



**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina – Botucatu/SP



**Deilson Elgui de Oliveira**

**Infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e vírus do papiloma humano (HPV), expressão da proteína p53 e proliferação celular em carcinomas de nasofaringe e laringe**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: *Profa. Dra. Maura M. Bacchi*

**Botucatu/SP**

**2002**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ELZA NUMATA

Elgui de Oliveira, Deilson

Infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e pelo vírus do papiloma humano (HPV), expressão da proteína p53 e proliferação celular em carcinomas de nasofaringe e laringe / Deilson Elgui de Oliveira. – 2002.

Tese (doutoramento) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2002.

Orientadora: Maura Moscardi Bacchi

1. Aparelho respiratório – Câncer – Patologia

CDD 616.9942

Palavras-chave: Câncer; Nasofaringe; Laringe; Vírus de Epstein-Barr; Vírus do Papiloma Humano; Proliferação celular

## Dedicatórias

*À Terezinha Elgui Severo e*

*José Deilson de Oliveira,*

pela graça de serem meus pais, por me  
cumularem de amor incondicional e repre-  
sentarem a evidência maior de que Deus  
derrama sobre mim Suas bênçãos.

*Em memória de Eduardo Augusto Gomes,*

cuja história de vida resgata a importância  
de sermos sempre instrumentos para a  
transformação do mundo.

## Agradecimentos especiais

***“Se vi mais longe, é porque me apoiei nos ombros de gigantes”***

(Isaac Newton)

*À Profa. Maura Moscardi Bacchi e*

*Prof. Carlos Eduardo Bacchi,*

pelo privilégio e prazer de tê-los mentores de minha carreira científica e, sobretudo, amigos na mais completa acepção da palavra.

## Agradecimentos

- À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)* e *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, cujos financiamentos tornaram possível a realização desta pesquisa (FAPESP proc. AP 1998/10058-0 e MS 1998/14442-1; CNPq proc. 141296/01-1).
- Ao *Dr. Ricardo Macarenco e Silva* e *Dr. José Vicente Tagliarini*, pelo auxílio prestado no levantamento e compilação dos dados clínicos dos pacientes com cânceres de cabeça e pescoço.
- Aos amigos *Marcos Roberto Franchi* e *Celene Maria Carvalho Gandin*, pelo excepcional suporte na confecção das lâminas histológicas, na execução da técnica de imunohistoquímica, e pela sempre agradabilíssima companhia.
- À equipe de trabalho dos laboratórios *Diagnóstika* (São Paulo, SP) e *Consultoria em Patologia* (Botucatu, SP), pelo auxílio na complementação da casuística de carcinomas de nasofaringe.
- Ao *Dr. Ricardo Cordeiro*, pelo valoroso suporte na avaliação dos resultados.
- Às biomédicas *Glenda Nicioli da Silva* e *Suzane Ramos da Silva*, bem como *Aline do Nascimento Bolpetti*, *Edaíse Maria da Silva*, *Érick da Cruz Castelli*, *Gisele Malerbi Zapparoli*, *Luciene Borges* e *Mariana Maschietto*, pelo auxílio prestado no processamento de amostras, pelo companheirismo e favorecimento de minha formação profissional.

- Ao Dr. Carlos Magno C. B. Fortaleza, Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori, Dra. Eliane Souto de Abreu, Dr. João Lauro V. de Camargo, Dra. Noeme Souza Rocha e Dra. Rachel Assad, pela amizade, pelo constante incentivo e ajuda oportuna nos momentos de dificuldade.
- Aos colegas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP), pelo receptivo ambiente de trabalho proporcionado e estímulo ao meu amadurecimento profissional e pessoal.
- Ao setor de pós-graduação da FMB-UNESP, particularmente Adnice Ruiz Pedro, Nathanael Pinheiro Salles, Regina Célia Spadin, Tânia Alice Andrade e Vera Lúcia Mengue, além dos companheiros do curso de pós-graduação em Patologia.
- Aos saudosos colegas do Instituto de Biociências de Botucatu e aos prestativos funcionários da Biblioteca do campus, pelo ininterrupto auxílio desde minha graduação.
- Aos meus irmãos Júnior, Deise, Amélia, Cassandra e Ive, meus sobrinhos, tios e aqueles que, não estando a mim ligados pelos laços da família, certamente estão pelos laços do coração.

Às pessoas não citadas explicitamente, cujo carinho e afeto jamais me faltaram, meu sincero pedido de desculpas e a certeza de que a omissão se restringe a estas páginas.

A todos, minha eterna gratidão!

***“Science is sometimes incredibly difficult and frustrating. But if you keep on working at it, you'll get over the hard parts and eventually succeed.”***

(Patrick S. Moore, MD MPH)

# Sumário

<b>I - RESUMO .....</b>	<b>15</b>
<b>II - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
II.1 - Câncer de cabeça e pescoço.....	19
II.2 - Vírus de Epstein-Barr.....	22
II.3 - Vírus do Papiloma Humano .....	26
II.4 - Gene supressor tumoral <i>TP53</i> .....	31
II.5 - Proliferação celular e câncer.....	35
<b>III - OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
<b>IV - CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
IV.1 - Seleção dos casos.....	43
IV.2 - Análise histopatológica .....	44
IV.3 - Estudo imunoistoquímico.....	44
IV.4 - Extração de DNA para os ensaios baseados em PCR.....	45
IV.5 - Pesquisa do EBV.....	46
IV.6 - Pesquisa do HPV.....	48
IV.7 - Análise de imagem e estimativa da proliferação celular .....	51
IV.8 - Análise dos resultados.....	56
<b>V - RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
V.1 - Carcinomas de Nasofaringe .....	58
V.1.1 - Caracterização geral da amostra de estudo .....	58
V.1.2 - Infecção pelo EBV e HPV.....	58
V.1.3 - Expressão de p53 e Ki-67: proliferação celular e suas correlações .....	61
V.2 - Carcinomas de Laringe.....	63
V.2.1 - Caracterização geral da amostra de estudo .....	63
V.2.1.1 - Epidemiologia.....	63
V.2.1.2 - Topografia.....	64
V.2.1.3 - Estadiamento TNM e estágio clínico.....	65

V.2.1.4 - Histopatologia .....	66
V.2.2 - Infecção pelo EBV e HPV.....	67
V.2.3 - Expressão de p53 e Ki-67: proliferação celular e suas correlações .....	68
<b>VI - DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
VI.1 - Carcinomas de Nasofaringe .....	73
VI.2 - Carcinomas de Laringe.....	80
<b>VII - CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>VIII - ABSTRACT .....</b>	<b>94</b>
<b>IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>97</b>

## Lista de Figuras, Tabelas e Quadros

- FIGURA 1 – A) Paciente apresentando Linfoma de Burkitt endêmico, neoplasia maligna associada à infecção pelo EBV em virtualmente todos os casos. B) Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando presença de partículas virais no tumor. No detalhe, modelo tridimensional do capsídeo. .... 23
- FIGURA 2 – A) Aspecto da partícula viral do HPV à microscopia eletrônica. No detalhe, modelo tridimensional do capsídeo. B) Esquematização do genoma do HPV, seus genes e principais funções. Genes de expressão precoce: E1, E2, E4, E5, E6 e E7; genes de expressão tardia: L1 e L2. LCR: região extensa de controle (*Long Control Region*). .... 27
- FIGURA 3 – Relação entre os fenômenos biológicos associados à diferenciação de células epiteliais normais e células epiteliais infectadas pelo HPV (Modificado de STUBENRAUCH & LAIMINS, 1999). .... 28
- FIGURA 4 – Degradação de p53 mediada pela proteína E6 do HPV-16. A proteólise mediada por ubiquitinação tem como etapa final incorporação de cadeias do polipeptídeo ubiquitina à proteína a ser degradada. Marcada, a proteína ubiquitinada segue para o proteossoma para clivagem. Em condições normais a p53 é substrato para ubiquitinação pela enzima ubiquitina-ligase E3, mas não pela ubiquitina-ligase E6AP. A proteína E6 do HPV 16 liga-se simultaneamente à E6AP e à p53, favorecendo a ubiquitinação desta e sua conseqüente degradação. Ub: Ubiquitina; E1: Enzima ativadora de ubiquitina; E2: enzima conjugadora de ubiquitina; E3 e E6AP: ubiquitina-ligases. .... 29
- FIGURA 5 – Cooperação entre as oncoproteínas E6 e E7 do HPV na transformação celular. Ao interagir com a pRB, a proteína E7 de HPVs de alto risco prejudica o controle da proliferação celular e diferenciação. Células que possuem atividade de *TP53* mantida respondem a este fenômeno induzindo apoptose. Entretanto, a expressão concomitante de E6 nas células infectadas compromete a deflagração de apoptose mediada por p53, ocasionando manutenção de células instáveis, sua proliferação e favorecimento da transformação celular (Modificado de HOPPE-SEYLER & BUTZ, 1995). .... 30
- FIGURA 6 – Representação esquemática das funções do produto de *TP53* e suas interações com proteínas com importante papel no processo carcinogênico. (Compilado a partir dos trabalhos de KOUZARIDES, 1995; GOTTLIEB & OREN, 1996; MOMAND, WU & DASGUPTA, 2000) ..... 33

