laríngeos está bem estabelecida e os tipos de HPV predominantemente presentes são os HPV 6 e 11 (HERRERO et al., 2003; MADKAN et al., 2007), os quais são agentes etiológicos da papilomatose laríngea. Existem quatro formas diferenciadas de papilomas laríngeos em função da característica clínica e da história natural da doença, bem como seu surgimento, sendo estes: Papilomatose juvenil isolada, juvenil múltipla, adulta isolada e adulta múltipla (MADKAN et al., 2007; TORRENTE et al., 2007). Mais recentemente, essa nomenclatura tem sido substituída pela Papilomatose Respiratória Recorrente (PRR), que descreve com mais precisão a extensão da doença e a sua tendência para reincidência (DERKAY et al., 2001; MUENSCHER et al., 2008).

Lesões pré-malignas de laringe são definidas como tecidos morfológicamente alterados nos quais a ocorrência de câncer é mais provável do que em tecidos aparentemente normais. Estas são conhecidas clinicamente como leucoplasias ou eritroplasias (JONES et al., 1984). Seu potencial maligno varia consideravelmente e pode coexistir em uma única lesão, de modo que o exame patológico é indispensável para um diagnóstico claro e um julgamento preditivo (AZZIMONTI et al., 1999).

As lesões orais pré- malignas geralmente se desenvolvem devido a vários fatores, nomeadamente o tabaco e o álcool, e interações sinérgicas ou cooperativas da infecção pelo HPV com estes fatores podem desempenhar um papel na evolução para câncer (CRUZ et al., 1996). A detecção do DNA do HPV em lesões pré- malignas comprova que a infecção por HPV está envolvida com o desenvolvimento da lesão. Para cavidade oral, existe uma forte correlação entre HPV 16, 18, em lesões altamente displásicas, e em carcinomas invasivos (DONOFRIO et al., 1995).

O papel do HPV como agente etiológico do câncer foi reconhecido pela primeira vez no colo uterino (TRAN et al., 2007). Certos tipos de HPVs, agentes etiológicos da carcinogênese anogenital, foram propostos como agentes no desenvolvimento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. No entanto, a presença do DNA do HPV detectada por PCR nestes sítios anatômicos nem sempre é sinônimo de que o vírus é o agente etiológico do carcinoma, causando uma superestimação no número de casos (BADARACCO et al., 2007).

Sendo assim, persistem as dúvidas se o HPV está casualmente associado com o câncer e o com o seu desenvolvimento na região de cabeça e pescoço (HOBBS et al., 2006). Porém as evidências epidemiológicas e experimentais indicam o papel do Papilomavírus Humano nos cânceres de cabeça e pescoço (TRAN et al., 2007). Uma recente revisão sistemática de casos usando métodos baseados em PCR para detectar o genótipo do HPV em biópsias de câncer de cabeça e pescoço, mostrou significativamente uma maior prevalência do HPV em carcinomas de células escamosas da região orofaríngea do que da cavidade oral ou da laringe (KREIMER et al., 2005).

1.3. BIOLOGIA DO HPV

Os papilomavírus são vírus epiteliotróficos presentes na pele (cutaneotrófico) e mucosa (mucosotrófico) de vários animais. Nos seres humanos mais de 100 tipos já foram descritos (VILLA et al., 2003; TUNGTEAKKHUN et al., 2008). Os tipos de HPV encontrados com maior frequência no trato anogenital, aproximadamente 40 tipos virais, foram classificados por Muñoz e colaboradores segundo seu risco de malignidade na cérvix em: HPV de baixo risco, tipos virais que apresentam baixo potencial oncogênico (HPV 6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70, 72, 74, e 81) e HPV de alto risco, com elevado potencial oncogênico (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82) (ZUR HAUSEN, 2000; STANLEY, 2002; MUÑOZ et al., 2003; MADKAN et al., 2007).

O HPV é um vírus pertencente à família *Papovaviridae* do gênero *Papovavírus* identificado primeiramente por Strauss em 1949, sendo que desde então este vem sendo isolado em inúmeras espécies animais. As partículas virais completas não são envelopadas, estas são envolvidas por um capsídeo composto por duas proteínas estruturais que se organizam em 72 subunidades (capsômeros) num arranjo icosaédrico. Este pequeno vírus com 55 nanômetros (nm) de diâmetro possui um genoma circular em dupla fita de DNA contendo aproximadamente 8.000 pares de base (pb) e peso molecular de $5,2 \times 10^6$ Daltons (HOWLEY, 1994; ZUR HAUSEN, 2002; HOORY et al., 2008).

O genoma do HPV pode ser organizado em oito *Open Reading Frames* (ORFs) e pode ser dividido em dois domínios. A região não codificadora denominada *Long Control Region* (LCR) ou *Upstream Regulatory Region* (URR) (KANODIA et al., 2007; PSYRRI et al., 2008) possui aproximadamente 1.000 pb e está localizada entre os

genes L1 e o início da região E6 (Figura 1). Esta região não tem qualquer função codificadora protéica, mas ostenta a origem de replicação, bem como fatores de transcrição importantes na regulação da expressão de RNA polimerase II (ZHENG et al., 2006). A região LCR representa 15% do genoma viral e contém genes responsáveis pelo controle de replicação do HPV (SOUSA et al., 1990; CHEAH et al., 1998).

Um segundo domínio da partícula viral codifica as proteínas virais da região E (*early*) ou região precoce com aproximadamente 4.000 pb e a região L (*late*) ou região tardia com aproximadamente 3.000 pb que representam 45% e 40%, respectivamente, do seu genoma (HOWLEY, 1994; ZUR HAUSEN, 2002; PSYRRI et al., 2008).

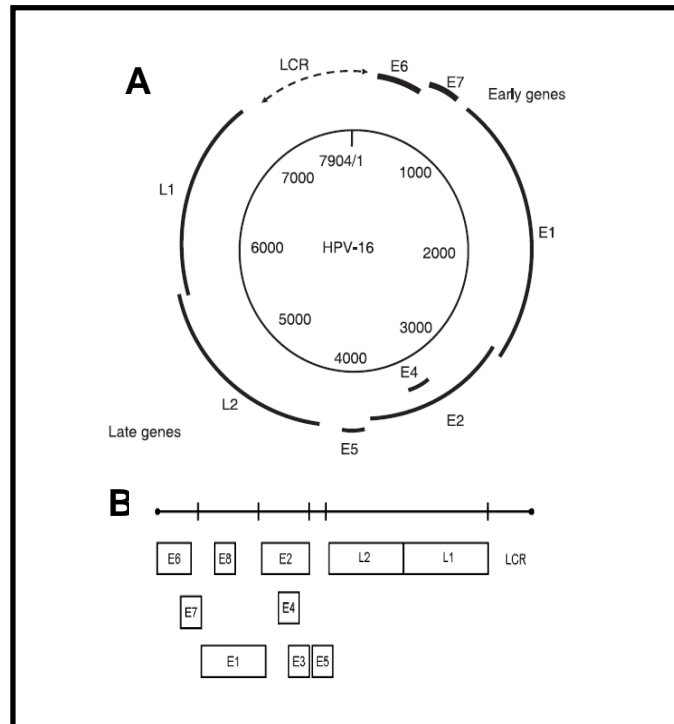


Figura 1. Representação esquemática do Genoma do Papilomavírus Humano. A) Genoma do Papilomavírus Humano (HPV), uma molécula circular em dupla fita de DNA contendo aproximadamente 8000 pares de base (pb). O mapa genético ilustrado é do HPV 16. ORFs (*Open Reading Frames*) são indicadas pelas linhas mais grossas. As seis ORFs precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) são expressas durante os diferentes estágios da diferenciação do epitélio. A região tardia, composta pelas ORFs L1 e L2, é expressa em células que estão replicando o DNA viral em células epiteliais da camada superficial (NARISAWA-SAITO et al., 2007). B) Genoma do HPV; genes precoces (E1-E6), genes tardios (L1 e L2) e LCR (*Long Control Region*) (TORRENTE, 2007).

A região E (*early*) é constituída por oito genes (E1- E8), sendo que E3 e E8 ainda não têm função conhecida (Tabela 1). Essa região codifica seis proteínas virais: E1, E2, E4, E5, E6 e E7, onde as proteínas E1, E2, E4 e E5 são recrutadas para replicação de DNA e as proteínas E6 e E7 nos HPVs de alto risco são responsáveis pelo processo de transformação e immortalização celular (ZUR HAUSEN, 2002; HEISE, 2003; TUNGTEAKKHUN et al., 2008). Como mencionado, a integração de HPV de alto risco pode resultar na instabilidade genômica e na immortalização da célula hospedeira.

A região L (*late*) codifica duas proteínas estruturais (L1 e L2) necessárias para a formação do capsídeo viral, conseqüentemente para a produção de partículas virais. Além desta existe uma região regulatória contendo a origem de replicação viral que controla a transcrição dos genes da região E (TUNGTEAKKHUN et al., 2008). As ORFs L1 (proteína principal maior de 54 KDa) e L2 (proteína secundária menor L2 52 KDa) possuem seqüência gênica altamente conservada entre todos os tipos de HPV e são responsáveis pela codificação de proteínas constituintes do capsídeo viral, as quais respondem por sua antigenicidade (MUNGER et al., 2002; ZUR HAUSEN, 2002; ZHENG et al., 2006).

Tabela 1. Característica das regiões regulatórias (ORFs) do Papilomavírus Humano.

ORF	Função Principal
E6	Ligação e degradação de p53, transformação celular
E7	Ligação a retinoblastoma (pRb), desregulação da checagem do ciclo em G1/S, transformação celular; coopera com E6 para imortalização celular
E1	Helicase, ATPase, essencial para replicação do DNA viral
E2	Regulação da transcrição viral, se liga a E1 para facilitar início da replicação do DNA
E3	Função desconhecida
E4	Ligação com a citoqueratina
E5	Fraca atividade na transformação celular, interação com receptores do fator de crescimento
L2	Proteína secundária do capsídeo
L1	Proteína principal do capsídeo

Fonte: Adaptado STANLEY et al., 2007.

1.4. CICLO DE VIDA DO HPV

A infecção pelo papilomavírus exige a disponibilidade de células epiteliais da epiderme ou da mucosa que são capazes de proliferação, onde o ciclo de vida produtivo do vírus ocorre juntamente ao ciclo de diferenciação celular das células do hospedeiro infectado. A infecção inicial pelo HPV ocorre em células basais, uma única camada de células proliferativas indiferenciadas (Figura 2) (HEBNER et al., 2006; STANLEY, 2008).

As células escamosas epiteliais normais se dividem como *stem cells* e formam o epitélio estratificado. Após a divisão uma das células filhas migra para a superfície do epitélio e começa a sofrer diferenciação terminal enquanto a outra permanece na camada basal desempenhando um lento ciclo para manter a renovação da população celular (WATT, 1998; NARISAWA-SAITO et al., 2007).

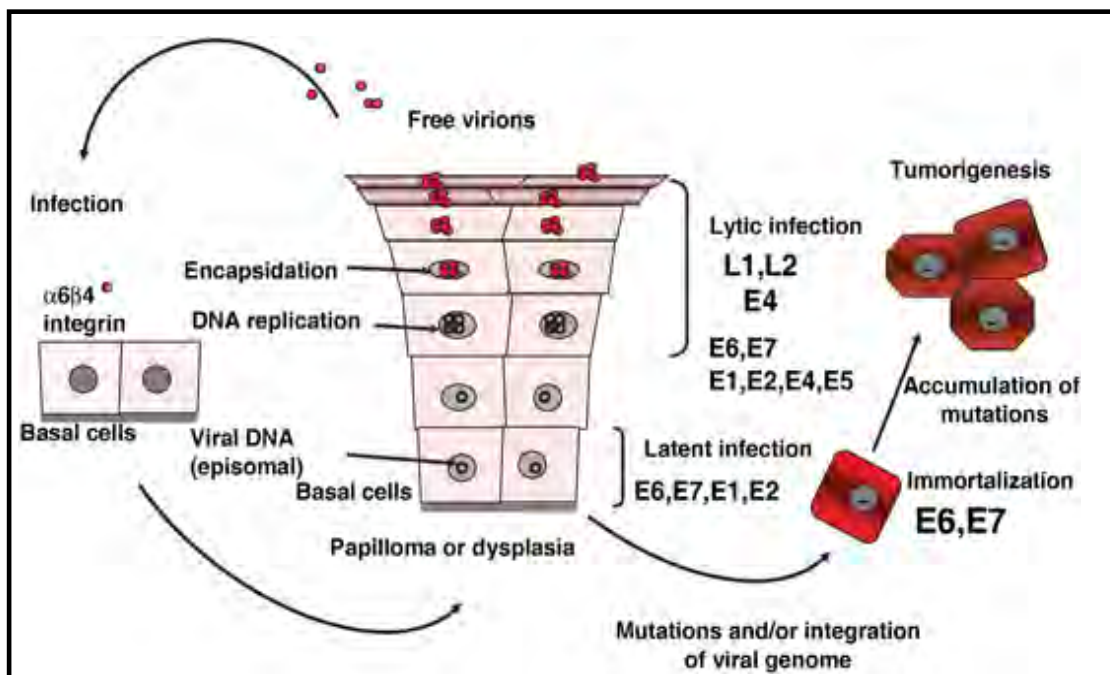


Figura 2. Representação esquemática do Ciclo de Vida do HPV. O Papilomavírus Humano (HPV) utiliza uma única estratégia de propagação infectando as células basais, onde uma fase de infecção latente é estabelecida, na qual o DNA viral se replica formando vírions. Na camada superior, onde se localizam as células diferenciadas, a replicação vegetativa do DNA viral coordena a expressão das proteínas do capsídeo produzindo vírions que posteriormente serão liberados à procura de novas células hospedeiras. Os níveis de expressão dos genes E6 e E7 nas células basais são considerados baixos, no entanto, como essas infecções podem persistir durante anos ou mesmo décadas, as células podem adquirir alto nível de expressão de E6 e E7 através de mutações e da integração do genoma viral, estas células podem se tornar imortais e tumorigênicas com mais eventos genéticos e epigenéticos (NARISAWA-SAITO et al., 2007).

O acesso às células basais acontece através de micro lesões causadas por diversas formas de trauma físico e pela interação com certos receptores como $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ integrina (YOON et al., 2001; PSYRRI et al., 2008). Nas células infectadas da camada basal são sintetizados baixos níveis de DNA viral formando aproximadamente 50 a 100 cópias episomais do genoma viral por célula (PETT et al., 2007).

A infecção das células basais pelo HPV leva à ativação de uma cascata de expressão de genes virais que resulta na replicação de seu genoma, no entanto, a expressão destes genes é amplamente reprimida existindo apenas uma limitada

expressão de genes virais específicos da região precoce. Os primeiros genes virais a serem expressos são os fatores de replicação, E1 e E2, que formam um complexo que se liga à origem de replicação e atua no sentido de recrutamento de polimerases celulares e proteínas acessórias que medeiam a replicação de DNA (Figura 2) (CONGER et al., 1999; STANLEY, 2008).

As proteínas E5, E6 e E7 possuem atividade proliferativa estimulante. A proteína E5 estimula o crescimento celular formando complexos com três tipos de receptores, sendo o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), o receptor de fator- β de crescimento derivado de plaquetas e o receptor de fator estimulante de colônia (HWANG et al., 1995; KANODIA et al., 2007). A E5 também foi indicada como uma proteína capaz de impedir a apoptose por danos no DNA (ZHANG et al., 2002).

As proteínas E6 e E7, independentemente, são capazes de imortalizar tipos celulares humanos em cultura de tecido, porém a eficiência é aumentada quando expressas simultaneamente (MUNGER et al., 1989; McDOUGALL et al., 1994; KANODIA et al., 2007). Juntas, as expressões destas proteínas virais resultam no bloqueio de saída do ciclo de diferenciação celular e na proliferação reforçada das células infectadas contendo centenas de cópias do genoma do HPV pela célula (FLORES et al., 2000; HEBNER et al., 2006).

A segregação dos genes precoces permite a infecção das células da camada basal e estes genes podem ser mantidos na lesão durante um longo período. Juntamente com a cinética de migração das células filhas infectadas para as camadas superiores do epitélio, os produtos virais dos genes tardios são produzidos para iniciar a fase episomal ou fase vegetativa do ciclo de vida do HPV resultando em um alto nível de amplificação do genoma viral (NARISAWA-SAITO et al., 2007; STANLEY et al.,

2007). O período entre a infecção e o aparecimento da lesão pode variar de semana a meses mostrando a capacidade que o vírus tem de evadir-se do sistema imune (ORIEL, 1971; STANLEY, 2008).

Tal como a replicação do DNA viral depende quase totalmente dos fatores de replicação do hospedeiro, exceto pela helicase E1, outros genes precoces (E5, E6 e E7) são responsáveis por coordenar um ambiente adequado na célula hospedeira para a replicação do DNA viral, o que por vezes induz a síntese de DNA celular e impede a apoptose (STANLEY, 2008). As funções de E4 e E5 no processo de replicação não são inteiramente compreendidas, sabe-se que o gene E4 é expresso relativamente tarde no vírus e está envolvido na replicação, maturação e liberação das partículas virais e também tem relação íntima com a expressão de produtos associados ao colapso dos filamentos de citoqueratina celular, um efeito citopático conhecido com coilocitose (ZHENG et al., 2006; TORRENTE et al., 2007).

Na seqüência da entrada para a camada superficial de células a expressão de genes virais tardios (L1 e L2) é iniciada e as proteínas estruturais são expressas. As proteínas tardias promovem a montagem dos capsídeos icosaédricos que contêm o genoma viral e partículas virais maduras, estas são liberadas das camadas do alto epitélio quando as células já estão diferenciadas para infectar outra célula suscetível (LEDWABA et al., 2004; MUNGER et al., 2004; ZHENG et al., 2006).

Devido à alta imunogenicidade dos vírions estas partículas são sintetizadas apenas nas camadas superficiais do epitélio escamoso estratificado, sendo então submetidas a uma vigilância relativamente limitada por células do sistema imune. Além disso, E6 e E7 inativam *interferons* (IFNs) e fatores regulatórios (IRF) a fim de que o vírus HPV permaneça no hospedeiro assintomaticamente (RONCO et al., 1998; UM et al., 2002).

A replicação viral ocorre exclusivamente no núcleo da célula hospedeira e o genoma viral pode interagir com o DNA celular de forma integrada ou epissomal (vegetativa) (KANODIA et al., 2007). Assim, há dois modos de replicação do HPV: o primeiro ocorre nas células da camada basal do epitélio, onde o genoma viral é distribuído às células filhas, principalmente quando o DNA pró-viral encontra-se integrado ao genoma da célula hospedeira; o segundo modo de interação é chamado epissomal ou vegetativo, e a replicação do HPV ocorre nas camadas mais diferenciadas do epitélio, não havendo integração do DNA viral ao genoma celular. Neste caso, são produzidas múltiplas cópias do DNA do HPV que serão envolvidas pelo capsídeo protéico formando assim as partículas virais maduras denominadas vírions (ZUR HAUSEN, 2002).

Curiosamente nas lesões benignas (por exemplo, verrugas) o genoma do HPV está presente na sua forma epissomal, enquanto que em lesões malignas o genoma é tipicamente integrado. Sugere-se que a integração do DNA pode alterar a expressão gênica viral (MADKAN et al., 2007).

1.5. INTEGRAÇÃO VIRAL E RISCO ONCOGÊNICO

O Papilomavírus Humano compreende um grupo complexo de vírus patogênicos. Na maioria dos casos, a infecção pelo HPV resulta em uma proliferação epitelial benigna (verruga) (TORRENTE et al., 2007), no entanto, tipos oncogênicos de HPV podem induzir a transformação maligna na presença de determinados cofatores (MADKAN et al., 2007).

A integração do DNA viral é muitas vezes acompanhada por uma perturbação do gene E2 e, menos freqüentemente, de E1 (TUNGTEAKKHUN et al., 2008). Devido

ao fato da proteína E2 atuar como repressora da expressão dos genes E6 e E7 a ruptura de E2 favorece a estabilidade do mRNA de E6/E7 o que leva a um descontrolado aumento dos níveis dessas oncoproteínas nos HPVs de alto risco (SCHMIDT et al., 2005; SNIJDERS et al., 2006).

A diminuição dos níveis de E6 e E7 vistos no início do ciclo de vida normal do vírus permite que o ciclo de vida inicial viral tenha um baixo número de células infectadas para a sobrevivência e expansão viral aumentando gradualmente esta infecção. Uma vez que a integração ocorre e os níveis de E2 diminuem, os níveis de E6 e E7 se elevam permitindo transformação celular (PETT et al., 2007; TUNGTEAKKHUN et al., 2008). Assim, as oncoproteínas (E6 e E7) podem interagir com proteínas reguladoras do ciclo celular contribuindo para a carcinogênese (DOORBAR et al., 2006). Deve ser notado que muitos ou a maioria destes eventos de integração podem não ser produtivos, devido à perda do acceptor de *splicing* e de sítios de poliadenilação (THOMAS et al., 1999; ZHENG et al., 2006; TUNGTEAKKHUN et al., 2008).

Em contrapartida, o DNA dos tipos de HPV de baixo risco não está integrado ao genoma celular, favorecendo a ação do gene E2 na repressão da transcrição dos genes E6/E7. Na ausência das oncoproteínas E6 e E7 o controle celular não está mais comprometido, o que resulta no menor risco de transformação maligna (WANG et al., 2003; PETT et al., 2007; MADKAN et al., 2007).

A integração não é uma ocorrência normal do ciclo de vida do HPV de alto risco, sendo caracterizada pela supressão de genes virais essenciais para a síntese do ciclo infeccioso do vírus. Assim, ela representa um subproduto da infecção viral que pode conferir uma vantagem seletiva para a célula hospedeira sem qualquer vantagem aparente para o vírus. Embora porções variáveis no genoma do HPV de alto risco sejam

deletadas, características consistentes podem ser notadas, particularmente a perda do gene viral E2, que pode inibir a transcrição do promotor viral de integração ao DNA celular (DOWHANICK et al., 1995; PETT et al., 2007).

1.6. HPV E O DESCONTROLE DO CICLO CELULAR

Em geral, a integração leva a uma maior expressão e estabilidade da codificação e transcrição das proteínas E6 e E7, que induzem a transformação celular através da interação e da perturbação de inúmeras moléculas intracelulares alterando a expressão de diversos genes. Este fato tem sido muito bem documentado, mostrando que as oncoproteínas E6/E7 são capazes de inativar duas proteínas celulares bem caracterizadas, a p53 e a retinoblastoma (pRb) (MÜNGER, et al. 2004; NARISAWA-SAITO et al., 2007).

As proteínas p53 e pRb são proteínas supressoras de tumor clássicas com papel central na prevenção da injúria genômica, o cancelamento de suas atividades permite o acúmulo de mutações genéticas levando a um fenótipo cancerígeno (TRAN et al., 2007).

A proteína viral E6 se liga a p53 para que esta seja então degradada pela ubiquitina ligase E6-AP (E6- *associated protein*) (Figura 3) (RAGIN et al., 2006). A proteína p53 atua na checagem do ciclo celular, quando ocorre dano no DNA aumenta p53 que induz a parada do ciclo celular em G1 (*G1 arrest*) ou induz a apoptose, ambas requeridas para a manutenção da estabilidade genômica (MANJARREZ et al., 2006).

A proteína E7 interage com pRb e degrada esta proteína também por ubiquitinação, como consequência o fator regulador de transcrição E2F é liberado a partir do complexo pRb-E2F, levando a ativação de genes transcricionais envolvidos na

proliferação celular (RAGIN et al., 2006; TRAN et al., 2007). A pRb desenvolve um importante papel na regulação negativa da proliferação celular, causando a parada do ciclo da metade da fase de G1 para a fase tardia onde a proteína é subfosforilada (NAIR et al., 2005; RAGIN et al., 2006).

Recentemente, verificou-se que E7 pode clivar pRb através do complexo calpaína cisteína protease cálcio ativada, e que esta clivagem é necessária para que E7 possa promover a degradação da pRb (NARISAWA-SAITO et al., 2007). A inativação funcional de pRb por E7 leva ao aumento da expressão de outras duas proteínas envolvidas na proliferação celular, a p16 e a p21, ambas ciclinas dependentes de quinases (RAGIN et al., 2006; ISHIKAWA et al., 2006). A p21 é uma proteína regulada e transcrita por p53, a degradação de p53 por E6-AP inibe a transcrição do gene p21 responsável pelo controle do ciclo celular levando a proliferação celular desordenada (SCULLY et al., 2000).