FIGURA 7 – Papel da proliferação celular na carcinogênese (ver texto).....	36
FIGURA 8 – Fluxograma geral da pesquisa. IHQ – Imunoistoquímica; HIS: Hibridação <i>in situ</i> . .....	43
FIGURA 9 – Análise de Imagem de lâminas marcadas com anticorpo monoclonal MIB-1 para avaliação da proliferação celular. A – Campo de carcinoma de laringe capturado no software de análise de imagem KS-300. Os núcleos das células que expressam o antígeno de proliferação celular Ki-67 apresentam-se corados em marrom pela deposição de cromógeno nos sítios de ligação antígeno-anticorpo. B – Seleção preliminar dos elementos da análise (ver texto). C – Resultado da seleção preliminar dos elementos da análise. A imagem gerada é denominada “máscara”. D – Conclusão da análise após refinamento da seleção dos núcleos marcados através do emprego de critérios de exclusão de elementos que não devem ser computados. ....	53
FIGURA 10 – Exemplo da intervenção do operador ao final da análise de imagem automática. Alguns núcleos que expressam Ki-67 não foram computados, pois não foram incluídos na seleção preliminar, ou não atenderam aos critérios definidos para exclusão de elementos da análise (cabeça de setas). Também é possível que dois ou mais núcleos muito próximos sejam considerados pelo software como um único elemento (asteriscos). As células marcadas com “+” são contadas manualmente, sendo que o número total obtido é acrescido ao resultado da contagem realizada pelo software. Procedimento análogo permite eliminar elementos erroneamente computados na contagem automática. ....	54
FIGURA 11 – Hibridação <i>in situ</i> para detecção do EBV em carcinoma indiferenciado de nasofaringe. Virtualmente todas as células neoplásicas exibem marcação nuclear com sonda biotilada complementar a segmento do transcrito viral EBER-1, ativamente expresso nas células infectadas pelo EBV (Aumento de 100x; contra coloração com verde de metila).....	59
FIGURA 12 – Avaliação por PCR da deleção de 30pb no gene viral BNLF-1 (que codifica a LMP-1 do EBV), em carcinomas de nasofaringe. Amplificação de segmento do gene viral pode ser observada nas amostras destacadas, sendo que casos com e sem deleção apresentam amplicons de 131pb (em vermelho) e 161pb (em azul), respectivamente. M – Marcador de peso molecular de 50pb; No – controle negativo da reação (sem DNA).....	60

- FIGURA 13 – Carcinoma de nasofaringe (N1) apresentando amplificação de segmento do genoma do HPV através de PCR com iniciadores genéricos (à direita), e de segmentos de 152pb e 216pb com iniciadores específicos (à esquerda), resultados compatíveis com infecção concomitante por HPVs 16 e 18. Ca – Controle positivo (amostra de DNA extraído de células CaSki); No – Controle negativo (sem DNA); HPV-6/11 – amostra de DNA extraído de condiloma acuminado (302pb); HPV-16 – DNA extraído de linhagem celular CaSki (152pb); HPV-18 – DNA extraído de linhagem celular HeLa (216pb)..... 61
- FIGURA 14 – Expressão do produto do gene supressor tumoral TP53 em caso de carcinoma indiferenciado de nasofaringe (Aumento de 200x; contra coloração com verde de metila). ..... 62
- FIGURA 15 – Comparação entre a média dos Índices de proliferação celular (IPC) de carcinomas de laringe (supraglóticos, glóticos e transglóticos) e carcinomas de nasofaringe. .... 62
- FIGURA 16 – Distribuição dos casos de carcinomas de laringe com relação ao tabagismo (n=110). ..... 63
- FIGURA 17 – Distribuição dos casos de carcinomas de laringe (n=110) com relação à topografia da lesão e estágio clínico, avaliado com base no estadiamento TNM.. 66
- FIGURA 18 – Graduação dos casos estudados de carcinomas espinocelulares de laringe. A - Grau I (carcinoma bem diferenciado; 200x); B - Grau II (carcinoma moderadamente diferenciado; 100x); C – Grau III (carcinoma pouco diferenciado; 200x)..... 67
- FIGURA 19 – Genotipagem do HPV por PCR *multiplex*, com emprego de iniciadores específicos para os tipos 6/11, 16 e 18. À esquerda, controles da reação: HPV-6/11 – amostra de DNA extraído de condiloma acuminado (302pb); HPV-16 – DNA extraído de linhagem celular CaSki (152pb); HPV-18 – DNA extraído de linhagem celular HeLa (216pb); No – controle negativo (sem DNA). À direita, avaliação de amostras de carcinoma de laringe glóticos e supraglóticos. Amostras HPV-positivas estão destacadas..... 68
- FIGURA 20 – Carcinoma espinocelular bem diferenciado de laringe revelando marcação imuno-histo-química para acúmulo nuclear do produto do gene supressor tumoral *TP53* nas células neoplásicas (Aumento de 100x; contra coloração com verde de metila). ..... 69

FIGURA 21 – Carcinoma moderadamente diferenciado de laringe exibindo elevada expressão nuclear do antígeno de proliferação celular Ki-67, avaliada através de imunoistoquímica com anticorpo monoclonal MIB-1 (contracoloração com verde de metila; aumento 200x). .....	70
FIGURA 22 – Índice de proliferação celular (IPC) segundo grau histológico e acúmulo de p53 em 104 casos de carcinomas de laringe.....	71
FIGURA 23 – Índice de proliferação celular (IPC) avaliado segundo infecção por HPV em 104 casos de carcinomas de laringe. ....	71
TABELA 1 - Estadiamento de cânceres de cabeça e pescoço empregando sistema TNM.....	21
TABELA 2 – Estabelecimento do estágio clínico de cânceres de cabeça e pescoço...	21
TABELA 3 – Iniciadores, constituintes de reação e perfil de ciclagem para avaliação de deleção no gene BNLF-1 do EBV através da PCR.....	48
TABELA 4 – Constituintes da reação e perfil de ciclagem nas PCRs empregadas para detecção do HPV .....	50
TABELA 5 – Iniciadores empregados, constituintes da reação e perfil de ciclagem de PCR <i>multiplex</i> para genotipagem de HPV.....	50
TABELA 6 – Resultados da pesquisa de infecção pelo EBV em carcinomas de nasofaringe através de hibridação in situ (HIS) dirigida ao transcrito viral EBER-1 e avaliação da deleção do gene BNLF-1 através de PCR (ver texto).....	60
TABELA 7 – Distribuição dos 110 casos de carcinoma de laringe segundo topografia da lesão, idade e faixa etária. ....	65
TABELA 8 – Distribuição dos carcinomas de laringe estudados segundo topografia do tumor primário, grau histológico e número de nódulos linfáticos com metástases (N+).....	67
TABELA 9 – Associação do HPV com desenvolvimento de carcinomas de cabeça e pescoço e lesões precursoras avaliada por diferentes estudos na literatura.....	84
QUADRO 1 – Listagem dos arquivos de configuração do sistema (IPC_O40F125.MS) e de comandos do software KS300 (IPC.MCR) para análise semi-automatizada de imagem para determinação do IPC a partir de lâminas coradas com o anticorpo monoclonal MIB-1.....	55

## Principais abreviaturas e siglas utilizadas

Preservou-se a grafia em inglês de algumas siglas, uma vez que seu consagrado uso em comunicações científicas permite que sejam mais prontamente assimiladas.

Nos demais casos, é apresentada a grafia em português.

**CEC** – Carcinoma espinocelular

**Cód.** – Código de catálogo

**CPH** – Complexo principal de histocompatibilidade

**CTAB** – Brometo de cetil-trimetil-amônio

**EBER-1** – RNAs codificados pelo EBV (*EBV-encoded RNAs*)

**EBV** – Vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*)

**HC-FMB** – Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Botucatu/SP

**HE** – Coloração pela hematoxilina e eosina

**HIS** – Hibridação *in situ*

**HIV** – Vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus*)

**HPV** – Vírus do papiloma humano (*Human papillomavirus*)

**IC** – Intervalo de confiança

**IHQ** – Imunoistoquímica

**IPC** – Índice de proliferação celular (ver definição pág. 49)

**kDa** – Quilodáltons

**kpb** – Quilopares de bases

**LMP-1** - Proteína latente de membrana 1 do EBV (*Latent membrane protein 1*)

**OD** – *odds ratio*

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**PCNA** – Antígeno nuclear de células em proliferação (*Proliferating cell nuclear antigen*)

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

**SAME** – Serviço de arquivo médico

**TNF** – Fator de necrose tumoral (*Tumor necrosis factor*)

**TRAF** – Fator associado ao receptor para TNF (*TNF receptor associated factor*)

# I - RESUMO

---

O trato aerodigestivo superior é suscetível à ação de diferentes agentes carcinogênicos, que colaboram de maneira multifatorial para o processo de transformação maligna. Carcinomas nasofaringe e de laringe possuem alta agressividade e associação com o vírus de Epstein-Barr (EBV) e vírus do papiloma humano (HPV), respectivamente, que são oncogênicos para seres humanos. Adicionalmente, alterações na função do gene supressor tumoral *TP53* são freqüentemente detectadas em neoplasias malignas humanas.

Esse trabalho utilizou metodologias de biologia molecular (hibridação *in situ* e PCR) para estimar a freqüência de infecção pelo EBV e pelo HPV em 25 carcinomas indiferenciados de nasofaringe e 110 carcinomas de laringe (52 tumores supraglóticos, 53 glóticos e 5 transglóticos). Detecção do produto do gene supressor tumoral *TP53* nas células neoplásicas foi realizada através de imunistoquímica. Adicionalmente, a taxa de proliferação celular nos tumores foi estimada empregando-se o anticorpo monoclonal MIB-1 (que reconhece o antígeno Ki-67) e análise semi-automatizada de imagem.

Nos carcinomas de nasofaringe foi observada infecção pelo EBV e HPV em 52% e 4% dos casos, respectivamente. Virtualmente todos os carcinomas de nasofaringe estudados exibiram acúmulo do produto do gene supressor tumoral *TP53* e, em geral, taxa de proliferação celular superior aos carcinomas de laringe. Carcinomas de nasofaringe EBV-positivos e EBV-negativos comportam-se de modo semelhante quanto à taxa de proliferação celular. Também não foi observada diferença com relação à presença de deleção de 30pb na porção terminal do gene viral BNLF-1, que codifica a proteína latente de membrana 1 (LMP-1) do EBV.

---

---

Infecção pelo HPV foi observada em 37,3% dos carcinomas de laringe, sendo mais evidente em tumores glóticos, e nenhum dos casos avaliados revelou infecção pelo EBV. Os carcinomas de laringe HPV-positivos apresentavam infecção por genótipo viral de alto risco (tipos 16 e 18), sem, contudo, distribuição preferencial dos genótipos virais quanto à topografia. Acúmulo de p53 foi observado em 78,2% dos casos, e se correlacionou principalmente com maior índice de proliferação celular e grau histológico mais elevado dos tumores.

Esses resultados ratificam a associação do EBV com carcinomas de nasofaringe e do HPV com pelo menos 1/3 dos carcinomas de laringe, notadamente tumores glóticos, na população estudada. Acúmulo de p53 (decorrente de mutações ou fenômenos epigenéticos) é fenômeno freqüente nos tumores analisados, e se correlacionou com aumento do índice de proliferação celular da neoplasia. Elevada proliferação celular em carcinomas de laringe esteve relacionada a outros fatores associados a maior agressividade biológica da neoplasia (e.g., grau histológico e metástases em nódulos linfáticos). Saliente-se ainda que o protocolo proposto para avaliação da proliferação celular permitiu análise mensurável desse fenômeno nos tumores estudados, podendo ser empregado em estudos posteriores em neoplasias de cabeça e pescoço ou mesmo outras topografias.

---

## II - INTRODUÇÃO

---

## II.1 - Câncer de cabeça e pescoço

Nos últimos 50 anos, as neoplasias malignas figuram entre as 3 principais causas de morte nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Dentre os principais fatores que explicam o aumento na incidência proporcional dos cânceres estão a melhoria nas condições de saúde, com conseqüente controle e mesmo erradicação de algumas doenças infecciosas, e mudanças no estilo de vida da sociedade pós-industrial, que ocasionaram elevação da expectativa de vida das populações humanas.

Em 2000, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que cerca de 22,4 milhões de pessoas estariam vivendo com câncer, 10 milhões de novos casos seriam diagnosticados e 6,2 milhões de óbitos ocorreriam em todo mundo decorrentes de neoplasias malignas ou suas complicações. Esses dados refletem aumento de aproximadamente 23% nas taxas de incidência e mortalidade em relação a estudo equivalente realizado em 1990 (PARKIN, BRAY & DEVESSA, 2000). No Brasil, as neoplasias malignas ocuparam o 2<sup>o</sup> lugar dentre as causas de morte não violentas em 1998, sendo menos freqüentes apenas que distúrbios cardio-respiratórios (BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Cânceres primários de cabeça e pescoço exibem elevada prevalência e etiologia diversa. Sob essa designação estão agrupados tumores que se originam em cavidade oral, orofaringe, nasofaringe, seios paranasais, hipofaringe e laringe (VOKES et al, 1993). Mais de 90% são carcinomas espinocelulares (CEC), que correspondem a aproximadamente 10% de todas as neoplasias malignas do ser humano. No Brasil, cânceres de lábio, cavidade oral, faringe e laringe figuraram em conjunto dentre as 5 neopla-

---

---

sias malignas mais letais no ano de 1998. Esses tumores tendem a surgir após os 50 anos, e sua incidência é maior no sexo masculino, alcançando até 32:1.

Os sintomas desencadeados pelos cânceres de cabeça e pescoço são variáveis e influenciados pela topografia da lesão e estágio da doença. Entre as principais queixas relatadas ao diagnóstico destacam-se as alterações de voz, dispnéia, disfagia, odinofagia, epistaxe e otalgia. Embora pacientes com carcinomas de laringe possam apresentar disфонia, como indício precoce de neoplasia, cânceres em orofaringe, hipofaringe e em região supraglótica de laringe, tendem a ser diagnosticados tardiamente em virtude de sintomatologia escassa e ausência de sinais específicos.

O estadiamento preciso das neoplasias malignas é imprescindível para abordagem terapêutica adequada e estabelecimento do prognóstico. Deve ser realizado integrando-se todas as informações clínicas disponíveis e dados obtidos de exames subsidiários (e.g., endoscopia, radiologia, tomografia computadorizada, histopatologia, etc). Para os carcinomas escamosos de cabeça e pescoço, comumente é adotado o sistema TNM com as alterações sugeridas pelo *American Joint Committee on Cancer Staging for Head and Neck* (VOKES et al, 1993), sumarizado nas tabelas 1 e 2.

O desenvolvimento de neoplasias em trato aerodigestivo superior está intimamente relacionado à exposição contínua de seus tecidos a agentes lesivos, e.g., constituintes do cigarro, etanol, poluição atmosférica, radiação e componentes da dieta (RAITIO-LA & PUKANDER, 1997; VOKES et al, 1993). Tabagismo e consumo de álcool são os fatores de risco mais relevantes (DECKER & GOLDENSTEIN, 1982), mas estudos recentes têm ainda sugerido participação de microorganismos, notadamente vírus, no desenvolvimento de alguns cânceres de cabeça e pescoço (FERLITO, VASEF & WEISS, 1997; FRANCHESCHI et al, 1997; TYAN et al, 1993). A real importância da

---

infecção viral na patogenia dos cânceres de cabeça e pescoço, contudo, não está adequadamente esclarecida em virtude da natureza multifatorial dessas lesões.

TABELA 1 - Estadiamento de cânceres de cabeça e pescoço empregando sistema TNM

CRITÉRIO	INTERPRETAÇÃO
<b>Avaliação do tumor primário</b>	
<b>Tx</b>	- Tumor primário não pôde ser avaliado.
<b>T0</b>	- Sem evidências de tumor primário.
<b>Tis</b>	- Carcinoma in situ.
<b>T1</b>	- Tumor $\leq 2$ cm*.
<b>T2</b>	- Tumor entre 2 e 4 cm*.
<b>T3</b>	- Tumor $> 4$ cm*.
<b>T4</b>	- Tumor invade estruturas adjacentes.
<b>Disseminação para nódulos linfáticos</b>	
<b>Nx</b>	- Nódulos linfáticos regionais não puderam ser avaliados.
<b>N0</b>	- Nódulos linfáticos regionais não comprometidos.
<b>N1</b>	- Metástase em único nódulo linfático homolateral ( $\leq 3$ cm*).
<b>N2</b>	- Metástases em único nódulo linfático homolateral (entre 3 e 6cm), ou em múltiplos nódulos linfáticos homolaterais (nenhuma $> 6$ cm*), ou em nódulos linfáticos bilaterais/contralaterais (nenhuma maior que 6 cm*).
<b>N3</b>	- Nódulos linfáticos comprometidos com metástases $> 6$ cm
<b>Presença de metástases a distância</b>	
<b>Mx</b>	- Não avaliado.
<b>M0</b>	- Sem evidências de metástases à distância.
<b>M1</b>	- Presença de metástases à distância.

\* Maior diâmetro do tumor

TABELA 2 – Estabelecimento do estágio clínico de cânceres de cabeça e pescoço

ESTÁGIO CLÍNICO	ENGLBA...
<b>0</b>	- Tis, N0, M0
<b>1</b>	- T1, N0, M0
<b>2</b>	- T2, N0, M0
<b>3</b>	- T3, N0, M0 / T1-3, N0, M0
<b>4</b>	- T4, N0-1, M0 / qualquer T, N2-3, M0 / qualquer T e N, M1

Carcinomas de laringe e de nasofaringe merecem especial atenção pela alta incidência e pelo comportamento biológico potencialmente agressivo. Em 2000, foram reportados 65 mil novos casos de câncer de nasofaringe em todo mundo e 161 mil de

---

câncer de laringe, que correspondem a 0,6% e 1,6% da casuística de câncer daquele ano, respectivamente (PARKIN, BRAY & DEVESA, 2001).

Os sintomas dessas doenças surgem tardiamente, sendo em geral escassos e freqüentemente relacionados com comprometimento de estruturas adjacentes por infiltração neoplásica. Resultados promissores para melhoria do prognóstico de pacientes com câncer de nasofaringe ou laringe têm surgido em função de otimização das estratégias terapêuticas empregadas, notadamente radioterapia e abordagem cirúrgica. O conhecimento acumulado sobre a etiopatogenia dessas lesões tem gerado benefícios em curto prazo, possibilitando diagnóstico precoce e aumento significativo das taxas de cura para pacientes portadores desses tumores.

## **II.2 - Vírus de Epstein-Barr**

O vírus de Epstein-Barr (EBV – *Epstein-Barr virus*) pertence à família *Herpesviridae*, dos quais também fazem parte o vírus do herpes simples (HHV-1), vírus varicela zoster (HHV-2), citomegalovírus, e o recém descrito vírus associado ao sarcoma de Kaposi (HHV-8) (MOORE & CHANG, 1995). Possui fita dupla de DNA com aproximadamente 172 kpb (BAER et al, 1984) e, assim como os demais herpesvírus, é capaz de estabelecer infecção latente em seus hospedeiros (PURTILLO et al, 1992). O EBV é microorganismo amplamente disseminado no ambiente, e praticamente todos os indivíduos em idade adulta apresentam evidências sorológicas de exposição prévia ao vírus (COHEN, 2000).