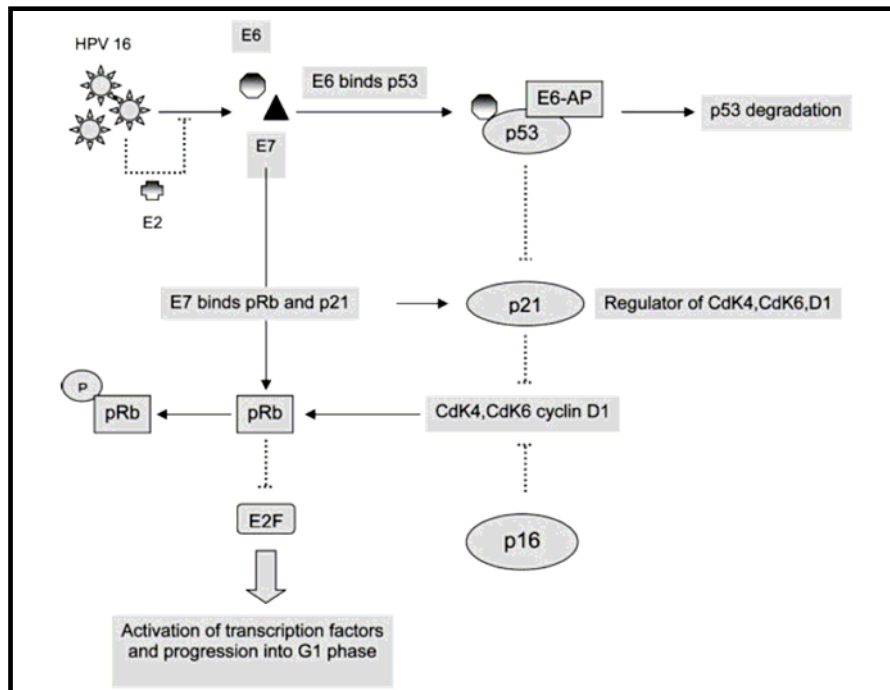


Figura 3. Representação esquemática do efeito das oncoproteínas E6 e E7 do HPV em células de mamíferos. A ruptura de E2 favorece a transcrição de oncogenes E6/E7. A oncoproteína E6 se liga a p53 que é então degradada pela ubiquitina ligase E6-AP, como resultado desta degradação a p21 não pode ser ativada. Este efeito promove o crescimento celular descontrolado. A oncoproteína E7 pode se associar tanto a pRb como a p21. Na biologia celular normal a pRb é hiperfosforilada para a manutenção do complexo pRb/E2F, bloqueando a progressão do ciclo celular. A degradação de pRb por E7 impede sua ligação a E2F iniciando a divisão celular descontrolada (TRAN et al., 2007).

Estudos mostram que a oncoproteína E6 pode imortalizar células ao ativar a telomerase levando a perda de replicação normal e senescência. Esse mecanismo ocorre quando a expressão de hTERT (*Telomerase Reverse Transcriptase in humans*) é inibida por E2 (LEE et al., 2002) e ativada por E6 (VELDMAN et al., 2001) e através dos efeitos cooperativos de E7 desempenha o processo de imortalização de células epiteliais (PETT et al., 2007).

A maioria dos genes supressores e oncogenes participam diretamente na regulação dos eventos de sinalização estimulando à progressão do ciclo celular e/ou a morte celular. Quando ocorre qualquer erro no controle de reparo dos eventuais pontos de mutação durante o ciclo as células são normalmente encaminhadas para a apoptose

(MURAKAMI et al., 2001). Portanto, a desregulação combinada nos eventos celulares de controle do ciclo celular e da apoptose leva a um aumento da instabilidade genômica, cujas características celulares contribuem para o desenvolvimento do fenótipo maligno (PETT et al., 2007). As interações das oncoproteínas virais E6 e E7 interferem nas duas maiores vias envolvidas na regulação e no controle do ciclo celular na fase G1/S, mostrando mais uma vez que a integração viral é um mecanismo de disparo para imortalização celular, desregulando a proliferação das células (MÜNGER et al., 2004).

Como dito anteriormente, a progressão da infecção do papilomavírus para o câncer é incomum, envolvendo muitas vezes a integração acidental do HPV no genoma do DNA da célula hospedeira (ZUR HAUSEN et al., 1996; PETT et al., 2007). Essa integração é um evento que leva à fase terminal do ciclo de vida do vírus, assim é importante a discriminação entre os mecanismos utilizados pelo vírus e mecanismos utilizados pelas células tumorais que possuem a finalidade de subverter o ataque imune. Muitos vírus têm meios evoluídos de modular a resposta imune, presumivelmente para permitir a replicação em um microambiente hostil (KANODIA et al., 2007).

1.7. EVASÃO DA RESPOSTA IMUNE DO HPV E DO CÂNCER

A natureza não-lítica da infecção pelo HPV limita a produção de antígenos virais que são processados e apresentados ao sistema imune adaptativo. As proteínas codificadas pelo vírus, em sua maioria, não são secretadas através da célula infectada: (i) as proteínas E (precoces) são expressas em níveis baixos e, sobretudo, no núcleo celular; (ii) a produção de proteínas do capsídeo, altamente imunogênicas, é limitada à camada mais diferenciada e liberada ao epitélio, onde os sinais pró-inflamatórios são diminuídos. O HPV apresenta um perfil insuficiente para ativar a resposta imune do

hospedeiro, uma vez que não há fase do ciclo de vida do HPV via corrente sanguínea, e apenas quantidades mínimas de replicação do vírus são expostas para o sistema imune, o vírus se torna praticamente “invisível” para o sistema imune do hospedeiro (KANODIA et al., 2007; STANLEY, 2008).

A resposta imune humoral pode ser uma forma eficaz para prevenir a infecção e a disseminação do HPV. No entanto, os linfócitos T são células importantes na luta contra infecções e tumores induzidos pelo vírus, sendo capazes de reconhecer as células infectadas pelo vírus através das interações de seus receptores com peptídeos virais ligados ao MHC (*Major Histocompatibility Complex*) presente na superfície das células. A desregulação da maquinaria de processamento do antígeno mediada pelo HPV, pode resultar em uma baixa expressão de peptídeos do complexo MHC na superfície de células infectadas e protegê-las do ataque imune (KEATING et al., 1995; EVANS et al., 1997).

A proteína E7 do HPV 16 e HPV 18 é capaz de reprimir o gene promotor da cadeia pesada do HLA de classe I, levando a uma perda do reconhecimento de células HPV infectadas pelos linfócitos T citotóxicos. No caso específico do HPV 18, E7 também reprime o gene promotor de LMP2/TAP1, diminuindo a atividade do MHC de classe I; essas características sugerem um maior potencial oncogênico ao HPV 18 em relação ao HPV 16. O mesmo efeito repressor de LMP2/TAP1 é observado no HPV 6 E7 (não oncogênico), mas ao contrário dos HPVs oncogênicos, ele aumenta a atividade do promotor de classe I. A capacidade de inibir a transcrição de TAP e LMP, mas não influenciar nos níveis de transcrição do promotor de HLA de classe I, pode conferir um baixo risco para malignidade para os HPVs de baixo grau oncogênico (GEORGOPOULOS et al., 2000).

Células infectadas pelos HPV de alto risco parecem estar modificadas no câncer cervical em relação à resposta celular e humoral efetuadas através da secreção de diversas citocinas (IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β) e receptores solúveis para TNF- α , ou através da produção de citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) em carcinomas escamosos. Essas alterações configuram um mecanismo de evasão viral contra a célula T mediadora da resposta imune (KIM et al., 1995; GONÇALVES et al., 2004). Estudos prévios demonstram que as oncoproteínas do HPV inibem a indução da resposta imune ativada por *interferon* gama (IFN- γ), o que também interfere na efetiva eliminação do vírus (BARNARD et al., 1999; GONÇALVES et al., 2004).

A expressão de IL-2 e IFN- γ é freqüentemente observada nos estágios recentes dos tumores de mucosa oral. Lesões pouco diferenciadas e aquelas com potencial metastático expressam mais IL-4 e IL-10 e suprimem a expressão de IL-2 e IFN- γ . Aparentemente, nos estágios precoces do desenvolvimento do carcinoma de células escamosas ocorre uma polarização da expressão de citocinas do perfil Th1, enquanto que nos estágios avançados do tumor com acentuada capacidade metastática a polarização se desvia para o perfil Th2 (AGARWAL et al., 2003).

Dentre os indivíduos infectados por HPV genital 80% a 90% destes conseguem eliminar o vírus, e cerca de 10% a 20% não se tornam HPV DNA negativo e desenvolvem infecção persistente (STANLEY, 2008). A persistência viral está relacionada à resposta imune do hospedeiro, especialmente na ausência de resposta linfoproliferativa em resposta à infecção (UNG et al., 1999). A resposta imune à infecção pelo HPV é pouco entendida, sendo assim postula-se que a resposta imune celular (Th1) seja prioritária em relação à resposta imune humoral (Th2). Ainda, a resposta imune do tipo Th1 pode gerar resposta específica dos linfócitos T citotóxicos, contribuindo para a eliminação da infecção e regressão das lesões infectadas pelos tipos

de HPV de baixo risco (GONÇALVES et al., 2004). Embora a resposta linfocitária específica possa ser encontrada no sangue periférico, a presença e a retenção de grande quantidade de linfócitos T citotóxicos são observadas, preferencialmente, no tumor cervical. Entretanto, não está definida a relação entre a resposta imune e a fisiopatologia da doença, nem mesmo o papel das oncoproteínas E7 com a persistência da infecção ou a eliminação do HPV relacionado à regressão das neoplasias intraepiteliais cervicais (UNG et al., 1999).

1.8. COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) também denominado MHC (*Major Histocompatibility Complex*) foi primeiramente descrito nos anos 40 pela observação de rejeição ou aceitação de transplantes de tecidos entre camundongos alogênicos ou singênicos, respectivamente (SNELL, 1948). Em camundongos essa região está localizada no cromossomo 17 e é denominada Histocompatibilidade-2 (H-2) (ABBAS, 2000). Em humanos, a região equivalente a H-2 dos camundongos localiza-se no braço curto do cromossomo 6, sendo denominada Antígeno Leucocitário Humano (HLA – *Human Histocompatibility Antigen*), pois seus produtos são expressos em leucócitos (BREUNING et al., 1977).

Estes genes, e conseqüentemente, as proteínas HLA são extremamente polimórficos e podem ser agrupados em três classes, classe I (HLA-I), classe II (HLA-II) e classe III (HLA-III). Pouco se sabe sobre as moléculas HLA de classe III, já as de classe I e classe II quase não diferem entre si. A molécula HLA de classe I contém uma porção extracelular constituída por heterodímeros de uma cadeia pesada α de 44 kD ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), ligada não-covalentemente à cadeia leve $\beta 2$ - microglobulina de 12 kD. A

molécula HLA de classe II também é um heterodímero formado por cadeias α de 32 kD ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e β de 29 kD ($\beta 1$ e $\beta 2$) (ZAVAZAVA et al., 1998; ADAMASHVILI, et al., 2005). As duas classes apresentam uma porção transmembrana que ancora a molécula à superfície da célula (TABAYOYONG et al.; 2007).

A molécula HLA-I é expressa na superfície de quase todas as células nucleadas, a expressão de HLA-II é restrita às células apresentadoras de antígenos (APC), às células endoteliais e linfócitos T ativados (ZAVAZAVA et al., 1998; SULLIVAN et al., 2006). A expressão de moléculas HLA na superfície celular enfatiza seu importante papel na apresentação do peptídeo antigênico para células T e início da resposta imune mediada por linfócitos T. As moléculas HLA-I normalmente apresentam antígenos intracelulares para linfócitos T CD8+ e moléculas HLA-II normalmente apresentam antígenos extracelulares para células T CD4+ (TABAYOYONG et al., 2007).

Atualmente, são reconhecidos mais de 40 locos no MHC humano. A região de classe I engloba os loci HLA-A, B, C, E, F, G, H, J, K e L (LAWLOR et al., 1990; GERAGHTY, 1993; BODMER et al., 1995) e pode ser subdividida em moléculas de HLA-I clássicas (HLA-Ia) e não clássicas (HLA-Ib). As moléculas do grupo HLA-Ia exibem alto grau de polimorfismo e são designadas a apresentar o maior número possível de peptídeos antigênicos, incluem HLA-A, HLA-B e HLA-C, enquanto que as moléculas do grupo HLA-Ib que incluem os genes HLA-E, HLA-F e HLA-G codificam moléculas encontradas em tecidos fetais e em alguns tecidos da fase adulta (GERAGHTY, 1993; PYO et al., 2006).

1.8.1. MOLÉCULA DE CPH NÃO-CLÁSSICA - HLA-G

No final da década de 80 três novos genes HLA-I foram descobertos e designados como genes HLA-Ib, este por sua vez foi subdividido em: HLA-E (KOLLER et al., 1988), HLA-F (GERAGHTY et al., 1990) e HLA-G (GERAGHTY et al., 1987).

Muitas características distinguem os genes não clássicos de classe Ib do sistema HLA, HLA-G, -E e -F, dos genes clássicos de classe Ia. Com exceção de HLA-E esses genes possuem diferentes mecanismos na sua regulação, que os leva a uma distribuição restrita em determinados tecidos (KOLLER, 1988; GERAGHTY, 1993; MÉGRET et al., 2007), e todos eles possuem características que favorecem a tolerância imunológica (SULLIVAN et al., 2006; CAROSELLA et al., 2008a). Em 1987, Daniel Geraghty e colaboradores conseguiram a primeira clonagem do gene HLA-G. Charlie Loke, juntamente com Shirley Ellis e Susan Kovats, e seus respectivos colaboradores foram os primeiros a identificar a molécula de HLA-G em citotrofoblastos extravilosos (ELLIS et al., 1990; GRABOWSKA et al., 1990; KOVATS et al., 1990). Anos mais tarde, Phillippe Le Bouteiller confirma que HLA-G é expresso em toda a interface materno-fetal como: células trofoblásticas invasivas, células do endotélio vascular fetal, células do âmnion e do líquido amniótico (LE BOUTEILLER et al., 1999), sendo que sua ausência está relacionada a abortos espontâneos (XEU et al., 2007). A molécula de HLA-G é também observada em indivíduos saudáveis com expressão basal da proteína em sítios imunoprivilegiados, como por exemplo, o timo (CRISA L et al., 1997), a córnea (LE DISCORDE et al., 2003), o pâncreas (CIRULLI et al., 2006) e precursores eritróides e endoteliais (MENIER et al., 2004).

Alguns tecidos expressam HLA-G na tentativa de subverter a resposta imune favorecendo o escape tumoral e inibindo o ataque das células tumorais por células *natural killer* (NK) e linfócito T citotóxico, porém o grau de expressão da molécula varia de acordo com o tecido (ROUAS- FREISS et al., 2005). Existem aqueles tecidos tumorais onde a expressão da molécula modulatória está ausente, tecidos em que a expressão da molécula é mediana e tecidos em que a expressão é relativamente alta, podendo até ser expresso nas células infiltrantes do tumor (CAROSELLA, et al., 2008a).

De modo semelhante aos tumores, os vírus desenvolvem estratégias para escapar do sistema imune. Sendo assim a indução da expressão da molécula de HLA-G por células infectadas por vírus pode ser um mecanismo adicional e induzido que o ajude a subverter as defesas do hospedeiro, como demonstrou Donaghy e colaboradores que verificaram que os níveis de HLA-G solúvel são maiores em indivíduos portadores do HIV (DONAGHY et al., 2007).

Em algumas doenças auto-imunes e inflamatórias foi observada a presença de HLA-G, mostrando que a molécula pode contribuir para a diminuição da antigenicidade das células envolvidas nestas patologias (WIENDL et al., 2005; DIEPSTRA et al., 2008).

Devido às características imunológicas apresentadas pela molécula HLA-G, estudos indicam que a expressão de HLA-G por tecidos transplantados pode favorecer a sobrevida do enxerto e ainda pode indicar que a molécula pode ser usada para monitorar pacientes transplantados que aceitam os enxertos, podendo se beneficiar com a redução do tratamento imunossupressor (LEMAOULT et al., 2003; QIU et al., 2006).

1.8.1.1. ISOFORMAS DE HLA-G

Como relatado anteriormente, o polimorfismo do gene HLA-G é reduzido, com somente sete variações diferentes da proteína codificada por 28 alelos, destes 23 correspondem a substituições na seqüência codificadora (HVIID et al., 2006). O transcrito primário de HLA-G gera sete mRNAs alternativos (Figura 4), que têm a capacidade de codificar sete isoformas do gene, sendo quatro proteínas de membrana (HLA-G1, -G2, -G3 e -G4) e três proteínas solúveis (HLA-G5, -G6 e -G7) (FUJII et al., 1994; KIRSZENBAUM et al., 1994; PAUL et al., 2000; FAVIER et al., 2007).

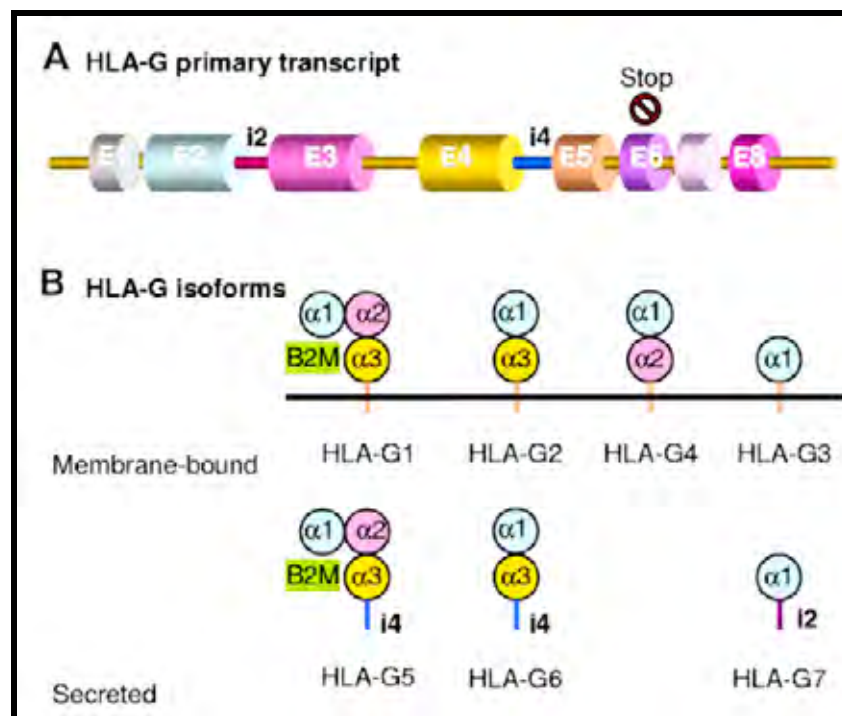


Figura 4. Representação esquemática do transcrito primário de HLA-G e das múltiplas isoformas. (A) O transcrito primário de HLA-G é homólogo ao da molécula HLA de classe I, porém contém um códon prematuro de término de leitura presente no éxon 6, logo após a seqüência codificadora do domínio transmembrana. (B) O *splicing* alternativo do transcrito primário leva a sete isoformas da proteína: as isoformas truncadas são geradas pela exclusão de um ou dois éxons codificadores de domínios globulares, enquanto a translação do íntron 4 ou do íntron 2 leva à isoforma solúvel, que perde o domínio transmembrana (CAROSELLA, 2008b).

O HLA-G1 é a isoforma protéica cuja estrutura mais se assemelha à das moléculas HLA classe I clássicas (LE MAOULT et al., 2003). Codifica proteínas com domínios extracelulares, $\alpha 1$, $\alpha 2$ e, $\alpha 3$, ligados ao domínio transmembrana codificado pelo éxon 5, e codifica também uma curta cauda citoplasmática, devido à presença de um códon prematuro de término de leitura presente no éxon 6 (GERAGHTY et al., 1987).

Os transcritos HLA-G2, -G3, e -G4 excluem o éxon 3, os éxons 3 e 4 e o éxon 4 respectivamente, gerando isoformas truncadas que retêm somente o domínio $\alpha 1$ para isoforma -G3, o domínio $\alpha 1$ e $\alpha 3$ para -G2 e o domínio $\alpha 1$ e $\alpha 2$ para -G4, todos ancorados às células pela região transmembrana (PAUL et al., 2000; CAROSELLA, et al., 2003). A isoforma -G5 retém os domínios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ e, $\alpha 3$, incluindo um códon de término de leitura presente no íntron 4, o que determina sua forma solúvel, assim como na isoforma -G6, que por sua vez perde o domínio $\alpha 2$ (FUJII, et al., 1994; PAUL et al., 2000). O mesmo ocorre com -G7, que possui um códon de término de leitura presente no íntron 2 (PAUL et al., 2000). Após a clivagem proteolítica de HLA-G1, podem ser encontradas moléculas solúveis HLA-G1, denominado *shed* HLA-G1 (HLA-G1s) (ROUAS-FREISS et al., 2007; CAROSELLA et al., 2008a). Todas as isoformas da molécula possuem o domínio $\alpha 1$.

1.8.1.2. MOLÉCULA HLA-G E A EVASÃO DA RESPOSTA IMUNE TUMORAL

HLA-G pode ser expresso nas células tumorais ou nos exossomas derivados do tumor, tanto na sua forma solúvel como ligado à membrana (RITEAU et al., 2003; ROUAS-FREISS et al., 2005). Essa expressão de HLA-G por células malignas pode impedir a rejeição imune ao tumor, devido à capacidade que a molécula HLA-G tem de

inibir células *natural killers* (NK), linfócitos T citotóxicos e células apresentadoras de antígenos (APCs).

Esta inibição ocorre através de sua ligação direta aos receptores inibitórios ILT (*Immunoglobulin-Like Trascript*), ILT-2 (LILRB1/CD85j), ILT-4 (LILRB2/CD85d) e também ao KIR2DL4 (CD158d) (*killer-cell immunoglobulin-like receptor, 2 domains, long cytoplasmic tail, 4*) (Figura 5) (CAROSELLA et al., 2003; LE MAOULT et al., 2005), que é um receptor específico para HLA-G (SHIROISHI et al., 2003). As expressões de HLA-G1 e de HLA-G5 são capazes de induzir o aumento da expressão de seus próprios receptores, ILT2 e ILT4 na APC, ILT2 e KIR2DL4 em células NK, e ILT2 e KIR2DL4 em linfócitos T CD4+, mas não em linfócitos T CD8+ (LE MAOULT et al., 2005). Estes dados mostram que a molécula HLA-G é capaz de alterar o equilíbrio do balanço de sinais de inibição *versus* estímulo, favorecendo assim a inibição de sinais, e aumentando os limiares de ativação para estas células (ROUAS-FREISS et al., 2007).

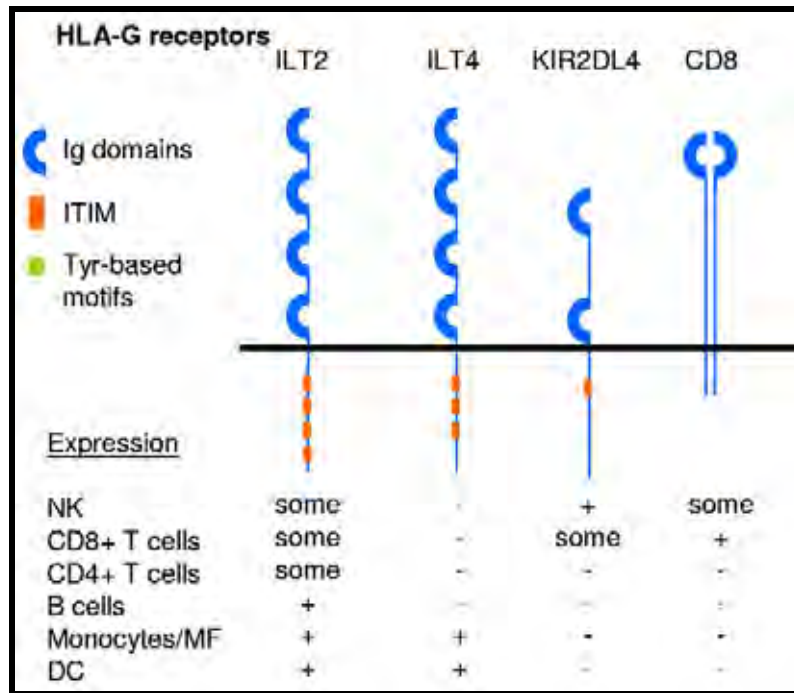


Figura 5. Representação esquemática da atuação de HLA-G através de sua ligação aos receptores inibitórios. Receptores ILT (*Immunoglobulin-Like Trascript*), ILT-2 (LILRB1/CD85j), ILT-4 (LILRB2/CD85d) e também ao KIR2DL4 (CD158d) (*killer-cell immunoglobulin-like receptor, 2 domains, long cytoplasmic tail, 4*) que são expressos diferencialmente por células do sistema imune. Sua ligação a CD8 também tem sido relatada. (CAROSELLA, 2008b).

A molécula HLA-G5 exibe propriedades inibitórias e possui a capacidade de se ligar à CD8 e à receptores inibitórios, tal como o HLA-G1. Na verdade, a isoforma solúvel HLA-G5 inibe células mediadoras de lise como NK e LT CD8+, e a resposta alogênica de linfócitos T citotóxicos. Por outro lado, existem relatos de que a molécula HLA-G5 pode induzir a apoptose de LT CD8+ ativados através da ligação de receptores Fas / Fas ligante de LT CD8+ e CD8. Além disso, HLA-G5 naturalmente produzido por LT CD4+ aloreativos, inibe a resposta proliferativa destas células, também exercendo o seu efeito inibitório através de um mecanismo de retroalimentação (CAROSELLA et al., 2003).