---

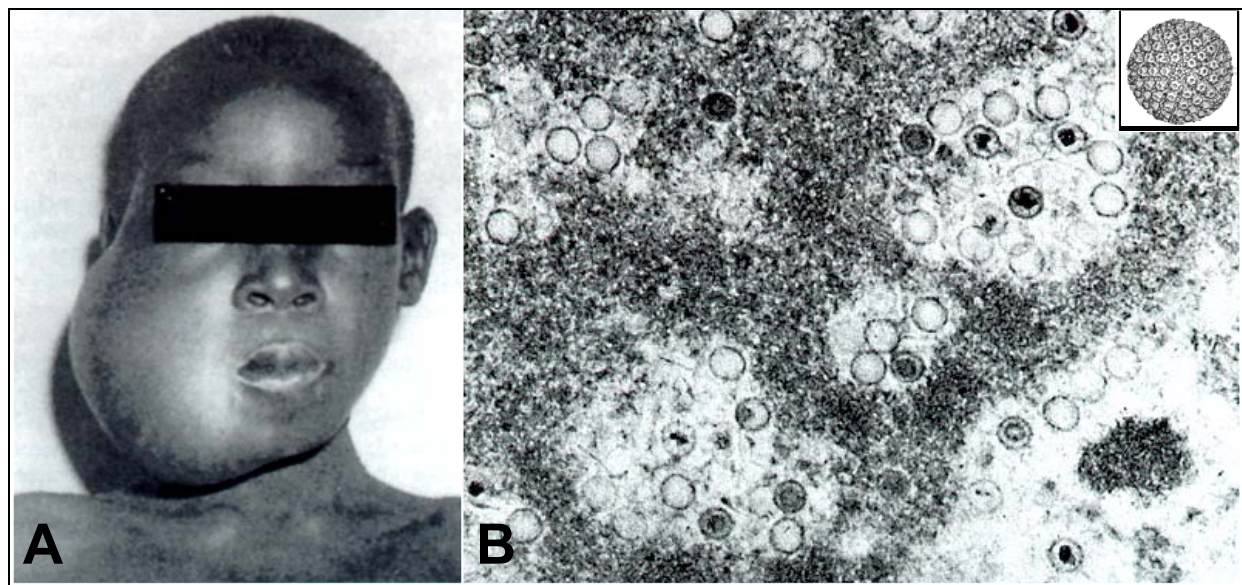


FIGURA 1 – A) Paciente apresentando Linfoma de Burkitt endêmico, neoplasia maligna associada à infecção pelo EBV em virtualmente todos os casos. B) Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando presença de partículas virais no tumor. No detalhe, modelo tridimensional do capsídeo.

A infecção pelo EBV ocorre através da saliva, podendo resultar em mononucleose infecciosa, principalmente nos casos de exposição primária tardia. O quadro clínico da mononucleose é semelhante ao de uma gripe forte, e o paciente pode apresentar esplenomegalia, linfadenopatia generalizada e linfócitos grandes e atípicos em sangue periférico. Além da mononucleose infecciosa, o EBV é agente etiológico da leucoplasia oral pilosa, lesão autolimitada observada em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). É sugerida participação do EBV em espectro ainda maior de doenças, dentre as quais alguns distúrbios auto-imunes (ARMSTRONG et al, 1998; NIEDOBITEK, HERBST & YOUNG, 1993) e número significativo de neoplasias malignas (GRIFFIN & XUE, 1998; SCHMIDT & MISK, 1995).

Dados de literatura acumulados nas últimas duas décadas têm demonstrado importante papel do EBV na patogênese de cânceres humanos. A infecção viral já foi relacionada ao desenvolvimento do linfoma de Burkitt (ZUR HAUSEN, 1998), ao carcinoma de nasofaringe (VOLKES et al, 1993), alguns subtipos da doença de Hodgkin

---

(DOLCETTI & BOIOCCHI, 1998; ELGUI DE OLIVEIRA et al, 2002), ao adenocarcinoma gástrico (SHIBATA & WEISS, 1992; TAKADA, 2000) e aos linfomas sinonasais de células T/NK (GUTIÉRREZ et al, 1998). Em todas essas doenças, o entendimento do processo de transformação celular beneficiou-se de estudos sobre o ciclo biológico do EBV e características da resposta do organismo hospedeiro à infecção viral.

A infecção pelo EBV se inicia no epitélio da orofaringe, e a partir do tecido linfóide na mucosa do anel de Waldeyer o vírus atinge linfócitos B (LAICHALK et al, 2002). Nessas células, a entrada do EBV ocorre através da ligação da glicoproteína viral gp350 com o receptor para o fragmento C3d do complemento (CD21) (FINGEROTH et al, 1984), e requer como co-fator moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) (LI et al, 1997). A ativação dos linfócitos infectados pode ser demonstrada por aumento na expressão de CD21 (TEO & GRIFFIN, 1987). Entretanto, embora essa seja a via clássica de infecção viral, mecanismos independentes de CD21 já foram descritos (HEDRICK et al, 1992; SIXBEY & YAO, 1992).

Dois tipos principais de infecção pelo EBV podem ser estabelecidos: 1) ciclo lítico ou produtivo, onde há liberação de vírions completos; e 2) ciclo latente, no qual ocorre manutenção do genoma viral na forma de epissomo nuclear. Em linfócitos B, a infecção é latente: não há replicação viral e as células são imortalizadas, adquirindo a capacidade de se propagarem indefinidamente *in vitro*. A expressão de certos genes do EBV é fundamental para que ocorra esse fenômeno (FARREL, CLUDTS & STÜHLER, 1997), e a transformação maligna pela células infectada, é possível graças à interferência de produtos virais no controle do ciclo celular.

Dentre os produtos virais com reconhecido papel na carcinogênese induzida pelo EBV, destaca-se a proteína latente de membrana 1 (LMP-1 – *Latent membrane pro-*

---

---

*tein 1*) (NICHOLSON & MORRIS, 1996). Quando expressa, a LMP-1 estimula de forma contínua a proliferação celular graças a sua ligação com a proteína TRAF-2 (*TNF receptor associated Factor 2*), envolvida na transdução de sinais (ELIOPOULOUS & YOUNG, 2001; KIEF, 1995). Outros genes, entretanto, codificam produtos com elevada homologia estrutural e funcional com proteínas normais das células hospedeiras. Nessa categoria, enquadram-se os genes BRFH-1 e BCRF-1 que codificam, respectivamente, proteínas similares a bcl-2 e à interleucina 10 humana (HSU et al, 1990; KHANNA, BURROWS & MOSS, 1995; MOORE et al, 1990).

Dados de literatura indicam que o EBV se associa a até 100% dos casos de carcinoma de nasofaringe (PEARSON, 1993), notadamente carcinomas indiferenciados. Nesses casos, a pesquisa do genoma do EBV ou expressão de produtos virais pode ser empregada como marcador adicional para confirmação diagnóstica do carcinoma (LIN et al, 2001) ou identificação de metástases (CHAO et al, 1996; WALTER, MENARGUEZ-PALANCA & PEIPER, 1992). Alguns poucos estudos empregando técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), relatam detecção do EBV também em carcinomas de orofaringe e hipofaringe (JENG et al, 1994), e mesmo em alguns subtipos histológicos especiais de carcinomas de cavidade nasal e seios paranasais (LEUNG, CHUNG & WONG, 1995). Embora esse fato levante a possibilidade de o EBV estar relacionado à patogênese de número ainda maior de tumores de cabeça e pescoço, a presença do EBV em neoplasias distintas do carcinoma indiferenciado de nasofaringe é achado controverso e pouco estudado na literatura.

---

---

### II.3 - Vírus do Papiloma Humano

Os papilomavírus pertencem à família *Papovaviridae*, da qual também fazem parte os poliomavírus (e.g., vírus SV40 e vírus JC, associado à leucoencefalopatia multifocal progressiva), e representam grupo de microorganismos com alta especificidade por seus hospedeiros naturais e tropismo por epitélios. São descritos cerca de 80 tipos de papilomavírus geneticamente relacionados e associados a lesões com aumento da proliferação celular em seres humanos (DELIUS et al, 1998). Baseado no modelo de carcinogênese em colo uterino, tradicionalmente os papilomavírus humanos (HPV – *Human papillomavirus*) são classificados em baixo risco (e.g., HPVs 6 e 11), risco intermediário (e.g., HPVs 31, 33 e 35) e alto risco (e.g., HPVs 16 e 18) para o desenvolvimento de neoplasia maligna (VOUSDEN, 1989).

O HPV é agente etiológico de papilomas e condilomas, sendo estreita sua associação com neoplasias em região anogenital (BOSCH et al, 1995; ZUR HAUSEN, 1991). A partícula viral é icosaédrica, não-envelopada, com cerca de 55nm de diâmetro. Seu genoma é constituído por dupla fita de DNA circular com algo entre 7,5-8,0kpb, organizado em região terminal de controle (*Long Control Region* – LCR), genes de expressão precoce (*Early genes*, E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e genes de expressão tardia (*late genes*, e.g., L1 e L2) (Figura 2).

---

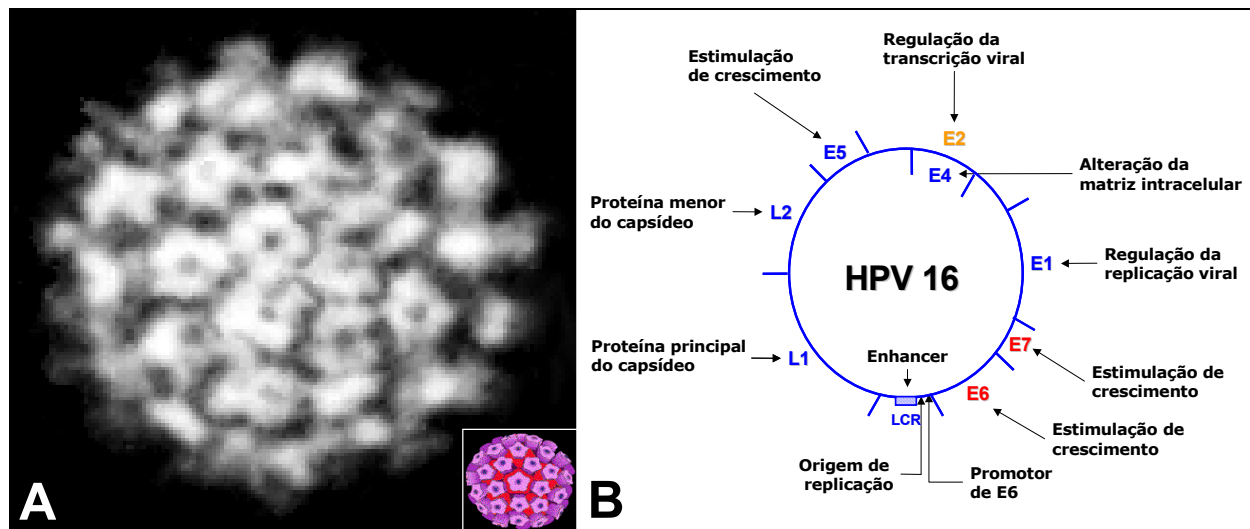


FIGURA 2 – A) Aspecto da partícula viral do HPV à microscopia eletrônica. No detalhe, modelo tridimensional do capsídeo. B) Esquematização do genoma do HPV, seus genes e principais funções. Genes de expressão precoce: E1, E2, E4, E5, E6 e E7; genes de expressão tardia: L1 e L2. LCR: região extensa de controle (*Long Control Region*).

Todos os papilomavírus humanos conhecidos possuem alta afinidade por células epiteliais, sendo que a formação dos vírions é subordinada à diferenciação destas em queratinócitos. As duas principais proteínas que constituem o capsídeo viral, com 55kDa e 70KDa (codificadas pelos genes L1 e L2, respectivamente), são expressas somente em células epiteliais com diferenciação terminal. O ciclo biológico do HPV se inicia com infecção de células pluripotentes das camadas mais profundas do epitélio pavimentoso estratificado (Figura 3). Embora não esteja completamente elucidado o mecanismo de infecção das células epiteliais, é sugerida participação de moléculas da família das integrinas como possíveis mediadores para a entrada do HPV (EVANDER et al, 1997). Uma vez dentro da célula, o genoma viral segue para o núcleo e é replicado para cerca de 50-100 cópias, mantidas não integradas ao DNA do hospedeiro. A divisão da célula infectada gera duas células-filhas que herdam o genoma viral, uma das quais é comprometida com a diferenciação (que se processa à medida que migra nos extratos do tecido), enquanto a remanescente permanece na camada basal e promove persistência da infecção viral graças ao seu alto potencial proliferativo.

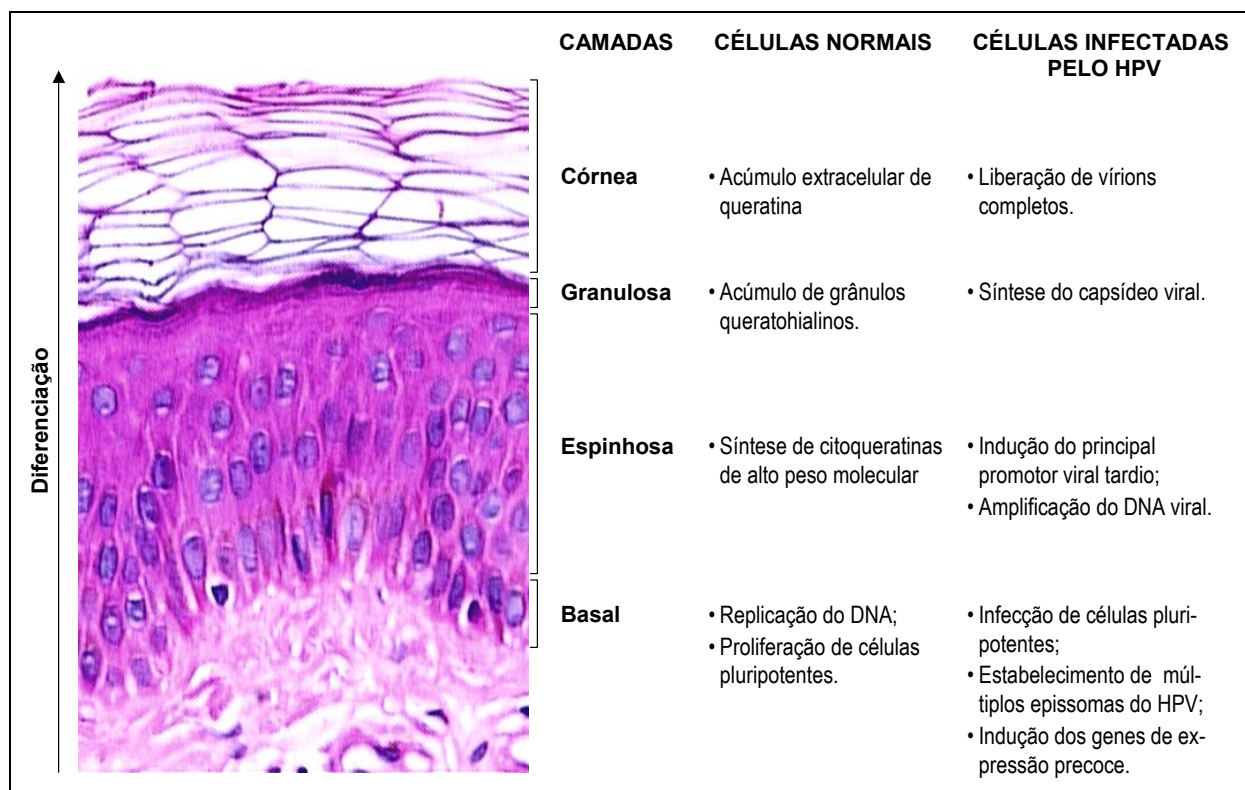


FIGURA 3 – Relação entre os fenômenos biológicos associados à diferenciação de células epiteliais normais e células epiteliais infectadas pelo HPV (Modificado de STUBENRAUCH & LAIMINS, 1999).

Os efeitos citopáticos da infecção pelo HPV só são observados em células das camadas suprabasais, onde ocorre ciclo viral produtivo. Morfologicamente essas células podem apresentar coilocitose, aspecto caracterizado pelo aumento no tamanho e densidade tintorial do núcleo (em virtude do acúmulo de cópias do genoma viral e proteínas estruturais não montadas), presença de halo claro perinuclear e citoplasma escasso.

A fim de que a replicação do genoma do HPV esteja acoplada à formação de partículas virais completas, alguns produtos virais interferem no controle da proliferação e da diferenciação celular. O estudo das ações biológicas dessas proteínas tem contribuído para o entendimento da importância do HPV na patogenia de neoplasias malignas em humanos. Particularmente importantes são as proteínas codificadas pelos ge-

nes E6 e E7, cujo potencial oncogênico tem sido sistematicamente verificado em estudos *in vitro* e *in vivo*.

O gene E6 do HPV codifica proteína nuclear de aproximadamente 150 aminoácidos. WERNESS e colaboradores demonstraram que a proteína E6 é capaz de se ligar ao produto do gene supressor tumoral *TP53 in vitro*. Verificaram ainda baixos níveis da proteína p53 em queratinócitos humanos transformados pelo HPV 16, quando comparado aos de queratinócitos não-transformados ou queratinócitos transformados pelo vírus SV40 (WERNESS, LEVINE & HOWLEY, 1990). Esses dados sugerem que ocorra favorecimento da degradação de p53 mediada pela proteína E6 do HPV. Estudos posteriores demonstraram que a proteína E6, notadamente aquela codificada por HPVs de alto risco (e.g., HPV 16 ou 18), é capaz de se ligar a uma proteína celular, a proteína associada a E6 (E6AP – *E6 Associated Protein*), estimulando a degradação da p53 selvagem pela via da ubiquitinação (MANTOVANI & BANKS, 1999; SCHEFNERR et al, 1990; SHEFFNER, 1998) (Figura 4).