As isoformas vinculadas à membrana atuam no local onde são expressas, entretanto, as isoformas solúveis, como por exemplo, HLA-G5, podem exercer suas

funções em locais distantes de distribuição, através do sistema circulatório (ROUAS-FREISS et al., 2005). A isoforma HLA-G5 foi encontrada influenciando a liberação de citocinas de células mononucleares de sangue periférico, estimulando a liberação de IL-10, TNF- α , e IFN- γ . Essas proteínas solúveis podem ter uma relevância particular, *in vivo*, uma vez que exerce as suas funções no seu ambiente próximo ao local de origem e / ou em sítios distantes, devido à distribuição através do sistema circulatório (CAROSELLA et al., 2003). A este respeito, HLA-G tem sido responsável por modular a liberação de citocinas a partir de sangue periférico e de células mononucleares em direção ao perfil Th2 (ROUAS-FREISS et al., 2005).

Várias citocinas podem induzir a expressão de HLA-G, tais como GM-CSF (fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos), interleucina (IL)- 10, IFNs (*Interferons*), e LIF (fator inibitório de leucócitos) (CAROSELLA et al., 2003; ROUAS-FREISS et al., 2007). Curiosamente, a presença de IL-10, que é secretada por células de linfoma cutâneo, é responsável por induzir a expressão HLA-G *in vitro* e *in vivo* (UROSEVIC et al, 2002), e no caso do câncer de pulmão, a interleucina aparece fortemente associada à expressão de HLA-G. Devido a estas propriedades imunossupressoras, HLA-G junto à IL-10 podem contribuir para a evasão de células malignas da imunovigilância (UROSEVIC et al., 2002).

Tanto IFN- β como IFN- γ , parecem reforçar a expressão de HLA-G na superfície celular *in vitro* e mais recentemente *in vivo* (CAROSELLA et al., 2003; MITSDOERFFER et al. 2005). Esta mudança fenotípica pode conferir imunoproteção às células tumorais, facilitando a propagação tumoral no hospedeiro. Assim sendo, a administração de IFNs para imunoterapia de doenças malignas apresenta um potencial efeito colateral para o aumento da regulação positiva da expressão de HLA-G no local do tumor (ROUAS-FREISS et al., 2007; CAROSELLA et al., 2008a).

Contudo, a interação da molécula HLA-G com esses receptores não era suficiente para explicar o mecanismo de escape tumoral dependente de HLA-G. Assim, mais recentemente demonstrou-se que células NK ativadas adquirem a molécula HLA-G presente na membrana de células tumorais por meio de um mecanismo denominado trogocitose (Figura 6). A trogocitose de HLA-G explica como em um ambiente heterogêneo, algumas células que expressam HLA-G podem proteger uma região maior, onde existem células que não expressam a molécula HLA-G do ataque por células da resposta imune, onde estas perdem suas propriedades citotóxicas e se comportam como células reguladoras capazes de inibir as funções citotóxicas de outras células NK temporariamente (LE MAOULT et al., 2007).

Isto é melhor ilustrado no caso das células NK, que na aquisição de HLA-G, mudam o seu comportamento funcional de células de lise para células reguladoras de células tumorais (células alvo) protegendo-as. A trogocitose de HLA-G1 também representa um novo mecanismo de geração da regulação celular: uma delas não envolve a maturação de células regulatórias de vida longa, e outra que envolve a conversão direta e imediata de células efetoras em células que adquirem temporariamente, efetiva função regulatória *in situ* e assim proporcionam uma supressão imunológica local de emergência (Figura 6) (CAROSELLA et al., 2008b).

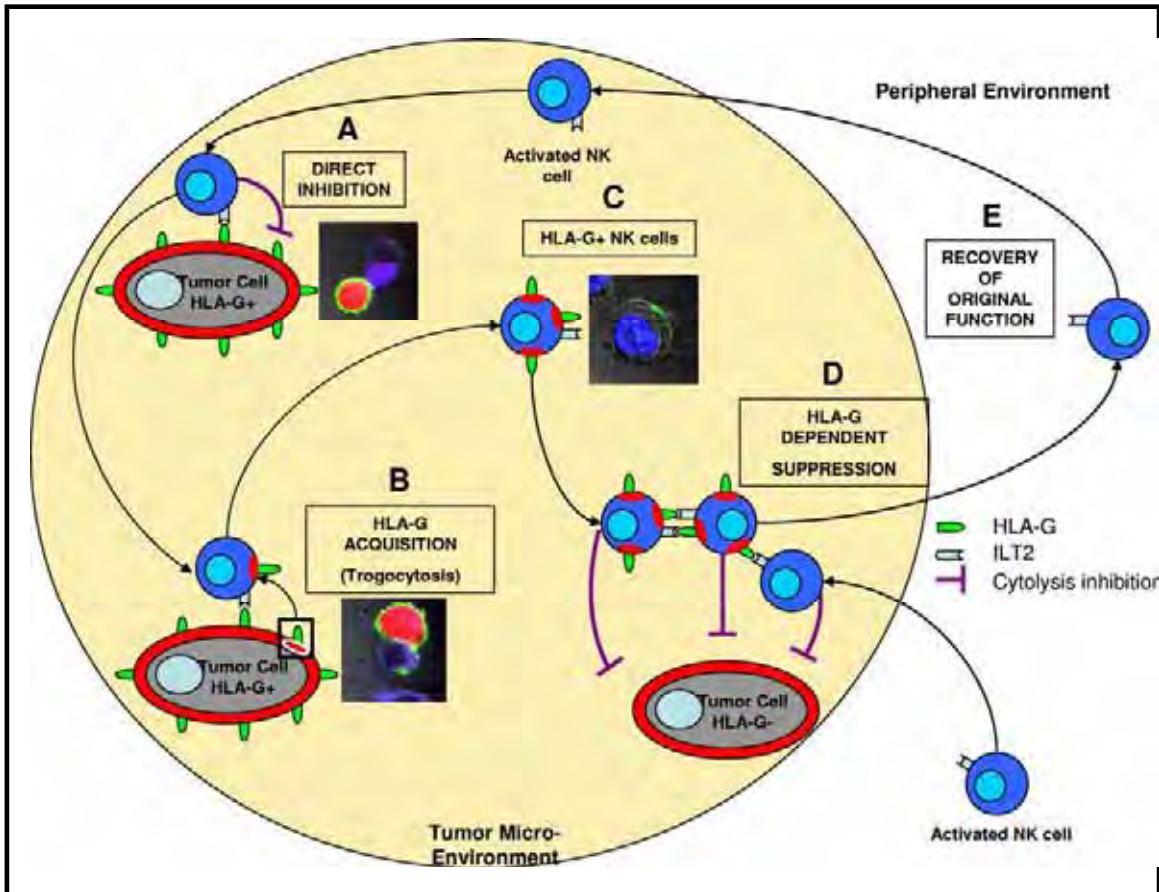


Figura 6. Representação esquemática da supressão imune local de emergência: um possível impacto de trogocitose de HLA-G sobre as respostas imunes. Dentro do microambiente de um tumor, por exemplo, onde algumas células expressam HLA-G e outras não (A), a função de ativação de NK está diretamente bloqueada pela interação de células tumorais que expressam HLA-G com NK através do receptor ILT2. Isto resulta na fuga da célula tumoral HLA-G-positiva do sistema imune. (B) Durante o contato célula à célula, porções da membrana de células tumorais contendo HLA-G são adquiridos pelas células NK ativadas dentro de minutos (através de um processo conhecido como trogocitose). (C) Isto resulta na geração de células NK ativadas HLA-G-positivas, que podem inibir outras NK ativadas (HLA-G-positivas ou HLA-G-negativas) através da ligação ao receptor ILT2. (D). Essa função supressiva de células NK HLA-G positivas resulta no escape imunológico de células tumorais HLA-G-negativas. (E) A supressão imunológica não se espalha com células NK, pois estas não traduzem HLA-G e perdem a sua expressão de superfície rapidamente se não estiverem em proximidade com as células HLA-G-positivas tumorais. Supressão imunológica local de emergência e geração local de células reguladoras, o que é rápido, local e temporário, poderiam constituir um mecanismo eficaz de escape imunológico.

Além de seu papel na inibição direta interagindo com receptores imunológicos, a molécula HLA-G também pode exercer seus efeitos imunossupressores através de uma

via indireta, por favorecer a expressão de outra molécula de HLA classe I não-clássica, a molécula HLA-E.

1.8.2. MOLÉCULA DE CPH NÃO-CLÁSSICA - HLA-E

Diferentemente da molécula de HLA-G, a expressão e função de HLA-E em processos fisiológicos e patológicos permanecem pobremente estabelecidos. HLA-E é expresso de forma constitutiva em linfócitos T e linfócitos B, células NK e macrófagos (COUPEL et al., 2007). Coupel e colaboradores (2007) demonstraram que em órgãos não linfóides de indivíduos normais, HLA-E é expresso nas células endotélias destes órgãos, e para que ocorra a estabilização da molécula para a sua expressão de superfície, HLA-E requer a disponibilidade de peptídeos derivados da seqüência líder de várias moléculas HLA de classe I clássicas, incluindo, HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-G (BRAUD et al., 1998; LEE et al., 1995). Ainda, HLA-E pode ser encontrado também na forma solúvel (HLA-Es). Assim, quando HLA-G é expresso em células ou tecidos, a co-expressão na superfície celular da molécula HLA-E também pode ocorrer (CAROSELLA et al., 2003).

HLA-E tem sido identificado como um ligante para os receptores CD94/NKG2A e CD94/NKG2C expressos em células NK. A interação do HLA-E com peptídeos de seqüência líder oriundas das moléculas de HLA de classe I clássicas interagem com o receptor inibitório CD94/NKG2A presente na célula NK, resultando na inibição da lise por estas células e por LT CD8⁺ (POSCH et al., 1998; BRAUD et al., 1998; LEE et al., 1995). Sendo assim, o complexo HLA-E e peptídeos da seqüência líder pode interagir com LT CD8⁺ expressando TCRs $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ e essa interação fornece uma via de proteção e regulação da função de LT CD8⁺ (POSCH et al., 1998). Por outro lado,

quando o HLA-E interage com peptídeo sinal oriundo da molécula de HLA-G, esse complexo interage com o receptor CD94/NKG2C, promovendo ativação das células NK (LEE et al., 1995; LLANO et al., 1998).

A evidência definitiva da importância de HLA-E na regulação da resposta imune foi obtida da construção de animais deficientes de Qa1 (homólogo para o HLA-E em humanos) (HU et al., 2004). Esses animais apresentaram defeitos na imunoregulação mediada pelos LT CD8+, mostrando o envolvimento de células T CD8+ supressoras restritas à expressão de HLA-E para antígenos próprios ou estranhos (PANOUTSAKOPOULOU et al., 2004; SARANTOPOULOS et al., 2004).

Devido ao fato de não ter sido realizada até o momento a verificação da expressão de moléculas HLA-G e HLA-E em câncer de laringe, e também de não existirem critérios claros para distinguir a prevalência do HPV neste órgão, o presente estudo propõe a avaliação das moléculas HLA de classe I não- clássicas (HLA-G e HLA-E) em lesões de laringe e sua relação com a infecção por HPV.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem por objetivo avaliar a expressão de moléculas HLA de classe I não-clássicas (HLA-G e HLA-E) em lesões benignas, pré- malignas e malignas de laringe assomaterciadas à infecção por HPV, verificando se a eventual desregulação da expressão de molécula HLA-G e HLA-E contribui para carcinogênese e progressão tumoral neste órgão.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a presença do HPV nas lesões benignas, pré-malignas e malignas de laringe através da detecção e identificação dos tipos de HPV de baixo ou alto risco, utilizando os métodos da reação em cadeia da polimerase (PCR) em lesões fixadas em formol e incluídas em parafina.
- Verificar se a eventual desregulação da expressão das moléculas HLA-G e HLA-E está associada à infecção pelo HPV, e se esta desregulação é dependente da infecção pelos tipos de HPV de baixo risco e de alto risco.
- Avaliar se o eventual aumento das moléculas HLA-G e HLA-E pela técnica imunohistoquímica está relacionado aos diferentes tipos histológicos de lesões de laringe.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

3.1.1. PACIENTES ESTUDADOS

No presente estudo foram avaliados 109 pacientes que concordaram em participar deste trabalho, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Comitê de Ética HCFMRP processo n°. 12206/2004).

3.1.2. BIÓPSIAS DE LARINGE

Dentre os 109 pacientes, foram analisadas 137 biópsias de laringe fixadas em formol tamponado e incluídas em parafina, retiradas dos arquivos do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Para análise das biópsias foram utilizados cortes de 5µm de espessura em lâminas silanizadas, estas foram selecionadas pelo diagnóstico histopatológico dos cortes corados por hematoxilina/eosina. A avaliação histológica das lesões foi realizada por um patologista, e foram então estratificadas em grupos denominados como lesões benignas de laringe- LB (papiloma laríngeo): 27/137, lesões pré-malignas de laringe- LPM (displasia leve, displasia moderada e displasia acentuada): 17/137 e lesões malignas de laringe, carcinoma *in situ* de laringe (CLIS): 10/137, carcinoma invasor de laringe sem metástase (CLS): 27/137, carcinoma invasor de laringe com metástase (CLM): 28/137 e linfonodos cervicais (LN); 28/137. Os linfonodos pertencem aos pacientes enquadrados no grupo de CLM.

Os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes foram coletados dos laudos obtidos do serviço de prontuários, SAME (Serviço de Arquivo Médico) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (USP).

3.2. METODOLOGIAS

3.2.1. REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA (HLA-G E HLA-E)

As lâminas foram submetidas a banhos consecutivos em baterias de xilol e álcool (Synth–Diadema, SP) para a completa desparafinização e posterior hidratação. Para a recuperação antigênica, os cortes foram imersos em solução de citrato 10mM/pH6,0 (Synth - Diadema, SP) e submetidos à fervura em panela à vapor *steam-cuisine* (T-FAL, Industria de Aparelhos Médicos LTDA) durante 40 minutos à 95 °C. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS 0,01M (pH 7.2), por 5 minutos cada lavagem. A seguir, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada tratando as lâminas com 2 banhos consecutivos de peróxido de hidrogênio 3% em metanol (v/v), por 30 minutos, à temperatura ambiente. Para o bloqueio de reações inespecíficas, as lâminas foram lavadas em PBS por três vezes, 5 minutos cada, e incubadas em solução de PBS e leite desnatado 1%, por 40 minutos. A diluição dos anticorpos foi estabelecida através da avaliação de positividade em lâmina sabidamente positiva (trofoblasto humano) com diferentes concentrações ao redor da concentração indicada pelo fabricante, para determinação do melhor título dos anticorpos anti- HLA-G e anti- HLA-E. Deste modo, as lâminas foram novamente lavadas em PBS por 5 minutos e foi adicionado o anticorpo monoclonal anti- HLA-G (clone 5A6G7, 1:50, EXBIO Antibodies, Republica Tcheca) e anti- HLA-E (clone MEM-E/2, EXBIO). As

lâminas foram incubadas em temperatura ambiente em câmara úmida por uma noite. Decorrido o período de incubação, as lâminas foram submetidas à lavagem com PBS e incubadas com o Complexo Ultra Estreptavidina - Biotina – Peroxidase (EP- USA/500, Signet, USA), em câmara úmida por 40 minutos, a 37 °C. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS, e a reação revelada com incubação dos cortes em solução de diaminobenzidina (Signet, USA) a 37 °C, por 10 minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS, contra coradas com hematoxilina de Carrazi por 60 segundos, lavadas em água corrente, desidratadas em baterias de álcool e xilol, e montadas em Permount (Fisher Scientific, CA, USA).

3.2.1.1. CONTROLES

Para controle positivo dos dois anticorpos foram utilizados cortes histológicos de trofoblasto humano no primeiro trimestre de gravidez para ambos os marcadores.

Para controle do anticorpo secundário foram utilizados cortes histológicos de trofoblasto humano, no qual ambos os anticorpos primários, anti- HLA-G e anti- HLA-E, foram substituídos por PBS.

Para o controle negativo de HLA-G, foram utilizados cortes histológicos de fígado normal, sabidamente negativo para a expressão de molécula HLA-G, os quais foram incubados com o anticorpo primário anti-HLA-G. Como a molécula HLA-E é expressa constitutivamente, foram utilizadas biópsias normais de laringe para avaliação da possível expressão destas moléculas, e também de HLA-G.

3.2.1.2. ANÁLISE QUALITATIVA DA EXPRESSÃO DE HLA-G e HLA-E

A avaliação qualitativa das biópsias submetidas à reação de imunohistoquímica foi realizada pelo patologista Prof. Dr. Edson Garcia Soares que possui comprovada experiência na interpretação de métodos de coloração imunohistoquímica. Primeiramente houve a avaliação da positividade da expressão da molécula HLA-G e HLA-E no tecido analisado. Quando a expressão foi classificada como positiva, determinou-se a intensidade da coloração, classificada como leve (expressão com fraca intensidade), moderada a acentuada (expressão com forte intensidade).

3.2.1.3. ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE HLA-G e HLA-E

A análise quantitativa da expressão de HLA-G e HLA-E por imunohistoquímica foi realizada através de um sistema de análise de imagem que inclui um microscópio (OLYMPUS BX50) acoplado a uma câmera colorida (OLYMPUS DP10) e a um computador, contendo o software Image Pro Plus, versão 4.1 – (Media Cybernetics), do Departamento de Fisiologia e Patologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP). A média de 8 a 10 campos randômicos com células marcadas foi selecionada de cada lâmina para a análise quantitativa dos diferentes marcadores. Cada lâmina foi digitalizada e a segmentação foi controlada interativamente pelo filtro RGB existente no programa de análise de imagem. As células foram consideradas positivas para os marcadores na presença de imunoprecipitado castanho no citoplasma da célula.

3.2.2. DETECÇÃO E TIPAGEM DO HPV

3.2.2.1. CONTROLES

Os controles positivos para HPV e betaglobina foram amostras cervicais coletadas pelo método de citologia. Como controle negativo, todos reagentes de PCR foram adicionados a um *ependorfs* que não continha amostras de DNA. Para os tipos de HPV 6 e HPV 11, os controles utilizados foram DNA Positivo de amostras cervicais. Para controle dos tipos de HPV 16 e HPV18, foi extraído DNA de cultura de células SiHa e HeLa, respectivamente, e por fim para os tipos de HPV 31 e HPV33 foram de amostras de pacientes positivas para esses tipos de HPV.

3.2.2.2. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE TECIDO PARAFINIZADO

Dois cortes histológicos de tecido parafinizado, com 10 μ m de espessura foram transferidos para *ependorfs* estéreis, adicionados de 1000 μ l de xilol absoluto em cada tubo. O tecido parafinizado contendo xilol foi homogeneizado por inversão e incubado em banho a 56 °C por 10 minutos, seguidos de centrifugação a 8.000 G por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e esse procedimento foi repetido por 3 a 5 vezes para remoção completa da parafina. Na última centrifugação, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 750 μ l de xilol absoluto e 250 μ l de etanol absoluto e em seguida, a amostra foi homogeneizada e centrifugada a 8.000 G por 2 minutos, e novamente o sobrenadante descartado. Posteriormente, foram adicionados ao sedimento, 500 μ l de xilol e 500 μ l de etanol absoluto, seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. Novamente, foram adicionados 250 μ l de xilol e 750 μ l de etanol absoluto, seguido de

centrifugação e descarte do sobrenadante. Na seqüência, 500µl de etanol absoluto foram acrescidos ao sedimento homogeneizado, centrifugando a 8.000 G. O sobrenadante foi novamente descartado, sendo este procedimento realizado por duas vezes. No sedimento obtido foi adicionado 1ml de tampão de lise Tris-HCL 10 Mm, pH 8,5 (2,5 mM MgCL₂, 50 mM KCL, Nonidet P-40 1% e Tween 1%). Em seguida, os tubos foram homogeneizados, centrifugados a 8.000 G, por 2 minutos e o sobrenadante descartado. A seguir, o sedimento obtido foi ressuspensionado com 100µl de tampão de lise Tris-HCL 10 mM, pH 8,5 e 10µl de proteinase K (10mg/ml) e incubado em banho a 65 °C por uma noite. Após o período de incubação, os tubos foram submetidos à temperatura de 94 °C por 10 minutos, objetivando a inativação da proteinase K. O DNA extraído foi acondicionado a -20 °C até o momento dos experimentos de amplificação para a detecção e identificação dos tipos de HPV.

3.2.2.3. AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE BETAGLOBINA E DO HPV (REGIÃO CONSENSO)

A amplificação do gene de betaglobina foi utilizada para avaliação da integridade do DNA genômico pós-extração e como um controle interno da amplificação. A mistura de reação foi constituída de: 2,75µl de MgCl₂ 50mM, 0,25µl de dNTP 20mM, 0,5µl do iniciador de betaglobina (0,25µl PCO₄ 10µM e 0,25µl do iniciador PCO₃ 10 µM), 0,25 µl de Taq DNA de tampão da enzima 10X, polimerase 500U e 1,0 µl de DNA a 100 ng/µl. O volume final da reação foi de 25µl. Os ciclos da reação foram estabelecidos segundo Iwasawa e colaboradores (1997) e modificados posteriormente nas etapas de padronização. Assim, o DNA a ser amplificado e demais reagentes de amplificação foram submetidos à desnaturação inicial um ciclo de 94 °C

por 7 minutos, seguido de 35 ciclos subsequentes de desnaturação de 94 °C por 1 minuto, de hibridização de 55 °C por 1 minuto, de extensão de 72 °C por 1 minuto e um ciclo de extensão final em temperatura de 72°C por 10 minutos.

Após a extração, o DNA do HPV obtido dos tecidos parafinados foi amplificado por PCR, usando 20mM de dNTP, 10 mM de cada iniciador (*primer*), 5U Taq DNA polimerase (Invitrogen, E.U.A.), 3,5µl de tampão da enzima 10X, 20µg do DNA genômico (50ng), e água destilada deionizada para completar o volume total de 25µl. O DNA foi amplificado em termociclador (MJ Research, MA, USA) de acordo com as seguintes condições de ciclo: um ciclo de 94 °C por 7 minutos, 37 ciclos consecutivos de 94 °C por 30 segundos, 45 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto. Finalmente, um ciclo de 72 °C por 10 minutos, e então o DNA amplificado foi mantido a 4 °C indefinidamente. Visto que os DNAs extraídos de tecido fixados em formalina tamponada e incluídos em parafina podem apresentar fragmentação, foram utilizados os iniciadores: GP5+ e GP6+ (TING et al., 1990) que amplificam pequenos fragmentos (150bp). O produto amplificado foi aplicado em gel de poliacrilamida a 10% não desnaturante e submetido à eletroforese em 200 volts por 1 hora e 15 minutos.

3.2.2.4. AMPLIFICAÇÃO COM INICIADORES TIPO ESPECÍFICOS (HPV 6, HPV 11, HPV 16, HPV 18, HPV 31 e HPV 33)

Para a tipificação viral utilizamos pares de iniciadores (*primers*) específicos HPV16E7.667/ HPV16E7.774 para o HPV 16 e HPV18R7.696/HPV18E7.799 para HPV 18, descritos por Walboomers e colaboradores (1999) que amplificam fragmentos de aproximadamente 100 pb da região E7 dos DNAs virais. Para os tipos de HPV 6, HPV 11, HPV 31 e HPV 33 utilizamos respectivamente os seguintes iniciadores:

HPV65'/HPV63', HPV115'/HPV113', HPV31e7.811/HPV31E7.890 e HPV33E7.671/HPV33E7.671. Para identificar os tipos de HPV 18 e HPV 31 utilizamos o kit PCR Master Mix M7502 (Promega) cuja solução pronta para uso contém Taq polimerase, dNTPs, MgCL2 e um tampão com uma concentração adequada para melhor amplificação do DNA.

O DNA amplificado foi aplicado em gel de poliacrilamida a 10% não desnaturante à eletroforese em 200 volts por 1 hora e 45 minutos, sendo posteriormente corado pelo protocolo segundo o método de Sanguinetti e colaboradores (1994).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos parâmetros clínico- epidemiológicos (sexo, tabagismo, consumo de álcool, cor e localização do tumor) foram comparadas entre os diferentes subgrupos de lesões laríngeas (LB, LPM, CLIS, CLS, CLM), através do Teste Exato de Fisher bicaudal para tabela de contingência 2×2, com o auxílio do software GraphPad InStat (San Diego, CA, E.U.A.), que também foi utilizado para estimar o Odds Ratio (OR) e seu intervalo de confiança 95% (IC 95%). A idade dos pacientes em estudo foi analisada através da média aritmética e do erro- padrão. Posteriormente, a idade também foi comparada entre os subgrupos por meio do Teste t de Student não- pareado.

A intensidade da imunocoloração de HLA-G e HLA-E em cada amostra foi classificada como de baixa e alta intensidade. Para comparar a distribuição destes dois tipos de intensidade entre os diferentes subgrupos de lesões laríngeas (LB, LPM, CLIS, CLS, CLM), novamente foi empregado o Teste Exato de Fisher bicaudal para tabela de contingência 2×2, e também estimou-se o Odds Ratio (OR) e seu intervalo de confiança 95% (IC 95%). Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad InStat (San Diego, CA, E.U.A.).