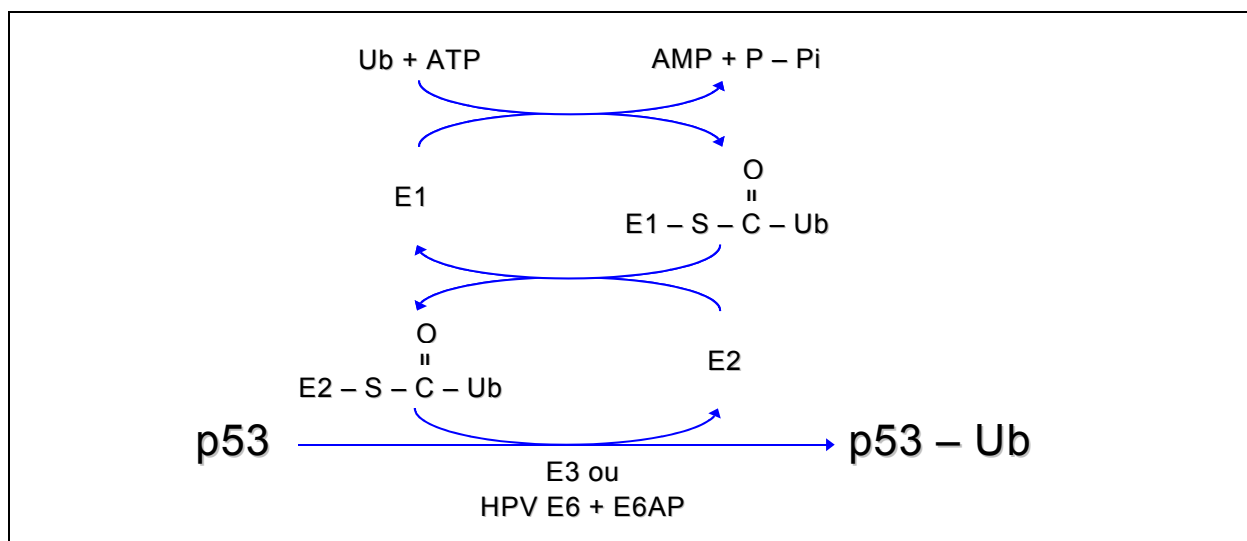


FIGURA 4 – Degradação de p53 mediada pela proteína E6 do HPV-16. A proteólise mediada por ubiquitinação tem como etapa final incorporação de cadeias do polipeptídeo ubiquitina à proteína a ser degradada. Marcada, a proteína ubiquitinada segue para o proteossoma para clivagem. Em condições normais a p53 é substrato para ubiquitinação pela enzima ubiquitina-ligase E3, mas não pela ubiquitina-ligase

E6AP. A proteína E6 do HPV 16 liga-se simultaneamente à E6AP e à p53, favorecendo a ubiquitinação desta e sua conseqüente degradação. Ub: Ubiquitina; E1: Enzima ativadora de ubiquitina; E2: enzima conjugadora de ubiquitina; E3 e E6AP: ubiquitina-ligases.

A proteína E7, por sua vez, é capaz de interferir no controle do ciclo celular mediado pela proteína do retinoblastoma (pRb). Analogamente ao que ocorre com a E6, a E7 de tipos de HPVs com alto potencial oncogênico exerce sua função eficientemente graças à maior afinidade de ligação com sua proteína-alvo. A E7 liga-se à forma hipofosforilada de pRb, ocasionando liberação do fator de transcrição E2F do complexo pRb-E2F. A expressão dos genes reguladores de ciclo celular estimulados por E2F está associada à divisão celular, de modo que células infectadas por HPV de alto risco são susceptíveis à proliferação descontrolada. Embora E6 e E7 possuam propriedades transformantes independentes, estudos *in vitro* demonstraram que a imortalização de queratinócitos só é obtida quando ambas as proteínas são expressas, sugerindo cooperação funcional desses produtos do HPV na indução da transformação celular (Figura 5).

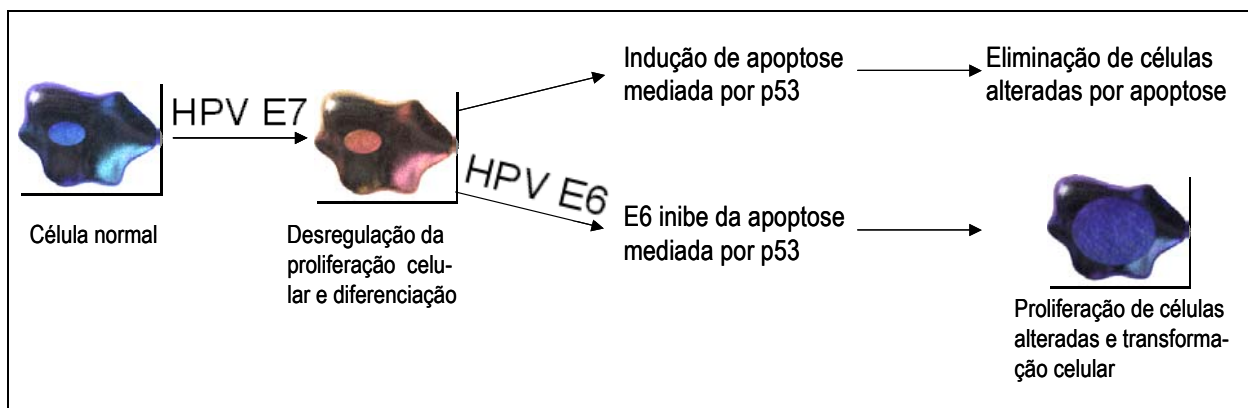


FIGURA 5 – Cooperação entre as oncoproteínas E6 e E7 do HPV na transformação celular. Ao interagir com a pRB, a proteína E7 de HPVs de alto risco prejudica o controle da proliferação celular e diferenciação. Células que possuem atividade de *TP53* mantida respondem a este fenômeno induzindo apoptose. Entretanto, a expressão concomitante de E6 nas células infectadas compromete a deflagração de apoptose mediada por p53, ocasionando manutenção de células instáveis, sua proliferação e favorecimento da transformação celular (Modificado de HOPPE-SEYLER & BUTZ, 1995).

---

Correlação análoga entre características histopatológicas das lesões em colo uterino e infecção por determinados tipos de HPV é observada em neoplasias de cabeça e pescoço (McKAIG, ABRIC & OLSHAN, 1998). Papilomas benignos de boca, laringe e esôfago se relacionam aos tipos de HPV de baixo risco, enquanto tipos de alto risco (notadamente HPV 16) são encontrados predominantemente em carcinomas (GARLICK & TAICHMAN, 1991). Trabalhos relacionando o HPV a neoplasias de cabeça e pescoço descrevem os tipos 2, 11, 16 e 18 em carcinomas de mucosa bucal, língua e assoalho da cavidade oral (WATTS, BREWER & FRY, 1991).

No papiloma de laringe (doença de evolução benigna na maioria dos casos, mas com freqüentes recidivas), a transformação maligna ocorre em aproximadamente 2% dos casos e a associação com HPV nos vários estágios da carcinogênese já foi descrita (FOURET et al, 1995; LINDEBERG et al, 1989). São raros os trabalhos na literatura sobre a incidência dos principais subtipos de HPV em carcinomas de nasofaringe (CHANG et al, 1992), e são também escassos estudos que categorizam topograficamente a infecção do vírus associada aos tumores de laringe. Desse modo, há uma lacuna a ser preenchida quanto à possibilidade da existência de distribuição preferencial do HPV em carcinomas de diferentes sítios anatômicos, bem como eventuais repercussões clínicas conseqüentes a essa associação.

## **II.4 - Gene supressor tumoral *TP53***

A proteína p53 foi originalmente identificada em 1979 em células transformadas pelo vírus oncogênico SV40 (LANE & CRAWFORD, 1979). Inúmeros trabalhos documentaram sistematicamente que alterações no respectivo gene, o supressor tumoral *TP53*, estão presentes em amplo espectro de neoplasias malignas humanas (CHANG

---

---

et al, 1993; NIGRO et al, 1989), demonstrando seu importante papel no controle do ciclo celular e manutenção da integridade genômica (COX, 1997; SHAW, 1996; VOLLGELSTEIN & KINZLER, 1992).

Em seres humanos, o gene *TP53* está mapeado em 17p13.1 e possui 11 éxons. A proteína p53 selvagem tem 53KDa e é homotetramérica, i.e., constituída por quatro cadeias polipeptídicas idênticas do produto de *TP53*. Em condições normais, a p53 encontra-se em baixos níveis no núcleo da célula, aquém da sensibilidade de detecção pelos métodos imunistoquímicos usuais. Sua meia-vida curta decorre da rápida degradação pelo sistema de ubiquitinação de proteínas. Células normais apresentam aumento importante na transcrição de *TP53*, com conseqüente elevação dos níveis intracelulares da proteína p53 tão logo são detectados danos no DNA. Esse fenômeno pode ser demonstrado *in vitro* através do tratamento de células em cultura com radiação ionizante, radiação ultravioleta, ou agentes químicos genotóxicos.

A p53 acumulada, estabilizada por modificações pós-traducionais, regula a expressão de inúmeros genes. Dentre eles, destacam-se aqueles relacionados à interrupção do ciclo celular (e.g, p21<sup>CIP1/WAF1/Sdi1</sup>, *GADD45*), genes que regulam a apoptose (e.g., *BAX*, *FAS*, *BCL-2*) e alguns que realizam retroalimentação negativa de *TP53*, reprimindo sua expressão (e.g., *MDM-2*) (KOUZARIDES, 1995; GOTTLIEB & OREN, 1996; MOMAND, WU & DASGUPTA, 2000). A Figura 6 apresenta visão geral dos mecanismos de controle do ciclo celular, reparo de DNA e deflagração da apoptose mediadas por p53.

---

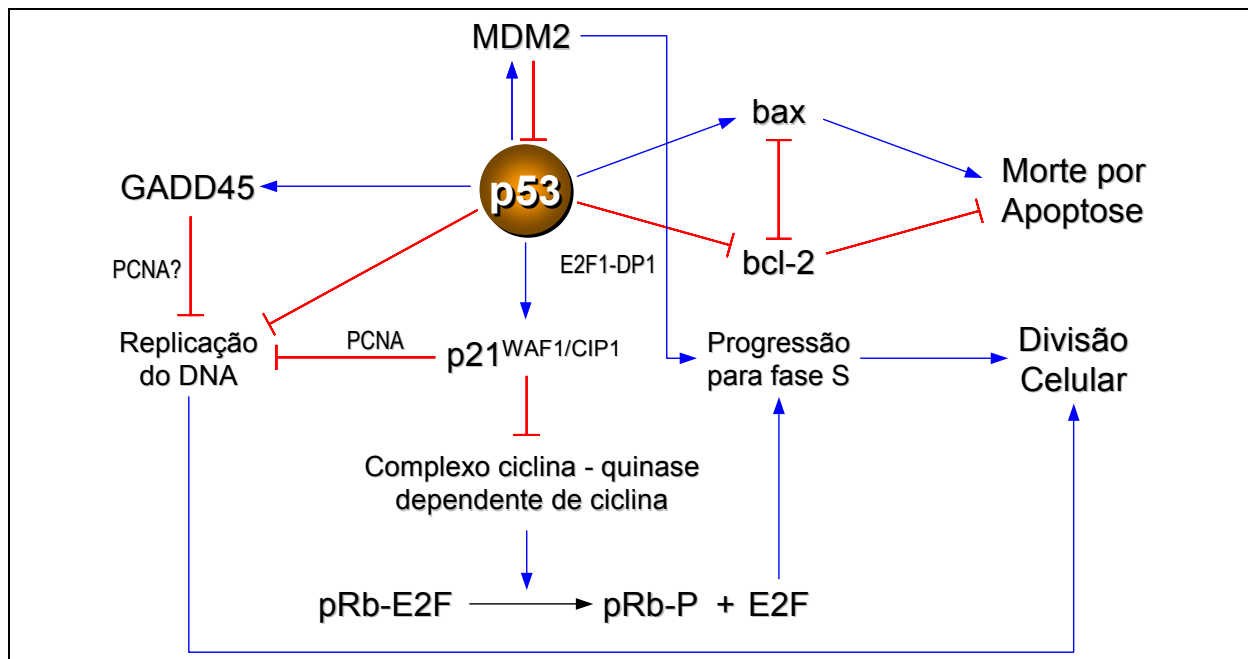


FIGURA 6 – Representação esquemática das funções do produto de *TP53* e suas interações com proteínas com importante papel no processo carcinogênico. (Compilado a partir dos trabalhos de KOUZARIDES, 1995; GOTTLIEB & OREN, 1996; MOMAND, WU & DASGUPTA, 2000)

Indivíduos acometidos pela Síndrome de Li-Fraumeni apresentam mutação constitucional em um dos alelos do gene *TP53*, o que lhes confere risco de 25 a 50 vezes maior que a população geral para o desenvolvimento de neoplasias malignas (EVANS & LOUZANO, 1997). A perda de heterozigosidade está também associada ao desenvolvimento de vários cânceres esporádicos (HOLLSTEIN et al, 1991). No entanto, embora se tenha como regra geral que genes supressores tumorais deixam de exercer sua função quando ambos os alelos estão comprometidos (conforme proposto por KNUDSON, 1971), alterações de um único alelo do *TP53* gera deficiência funcional de seu produto graças à formação de tetrâmeros híbridos, com cadeias normais e alteradas. A *dominância-negativa*, como é denominado esse fenômeno, explica parcialmente porque algumas células se tornam geneticamente instáveis, propensas à proliferação clonal e desenvolvimento neoplásico, mesmo na vigência de um alelo normal de *TP53*.

---

Mutações em *TP53* envolvem com maior frequência os éxons 5, 6, 7 e 8 (LEVIN, MOMAND & FINLAY, 1991; WANG & HARRIS, 1997). Entretanto, alguns desvios nas funções exercidas pelo *TP53* não podem ser atribuídos a alterações na seqüência do gene. É relatado que a proteína codificada pelo gene E6 do HPV, notadamente tipos 16 e 18, liga-se à proteína p53 normal e eleva sua velocidade de degradação. Esse mecanismo desempenha papel importante na patogênese dos carcinomas associados à infecção por esse vírus. Entretanto, em outras neoplasias humanas é ainda controversa a relação entre infecção viral e disfunções de *TP53*, com ou sem mutações no gene. Embora expressão exacerbada da proteína p53 tenha sido relatada em carcinomas indiferenciados de nasofaringe associados ao EBV (NIEDOBITEK et al, 1993), não foi possível associar esse fenômeno à existência de mutações no *TP53*, que em tese acarretariam acúmulo da proteína anômala, mais resistente à degradação (EFFERT et al, 1992; SPRUCK et al, 1992).

Em trabalho publicado em 1992, CHANG e colaboradores relatam detecção de mutações no gene *TP53* em 100% (6/6) dos casos de carcinomas de nasofaringe associados ao EBV, e em frequências menores em carcinomas de hipofaringe (1/3), laringe (1/3) e seios paranasais (2/7). No mesmo trabalho, mutações em *TP53* foram verificadas em carcinomas de nasofaringe (3/6), hipofaringe (2/3), laringe (1/3) e seios paranasais (6/13) associados ao HPV 16, e em nenhuma das amostras de tecido normal utilizadas como controle (0/6). Embora alterações em *TP53* possam não representar o evento crítico da transformação maligna nas neoplasias de cabeça e pescoço (FIELD, 1996), o produto alterado do gene deve desempenhar algum papel na progressão tumoral. Por este motivo, a detecção da proteína acumulada através da imunistoquímica ou mesmo identificação do número e natureza das mutações em *TP53* pelas téc-

---

---

nicas de biologia molecular disponíveis podem ter importância prognóstica para esses tumores.

## **II.5 - Proliferação celular e câncer**

As neoplasias constituem conjunto heterogêneo de doenças que compartilham ao menos um mecanismo patogênético comum: aumento da população celular. A massa neoplásica surge graças à proliferação celular exacerbada e/ou morte celular diminuída. Avaliação da proliferação celular em tumores remonta o início do estudo das neoplasias ao nível celular; por outro lado, só recentemente a morte celular, notadamente por apoptose, tem recebido maior atenção (LOWE & LIN, 2000).

A proliferação celular desempenha papel importante em todas as etapas da carcinogênese, i.e., iniciação, promoção e progressão da neoplasia (Figura 7). A replicação do DNA não é processo livre de erros: mutações em níveis basais são observadas em virtualmente todas as células em divisão. Algumas dessas alterações na dupla hélice são corrigidas pela ação das enzimas que constituem o complexo de reparos a danos. As demais podem: 1) ser incorporadas ao patrimônio genético da célula e se manterem silenciosas; 2) induzir morte celular por apoptose; ou 3) caso não sejam letais, ainda que comprometam segmentos de genes críticos ou porções regulatórias importantes, tornar a célula iniciada e propensa à transformação maligna.

Células submetidas a estímulos contínuos de proliferação são mais susceptíveis à persistência de lesões no DNA graças à diminuição na eficácia dos mecanismos responsáveis pela manutenção da integridade genômica. Desse modo, situações de intensa proliferação celular propiciam aparecimento de novas mutações em células previamente iniciadas, aumentando sua instabilidade genética e tornando iminente o apare-

---

cimento de células transformadas que podem dar origem a um tumor. Mesmo após o estabelecimento da neoplasia, o balanço entre proliferação e morte celular desempenha importante papel ao selecionar os clones mais adaptados a condições adversas, tais como escassez de nutrientes ou citotoxicidade mediada por células do sistema imunitário. Por esse, motivo a proliferação celular figura entre os fatores prognósticos de maior importância para diversas neoplasias humanas, sendo indicador de agressividade da neoplasia e por vezes estabelecendo diagnóstico de malignidade para lesões de difícil avaliação, ditas limítrofes.