A análise qualitativa da presença ou ausência da expressão das moléculas HLA-G e HLA-E em relação ao sexo, cor, tabagismo e uso de álcool foi avaliada através do Teste Exato de Fisher bicaudal para tabela de contingência 2×2, com o auxílio do software GraphPad InStat (San Diego, CA, E.U.A.), que também foi utilizado para seu Intervalo de Confiança 95% (IC 95%). Quanto à localização anatômica do tumor, idade e tipo de lesão, estes parâmetros foram avaliados pelo Teste Qui-quadrado.

A análise qualitativa da expressão das moléculas HLA-G e HLA-E por imunohistoquímica em relação ao acometimento do sítio anatômico pelo tumor, idade e tipo de lesão foi avaliada pelo Teste Qui-quadrado.

Para análise quantitativa de ambos os marcadores, uma vez que os dados encontrados assumem caráter para testes paramétricos, foi realizada a análise de variância One Way ANOVA com pós- teste de Tukey para comparar a expressão quantitativa de HLA-G e HLA-E em lesões laringeas e nos linfonodos cervicais.

Para a análise da presença viral em relação a expressão das moléculas HLA-G e HLA-E foi utilizado o Teste Exato de Fisher bicaudal para tabela de contingência 2×2, com o auxílio do software GraphPad InStat (San Diego, CA, E.U.A.), que também foi utilizado para seu Intervalo de Confiança 95% (IC 95%).

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DAS BIÓPSIAS LARÍNGEAS DOS PACIENTES ESTUDADOS

Por ocasião do surgimento de manifestações clínicas sugestivas de alterações da função de fonação, surgimento de odinofagia ou mesmo de uma leve disfagia, espécimes laríngeas foram coletadas, fixadas e processadas para análise histológica. Com base nessa análise, dos 109 pacientes analisados, foram avaliadas 137 biópsias de lesões laríngeas e estas foram selecionadas e estratificadas pelo diagnóstico histopatológico em 27/137 (19,7%) lesões benignas de laringe- (papiloma laríngeo), em 17/137 (12,4%) amostras de lesões pré-malignas de laringe- (displasia leve, moderada e acentuada), em 10/137 (7,3%) amostras de carcinoma *in situ* de laringe, em 27/137 (19,7%) carcinoma de invasor de laringe sem metástase, em 28/137 (20,5%) carcinoma invasor de laringe com metástase e em 28/137 (20,5%) linfonodos cervicais (Figura 7).

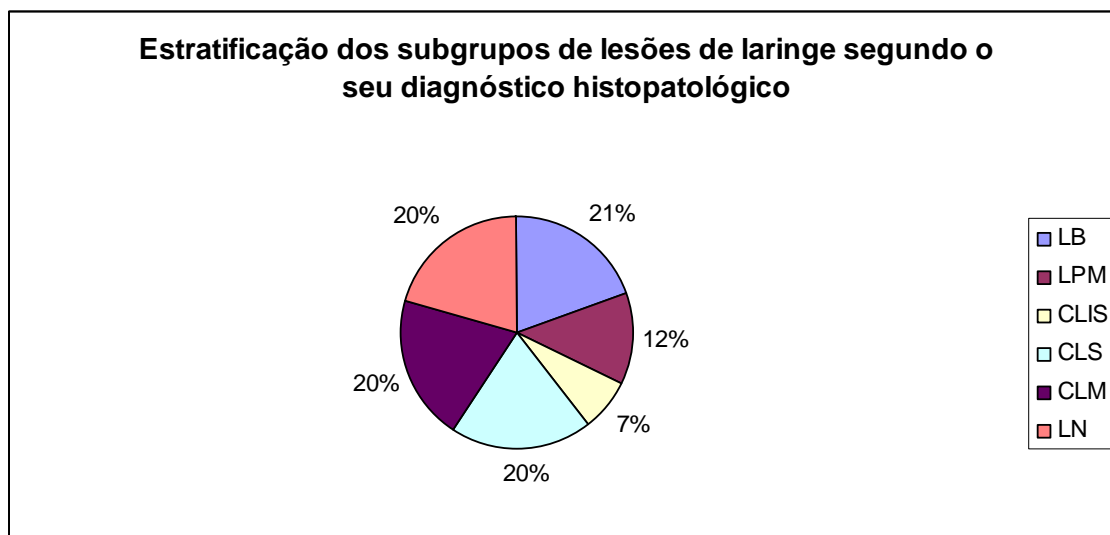


Figura 7. LB= lesões benignas (papiloma); LPM= lesões pré-malignas (displasia leve, displasia moderada e displasia acentuada); CLIS= carcinoma de laringe *in situ*, CLS= carcinoma de laringe invasor sem metástase; CLM= carcinoma de laringe invasor com metástase e LN= linfonodos cervicais.

Os parâmetros clínico- epidemiológicos dos 109 pacientes com lesões laríngeas estão apresentados na tabela 2. Demonstraram significância estatística com a idade (LB *versus* LPM; $p= 0,0001$), (LB *versus* CLIS; $p= 0,0001$), (LB *versus* CLS; $p= 0,0001$), (LB *versus* CLM; $p= 0,0001$), (LPM *versus* CLIS; $p= 0,0001$), (LPM *versus* CLS; $p= 0,0047$), (LPM *versus* CLM; $p= 0,0001$), onde foi realizado o Teste t de Student não-pareado. O parâmetro tabagismo mostrou significância estatística: (LB *versus* LPM; $p= 0,0001$), (LB *versus* CLIS; $p= 0,0053$), (LB *versus* CLS; $p= 0,0001$), (LB *versus* CLM; $p= 0,0001$), (LPM *versus* CLIS; $p= 0,0437$), (LPM *versus* CLS; $p= 0,034$), (LPM *versus* CLM; $p= 0,0025$); bem como o parâmetro álcool: (LB *versus* LPM; $p= 0,0001$), (LB *versus* CLIS; $p= 0,0006$), (LB *versus* CLM; $p= 0,0001$), (LPM *versus* CLIS; $p= 0,0402$), (CLIS *versus* CLS; $p= 0,0302$), nos quais foram realizados o Teste Exato de Fisher bicaudal (Tabela 2).

Não houve significância estatística entre o sexo, a cor e o sítio anatômico acometido pela lesão na laringe em relação aos diferentes grupos histológicos. No entanto, os pacientes eram predominantemente homens com idade acima dos 40 anos que faziam uso do tabaco e do álcool, e as lesões eram mais frequentes na supraglote. (Anexo) (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros clínico-epidemiológicos de 109 pacientes com lesões de laringe estratificadas segundo seu diagnóstico histológico.

	Idade	Sexo		Tabagismo		Álcool		Cor		
		M ± DP	Masc.	Fem.	Sim	Não	Sim	Não	Branca	Não-branca
LB (n=27)		28,0 ±3,26	19	8	3	24	4	23	25	2
LPM (n=17)		69,4 ±2,04	14	3	16	1	13	4	14	3
CLIS (n=10)		59,2 ±2,56	6	4	6	4	3	7	9	1
CLS (n=27)		59,18 ± 1,47	18	9	25	2	17	10	24	3
CLM (n=28)		56,07 ± 1,78	23	5	28	0	20	8	22	6
Comparações:	<i>p</i> -valor ^a	<i>p</i> -valor ^b e OR		<i>p</i> -valor ^b e OR		<i>p</i> -valor ^b e OR		<i>p</i> -valor ^b e OR		
LB vs LPM	<i>p</i> = 0,0001	<i>p</i> = 0,4876 OR= 0,5089 (0,1140-2,272)		<i>p</i> = 0,0001 OR= 0,007813 (0,0007-0,08196)		<i>p</i> = 0,0001 OR= 0,5351 (0,1142-0,2507)		<i>p</i> = 0,3590 OR= 2,679 (0,3984-0,18008)		
LB vs CLIS	<i>p</i> = 0,0001	<i>p</i> = 0,6964 OR= 1,583 (0,3493-7,177)		<i>p</i> = 0,0053 OR= 0,8333 (0,1456-0,4768)		<i>p</i> = 0,3596 OR= 0,4058 (0,7267-2,266)		<i>p</i> = 1,0000 OR= 1,389 (0,1119-17,246)		
LB vs CLS	<i>p</i> = 0,0001	<i>p</i> = 1,0000 OR= 1,188 (0,3759-3,752)		<i>p</i> = 0,0001 OR= 0,01000 (0,001533-0,06523)		<i>p</i> = 0,0006 OR= 0,1023 (0,02737-0,3824)		<i>p</i> = 1,0000 OR= 1,563 (0,2396-10,192)		
LB vs CLM	<i>p</i> = 0,0001	<i>p</i> = 0,3550 OR= 0,5163 (0,1447-1,843)		<i>p</i> = 0,0001 OR= 0,002506 (0,0001232-0,05098)		<i>p</i> = 0,0001 OR= 0,6957 (0,1818-0,2662)		<i>p</i> = 0,2516 OR= 3,409 (0,6227-18,665)		

Continuação da tabela 2. Parâmetros clínico-epidemiológicos de 109 pacientes com lesões de laringe estratificadas segundo seu diagnóstico histológico.

	Idade	Sexo		Tabagismo		Álcool		Cor	
		Masc.	Fem.	Sim	Não	Sim	Não	Branca	Não-branca
	M ± DP								
LPM vs CLIS	$p = 0,0047$	$p = 0,3648$ OR = 3,111 (0,5263-18,390)		$p = 0,0437$ OR = 10,667 (0,9830-115,75)		$p = 0,0402$ OR = 7,583 (1,309-43,941)		$p = 1,0000$ OR = 0,5185 (0,04640-5,795)	
LPM vs CLS	$p = 0,0001$	$p = 0,3152$ OR = 2,333 (0,5301-10,270)		$p = 1,0000$ OR = 1,280 (0,1070-15,311)		$p = 0,5087$ OR = 1,912 (0,4876-7,496)		$p = 0,6619$ OR = 0,5833 (0,1033-3,294)	
LPM vs CLM	$p = 0,0001$	$p = 1,0000$ OR = 1,014 (0,2093-4,918)		$p = 0,3778$ OR = 0,1930 (0,007421-5,019)		$p = 1,000$ OR = 1,300 (0,3242-5,214)		$p = 1,0000$ OR = 1,273 (0,2729-5,935)	
CLIS vs CLS	$p = 0,9959$	$p = 0,7158$ OR = 0,7500 (0,1678-3,352)		$p = 0,0347$ OR = 0,1200 (0,01764-0,8165)		$p = 0,1363$ OR = 0,2521 (0,05286-1,202)		$p = 1,0000$ OR = 1,125 (0,1031-12,277)	
CLIS vs CLM	$p = 0,3593$	$p = 0,2051$ OR = 0,3261 (0,0663-1,604)		$p = 0,0025$ OR = 0,02534 (0,001207-0,5320)		$p = 0,0302$ OR = 0,1714 (0,3524-0,8340)		$p = 0,6496$ OR = 2,455 (0,2574-23,408)	
CLS vs CLM	$p = 0,1866$	$p = 0,2270$ OR = 0,4348 (0,1239-1,526)		$p = 0,2364$ OR = 0,1789 (0,008193-3,908)		$p = 0,5731$ OR = 0,6800 (0,2191-2,111)		$p = 0,4688$ OR = 2,182 (0,4858-9,799)	

LB= lesões benignas (papiloma); LPM= lesões pré-malignas (displasia leve, displasia moderada e displasia acentuada); CLIS= carcinoma de laringe *in situ*, CLS= carcinoma de laringe invasor sem metástase; CLM= carcinoma de laringe invasor com metástase. OR (Odds Ratio); IC= Intervalo de Confiança 95%; M= média; DP= Desvio padrão. ^aTest t de Student não-pareado. ^bTeste Exato de Fisher.

5.2. EXPRESSÃO DA MOLÉCULA HLA-G

A expressão da molécula HLA-G foi observada em espécimes obtidos de indivíduos que não apresentavam lesão laríngea, isto é, indivíduos que tiveram morte por trauma violento, sendo uma expressão de intensidade leve, porém difusa.

Dentre as 137 biópsias avaliadas, 62 (45%) apresentaram expressão de HLA-G. Nos diferentes graus histológicos houve expressão em 20/27 (74%) das amostras de lesões benignas (LB- papilomas), em 13/17 (76,5%) amostras de lesões pré-malignas (LPM- displasia leve, displasia moderada e displasia acentuada), em 6/10 (60%) amostras de carcinoma *in situ* (CLIS), em 5/27 (18,5%) amostras de carcinoma invasor de laringe sem metástase (CLS), em 9/28 (32,2%) amostras de carcinoma invasor de laringe com metástase (CLM) e em 9/28 (32,2%) das amostras de linfonodos cervicais (LN) (Tabela 3) (Figura 8). É importante ressaltar que nas LB e LPM a intensidade da coloração foi 100% fraca, e na CLIS a intensidade fraca apareceu em 83,33%. Isso já era esperado, uma vez que em espécimes normais de laringe existe uma expressão leve e difusa, como dito anteriormente

Quando aplicamos o Teste Exato de Fisher, houve significância estatística entre: alguns tipos de lesões: (LB *versus* CLS; $p= 0,0043$), (LB *versus* CLM; $p= 0,0053$), (LB *versus* LN; $p= 0,00002$), (LPM *versus* CLS; $p= 0,0123$), (LPM *versus* CLM; $p= 0,0172$), (LPM *versus* LN; $p= 0,0011$) (Tabela 3).

Na análise quantitativa da expressão de HLA-G dentre os diferentes tipos histológicos houve significância estatística ($p= 0,0002$). Foi realizada a análise de variância One Way ANOVA com pós- teste de Tukey: (LB *versus* CLS; $p< 0,05$), (LPM *versus* CLIS; $p< 0,001$), (LPM *versus* LN; $p< 0,05$), (CLIS *versus* CLS; $p< 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Expressão qualitativa e quantitativa de HLA-G entre as lesões de laringe estratificadas segundo o diagnóstico histológico.

	Negativa	Fraca^a	Forte^a	(M ± EP)^b
	n (%)	n (%)	n (%)	
LB n= 27 (19,7)	7 (26)	20 (74)	0	41,42 ± 6,66
LPM n=17 (12,4)	4 (23,5)	13 (76,5)	0	57,94 ± 9,28
CLIS n= 10 (7,3)	4 (40)	5 (50)	1 (10)	49,10 ± 15,04
CLS n= 27 (19,7)	22 (81,48)	2 (7,40)	3 (11,11)	6,90 ± 4,37
CLM n= 28 (20,5)	19 (67,85)	5 (17,85)	4 (14,28)	27,31 ± 8,13
LN n= 28 (20,5)	19 (67,85)	3 (10,71)	6 (21,43)	23,32 ± 7,18

LB= lesões benignas (papiloma); LPM= lesões pré-malignas (displasia leve, displasia moderada e displasia acentuada); CLIS= carcinoma de laringe *in situ*, CLS= carcinoma de laringe invasor sem metástase; CLM= carcinoma de laringe invasor com metástase e LN= linfonodos cervicais. Negativa= Ausência de expressão na amostra; Fraca= expressão de leve intensidade; Forte= expressão de moderada a acentuada intensidade. ^aTeste Exato de Fisher ^bOne Way ANOVA com pós- teste de Tukey.

Comparamos a expressão de HLA-G em tecido laríngeo dados clinico-epidemiológicos dos pacientes estudados, não sendo encontradas diferenças significantes (Tabela 4). Durante a análise qualitativa de HLA-G, através do Teste Exato de Fisher e do teste Qui- quadrado (Tabela 4), foi possível observar que a expressão do HLA-G estava associada às lesões ($p < 0,0001$) e à idade ($p = 0,414$). No entanto, quando correlacionamos a expressão de HLA-G com o sexo ($p = 0,8288$), cor ($p = 0,5819$), tabagismo ($p = 0,1366$), álcool ($p = 0,7024$) e sítio anatômico ($p = 0,2087$) não observamos resultados estatisticamente significantes.

Tabela 4. Características clínico- epidemiológicas dos 109 pacientes, estratificadas de acordo com a expressão qualitativa da molécula de HLA-G em biópsia.

	HLA-G- positivo	HLA-G- negativo	Valor P	OR (95% IC)
	n (53)	n (56)		
Sexo				
Masculino	38	42	0,8288 ^a	0,8444 (0,3607-1,977)
Feminino	15	14		
Cor				
Branco	47	47	0,5819 ^a	1,500 (0,4946-4,550)
Não-Branca	6	9		
Tabagismo				
Sim	34	44	0,1366 ^a	0,4880 (0,2085-1,142)
Não	19	12		
Uso de álcool				
Sim	29	28	0,7024 ^a	1,208 (0,5690-2,566)
Não	24	28		
Localização anatômica				
Glote	20	15	0,2087 ^b	
Supraglote	33	39		
Subglote	0	2		
Idade				
<20	8	4	0,0414 ^b	
20-39	5	2		
40-59	18	31		
60-79	22	16		
>80	0	3		
Lesão				
LB (n=27)	20	7	0,0001 ^b	
LPM (n=17)	13	4		
CLIS (n=10)	6	4		
CLS (n=27)	5	22		
CLM (n=28)	9	19		

^aTeste Exato de Fisher; ^bTeste Qui- Quadrado; OR= Odds Ratio; IC= Intervalo de Confiança 95%.

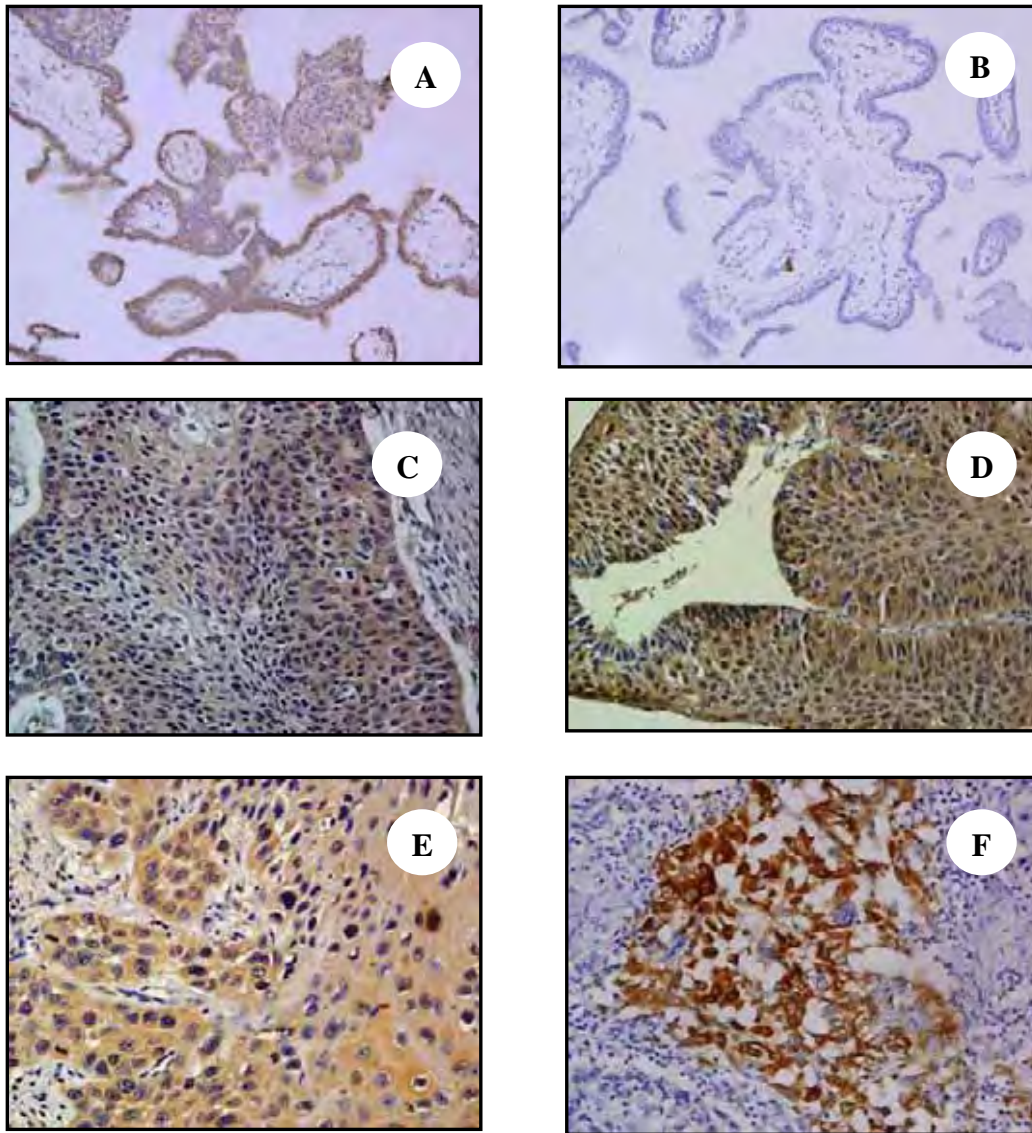


Figura 8. Reação de imunoperoxidase para HLA-G com marcação castanha no citoplasma em lesões de laringe. A) Expressão de HLA-G em trofoblasto humano como controle positivo; B) Expressão de HLA-G em trofoblasto humano como controle negativo; C) Expressão de HLA-G em papiloma laríngeo (LB) apresentando leve marcação citoplasmática; D) Expressão de HLA-G em carcinoma *in situ* de laringe (CLIS) apresentando intensa marcação citoplasmática; E) Expressão de HLA-G em carcinoma invasor de laringe sem metástase (CLS) apresentando intensa marcação citoplasmática; F) Expressão de HLA-G em carcinoma de laringe invasor com metástase (CLM) em área necrótica apresentando intensa marcação citoplasmática.

De forma geral, a expressão da molécula HLA-G se apresentou elevada, aparecendo em um maior número de biópsias, quando as lesões eram benignas e pré-malignas, e sua expressão diminuiu conforme aumentou a malignização do tecido, como no caso dos carcinomas invasores sem metástase e com metástase, e dos linfonodos cervicais.

5.3. EXPRESSÃO DA MOLÉCULA HLA-E

Nas biópsias de laringe normais não foi observada a expressão da molécula HLA-E. Dentre as 137 biópsias avaliadas, 85 (62%) apresentaram expressão de HLA-E. Dentre os diferentes graus histológicos houve expressão em 11/27 (40,74%) das amostras de lesões benignas (LB- papilomas), em 5/17 (29,41%) amostras de lesões pré-malignas (LPM- displasia leve, displasia moderada e displasia acentuada), em 4/10 (40%) amostras de carcinoma *in situ* (CLIS), em 19/27 (70,37%) amostras de carcinoma invasor de laringe sem metástase (CLS), em 14/28 (85,71%) amostras de carcinoma invasor de laringe com metástase (CLM) e em 22/28 (78,57%) das amostras de linfonodos cervicais (LN) (Tabela 5) (Figura 9).

As lesões menos alteradas, as LB e LPM e também nos CLIS, a expressão da molécula foi predominantemente fraca quando apareceu. Nas lesões invasivas e linfonodos cervicais a expressão da molécula HLA-E foi aberrante.

Não houve resultado significativo entre as lesões e a expressão qualitativa da molécula quando aplicamos o Teste Exato de Fisher (Tabela 5).

A expressão quantitativa de HLA-E dentre os diferentes tipos histológicos houve significância estatística ($p= 0,0001$). Foi realizada a análise de variância One Way ANOVA com pós- teste de Tukey: (BL *versus* CLS; $p < 0,05$), (BL *versus* CLM; $p <$

0,001), (LPM versus CLM; $p < 0,001$), (LPM versus LN; $p < 0,001$), (CLIS versus CLM; $p < 0,001$), (CLIS versus CLM; $p < 0,001$) (Tabela 5).

Tabela 5. Expressão qualitativa e quantitativa de HLA-E entre as lesões de laringe estratificadas segundo o diagnóstico histológico.

	Negativa n (%)	Fraca^a n (%)	Forte^a n (%)	(M ± EP)^b
LB n= 27 (19,7)	16 (59,26)	8 (29,63)	3 (11,11)	22,01 ± 6,24
LPM n=17 (12,4)	12 (70,59)	4 (23,52)	1 (5,88)	22,25 ± 8,87
CLIS n= 10 (7,3)	6 (60)	4 (40)	0	19,12 ± 10,12
CLS n= 27 (19,7)	8 (29,62)	10 (37,03)	9 (33,33)	52,58 ± 8,34
CLM n= 28 (20,5)	4 (14,28)	11 (39,28)	13 (46,43)	75,92 ± 7,01
LN n= 28 (20,5)	6 (21,43)	16 (57,14)	6 (21,43)	71,02 ± 7,22

LB= lesões benignas (papiloma); LPM= lesões pré-malignas (displasia leve, displasia moderada e displasia acentuada); CLIS= carcinoma de laringe *in situ*, CLS= carcinoma de laringe invasor sem metástase; CLM= carcinoma de laringe invasor com metástase e LN= linfonodos cervicais. Negativa= Ausência de expressão na amostra; Fraca= expressão de leve intensidade; Forte= expressão de moderada a acentuada intensidade. ^aTeste Exato de Fisher ^bOne Way ANOVA com pós- teste de Tukey.

Ainda, comparamos a expressão de HLA-E em tecido laríngeo com os dados demográficos e clínicos dos pacientes estudados (Tabela 6). Conforme os resultados qualitativos obtidos, nota-se que somente houve significância estatística entre a expressão de HLA-E e as lesões ($p < 0,0002$). Quanto à expressão da molécula com os parâmetros sexo ($p = 1,000$), cor ($p = 0,7817$), tabagismo ($p = 0,0522$), álcool ($p = 0,2509$), sítio anatômico ($p = 0,5121$) e idade ($p = 0,0968$) não houve resultados significantes.

Tabela 6. Características clínico- epidemiológicas dos 109 pacientes, estratificadas de acordo com a expressão qualitativa da molécula de HLA-E em biópsia.

	HLA-E-positivo	HLA-E-negativo	Valor P	OR (95% IC)
	n (63)	n (46)		
Sexo				
Masculino	46	34	1,000 ^a	0,9550 (0,4033-2,261)
Feminino	17	12		
Cor				
Branco	55	39	0,7817 ^a	1,234 (0,4130-3,687)
Não-Branca	8	7		
Tabagismo				
Sim	50	28	0,0522 ^a	2,473 (1,056-5,788)
Não	13	18		
Uso de álcool				
Sim	36	21	0,2509 ^a	1,587 (0,7383-3,413)
Não	27	25		
Localização anatômica				
Glote	23	12	0,5121 ^b	
Supraglote	39	33		
Subglote	1	1		
Idade				
<20	3	9	0,0968 ^b	
20-39	4	3		
40-59	33	16		
60-79	22	16		
>80	1	2		
Lesão				
LB (n=27)	12	15	0,0002 ^b	
LPM (n=17)	4	13		
CLIS (n=10)	4	6		
CLS (n=27)	19	8		
CLM (n=28)	24	4		

^aTeste Exato de Fisher ; ^bTeste Qui- Quadrado; OR= Odds Ratio; IC= Intervalo de Confiança 95%.

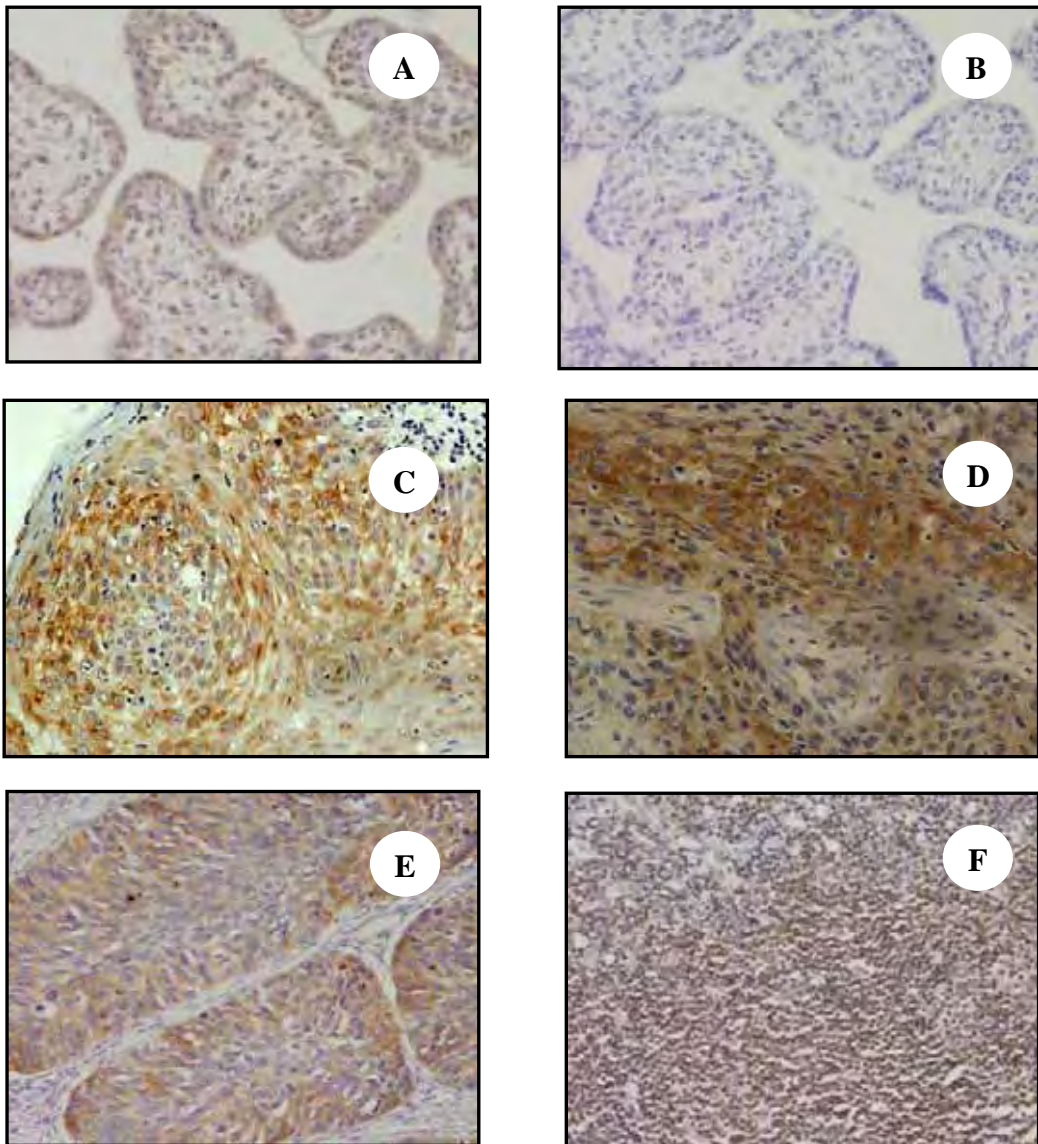


Figura 9. Reação de imunoperoxidase para HLA-E com marcação castanha no citoplasma em lesões de laringe. A) Expressão de HLA-E em trofoblasto humano como controle positivo; B) Expressão de HLA-E em trofoblasto humano como controle negativo; C) Expressão de HLA-E em papiloma laríngeo (LB) apresentando intensa marcação citoplasmática; D) Expressão de HLA-E em carcinoma invasor de laringe sem metástase (CLS) apresentando intensa marcação citoplasmática; E) Expressão de HLA-E em carcinoma de laringe invasor com metástase apresentando intensa marcação citoplasmática (CLM); F) Expressão de HLA-E em linfonodo cervical (LN) apresentando intensa marcação citoplasmática.

Com a finalidade de verificar associação entre expressão de moléculas HLA-G e HLA-E e indução de resposta tolerogênica nos pacientes com lesões na laringe. É possível observar que dentre os resultados obtidos através da técnica de imunohistoquímica, houve uma correlação inversa entre a expressão das moléculas HLA-G e HLA-E ($p < 0,0001$) (Figura 10). Nos subgrupos de lesões laríngeas como LB, LPM e CLIS detectou-se um aumento da expressão de HLA-G concomitantemente à diminuição da expressão de HLA-E. O inverso ocorre nos subgrupos de lesões laríngeas como CLS, CLM e LN.

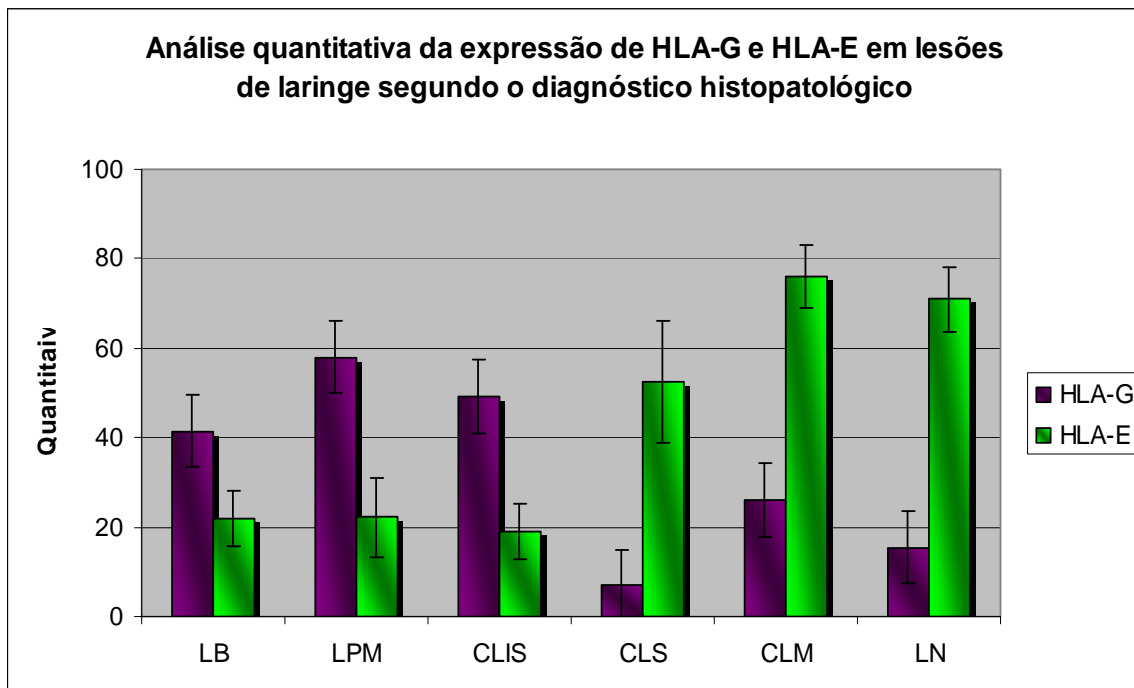


Figura 10. LB= lesões benignas (papiloma); LPM= lesões pré-malignas (displasia leve, displasia moderada e displasia acentuada); CLIS= carcinoma de laringe *in situ*, CLS= carcinoma de laringe invasor sem metástase; CLM= carcinoma de laringe invasor com metástase e LN= linfonodos cervicais. One Way ANOVA com pós teste de Tukey.

5.4. MÉTODOS DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Primeiramente foi realizada a amplificação de gene de betaglobina para a avaliação da integridade do DNA nas biópsias (Figura 11. A.). Em 12 (8,76%) de 137

biópsias, o gene betaglobina não foi amplificado, indicando degradação do DNA, e estes pacientes foram excluídos da análise em relação a detecção do HPV.

Na avaliação da presença do HPV entre 137 biópsias, o DNA do HPV 6/11 foi encontrado em 11/125 (8,8%) das amostras, destas 9 (33,33%) eram de LB, uma (3,84%) de CLS e uma (4,35%) de CLM. O HPV 16 foi encontrado em 3/125 (2,4%) amostras, sendo uma (4,35%) de CLM e duas (8%) de LN. O HPV 18 foi detectado em uma das 125 (0,8%) amostra de CLIS. O tipo viral HPV 31 foi detectado em 5/125 (4%) das amostras, 2 (7,40%) em LB, uma (3,84) de CLS, uma (4,35%) de CLM e uma (4%) de LN. O HPV 33 foi encontrado em 3/125 (2,4%) das amostras, uma (3,70%) em LB, uma (3,84%) de CLS e uma (4%) de LN (Tabela 7) (Figura 11.; B, C, D).

Dentre as 137 amostras, 6 (4,8%) apresentaram mais de um tipo de HPV em cada lesão. Dois pacientes apresentaram positividade para os tipos virais HPV 11 e 31 e estavam enquadrados no grupo de LB. No grupo de LPM não houve paciente HPV DNA positivo. Um paciente pertencente ao grupo CLS apresentou positividade para os tipos virais HPV 31 e 33. No grupo de CLM um paciente apresentou positividade para os tipos virais HPV 16 e 6. Dentre o grupo LN, um paciente apresentou positividade para os tipos virais HPV 31 e 16, e um paciente apresentou positividade para os tipos virais HPV 33 e 16 (Tabela 7).

Tabela 7. Detecção do DNA do HPV (GP5+/GP6+) e tipificação (primers específicos) em 125 biópsias (*) com lesões de laringe estratificadas segundo diagnóstico histológico.

	HPV							
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	6/11 n (%)	16 n (%)	18 n (%)	31 n (%)	33 n (%)	MTV n (%)
LB(n=27)	10 (37,03)	17 (62,96)	9 (33,33)	0	0	2 (7,40)	1 (3,70)	2 (7,40) ^a
LPM (n=15)	0	15 (100)	0	0	0	0	0	0
CLIS (n=9)	1 (11,11)	8 (88,88)	0	0	1 (10)	0	0	0
CLS (n=26)	2 (7,69)	24 (92,30)	1 (3,84)	0	0	1 (3,84)	1 (3,84)	1 (3,84) ^b
CLM (n=23)	2 (8,69)	21 (91,30)	1 (4,35)	1 (4,35)	0	1 (4,35)	0	1 (4,35) ^c
LN (n=25)	2 (8)	23 (92)	0	2 (8)	0	1(4)	1(4)	2 (8) ^d
Total (n=125)*	17 (13,6)	108 (86,4)	11 (8,8)	3 (2,4)	1 (0,8)	5 (4)	3 (2,4)	6 (4,8)

LB= lesão benigna, LPM= lesão pré- maligna, CLIS= carcinoma *in situ* de laringe, CLS= carcinoma invasor de laringe sem metástase, CLM= carcinoma invasor de laringe com metástases, LN = linfonodos cervicais, MTV= múltiplos tipos virais. ^aDois pacientes com HPV 11 e 31; ^bHPV 31 e 33, ^cHPV 16 e 6; ^dum paciente com HPV 31 e 16 e um paciente com HPV 33 e 16. (*) Em 12 (8,76%) de 137 biópsias, o gene betaglobina não foi amplificado, indicando degradação do DNA, e estes pacientes não foram considerados como sendo o HPV negativo ou positivo.

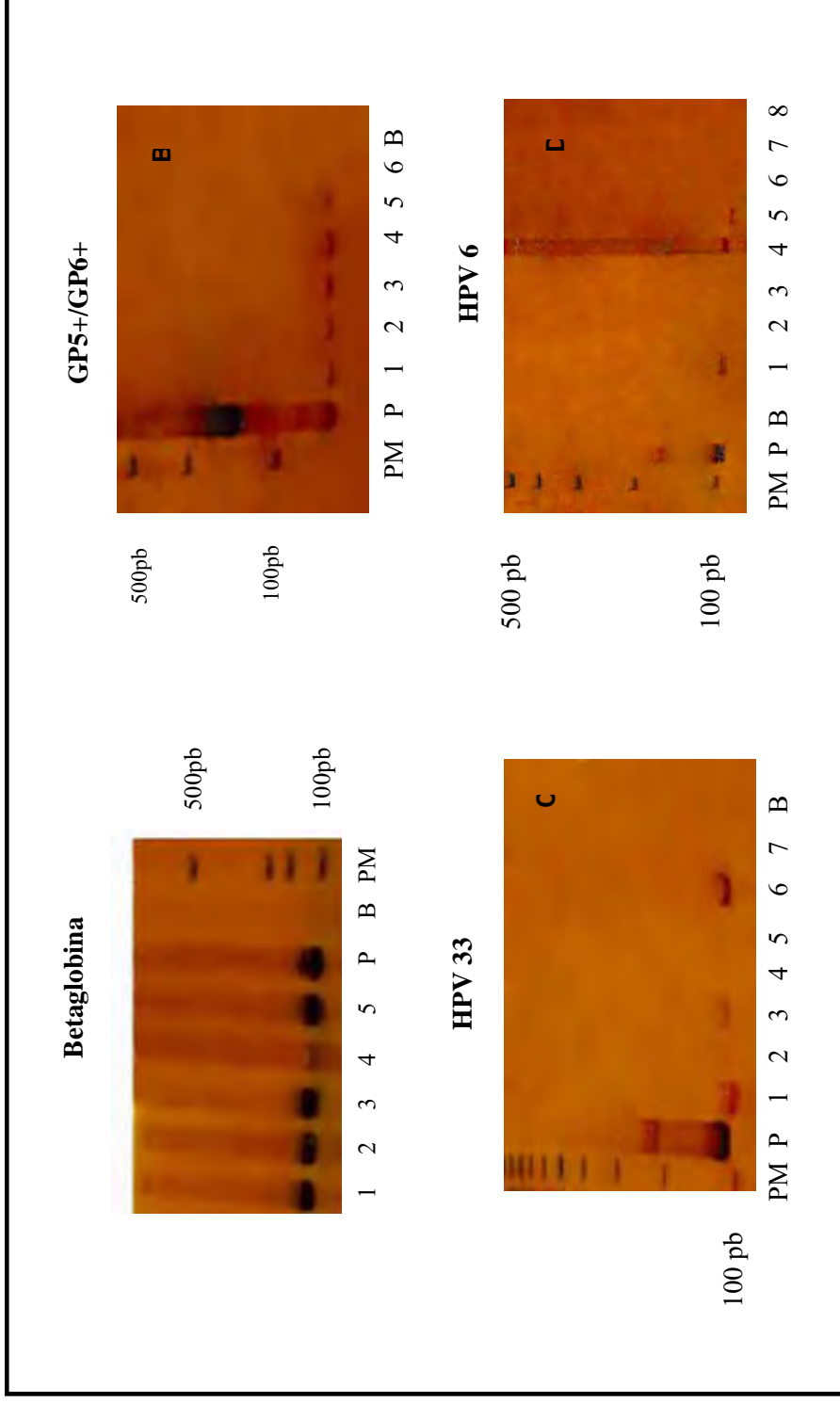


Figura 11. Reação de polimerização em cadeia (PCR) em gel de poliacrilamida 10%. Canaletas: B (Branco)= controle negativo, sem DNA; PM= peso molecular; P= controle positivo com banda de 100 pb referente a amplificação de DNA de HPV 11 extraído de células HeLa. A) Reação de amplificação do gene de betaglobina amplificado com banda de 100 pb; canaletas 1, 2, 3, 5= pacientes betaglobina positivo. B) Amplificação de DNA de HPV utilizando iniciadores de região consenso (GP5+/GP6+); canaletas 1, 2, 3, 4, 5= pacientes HPV positivos. C) Identificação de HPV 33 utilizando iniciadores específicos; canaletas 1, 3, 6= pacientes positivos para a presença do HPV 33 e canaletas 2, 4, 5, 7= pacientes negativos. D) Identificação de HPV 6 utilizando iniciadores específicos; canaletas 1, 4, 5= pacientes positivos para a presença do HPV 6 e canaletas 2, 3, 6, 7, 8= pacientes negativos.

Em relação a expressão da molécula HLA-G juntamente com a detecção viral nas biópsias, é importante ressaltar que os tipos virais de baixo risco HPV6/11 foram encontrados exclusivamente nas lesões que apresentaram uma expressão de baixa intensidade 8 (72,7%). Enquanto que os outros tipos virais, os de alto risco, apresentam-se de forma distribuída entre as formas de intensidade de expressão da molécula HLA-G, com exceção de HPV 18 que foi detectado em uma biópsia que se apresentou negativa na expressão da molécula HLA-G (Tabela 8). Ainda, 8 (47%) das biópsias nas quais foram detectadas a presença viral eram negativas para a expressão de HLA-G. No caráter intensidade 10 (59%) das biópsias HPV DNA positivas eram de fraca expressão e 4 (23%) eram de forte expressão da molécula HLA-G (Tabela 8).

Tabela 8. Expressão qualitativa e quantitativa de HLA-G entre as lesões de laringe em biópsias positivas para os tipos de HPV encontrados.

	HLA-G			
	Negativa n (%)	Fraca n (%)	Forte n (%)	1-100% n (%)
HPV 6/11 (n= 11)	3 (27,2)	8 (72,7)	0	8 (72,7)
HPV 16 (n= 3)	2 (66,7)	0	1 (33,3)	1 (33,3)
HPV 18 (n= 1)	1 (100)	0	0	0
HPV 31 (n= 5)	1 (20)	2 (40)	2 (40)	4 (80)
HPV 33 (n= 3)	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	2 (66,7)
Total (n= 17)	8 (47)	10 (59)	4 (23)	15 (88)

Fraca= expressão de leve intensidade; Forte= expressão de moderada a acentuada intensidade.

Sendo assim, para uma melhor visualização dos dados inserimos uma figura mostrando o perfil de intensidade da expressão da molécula HLA-G frente à infecção viral nas biópsias dos tipos de HPV de baixo (HPV 6/11) e alto risco (HPV 16, 18, 31, 33) (Figura 12). Pode-se verificar a que os tipos virais HPV 6/11

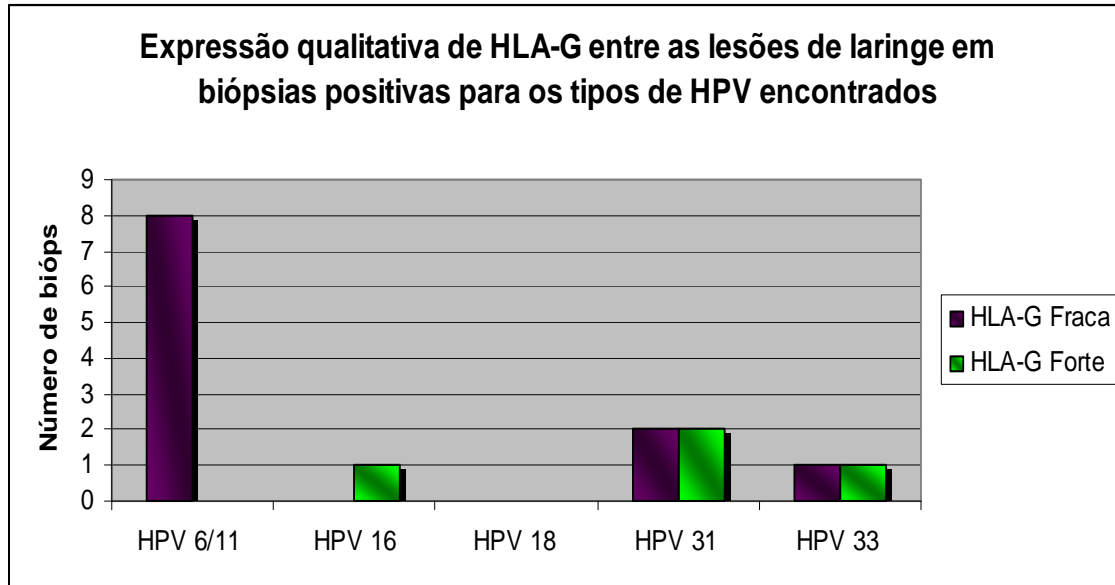


Figura 12. HLA-G Fraca= Expressão de fraca intensidade; HLA-G Forte= Expressão de forte intensidade.

Pôde-se verificar que os tipos virais HPV 6/11 (HPVs de baixo risco) apresentaram somente a expressão da molécula na sua intensidade fraca, em oito biópsias. Em relação aos HPVs de alto risco, o HPV 16 foi encontrado em somente uma biópsia com intensidade forte, o HPV 18 estava presente em uma biópsia que não expressou a molécula de HLA-G, o HPV 31 estava presente em duas biópsias com forte intensidade da expressão da molécula de HLA-G e duas biópsias com fraca intensidade da expressão desta molécula. O HPV 33 foi detectado em uma biópsia com forte intensidade e uma com fraca intensidade da expressão da molécula de HLA-G.

A análise da expressão da molécula HLA-E e a detecção viral nas 17 biópsias positivas para o DNA do HPV, os tipos virais HPV6/11 foram detectados em sua maioria nas lesões que apresentaram uma expressão de baixa intensidade 4 (36%) (Tabela 9). As biópsias positivas para a expressão da molécula HLA-E que apresentaram HPV de alto risco, eram em sua maioria do HPV 31 (60%) e menos freqüentemente de HPV 16 (67%) (Tabela 9).

Tabela 9. Expressão qualitativa e quantitativa de HLA-E entre as lesões de laringe em biópsias positivas para os tipos de HPV encontrados.

	HLA-E			
	Negativa n (%)	Fraca n (%)	Forte n (%)	1-100% n (%)
HPV 6/11 (n= 11)	5 (45)	4 (36)	2 (18)	6 (55)
HPV 16 (n= 3)	1 (33)	0	2 (67)	2 (67)
HPV 18 (n= 1)	1 (100)	0	0	0
HPV 31 (n= 5)	2 (40)	1 (20)	2 (40)	3 (60)
HPV 33 (n= 3)	3 (100)	0	0	0
Total (n= 17)	12 (71)	5 (29)	6 (35)	11 (65)

Fraca= expressão de leve intensidade; Forte= expressão de moderada a acentuada intensidade.

Para mais facilmente visualizarmos os dados referentes à expressão da molécula HLA-E e a presença dos diferentes tipos virais nas biópsias (entre tipos virais de baixo e de alto risco), segue a figura abaixo (Figura 13).

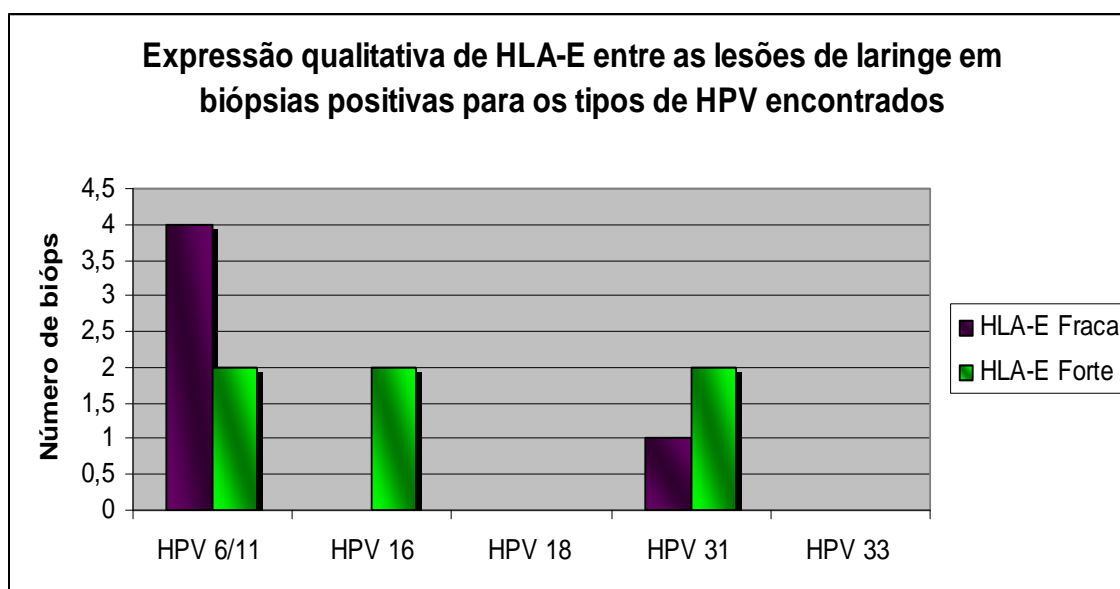


Figura 13. HLA-E Fraca= Expressão de fraca intensidade; HLA-E Forte= Expressão de forte intensidade.

À respeito da presença viral e a expressão de HLA-E, observou-se que os tipos virais HPV 6/11 apresentaram uma expressão de intensidade fraca em quatro biópsias e intensidade forte em duas. O HPV 16 foi encontrado em duas biópsias com intensidade forte, já o HPV 18 estava presente em uma biópsia que não expressou a molécula de HLA-E, bem como a de HLA-G, como citado anteriormente (Figura 12). O HPV 31 estava presente em uma biópsia com fraca intensidade da expressão de HLA-E e duas biópsias com forte intensidade de expressão. O HPV 33 foi detectado em biópsias que não apresentaram a expressão para HLA-E.

Devido à baixa frequência viral entre as biópsias, não foi possível estabelecer uma análise mais precisa em relação à presença dos diferentes tipos virais e a intensidade da imunocoloração com os diferentes marcadores (HLA-G e HLA-E). Porém, ao avaliarmos a positividade viral das biópsias em relação à expressão da molécula HLA-G, pôde-se verificar uma pequena associação estatística entre a positividade da molécula HLA-G e a presença viral nas biópsias analisadas ($p < 0.0335$) (Figura 14).

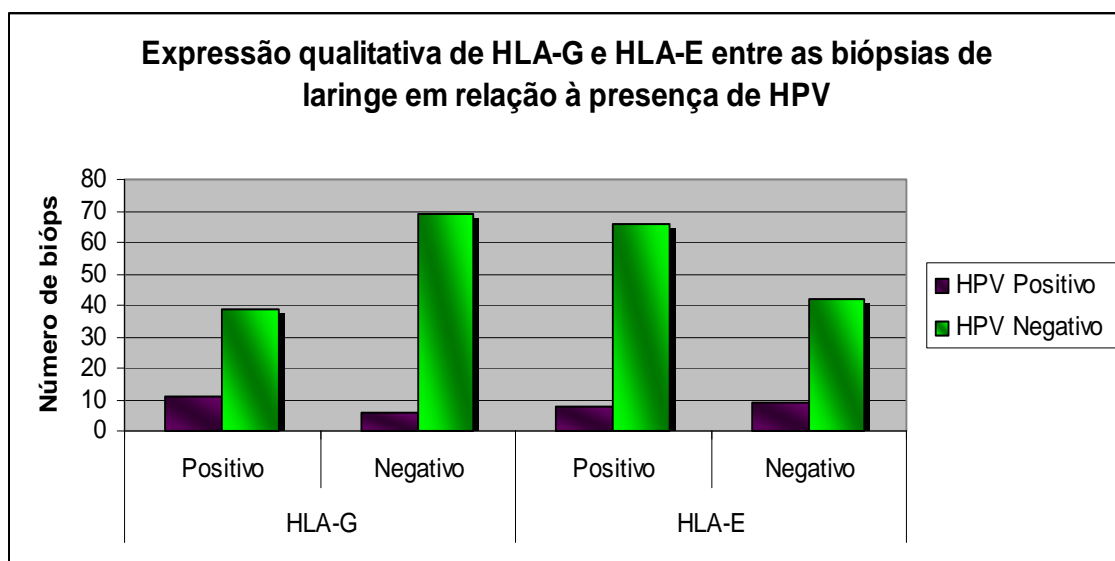


Figura 14. HLA-E Fraca= Expressão de fraca intensidade; HLA-E Forte= Expressão de forte intensidade. Teste Exato de Fisher.

6. DISCUSSÃO

Na laringe, o Papilomavírus Humano é o agente etiológico de uma doença conhecida como papilomatose laríngea. Apesar do seu caráter benigno, a transformação maligna das células escamosas pode ocorrer em uma certa proporção de casos (GUNGOR et al., 2007). A replicação não só do HPV mas de outros vírus, interfere na síntese de proteínas celulares, levando à lesão e a morte das células infectadas (efeito citopático). Ainda, o HPV pode causar infecções latentes, durante o período em que este se hospeda intracelularmente levando à produção de proteínas que podem ou não alterar as funções celulares. O objetivo da resposta imunológica ao vírus é o bloqueio da infecção para eliminar as células infectadas (ABBAS, 2000).

No entanto, quando o vírus não é eliminado e possui a capacidade de integrar seu DNA ao genoma da célula hospedeira, ocorre então o descontrole do ciclo celular levando a malignização do tecido. O papel do HPV no processo da malignização do tecido laríngeo é controverso, uma vez que estudos mostram que os fatores de risco para o câncer de laringe podem estar associados, assim como acontece no colo do útero, onde a presença do Papilomavírus Humano (HPV) não é o único fator envolvido no desenvolvimento do carcinoma (TORRENTE et al., 2007).

Nos estudos de lesões benignas de laringe a prevalência do HPV varia consideravelmente sendo encontrados: 0% (0/14) (GORGOLIS et al., 1999), 19% (6/32) (RIHKANEN et al., 1994) e em 6% (1/16) das amostras de lesões deste sítio anatômico (FOURET et al., 1995). No presente trabalho foi encontrada uma elevada frequência dos tipos virais de baixo risco (HPV 6 e HPV 11) nas lesões benignas da laringe, porém também foi detectada a presença destes mesmos tipos virais em alguns pacientes com carcinoma invasor de laringe com e sem metástase.

Na laringe, existem poucos estudos abordando a questão da infecção pelo HPV em indivíduos saudáveis. Em um estudo realizado por Nuñez e colaboradores, o DNA do HPV foi identificado em 3 espécimes de 12 autópsias de laringes normais (NUÑEZ et al., 1994).

Até o ano 1998, um total de 688 PRRs haviam sido analisadas por diferentes técnicas de detecção de HPV, onde foram detectados 524 casos (76,2%) HPV DNA positivos (TORRENTE et al., 2007). Desde então, relatórios recentes têm sido publicados em maior número (DERKAY et al., 2001; RABAH et al., 2001). A prevalência observada de quase 80% de HPV em PRR é quase tão significativa quando comparada aos condilomas genitais e câncer cervical, os quais estão relacionados ao HPV (MADKAN et al., 2007; MUENSCHER et al., 2008). Neste estudo, foi realizada a avaliação da frequência do HPV em biópsias de indivíduos saudáveis, e não foi encontrada a presença viral. Quando essa análise foi realizada em biópsias classificadas como sendo lesões benignas (papilomas laríngeos), pôde-se observar que o DNA viral estava presente em 10/17 (37%).

Levando em consideração o caráter basicamente benigno destas lesões, a transformação maligna na laringe, traquéia e carcinoma de células escamosas de brônquios são raras. Aproximadamente 1 a 2% dos pacientes com PRR desenvolvem carcinoma de células escamosas no trato respiratório superior (TORRENTE et al., 2007; MUENSCHER et al., 2008).

A detecção do DNA do HPV em lesões pré-malignas de laringe foi investigada por Azzimonti e colaboradores, onde se detectou que o HPV está associado às lesões laríngeas com leve, moderada ou acentuada displasia em 28/50 (56%) (AZZIMONTI et al., 1999). Em contrapartida, um estudo realizado por Fouret e colaboradores identificou

a infecção pelo HPV em apenas uma minoria destas lesões 6/57 (10,5%), sendo 6/6 (100%) amostras HPV 16 DNA positivas (FOURET et al., 1995).

As taxas de detecção de DNA do HPV variam de 3 a 85% em função da sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares de detecção viral (*Southern blot*, hibridização *in situ* ou PCR) (GARCÍA-MILÍAN et al., 1998; ATULA et al., 1999; VENUTI et al., 2000; JACOB et al., 2002). Por outro lado, quando a técnica de PCR é utilizada, a frequência do vírus em lesões malignas oscila de 4 a 54% (PEREZ-AYALA, 1990; PAZ, 1997; KREIMER et al., 2005).

Em lesões invasivas e/ou carcinomas de laringe a frequência de HPV encontrada foi de 4/30 (13%), sendo que o HPV 16 foi encontrado em 3/4 (75%) destas lesões (BADARACCO et al., 2007). Pintos e colaboradores, por sua vez, encontraram uma frequência viral de 17/101 (16,8%). Nos cânceres de cabeça e pescoço, o carcinoma invasor sem metástase (sem o envolvimento do linfonodo) revelou uma taxa de detecção de HPV maior 29/137 (21,4%) do que aquela observada em carcinomas com metástase 8/137 (6,5%) (PINTOS et al., 1999). Uma análise realizada somente com linfonodos, mostra que o DNA do HPV foi encontrado em 3/16 (18%) das amostras analisadas (UMUDUM et al., 2005).

A frequência relativa de genótipos de HPV em carcinoma de laringe ainda é desconhecida, uma vez que os estudos que relatam a prevalência de genótipos específicos do vírus foram realizados somente na América do Norte e na Europa, especificamente para HPV de alto risco. Assim como nos carcinomas cervicais, o HPV 16 parece ser o genótipo mais comum, sendo encontrado em 12/19 (63%) (GORGOLIS et al., 1999) carcinomas de laringe e em 56/62 (90%) tumores de cabeça e pescoço (GILLISON et al., 2000).

Em nossos estudos, de 109 pacientes apenas 17 (13,6%) eram HPV positivos, mas o método da PCR foi aplicado também nas espécimes de linfonodos, o que suporta o ponto de vista no qual o papel do HPV em cânceres de cabeça e pescoço é mais importante em outros sítios anatômicos desta região do que na laringe (KOSKINEN et al., 2007), existindo ainda dados convincentes para uma baixa prevalência de HPV em carcinoma da laringe (LINDEBERG et al. 1999; GILLISON et al. 2000). As discrepâncias observadas nos estudos referentes a presença viral em lesões de laringe podem ser imputáveis as diferentes metodologias e/ou fatores epidemiológicos da população analisada dentre os diferentes trabalhos.

Existem diversos relatos de diferentes países que apresentou o conceito de infecção pelo HPV em carcinomas da laringe (GORGOULIS et al., 1999). Embora a frequência de envolvimento do HPV varie entre 1% a 100% sem um padrão específico de genotipagem, o HPV subtipo 16 tendia a ser mais freqüente.

A presença de DNA de HPV em 2% das displasias em comparação com 21% dos carcinomas sugere que a infecção pelo HPV ocorre como um evento tardio no carcinoma de células escamosas da laringe (GORGOULIS et al., 1999). Resultados similares foram encontrados por Poljak e colaboradores (1997), que não encontraram qualquer DNA de HPV nas lesões displásicas de laringe. Neste trabalho também não foram encontrados DNA de HPV nas lesões displásicas (pré- malignas): 0/15 (0%).

As moléculas HLA são responsáveis pela apresentação de antígenos estranhos às células do sistema imune, que têm como função reconhecer e eliminar as células infectadas ou tumorais. Moléculas de HLA que se ligam aos antígenos do HPV com grande afinidade estão associadas à proteção contra o desenvolvimento do câncer cervical, enquanto aquelas que não reconhecem os antígenos virais podem estar associadas com o aumento do risco para a doença. Os HLAs de classe I são expressos

em todas as células nucleadas do organismo e são conhecidas por apresentarem antígenos de células infectadas aos LT CD8⁺ que destroem essas células (HILDESHEIM et al., 2002).

Sabe-se que, a resposta imune do hospedeiro é um fator importante na proteção contra o HPV. Estudos epidemiológicos confirmam que em indivíduos imunodeficientes (transplantados, HIV soropositivos, etc.) há um aumento da persistência viral e maior chance de progressão neoplásica (GONÇALVES et al., 2004).

A replicação viral, não só a do HPV, interfere com a síntese de proteínas da célula. Em uma resposta imune eficiente, proteínas virais são apresentadas pelas células apresentadoras de antígenos e as células infectadas são destruídas. Os antígenos virais são fragmentados por proteossomas em pequenas seqüências peptídicas, exportadas para o retículo endoplasmático pelas moléculas transportadoras TAP1 e TAP2, onde são finalmente associadas às moléculas HLA classe I. Após passar pelo complexo de Golgi, o complexo peptídeo/HLA classe I é expresso na membrana celular e o peptídeo é apresentado aos receptores dos linfócitos TCD8⁺. A interação peptídeo/HLA classe I e o receptor de célula T, ativa os linfócitos T citotóxicos que vão lisar a célula infectada (GONÇALVES et al., 2004; KEATING et al., 1995).

Devido ao fato do HPV apresentar um ciclo lisogênico, a falha no reconhecimento imune pode ser explicada pela ausência de citocinas inflamatórias no tecido infectado (KANODIA et al., 2007; STANLEY, 2008).

Apesar da dificuldade de acesso das células imunitárias as camadas basais e intermediárias do epitélio, estas células expressam as proteínas E5, E6 e E7, podendo serem reconhecidas pelos linfócito T citotóxicos. Porém, a expressão das oncoproteínas E6 e E7 contribuem para a evasão da vigilância imunológica, pois essas oncoproteínas

inibem a indução de IFNs, limitando assim a ativação desses linfócitos (BARNARD et al., 2000).

Essas oncoproteínas também atuam inibindo o gene promotor da cadeia pesada do HLA de classe I e o promotor que regula a expressão dos genes que codificam as proteínas TAP-1 e LMP2; com isso o transporte e apresentação do complexo peptídeo/HLA classe I para os linfócitos T citotóxicos na superfície celular fica prejudicado (GEORGOPOULOS et al., 2000). A ausência de moléculas de HLA de classe I clássica na superfície celular pode limitar a apresentação de peptídeos virais às células T, prevenindo assim a eliminação destas células infectadas pelos linfócitos T citotóxicos.

Podendo atuar conjuntamente com os efeitos das oncoproteínas virais na evasão da resposta imune de células tumorais e infectadas por vírus, a expressão do HLA-G pode proteger as células contra a ação da lise por células NK (LLANO et al., 1998; RITEAU et al., 2001) Nesses casos, a expressão de HLA-G desempenha um papel fundamental na indução de tolerância imunológica (CAROSELLA et al., 2008a). Através de nossos resultados, ainda não se pode afirmar que a presença viral do HPV module a expressão da molécula de HLA-G, bem como a de HLA-E; sendo necessário maiores análises para a avaliação da resposta imunológica das moléculas de HLA de classe I não-clássicas e sua relação com o Papilomavírus Humano.

A indução de tolerância é a principal função da molécula de HLA-G, que tem um efeito deletério quando é expressa em células tumorais ou infectadas por vírus (CARROSELLA et al., 2008b). Porém, neste estudo foi encontrado um aumento da expressão de HLA-G em lesões benignas e pré-malignas de laringe, bem como no tecido normal. Nas lesões malignas como nos carcinomas invasores de laringe, a molécula apresenta uma expressão diminuída.

O atual entendimento do papel de HLA-G é largamente baseado em estudos sobre o ambiente materno-fetal. A molécula de HLA-G é responsável por proteger o feto da lise de células NK, interagindo diretamente com receptores KIRs (*killer immunoglobulin-like receptors*), indiretamente através da estabilização da expressão de superfície de moléculas HLA-E, que têm a capacidade de interagir com os receptores inibitórios CD94/NKG2A de células NK. Sabe-se que a molécula HLA-G produz uma polarização para as citocinas do perfil Th2, estimulando a secreção particularmente IL-10 (ROUAS-FREISS et al., 2005). Análises por imunohistoquímica de biópsias de câncer revelaram o aumento da expressão da proteína HLA-G em vários tipos de lesões malignas, apresentando expressão nas células tumorais e/ou em células inflamatórias infiltradas. Embora o HLA-G tenha sido detectado em todos os tipos de tumores analisados, a percentagem de lesões positivas variou de acordo com o tecido analisado com o mínimo de 14% no carcinoma de células basais e o máximo de 100% nas molas hidatiformes (ROUAS-FREISS et al., 2003). A proteína HLA-G também foi detectada em tumores de cérebro, tais como, glioblastomas e oligoastrocitomas anaplásicos e em carcinoma de pulmão (UROSEVIC et al., 2001; WIENDL et al., 2002). Nas doenças linfoproliferativas e em células de carcinoma renal, o HLA-G foi detectado na forma solúvel (BUKUR et al., 2003a; BUKUR et al., 2003b; SEBTI et al., 2003). Estudos também demonstram a expressão de mRNA na maioria dos carcinomas de células renais, mas nunca em células renais normais, associando a expressão de HLA-G com o quadro maligno (ARACTINGI et al., 2003). Na leucemia linfocítica crônica de células B, a expressão de HLA-G foi correlacionada com o grau de imunossupressão celular e humoral em pacientes com leucemia linfocítica crônica de células B (NUCKEL et al., 2005). A alta expressão de HLA-G também foi relacionada à transformação maligna em células melanocíticas (IBRAHIM et al., 2004).

No presente estudo, dentre os diferentes graus de lesões de laringe observou-se uma correlação inversa entre a expressão da molécula HLA-E e a de molécula HLA-G. A molécula HLA-E apresentou uma elevada expressão dentre as lesões de carcinoma invasor com e sem metástase e nos linfonodos cervicais. Porém houve baixa expressão da molécula nas lesões benignas, pré- malignas e no carcinoma *in situ*. Semelhantes resultados foram relatados por Gonçalves e colaboradores (2008) quando o autor analisou a expressão das moléculas (HLA-G e HLA-E) no câncer cervical. Assim, a expressão de HLA-G nas lesões benignas, pré- malignas e carcinoma *in situ* menos diferenciadas e a aberrante expressão de HLA-E em carcinomas invasores poderia ser uma estratégia do tumor para escapar da imunovigilância do hospedeiro realizadas pela ação lítica das células NK e linfócitos T citotóxicos.

Interessantemente, tem sido descrito que linfócitos T CD8⁺ expressando TCR $\alpha\beta$ específicos para molécula não clássica de HLA-E tem potencial capacidade de proliferar e lisar um amplo painel de blastos oriundos de diferentes doadores alogênicos em cultura mista de leucócitos (ROMAGNANI et al., 2002). Por outro lado, essas células não interagem com blastos autólogos nem com blastos alogênicos de um restrito número, sugerindo que o reconhecimento de HLA-E é dotado de um grau de especificidade. De fato, linfócitos T CD8⁺ distinguem entre diferentes complexos HLA-E/peptídeos, e a interação só acontece quando a molécula está ligada ao peptídeo apropriado (ROMAGNANI et al., 2002). Derré e colaboradores demonstraram que linhagens de melanoma produzem grande quantidade de HLA-E, e que essa molécula não é expressa na superfície celular ficando retida no interior das células (DERRÉ et al., 2006). Devido ao fato do nosso estudo apresentar uma diminuição da expressão de HLA-E na superfície das células normais de laringe, bem como nas lesões benignas, nas pré- malignas e no carcinoma *in situ*, esta poderia estar associada com ausência do

peptídio líder em virtude da alta expressão de HLA-G na superfície das células que apresentaram o mesmo tipo de alteração. Ou ainda, que a interação da molécula de HLA-E com o peptídio sinal oriundo da molécula de HLA-G favoreceria um fenótipo de ativação dessa molécula em virtude da interação com o receptor CD94/NKG2C presente nas células NK (LLANO et al., 1998). Dados semelhantes, foram encontrados por Crispim e colaboradores em 2007 (submetido a publicação), onde avaliaram a expressão de HLA-G e HLA-E na tolerância ao alotransplante renal.

Os diferentes resultados obtidos com vários tipos de doenças malignas podem refletir as diferenças na biologia dos diversos tipos de tumores analisados, testados no grupo dos pacientes, e/ou na sensibilidade dos métodos utilizados para detectar os antígenos HLA-G e HLA-E em lesões malignas. Além disso, o regulamento dos genes não- clássicos pode diferir entre os diferentes tipos de tumores e pode ser influenciado pelo microambiente do tumor, assim como pela patogênese subjacente à transformação maligna de células.

7. CONCLUSÕES

- Verificou-se a baixa frequência do HPV nas lesões laríngeas, havendo um aumento da presença viral nas lesões benignas e malignas, respectivamente os tipos HPV 6/11 e HPV 31.
- Devido à baixa frequência do HPV nas lesões laríngeas não foi possível estabelecer a possível existência da associação entre a regulação da expressão da molécula HLA-G e HLA-E a presença viral.
- Observou-se a expressão de HLA-G nas lesões benignas, pré- malignas e nos carcinomas *in situ* de laringe, e essa expressão diminuiu progressivamente entre as lesões malignas. Observou-se o aumento na expressão de HLA-E nas lesões invasivas sem e com metástase e nos linfonodos cervicais. A expressão de HLA-E parece estar associada à malignização das lesões de laringe.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.J. The Major Histocompatibility Complex. In: SCHMITT, W. (Ed). **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. p. 63 - 78.

ADAMASHVILI, I.M.; KELLEY, R.E.; PRESSLY, T.; MCDONALD, J.C. Soluble HLA: patterns of expression in normal subjects, autoimmune diseases, and transplant recipients. **Rheumatol. Int.**, v. 25, p. 491–500, 2005.

AGARWAL, A.; RANI, M.; SAHA, G.K.; VALARMATHI, T.M.; BAHADUR, S.; MOHANTI, M.; DAS, S.N. Disregulated expression of the Th2 cytokine gene in patients with intraoral squamous cell carcinoma. **Immunol. Invest**, v. 32, n. 2, p. 17-30, 2003.

ALGARRA, I.; GARCIA-LORA, A.; CABRERA, T.; RUIZ-CABELLO, F; GARRIDO, F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. **Cancer Immunol Immunother.**, v. 53, p. 904-910, 2004.

ARACTINGI, S.; KANITAKIS, J.; EUVRARD, S.; LE DANFF, C.; CAROSELLA, E.D. Selective expression of HLA-G in malignant and premalignant skin specimens in kidney transplant recipients. **Int J Cancer**, v. 106, p. 232-235, 2003.

ATULA, S.; GRENMAN, R.; KUJARI, H.; SYRJÄNEN, S. Detection of Human Papillomavirus (HPV) in laryngeal carcinoma cell lines provides evidence for a heterogeneous cell population. **Eur. J. Cancer**, v. 35, n. 5, p. 825-832, 1999.

AZZIMONTI, B.; HERTEL, L.; ALUFFI, P.; PIA, F.; MONGA, G.; ZOCCHI, M.; LANDOLFO, S.; GARIGLIO, M. Demonstration of multiple HPV types in laryngeal premalignant lesions using polymerase chain reaction and immunohistochemistry. **J. Med. Virol.**, v. 59, p. 110-116, 1999.

BADARACCO, G.; RIZZO, C.; MAFERA, B.; PICHI, B.; GIANNARELLI, D.; RAHIMI, S.S.; VIGILI, M.G.; VENUTI, A. Molecular analyses and prognostic relevance of HPV in head and neck tumours. **Oncol. Reports**, v. 17, p. 931-939, 2007.

BARNARD, P.; MCMILLAN, N.A. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. **Virology**, v. 259, p. 305-313, 1999.

BARNARD, P.; PAYNE, E.; MCMILLAN, N.A. The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. **Virology**, v. 277, p. 411-419, 2000.

BODMER, J.G.; MARSH, S.G.E.; ALBERT, E.D.; BODMER, W.F.; BONTROP, R.E.; CHANNON, D.; DUPONT, B.; ERLICH, H.A.; MACH, W.R.; PARHAM, P.; SASAZUKI, T.; SCHNEUDEUR, G.H.T.H.; STROMINGER, J.L.; SVEJGAARD, A.; TERASAKI, P.I. Nomenclature for factors of the HLA system. **Tissue Antigens**, v. 46, p.1-18, 1995.

BRAUD, V.M.; ALLAN, D.S.; WILSON, D.; MCMICHAEL, A.J. TAP - and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. **Curr. Biol.**, v. 8, p. 1-10, 1998.

BREUNING, M.H.; VAN DEN BERG-LOONEN, E.M.; BERNINI, L.F.; BIJLSMA, J.B.; VAN LOGHEM, E.; MEERA KHAN, P.; NIJENHUIS, L.E. Localization of HLA on the short arm of chromosome 6. **Hum Genet**, v. 37, p. 131-139, 1977.

BUKUR, J.; REBMANN, V.; GROSSE-WILDE, H.; LUBOLDT, H.; RUEBBEN, H.; DREXLER, I.; SUTTER, G.; HUBER, C.; SELIGER, B. Functional role of human leukocyte antigen-G up-regulation in renal cell carcinoma. **Cancer Res.**, v. 63, n. 14, p. 4107–4111, 2003.

CAROSELLA, E.D; MOREAU, P.; LE MAOULT , J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends Immunol.**, v. 29, n. 3, p. 125-32, 2008a.

CAROSELLA, E.D.; FAVIER, B.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; LE MAOULT, J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4862-4870, 2008b.

CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P.; LE MAOULT, J.; LE DISCORDE, M.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. **Adv. Immunol.**, v. 81, p. 199-252, 2003.

CHEAH, P.L.; LOOI, L.M. Biology and pathological associations of the human papillomaviruses. **Malays. J. Pathol.**, v. 20, p. 1-10, 1998.

CHIN, D.; BOYLE, G.M.; PORCEDDU, S.; THEILE, D.R.; PARSONS, P.G.; COMAN, W.B. Head and Neck cancer: past, present and future. **Expert Rev Anticancer Ther.**, v. 6, n. 7, p. 1111-1118, 2006.

CIRULLI, V.; ZALATAN, J.; MCMASTER, M.; PRINSEN, R.; SALOMON, D.R.; RICORDI, C.; TORBETT, B.E.; MEDA, P.; CRISA, L. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1214-1222, 2006.

CONGER, K.L.; LIU, J.S.; KUO, S.R.; CHOW, L.T.; WANG, T.S. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 2696-2705, 1999.

COUPEL, S.; MOREAU, A.; HAMIDOU, M.; HOREJSI, V.; SOULILLOU, J.P.; CHARREAU, B. The HLA Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2806-2814, 2007.

CRISA, L.; MCMASTER, M.T.; ISHII, J.K.; FISHER, S.J.; SALOMON, D.R. Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. **J. Exp. Med.**, v. 186, n. 2, p. 289-298, 1997.

CRUZ, I.B.; SNIJDERS, P.J.; STEENBERGEN, R.D.; MEIJER, C.J.; SNOW, G.B. WALBOOMERS, J.M.; VAN DER WAAL, I. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. **Eur J Cancer B Oral Oncol.**, v. 32B, n. 1, p. 55-62, 1996.

DERRÉ, L.; CORVAISER, M.; CHARREAU, B.; MOREAU, A.; GODEFROY, E.; MOREAU-AUBRY, A.; JOTEREAU, F.; GERVOIS, N. Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: Potential impact on the response of cytotoxic effector cells. **J. Immunol.**,v.177, p.3100-3107, 2006.

DERKAY, C.S. Recurrent respiratory papillomatosis. **Laryngoscope**, n.111, p. 57-69, 2001.

DIEPSTRA, A.; POPPEMA, S.; BOOT, M.; VISSER, L.; NOLTE, I.M.; NIENS, M.; TEMEERMAN, G.J.; VAN DEN BERG, A. HLA-G protein expression as a potential immune escape mechanism in classical Hodgkin's lymphoma. **Tissue Antigens**, v. 71, n. 3, p. 219-226, 2008.

DOBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 24, p. 9–17, 2005.

DONAGHY, L.; GROS, F.; AMIOT, L.; MARY, C.; MAILLARD, A.; GUIGUEN, C.; GANGNEUX, J.P. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol.**, v. 147, n. 2, p. 236-240, 2007.

DONAGHY, L.; GROS, F.; AMIOT, L.; MARY, C.; MAILLARD, A.; GUIGUEN, C.; GANGNEUX, J.P. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol.**, v. 147, p. 236–240, 2006.

DONOFRIO, V.; LO MUZIO, L.; MIGNOGNA, M.D.; TRONCONE, G.; STAIBANO, S.; BOSCAINO, A.; DE ROSA, G. Prognostic evaluation of HPV-associated precancerous and microinvasive carcinoma of the oral cavity: combined use of nucleolar organiser regions (AgNOR) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **Eur J Cancer B Oral Oncol.**, v. 31B, n. 3, p. 174-180, 1995

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin. Sci.**, v. 110, p. 525–541, 2006.

DOWHANICK, J.J.; MCBRIDE, A.A.; HOWLEY, P.M. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. **J Virol.**, v. 69, p. 7791–7799, 1995.

ELLIS, S.A.; PALMER, M.S.; MCMICHAEL, A.J. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. **J. Immunol.**, v. 144, p. 731-735, 1990.

ERICH, M.; STURGIS, P.; CINCIRIPINI, M. Trends in Head and Neck Cancer Incidence in Relation to Smoking Prevalence An Emerging Epidemic of Human Papillomavirus-Associated Cancers? **Cancer**, v. 110, p. 1429–1435, 2007.

European Cancer Incidence and Mortality- EUROCIM. **European Network of Cancer Registries**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1997.

EVANS, E.M.; MAN, S.; EVANS, A.S.; BORYSIEWICZ, L.K. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. **Cancer Res.**, v. 57, p. 2943-2950, 1997.

FAVIER, B.; LE MAOULT, J.; ROUAS-FREISS, M.; MOREAU, P.; MENIER, C.; CAROSELLA, E.D. Research on HLA-G: an update, **Tissue Antigens.**, v. 69, p. 207–211, 2007.

FEHRMANN, F.; KLUMPP, D.J.; LAIMINS, L.A. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. **J Virol.**, v. 77, 2819-2831, 2003.

FERLAY, J.; BRAY, F.; PISANI, P.; PARKIN, D.M. **Globocan 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide**, Lyon, France: IARC, 2004.

FOURET, P.; MONCEAUX, G.; TEMAM, S.; LACOURREYE, L.; LACAU, S.T.; GUILY, J. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in nonsmokers. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 123, p. 513-516, 1997.

FOURET, P.; DABIT, D.; SIBONY, M.; AIII, 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. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 3, p.599-604, 1995.

FREEDMAN, N.D.; ABNET, C.C.; LEITZMANN, M.F.; HOLLENBECK, A.R.; SCHATZKIN, A. Prospective investigation of the cigarette smoking-head and neck cancer association by sex. **Cancer**, v. 110, n. 7, p. 1593-1601, 2007.

FUJII, T.; ISHITANI, A.; GERAGHTY, D.E. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. **J. Immunol.**, v. 153, n. 12, p. 5516-5524, 1994.

GALLI, J.; CAMMAROTA, G.; CALÒ, L.; AGOSTINO, S.; D'UGO, D.; CIANCI, R.; ALMADORI, G. The role of acid and alkaline reflux in laryngeal squamous cell carcinoma. **Laryngoscope**, v. 112, n. 10, p.1861-1865, 2002.

GARAVELLO, W.; LUCENTEFORTE, E.; BOSETTI, C.; TALAMINI, R.; LEVI, F.; TAVANI, A.; FRANCESCHI, S.; NEGRI, E.; LA VECCHIA, C. Diet diversity and the risk of laryngeal cancer: A case-control study from Italy and Switzerland. **Oral Oncol.**, 2008. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.02.011

GARCÍA-MILIÁN, R.; HERNÁNDEZ, H.; PANADÉ, L.; RODRÍGUEZ, C.; GONZÁLEZ, N.; VALENZUELA, C.; ARAÑA, M.D.J.; PEREA, S.E. Detection and typing of human papillomavirus DNA in benign and malignant tumours of laryngeal epithelium. **Acta Otolaryngol.**, v. 118, p. 754-758, 1998.

GEORGOPOULOS, N.T.; PROFFITT, J.L.; BLAIR, G.E. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. **Oncogene**, v. 19, 4930-4935, 2000.

GERAGHTY, D.E. Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. **Immunology**, v. 5, p. 3-7, 1993.

GERAGHTY, D.E.; KOLLER, B.H.; ORR, H.T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 84, p. 9145-9149, 1987.

GERAGHTY, D.E.; WEI, X.H.; ORR, H.T.; KOLLER, B.H. Human leukocyte antigen F (HLA-F). An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element. **J. Exp. Med.**, v. 171, n. 1, p. 1-18, 1990.

GILLISON, M.L.; KOCH, W.M.; CAPONE, R.B.; SPAFFORD, M.; WESTRA, W.H.; WU, L.; ZAHURAK, M.L.; DANIEL, R.W.; VIGLIONE, M.; SYMER, D.E.; SHAH, K.V.; SIDRANSKY, D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 92, p. 709-720, 2000.

GONÇALVES, M.A.; LE DISCORDE, M.; SIMÕES, R.T.; RABREAU, M.; SOARES, E.G.; DONADI, E.A.; CAROSELLA, E.D. Classical and non-classical HLA molecules and p16INK4a expression in precursors lesions and invasive cervical cancer. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 141, n. 70-74, 2008.

GONÇALVES, M.A.; DONADI, E.A. Immune cellular response to HPV: Current concepts. **Braz J Infect Dis.**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2004.

GOODWIN, W.J.; THOMAS, G.R.; PARKER, D.F.; JOSEPH, D.; LEVIS, S.; FRANZMANN, E.; ANELLO, C.; HU, J.J. Unequal burden of head and neck cancer in the United States. **Head Neck**, v. 30, n. 3, p. 358-371, 2008.

GORGOLIS, V.G.; ZACHARATOS, P.; KOTSINAS, A.; KYROUDI, A.; RASSIDAKIS, A.N.; IKONOMOPOULOS, J.A.; BARBATIS, C.; HERRINGTON, C.S.; KITTAS, C. Human Papilloma Virus (HPV) is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. **Hum. Pathol.**; v. 30, p. 274-283, 1999.

GORGOULIS, V.G.; ZACHARATOS, P.; KOTSINAS, A.; KYROUDI, A.; RASSIDAKIS, A.N.; IKONOMOPOULOS, J.A.; BARBATIS, C.; HERRINGTON, C.S.; GRABOWSKA, A.; CARTER, N.; LOKE, Y.W. Human trophoblast cells in culture express an unusual major histocompatibility complex class I-like antigen. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 23, p. 10–18, 1990.

GUNGOR, A.; CINCIK, H.; BALOGLU, H.; CEKIN, E.; DOGRU, S.; DURSUN, E. Human papilloma virus prevalence in laryngeal squamous cell carcinoma. **J Laryngol Otol.**, v. 121, n. 8, p. 772-774, 2007.

HANSEL, D.E.; RAHMANB, A.; WILENTZ, R.E.; SHIH, I.E.M.; McMASTER, M.T.; YEO, C.J; MAITRA, A. HLA-G upregulation in pre-malignant and malignant lesions of the gastrointestinal tract. **Int. J. Gastrointest. Cancer**, v. 35, n. 1, p. 15–24, 2005.

HEISE, A. The Clinical Significance of HPV. **Nur. Practit.**, v. 28, p. 8-19, 2003.

HERRERO, R. Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. **J. Natl. Cancer Inst. Monographs**, v. 31, p. 47-51, 2003.

HILDESHEIM, A.; WANG, S.S. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. **Virus Res.** v. 89, p. 229-240, 2002.

HOBBS, C.G.; STERNE, J.A.; BAILEY, M.; HEYDERMAN, R.S.; BIRCHALL, M.A.; THOMAS, S.J. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. **Clin. Otolaryngol.**, v. 31, n. 4, p. 259-266, 2006.

HOORY, T.; MONIE, A.; GRAVITT, P.; WU, T.C. Molecular epidemiology of human papillomavirus. **J. Formos. Med. Assoc.**, v. 107, n. 3, p. 198-217, 2008.

HOWLEY, P.M.; SCHEFFNER, M.; ROMANCZUK, H.; MUNGER, K.; HUIBREGTSE, J.M.; MIETZ, J.A. Functions of human papillomavirus proteins. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 186, p. 83-99, 1994.

HU, D.; IKIZAWA, K.; LU, L.; SANCHIRICO, M.E.; SHINOHARA, M.L.; CANTOR, H. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. **Nat. Immunol.**, v. 5, n. 5, p. 516-523, 2004.

HVIID, T.V.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; STIGNANI, M.; BARICORD, O.R. Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. **Hum. Immunol.**, v. 67, n. 1-2, p. 53-62, 2006.

HWANG, E.S.; NOTTOLI, T.; DIMAIO, D. The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. **Virology**, v. 211, p. 227-233, 1995.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC - **Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans**. Lyon: IARC 1986. (IARC Monographs, 38: Human papillomaviruses.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC - **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon: IARC 1995. (IARC Monographs, 64: Human papillomaviruses).

IBRAHIM, E.L.C.; ARACTINGI, S.; ALLORY, Y.; BORRINI, F.; DUPUY, A.; DUVILLARD, P.; CAROSELLA, E.D.; AVRIL, M.F.; PAUL, P. Analysis of HLA antigen expression in benign and malignant melanocytic lesions reveals that upregulation of HLA-G expression correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration and HLA-A1 genotype. **Int. J. Cancer**, v. 108, n. 2, p. 243–250, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER- INCA. Epidemiologia. Câncer de laringe. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=332. Acesso em: 05 jun 2008.

IWASAWA, A.; NIEMINEN, P.; LEHTINEN, M.; PAAVONEN, J. Human Papillomavirus in squamous cell carcinoma of the vulva by polymerase chain reaction. **Obstet Gynecol**, v. 89, n. 1, p. 81-84, 1997.

JONES, S.R.; MYERS, E.N.; BARNES, L. Benign neoplasm of the larynx. **Otolaryngol. Clin. North Am.**, v. 17, p. 151–178, 1984.

KANODIA, S.; FAHEY, L.M.; KAST, W.M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 7, p. 79-89, 2007.

KEATING, P.J.; CROMME, F.V.; DUGGAN-KEEN, M.; SNIJDERS, P.J.; WALBOOMERS, J.M.; HUNTER, R.D.; DYER, P.A.; STERN, P.L. Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. **J. Cancer**, v. 72, n. 2, p. 405-411, 1995.

KIM, K.H.; KIM, Y.S. Role of HPV and p53 suppressor gene in cervical carcinogenesis. **Yonsei Med.**, v. 36, p. 412-425, 1995.

KIRSZENBAUM, M.; MOREAU, P. ; GLUCKMAN, E.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 91, n. 10, p. 4209-4213, 1994.

KOLLER, B.H.; GERAGHTY, D.E.; SHIMIZU, Y.; DEMARS, R. A Novel HLA Class I Gene Expressed in Resting T Lymphocytes. **Print. USA.**, v. 141, p. 897-904, 1988.

KOVATS, S.; MAIN, E.K.; LIBRACH, C.; STUBBLEBINE, M.; FISHER, S.J.; DeMARS, R. A class 1 antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. **Science**, v. 248, p. 220-223, 1990.

KREIMER, A.R.; CLIFFORD, G.M.; BOYLE, P.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 14, n. 2, p. 467-475, 2005.

LA VECCHIA, C.; ZHANG, Z.F.; ALTIERI, A. Alcohol and laryngeal cancer: an update. **Eur. J. Cancer Prev.**, v. 17, n. 2, p.116-124, 2008.

LAWLOR, D.A.; ZEMMOUR, J.; ENNIS, P.D.; PARHAM, P. Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. **Annu. Rev. Immunol.**, v.8, p. 23-63, 1990.

LE BOUTEILLER, P.; SOLIER, C.; PROLL, J.; AGUERRE-GIRR, M.; FOURNEL, S.; LENFANT, F. Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? **Hum. Reprod. Update**, v. 5, p. 223-233, 1999.

LE DISCORDE, M.; MOREAU, P.; SABATIER, P.; LEGEAIS, J.M.; CAROSELLA, E.D. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. **Hum. Immunol.**, v. 64, n. 11, p. 1039-1044, 2003.

LEDWABA, T.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K . Molecular genetics of human cervical cancer: role of papillomavirus and the apoptotic cascade. **J. Biol. Chem.**, v. 385, p. 671–682, 2004.

LEE, D.; KIM, H.Z.; JEONG, K.W.; SHIM, Y.S.; HORIKAWA, I.; BARRETT, J.C.; CHOE, J. Human papillomavirus E2 down-regulates the human telomerase reverse transcriptase promoter. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 27748–27756, 2002.

LEE, N.; MALACKO, A.R.; ISHITANI, A.; CHEN, M.C.; BAJORATH, J.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY, D.E. The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. **Immunity**, v. 3, n. 5, p. 591-600, 1995.

LEFEBVRE, S.; ANTOINE, M.; UZAN, S.; McMASTER, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P. Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. **J. Pathol.**, v. 196, n. 3, p. 266–274, 2002.

LE MAOULT , J.; CAUMARTIN, J.; DAOUYA, M.; FAVIER, B.; LEROND, S.; GONZALEZ, A.; CAROSELLA, E.D. Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2040, 2007.

LE MAOULT , J.; LE DISCORDE, M.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; MCCLUSKEY, J.; CAROSELLA, E.D. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. **Tissue Antigens**, v. 62, n. 4, p. 273-284, 2003.

LE MAOULT , J.; ZAFARANLOO, K.; LE DANFF, C.; CAROSELLA, E.D. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. **FASEB J.**, v. 19, n. 6, p. 662–664, 2005.

LEROND, S.; GONZALEZ, A.; GONZALEZ, A.S.; CAROSELLA, E.D.; ROUAS-FREISS, N. Indoleamine 2,3 dioxygenase and human leucocyte antigen-G inhibit the T-cell alloproliferative response through two independent pathways. **Immunology**, v. 116, n. 3, p. 297-307, 2005.

LLANO, M.; LEE, N.; NAVARRO, F.; GARCIA, P.; ALBAR, J.P.; GERAGHTY, D.E.; LOPEZ-BOTET, M. HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 2854-2863, 1998.

LICITRA, L.; BERNIER, J.; GRANDI, C.; LOCATI, L.; MERLANO, M.; GATTA, G.; LEFEBVRE, J.L. Cancer of the larynx. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 47, n. 1, p. 65-80, 2003.

LINDEBER, G.H.; KROGDAHL, A. Laryngeal cancer and human papillomavirus: HPV is absent in the majority of laryngeal carcinomas. **Cancer Lett.**, v. 146, n. 1, 9-13, 1999.

MADKAN, V.K.; COOK-NORRIS, R.H.; STEADMAN, M.C.; ARORA, A.; MENDOZA, N.; TYRING, S.K. The oncogenic potential of human papillomaviruses: a review on the role of host genetics and environmental cofactors. **Brit. J. Dermatol.**, v. 157, p. 228-241, 2007.

MANJARREZ, M.E.; OCADIZ, R.; VALLE, L.; PACHECO, C.; MARROQUIN, A.; DE LA TORRE, C.; SELMAN, M.; GARIGLIO, P. Detection of human papillomavirus and relevant tumor suppressors and oncoproteins in laryngeal tumors. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, n. 23, p. 6946-6951, 2006.

MCDOUGALL, J.K. Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 186, p. 101-119, 1994.

MÉGRET, F.; PREHAUD, C.; LAFAGE, M.; MOREAU, P.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E.D.; LAFON, M. Modulation of HLA-G and HLA-E expression in human neuronal cells after rabies virus or herpes virus simplex type 1 infections. **Hum. Immunol.**, v. 68, n. 4, p. 294-302, 2007.

MENIER, C.; RABREAU, M.; CHALLIER, J.C.; LE DISCORDE, M.; CAROSELLA, E.D.; ROUAS-FREISS, N. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3153-3160, 2004.

MIRRA, A.P.; LATORRE, M.R.D.O.; VENEZIANO, D.B. **Incidência de Câncer no Município de São Paulo, Brasil 1997-1998**. Mortalidade de Câncer no Município de São Paulo, Brasil. Tendência no Período de 1969-1998. Brasília, DF. Ministério da Saúde, 2001.

MITSDOERFFER, M.; SCHREINER, B.; KIESEIER, B.C.; NEUHAUS, O.; DICHGANS, J.; HARTUNG, H.P.; WELLER, M.; WIENDL, H. Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.**, v. 159, n. 1-2, p. 155-164, 2005.

MUENSCHER, A.; FEUCHT, H.H.; KUTTA, H.; TESCHE, S.; WENZEL, S. Integration of human papilloma virus type 26 in laryngeal cancer of a child. **Auris Nasus Larynx.**, doi:10.1016/j.anl.2008.05.011, 2008.

MÜNGER, K.; BALDWIN, A.; EDWARDS, E.M.; HAYAKAWA, H. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. **J Virol.**, v. 78, p. 11451-11460, 2004.

MÜNGER, K.; HOWLEY, P.M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Res.**, v. 2, p. 213-228, 2002.

MÜNGER, K.; PHELPS, W.C.; BUBB, V.; HOWLEY, P.M.; SCHLEGEL, R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. **J Virol.**, v. 63, p. 4417-4421, 1989.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; DE SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P.J.; MEIJER, C.J. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 518–527, 2003.

NAIR, S.; PILLAI, M.R. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. **Oral Diseases**, v. 11, p. 350–359, 2005.

NARISAWA-SAITO, M.; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Sci.**, v. 98, n. 10, p. 1505–1511, 2007.

NUCKEL, H.; REBMANN, V.; DURIG, J.; DUHRSEN, U.; GROSSE-WILDE, H. HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 105, p. 1694-1698, 2005.

NUÑEZ, 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.**, v./108, p. 319-320, 1994.

ORIEL, J.D. Natural history of genital warts. **Br J Vener Dis.**, v. 47, p. 1–13, 1971.

OTERO, U.B.; ANTONIAZZI, B.N.; VEIGA, L.H.S.; TURCI, S.R. Aplicação de uma metodologia de screening para avaliar a mortalidade por câncer em municípios selecionados do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. 4, p. S537-S548, 2007.

PANOUSAKOPOULOU, V.; HUSTER, K.M.; MCCARTY, N.; FEINBERG, E.; WANG, R.; WUCHERPFENNIG, K.W.; CANTOR, H. Suppression of autoimmune disease after vaccination with autoreactive T cells that express Qa-1 peptide complexes. **J. Clin. Invest.**, v. 113, n. 8, p. 1218-1224, 2004.

PARKIN, D.M.; WHELAN, S.L.; FERLAY, J.; TEPPA, L.; THOMAS, D.B. **Cancer incidence in five continents**. v. VIII. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2002.

PAUL, P.; CABESTRE, F.A.; IBRAHIM, E.C.; LEFEBVRE, S.; KHALIL-DAHER, I.; VAZEUX, G.; QUILES R.M., BERMOND, F.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. **Hum. Immunol.**, v. 61, n. 11, p. 1138–1149, 2000.

PAZ, I.B.; COOK, N.; ODOM-MARYON, T.; XIE, Y.; WILCZYNSKI, S.P. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **Cancer**, v. 79, p. 595-604, 1997.

PEREZ-AYALA, M.; RUIZ-CABELLO, F.; ESTEBAN, F.; CONCHA, A.; REDONDO, M.; OLIVA, M.R.; CABRERA, T.; GARRIDO, F. Presence of HPV 16 sequence in laryngeal carcinomas. **Int. J. Cancer**, v. 46, p. 8-11, 1990.

PETT, M.; COLEMAN, N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? **J. Pathol.**, v. 212, p. 356–367, 2007.

PHILLIPS, D.H. Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 12, p. 1979-2004, 2002.

PINTOS, J.; FRANCO, E.L.; BLACK, M.J.; BERGERON, J.; ARELLA, M. Human Papillomaviruses and prognoses of patients with cancers of the upper aerodigestive tract. **Amer. Cancer Soc.**, v. 85, n. 9, p. 1903-1909, 1999.

POETKER, D.M.; SANDLER, A.D.; SCOTT, D.L.; SMITH, R.J.; BAUMAN, N.M. Survivin expression in juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, v. 111, p. 957-961, 2002.

POLEDNAK, A.P. Secular trend in U.S. black-white disparities in selected alcohol-related cancer incidence rates. **Alcohol Alcohol.**, v. 42, n. 2, p. 125-130, 2007.

POLJAK, M.; GALE, N.; KAMBIC, V. Human papillomaviruses: a study of their prevalence in the epithelial hyperplastic lesions of the larynx. **Acta Otolaryngol.**, v. 527, p. 66-69, 1997.

POSCH, P.E.; BORREGO, S.; SAEZ, M.E.; RUIZ, A.; GIMM, O.; LOPEZ-ALONSO, M.; ANTINOLO, G.; ENG, C. HLA-E is the ligand for the natural killer cell CD94/NKG2A receptors. **J. Biomed. Sci.**, v. 5, n. 5, p. 321-31, 1998.

PSYRRI, A.; DIMAIO, D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. **Nat. Clin. Pract. Oncol.**, n. 5, v. 1, p. 24-31, 2008.

PYO, C.; WILLIAMS, L.M.; MOORE, Y.; HYODO, H.; LI, S.S.; ZHAO, L.P.; SAGESHIMA, N.; ISHITANI, A.; GERAGHTY, D.E. HLA-E, HLA-F, and HLA-G polymorphism: genomic sequence defines haplotypes structure and variation spanning the nonclassical class I genes. **Immunogenetics**, v. 58, p. 241-251, 2006.

QIU, J.; TERASAKI, P.I.; MILLER, J.; MIZUTANI, K.; CAI, J.; CAROSELLA, E.D. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. **Am. J. Transplant.**, v. 6, n. 9, p. 2152-2156, 2006.

RABAH, R.; LANCASTER, W.D.; THOMAS, R.; GREGOIRE, L. Human papillomavirus-11-associated recurrent respiratory papillomatosis is more aggressive than human papillomavirus-6-associated disease. **Pediatr. Dev. Pathol.**, v. 4, n. 1, p. 68-72, 2001.

RAGIN, C.C.; MODUGNO, F.; GOLLIN, S.M. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 2, p. 104-114, 2007.

RAGIN, C.C.; TAIOLI, E.; WEISSFELD, J.L.; WHITE, J.S.; ROSSIE, K.M.; MODUGNO, F.; GOLLIN, S.M. 11q13 amplification status and human papillomavirus in relation to p16 expression defines two distinct etiologies of head and neck tumours. **Br J Cancer.**, v. 95, p. 1432 – 1438, 2006.

RIHKANEN, H.; PELTOMAA, J.; SYRJANEN, S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in vocal cords without laryngeal papillomas. **Acta Otolaryngol.**, v. 114, p. 348-351, 1994.

RITEAU, B.; FAURE, F.; MENIER, C.; VIEL, S.; CAROSELLA, E.D.; AMIGORENA, S.; ROUAS-FREISS, N. Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. **Hum. Immunol.**, v. 64, n. 11, p. 1064-1072, 2003.

RITEAU, B.; MENIER, C.; KHALIL-DAHER, I.; MARTINOZZI, S.; PLA, M., DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G1 co-expression boosts the HLA class I-mediated NK lysis inhibition. **Int Immunol.**, v. 13, p. 193-201, 2001.

ROMAGNANI, C.; PIETRA, G.; FALCO, M.; MILLO, E.; MAZZARINO, P.; BIASSONI, R.; MORETTA, A.; MORETTA, L.; MINGARI, M.C. Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 99, n. 17, p. 11328-1133, 2002.

RONCO, L.V.; KARPOVA, A.Y.; VIDAL, M.; HOWLEY, P.M. Human papillomavirus 16, E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes Dev.**, v. 12, p. 2061-2072, 1998.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; LE MAOULT, J.; CAROSELLA, E.D. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. **Semin. Cancer Biol.**, v. 17, n. 6, p. 413-421, 2007.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; FERRONE, S.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? **Cancer Res.**, v. 65, n. 22, p. 10139-10144, 2005.

SANGUINETTI, C.; NETO, D.E.; SIMPSON, A.J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 5, p. 914-921, 1994.

SARANTOPOULOS, S.; LU, L.; CANTOR, H. Qa-1 restriction of CD8⁺ suppressor T cells. **J Clin Invest.**, v. 114, n. 9, p. 1218-1221, 2004.

SARTOR, S.G. Riscos ocupacionais para câncer de laringe: um estudo caso-controlado. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. 6, p. 1473-1481, 2007.

SCULLY, C.; FIELD, J.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncol.**, v. 36, p. 256-263, 2000.

SHANGINA, O.; BRENNAN, P.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; MATES, D.; FABIÁNOVÁ, E.; FLETCHER, T.; T'MANNETJE, A.; BOFFETTA, P.; ZARIDZE, D.

Occupational exposure and laryngeal and hypopharyngeal cancer risk in central and Eastern Europe. **Am. J. Epidemiol.**, v. 164, p. 367-375, 2006.

SHIROISHI, M.; TSUMOTO, K.; AMANO, K.; SHIRAKIHARA, Y.; COLONNA, M.; BRAUD, V.M.; ALLAN, D.S.; MAKADZANGE, A.; ROWLAND-JONES, S.; WILLCOX, B.; JONES, E.Y.; VAN DER MERWE, P.A.; KUMAGAI, I.; MAENAKA, K. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 100, p. 8856-8861, 2003.

SNELL, G.D. Methods for the study of histocompatibility genes. **J Genet**, v. 49, p. 87-108, 1948.

SNIJDERS, P.J.F.; STEERBERGEN, D.M.; HEIDEMAN, D.A.M.; MEIJER, C.L.J.M. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. **J. Pathol.**, v. 208, p. 152- 164, 2006.

SOUSA, R.; DOSTATNI, N.; YANIV, M. Control of papillomaviruse gene expression. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1032, p. 19, 1990.

SPECTOR, J.G.; SESSIONS, D.G.; HAUGHEY, B.H.; CHAO, K.S.; SIMPSON, J.; EL MOFTY, S.; PEREZ, C.A. Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. **Laryngoscope**, v. 111, n. 6, p.1079-1087, 2001.

ST JOHN, M.A.; ABEMAYOR, E.; WONG, D.T. Recent new approaches to the treatment of head and neck cancer. **Anticancer Drugs**, v. 17, n. 4, p. 365-375, 2006.

STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecol. Oncol.**, v. 109, S15-S21, 2008.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24, Suppl 1, p. S16-S22, 2006.

STANLEY, M.A. Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. **Virus Res.**, v. 89, n. 2, p. 241-248, 2002.

STANLEY, M.A.; PETT, M.R.; COLEMAN, N. HPV: from infection to cancer. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 6, 2007.

STURGIS, E.M.; WEI, Q.; SPITZ, M.R. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. **Semin. Oncol.**, v. 31, n. 6, p. 726–733, 2004.

SULLIVAN, L.C.; HOARE, H.L.; McCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J.; BROOKS, A.G. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. **Trends Immunol.**, v. 27, n. 9, p. 413-420, 2006.

SYRJÄNEN, K.J.; PYRHÖNEN, S.; SYRJÄNEN, S.M.; LAMBERG, M.A. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. **Br. J. Oral Surg.**, v. 21, n. 2, p. 147-153, 1983.

SYRJANEN, S.; SYRJANEN, K.; MANTYJARVI, R.; COLLAN, Y.; KARJA, J. Human papillomaviruse DNA in squamous cell carcinomas of the larynx demonstrated by in situ DNA hybridization. **J. Otorhinolaryngol .Relat. Spec.**, v. 49, p. 175-186, 1987.

SZYFTER, K.; HEMMINKI, K.; SZYFTER, W.; SZMEJA, Z.; BANASZEWSKI, J.; YANG, K. Aromatic DNA adducts in larynx biopsies and leukocytes. **Carcinogenesis**, v. 15, p. 2195–2199, 1994.

TABAYOYONG, W.B.; ZAVAZAVA, N. Soluble HLA revisited. **Leuk. Res.**, v. 31, n. 2, p. 121–125, 2007.

TERASAKI, P.I. Nomenclature for factors of the HLA system. **Tissue Antigens.**, v. 46, p. 1-18, 1995.

THOMAS, J.T.; HUBERT, W.G.; RUESCH, M.N.; LAIMINS, L.A. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 8449–8454, 1999.

TOMMASINO, M.; ACCARDI, R.; CALDEIRA, S.; DONG, W.; MALANCHI, A.; SMET, A.; ZEHBE, I. The role of TP53 in cervical carcinogenesis. **Hum. Mutat.**, v. 21, n. 3, p. 307-312, 2003.

TORRENTE, M.; ABUD, S.; ABUD, M.; OJEDA, J.M. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus in laryngeal carcinoma specimens. **Acta Otolaryngol.**, v.v125, p. 888-893, 2005.

TORRENTE, M.C.; OJEDA, J.M. Exploring the relation between human papilloma virus and larynx cancer. **Acta Otolaryngol.**; v. 127, n. 9, p. 900-906, 2007.

TRAN, N.; ROSE, B.R.; O'BRIEN, C.J. Role of human papillomavirus in the etiology of head and neck cancer. **Head Neck.**, v. 29, n. 1, p. 64-70, 2007.

TSAI, T.C.; CHEN, S.L. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. **Arch. Virol.**, v. 148, p. 1445-1453, 2003.

TUNGTEAKKHUN, S.S.; DUERKSEN-HUGHES, P.J. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. **Arch. Virol.**, v. 153, p. 397–408, 2008.

TUYNS, A.J.; ESTEVES, J.; RAYMOND, L.; BERRINO, F.; BENHAMOU, E.; BLANCHET, F.; BOFFETTA, P.; CROSIGNANI, P.; DEL MORAL, A.; LEHMANN, W. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol. IARC International case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). **Int. J. Cancer**, v. 41, p. 483-491, 1988.

UM, S.J.; RHYU, J.W.; KIM, E.J.; JEON, K.C.; HWANG, E.S.; PARK, J.S. Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. **Cancer Lett.**, v. 179, p. 205–212, 2002.

UMUDUM, H.; REZANKO, T.; DAG, F.; DOGRULUK, T. Human papillomavirus genome detection by in situ hybridization in fine-needle aspirates of metastatic lesions from head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer*. v. 105, n. 3, 171-177, 2005.

UNG, A.; KRAMER, T.R.; SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; BRATTI, C.B.; BURK, R.D.; SWANSON, C.A.; SHERMAN, M.E.; HUTCHINSON, M.L.; ALFARO, M.; MORALES, J.; BALMACEDA, H.; HILDESHEIM, A. Soluble interleukin 2 receptor levels and cervical neoplasia: results from a population-based case-control study in Costa Rica. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 8, p. 249-253, 1999.

UROSEVIC, M.; KURRER, M.O.; KAMARASHEV, J.; MUELLER, B.; WEDER, W.; BURG, G.; STAHEL, R.A.; DUMMER, R.; TROJAN, A. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade human histology, leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. **Am. J. Pathol.**, v. 159, n. 3, p. 817–824, 2001.

UROSEVIC, M.; WILLERS, J.; MUELLER, B.; KEMPF, W.; BURG, G.; DUMMER, R. HLA-G protein upregulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. **Blood**, v. 99, n. 2, p. 609–617, 2002.

VELDMAN, T.; HORIKAWA, I.; BARRETT, J.C.; SCHLEGEL, R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. **J. Virol.**, v. 75, p. 4467–4472, 2001.

VENUTI, A.; MANNI, V.; MORELLO, R.; DE MARCO, F.; MARZETTI, F.; MARCANTE, M.L. Physical state and expression of human papillomaviruse in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. **J. Med. Virol.**, v. 60, p. 396-402, 2000.

VILLA, L.L. Vaccines against papillomavirus infections and disease. **Salud Publica Mex.**, Suppl 3, S443-S448, 2003.

WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, M.M.; BOSCH, F.X.; KUMMER, J.A.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P.J.; PETO, J.; MEIJER, C.J.; MUNOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cancer worldwide. **J. Pathol.**, v. 189, p. 12-19, 1999.

WANG, S.S.; HILDESHEIM, A. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. **J. Natl. Cancer Inst. Monogr.**, v. 31, p. 35–40, 2003.

WATT, F.M. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 353, p. 831–837, 1998.

WIENDL, H.; FEGER, U.; MITTELBRONN, M.; JACK, C.; SCHREINER, B.; STADELMANN, C.; ANTEL, J.; BRUECK, W.; MEYERMANN, R.; BAR-OR, A.; KIESEIER, B.C.; WELLER, M. Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. **Brain**, v. 128; n. 11, p. 2689-2704, 2005.

WÜNSCH-FILHO, V. The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. **Sao Paulo Med. J.**, v. 122, n. 5, p. 188-194, 2004.

XAVIER, S.D.; BUSSOLOTI FILHO, I.; LANCELLOTTI, C.L. Prevalence of histological findings of human papillomavirus (HPV) in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma biopsies: preliminary study. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 71, n. 4, p. 510-514, 2005.

YOON, C.S.; KIM, K.D.; PARK, S.N.; CHEONG, S.W. Alpha(6) integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 283, p. 668–673, 2001.

ZAVAZAVA, N. Soluble HLA class I molecules: biological significance and clinical implications. **Molecular Medicine Today**, v. 4, n. 3, p. 116–121, 1998.

ZHANG, B.; SPANDAU, D.F.; ROMAN, A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. **J. Virol.**, v. 76, p. 220-231, 2002.

ZHENG, Z.M.; BAKER, C.C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Front. Biosci.**, v. 1, n. 11, p. 2286-2302, 2006.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1288, p. F55-F78, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 342-350, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 92, n. 9, p. 690-698, 2000.

Anexo

Dados da expressão qualitativa e quantitativa de HLA-G e de HLA-E nas lesões de laringe dos 109 paciente estudados.

AM	LESÃO	HPV	HLA-G (%)	INTENS HLA-G	HLA-E (%)	INTENS HLA-E	SEXO	IDADE	FUMO	ÁLCOOL	COR	SÍTIO
1	DL	NEGATIVA	100	LEVE	0	NEGATIVA	M	66	S	S	BRA	GLOTE
2	DL	NEGATIVA	100	LEVE	81,25	LEVE	M	62	S	S	BRA	GLOTE
3	DL	NEGATIVA	64,89	LEVE	75,43	LEVE	F	74	S	S	BRA	SUPRA
4	DL	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	M	73	S	S	PRE	SUPRA
5	DL	NEGATIVA	52,08	LEVE	52,16	LEVE	M	57	Ex-tabag	N	BRA	SUPRA
6	DM	NEGATIVA	100	LEVE	0	NEGATIVA	M	72	S	S	BRA	SUPRA
7	DM	NEGATIVA	47,65	LEVE	0	NEGATIVA	M	66	S	S	BRA	SUPRA
8	DM	NEGATIVA	56,27	LEVE	69,48	LEVE	F	66	S	S	PRE	SUPRA
9	DM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	MODERADA	M	85	S	S	BRA	SUPRA
10	DM	NEGATIVA	71,12	LEVE	0	NEGATIVA	M	60	S	S	BRA	SUPRA
11	DM	NEGATIVA	80,83	LEVE	0	NEGATIVA	M	77	Ex-tabag	N	BRA	GLOTE
12	DM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	M	83	N	N	BRA	SUPRA
13	DM	NEGATIVA	95,41	LEVE	0	NEGATIVA	M	56	S	S	BRA	SUPRA
14	DA	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	F	69	S	N	BRA	GLOTE
15	DA	NEGATIVA	100	LEVE	0	NEGATIVA	M	79	S	S	BRA	SUPRA
16	DA	NEGATIVA	40,54	LEVE	0	NEGATIVA	M	67	S	S	BRA	SUPRA
17	DA	NEGATIVA	76,17	LEVE	0	NEGATIVA	M	69	S	S	PRE	GLOTE
18	PL	NEGATIVA	100	LEVE	100	MODERADA	M	18	N	N	BRA	SUPRA
19	PL	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	M	57	N	N	BRA	SUPRA
20	PL	HPV 11, 31	85,3	LEVE	0	NEGATIVA	F	13	N	N	MUL	SUPRA
21	PL	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	F	27	N	N	MUL	SUPRA
22	PL	HPV 11	31,83	LEVE	0	NEGATIVA	F	15	N	N	BRA	GLOTE
23	PL	NEGATIVA	38,67	LEVE	53,54	MODERADA	F	40	N	N	BRA	GLOTE
24	PL	HPV 11	100	LEVE	0	NEGATIVA	M	40	N	S	BRA	SUPRA

AM	LESÃO	HPV	HLA-G (%)	INTENS HLA-G	HLA-E (%)	INTENS HLA-E	SEXO	IDADE	FUMO	ÁLCOOL	COR	SÍTIO
25	PL	NEGATIVA	59,44	LEVE	47,24	LEVE	M	34	N	S	BRA	GLOTE
26	PL	NEGATIVA	42,45	LEVE	51,16	LEVE	M	15	N	N	BRA	SUPRA
27	PL	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	LEVE	M	18	N	N	BRA	GLOTE
28	PL	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	M	15	N	N	BRA	GLOTE
29	PL	NEGATIVA	65,18	LEVE	0	NEGATIVA	M	12	N	N	BRA	GLOTE
30	PL	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	M	19	N	N	BRA	SUPRA
31	PL	NEGATIVA	21,15	LEVE	0	NEGATIVA	M	27	N	N	BRA	GLOTE
32	PL	HPV 11	0	NEGATIVA	90	LEVE	F	40	N	N	BRA	GLOTE
33	PL	NEGATIVA	21,33	LEVE	0	NEGATIVA	F	33	N	N	BRA	SUPRA
34	PL	NEGATIVA	72,55	LEVE	57,4	LEVE	M	27	N	N	BRA	SUPRA
35	PL	HPV 11	34,42	LEVE	0	NEGATIVA	M	7	N	N	BRA	SUPRA
36	PL	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	F	10	N	N	BRA	SUPRA
37	PL	HPV 11	25,06	LEVE	38,06	LEVE	M	28	N	N	BRA	SUPRA
38	PL	HPV 33	42,7	LEVE	0	NEGATIVA	M	7	N	N	BRA	SUPRA
39	PL	NEGATIVA	28,63	LEVE	0	NEGATIVA	M	15	N	N	BRA	SUPRA
40	PL	HPV 11	53,33	LEVE	36,6	LEVE	F	46	S	S	BRA	GLOTE
41	PL	NEGATIVA	49,82	LEVE	0	NEGATIVA	M	49	N	N	BRA	GLOTE
42	PL	NEGATIVA	100	LEVE	85,1	ACENTUADA	M	78	Ex-tabag	Ex-etiologista	BRA	SUPRA
43	PL	HPV 11	46,38	LEVE	0	NEGATIVA	M	24	N	N	BRA	GLOTE
44	PL	HPV 11, 31	100	LEVE	36,46	LEVE	M	43	Ex-tabag	N	AMARELO	SUPRA
45	CLIS	NEGATIVA	100	MODERADA	0	NEGATIVA	F	60	S	N	BRA	SUPRA
46	CLIS	NEGATIVA	100	LEVE	0	LEVE	M	62	S	N	BRA	GLOTE
47	CLIS	NEGATIVA	100	LEVE	0	NEGATIVA	M	58	S	S	BRA	SUPRA
48	CLIS	NEGATIVA	32,49	LEVE	56,7	LEVE	F	60	N	N	BRA	GLOTE
49	CLIS	NEGATIVA	58,54	LEVE	84,8	LEVE	F	64	N	N	BRA	SUPRA
50	CLIS	NEGATIVA	100	LEVE	0	NEGATIVA	M	62	S	S	BRA	GLOTE
51	CLIS	HPV 18	0	NEGATIVA	49,74	NEGATIVA	M	72	S	N	BRA	SUPRA
52	CLIS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	M	55	S	N	BRA	SUPRA
53	CLIS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	LEVE	M	59	N	S	BRA	GLOTE
54	CLIS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	F	40	N	N	MUL	SUPRA
55	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	73,86	LEVE	M	54	Ex-tabag	N	BRA	SUPRA

AM	LESÃO	HPV	HLA-G (%)	INTENS HLA-G	HLA-E (%)	INTENS HLA-E	SEXO	IDADE	FUMO	ÁLCOOL	COR	SÍTIO
56	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	MODERADA	M	72	S	N	BRA	SUPRA
57	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	LEVE	F	59	S	N	BRA	SUPRA
58	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	F	59	S	N	BRA	GLOTE
59	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	F	59	S	S	BRA	SUPRA
60	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	M	59	S	S	BRA	SUPRA
61	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	57	LEVE	F	70	S	N	BRA	GLOTE
62	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	73,27	MODERADA	M	63	N	N	BRA	SUPRA
63	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	MODERADA	M	72	S	S	BRA	SUPRA
64	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	MODERADA	M	64	S	S	BRA	SUPRA
65	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	47,24	LEVE	F	60	S	N	BRA	SUPRA
66	CLS	HPV 6	0	NEGATIVA	100	MODERADA	M	47	S	N	BRA	SUPRA
67	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	LEVE	M	55	S	S	PRE	GLOTE
68	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	LEVE	M	59	S	S	BRA	GLOTE
69	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	90	MODERADA	M	65	N	N	BRA	SUPRA
70	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	F	48	S	S	MUL	SUPRA
71	CLS	NEGATIVA	100	ACENTUADA	37,71	MODERADA	F	61	S	S	BRA	SUPRA
72	CLS	NEGATIVA	70	LEVE	100	LEVE	M	62	S	S	BRA	GLOTE
73	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	M	49	S	S	BRA	SUB
74	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	MODERADA	M	59	S	S	BRA	SUPRA
75	CLS	NEGATIVA	40	MODERADA	25,63	MODERADA	F	65	Ex-tabag	N	MUL	SUPRA
76	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	M	74	S	S	BRA	SUPRA
77	CLS	NEGATIVA	32,54	LEVE	0	LEVE	M	47	S	S	BRA	GLOTE
78	CLS	HPV 33, 31	80	MODERADA	0	NEGATIVA	F	61	S	Ex-etilista	BRA	SUPRA
79	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	58,49	LEVE	M	52	S	S	BRA	SUPRA
80	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	62,05	NEGATIVA	M	52	S	S	BRA	SUPRA
81	CLS	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	LEVE	M	51	S	S	BRA	SUPRA
82	CLM	NEGATIVA	100	LEVE	83,76	MODERADA	F	59	S	S	BRA	SUPRA
83	LN	NEGATIVA	100	ACENTUADA	100	MODERADA						
84	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	MODERADA	M	57	S	S	MUL	SUPRA
85	LN	NEGATIVA	59,1	MODERADA	100	LEVE						
86	CLM	NEGATIVA	100	LEVE	100	LEVE	M	47	S	S	BRA	SUPRA

AM	LESÃO	HPV	HLA-G (%)	INTENS HLA-G	HLA-E (%)	INTENS HLA-E	SEXO	IDADE	FUMO	ÁLCOOL	COR	SÍTIO
87	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	LEVE						
88	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	MODERADA	M	61	S	S	BRA	SUPRA
89	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	LEVE						
90	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	LEVE	M	45	S	S	BRA	SUPRA
91	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA						
92	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	MODERADA	M	40	S	S	BRA	GLOTE
93	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	LEVE						
94	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	M	57	S	S	PRE	SUPRA
95	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	LEVE						
96	CLM	HPV 31	0	NEGATIVA	100	MODERADA	M	47	S	S	BRA	GLOTE
97	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	81,21	MODERADA						
98	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	MODERADA	M	54	S	N	BRA	SUPRA
99	LN	NEGATIVA	98,3	LEVE	0	NEGATIVA						
100	CLM	NEGATIVA	100	LEVE	100	LEVE	F	50	S	S	BRA	SUPRA
101	LN	HPV 31, 16	55	MODERADA	100	MODERADA						
102	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	56,33	LEVE	M	51	S	S	BRA	GLOTE
103	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	79,93	LEVE						
104	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	M	57	Ex-tabag	N	BRA	SUPRA
105	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA						
106	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	M	81	S	N	BRA	SUPRA
107	LN	NEGATIVA	26,2	MODERADA	100	LEVE						
108	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	53,45	LEVE	F	50	S	N	PRE	GLOTE
109	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	57,1	LEVE						
110	CLM	NEGATIVA	79	MODERADA	100	MODERADA	M	56	S	S	MUL	GLOTE
111	LN	HPV 16, 33	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA						
112	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	61,45	LEVE	M	72	Ex-tabag	Ex-estilista	BRA	SUPRA
113	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	87,38	LEVE						
114	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	LEVE	M	65	S	N	BRA	GLOTE
115	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	67,15	LEVE						
116	CLM	NEGATIVA	100	MODERADA	100	LEVE	M	58	S	S	PRE	SUPRA
117	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	76,32	LEVE						

AM	LESÃO	HPV	HLA-G (%)	INTENS HLA-G	HLA-E (%)	INTENS HLA-E	SEXO	IDADE	FUMO	ÁLCOOL	COR	SÍTIO
118	CLM	NEGATIVA	21,1	LEVE	23,75	LEVE	M	46	S	S	BRA	SUPRA
119	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	32,78	LEVE						
120	CLM	NEGATIVA	64,7	MODERADA	100	MODERADA	M	67	S	S	BRA	GLOTE
121	LN	NEGATIVA	77,2	MODERADA	100	MODERADA						
122	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	LEVE	F	45	Ex-tabag	N	BRA	SUPRA
123	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	70,33	LEVE						
124	CLM	HPV 6, 16	0	NEGATIVA	100	MODERADA	M	66	S	S	BRA	SUPRA
125	LN	NEGATIVA	100	LEVE	100	MODERADA						
126	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	MODERADA	M	73	S	S	BRA	GLOTE
127	LN	NEGATIVA	37,1	LEVE	100	LEVE						
128	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	MODERADA	F	52	S	N	PRE	SUPRA
129	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	LEVE						
130	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA	M	54	S	S	BRA	SUPRA
131	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	92,4	LEVE						
132	CLM	NEGATIVA	0	NEGATIVA	87,03	MODERADA	M	52	S	S	BRA	SUB
133	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	100	MODERADA						
134	CLM	NEGATIVA	100	LEVE	60,06	LEVE	M	53		N	BRA	GLOTE
135	LN	NEGATIVA	100	MODERADA	44	LEVE						
136	CLM	NEGATIVA	100	MODERADA	100	MODERADA	M	55	S	S	BRA	SUPRA
137	LN	NEGATIVA	0	NEGATIVA	0	NEGATIVA						

AM: Amostra; INTENS: intensidade; DL: Displasia leve; DM: Displasia moderada; DA: Displasia acentuada; PL: Papiloma laringeo; CLIS: Carcinoma *in situ* de laringe; CLS: Carcinoma invasor de laringe sem metástase; CLM: Carcinoma invasor de laringe com metástase; M: Masculino; F: Feminino; N: Não; S: Sim; SUPRA: Supraglote; SUB: Subglote; Ex-tabag: ex-tabagista.