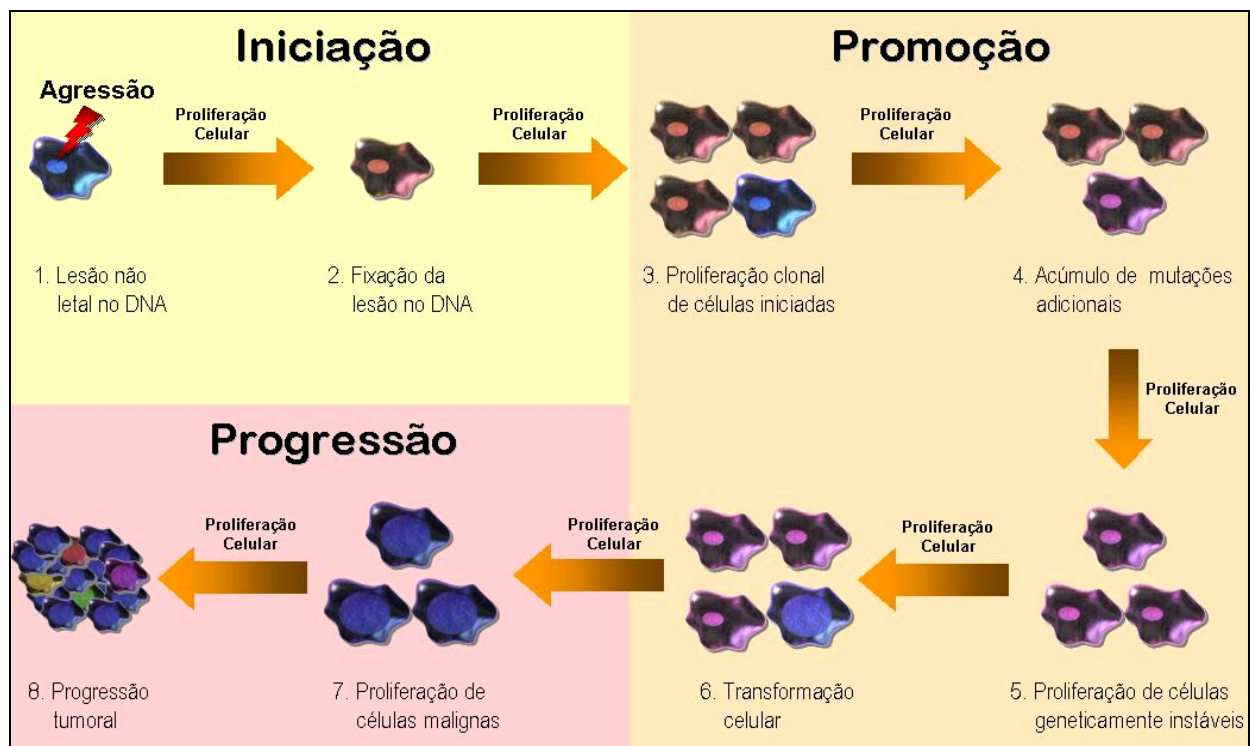


FIGURA 7 – Papel da proliferação celular na carcinogênese (ver texto).

Diversas metodologias têm sido empregadas para estimativa do número de células em divisão no tecido tumoral (FOSTER, 1997). Dentre os marcadores de proliferação celular mais comumente estudados, destacam-se as figuras de mitose e a expressão de moléculas que atuam em uma ou mais fases do ciclo celular.

---

A contagem de figuras de mitose por campo à microscopia óptica convencional constitui avaliação rápida e amplamente difundida da proliferação celular. No entanto, figuras de mitose representam aspecto morfológico de etapas tardias da divisão celular, principalmente metáfase e anáfase, e sua mensuração em tecido pode subestimar significativamente o grau de proliferação de células neoplásicas. Essa abordagem está também subordinada à acuidade e experiência do examinador, e é prejudicada pela presença de artefatos de técnica histológica.

Por outro lado, algumas técnicas que permitem melhor avaliação da proliferação celular (e.g., cintilografia, citometria de fluxo ou metodologias baseadas em ELISA) empregam homogeneizados de células, eliminando a possibilidade de análise topográfica das células em divisão. A detecção de moléculas que participam do ciclo celular através de reação imunoistoquímica superou vários desses obstáculos, tendo se mostrado eficiente no estudo da proliferação celular e passível de ser realizada em tecido fixado em formalina e incluído em parafina. Assim sendo, essa metodologia atualmente representa alternativa adequada para o estudo da proliferação celular em corte histológico de rotina (BACCHI & GOWN, 1993).

Trabalhos que utilizam imunoistoquímica para avaliação da proliferação celular em neoplasias freqüentemente têm empregado anticorpos monoclonais contra duas proteínas envolvidas no ciclo celular: o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA - *Proliferating cell nuclear antigen*) e o antígeno Ki-67.

A proteína PCNA possui 36KDa e atua como fator de processividade para a DNA polimerase, estabilizando a enzima junto à fita molde de DNA durante a replicação. É expressa durante as fases G1-S do ciclo celular, acumulando-se nas células em mitose. Entretanto, células interfásicas cujo sistema de reparo a danos ao DNA tenha sido

---

---

ativado, além daquelas estimuladas pela ação de determinados fatores de crescimento, também expressam PCNA (HALL et al, 1994; McCORMICK & HALL, 1994; SHIVJI, KENNY & WOOD, 1992), fato que prejudica a avaliação precisa da proliferação celular por meio deste marcador.

O antígeno Ki-67, por outro lado, é expresso somente nas células em mitose, em todas as fases exceto G0. O gene *Ki-67* codifica transcrito que sofre processamentos (*splicing*) alternativos, gerando duas formas predominantes da proteína Ki-67, com de 320kDa e 359kDa, respectivamente. Embora a estreita relação entre expressão de Ki-67 e proliferação celular seja conhecida há cerca de duas décadas, só recentemente sua função tem sido elucidada. Postula-se que Ki-67 seja constituinte da matriz nuclear (ENDL & GERDES, 2000), e KREITZ e colaboradores (2000) sugerem que essa proteína participe da estrutura de compactação da heterocromatina celular.

Anticorpo monoclonal que reconhece epítipo da proteína Ki-67 foi produzido originalmente por GERDES e colaboradores em 1984, tendo se mostrado útil e de amplo uso na determinação do número de células em divisão em tumores e tecidos não-neoplásicos.

Trabalhos avaliando proliferação celular em neoplasias de cabeça e pescoço são escassos e mais freqüentes em carcinomas de laringe que em carcinomas de nasofaringe. Embora alguns autores indiquem que a proliferação celular seja fator prognóstico para o carcinoma laríngeo (LERA et al, 1998; WELKOLBORSKY, 1995), essa conclusão não é consenso na literatura (SPAFFORD et al, 1996). Adicionalmente, os dados até o momento disponíveis não consolidam a eventual associação da proliferação celular com diferentes parâmetros anátomo-clínicos de agressividade dessas doenças, tais

---

---

como estadiamento, grau histológico, expressão do produto do supressor tumoral *TP53* ou mesmo infecção pelo EBV e HPV.

---

## III - OBJETIVOS

O presente trabalho se propõe:

1. Pesquisar a associação do EBV e do HPV com carcinomas de nasofaringe e laringe. Nos carcinomas de laringe, estudar a frequência da infecção viral em relação à localização anatômica dos tumores (supraglótica, glótica e transglótica).
  2. Avaliar a expressão da proteína p53 nos carcinomas de nasofaringe e laringe.
  3. Determinar o Índice de Proliferação Celular (IPC) nas lesões estudadas através da marcação imunohistoquímica do antígeno de proliferação celular Ki-67 e análise de imagem semi-automatizada.
  4. Investigar as associações entre os dados anátomo-clínicos levantados, infecção pelo EBV e HPV, expressão de p53 e proliferação celular nos carcinomas de nasofaringe e de laringe estudados.
-

# IV - CASUÍSTICA E MÉTODOS

A figura 8 apresenta delineamento geral da pesquisa.

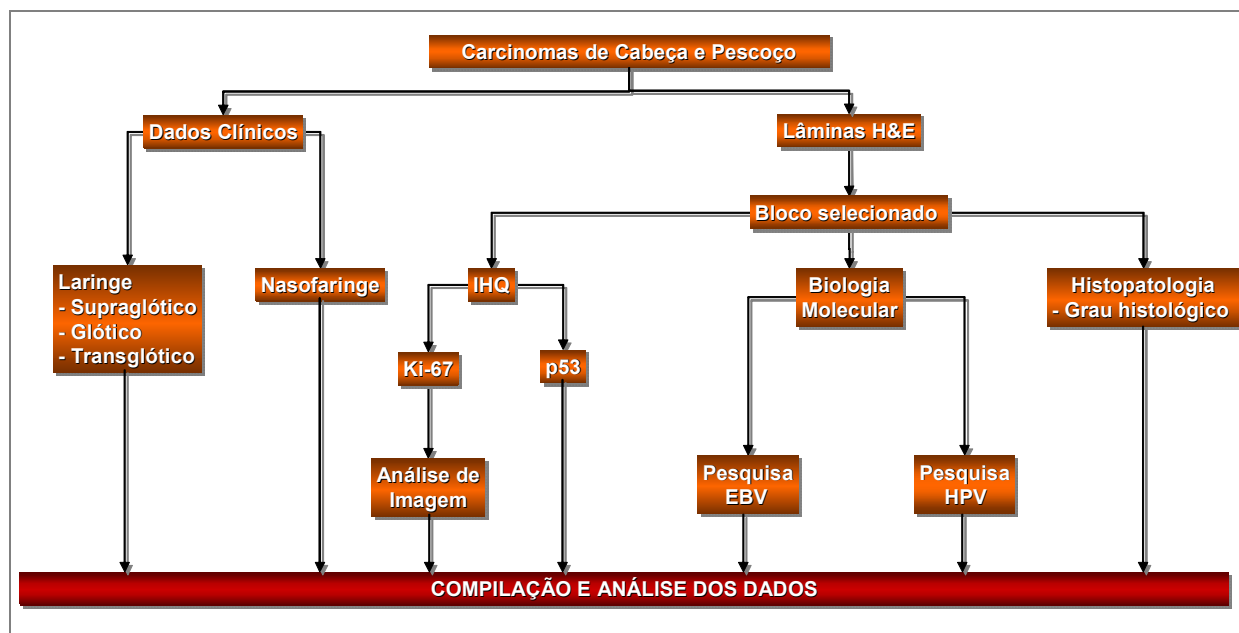


FIGURA 8 – Fluxograma geral da pesquisa. IHQ – Imunohistoquímica; HIS: Hibridação *in situ*.

#### IV.1 - Seleção dos casos

Prontuários de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, atendidos no período de 1978 a 2000, foram obtidos junto ao Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (HC-FMB). As informações relevantes obtidas (e.g., dados gerais do paciente, informações clínicas e antecedentes, caracterização e topografia da lesão, intervenção médica, evolução do quadro, seguimento e sobrevida) constituíram banco de dados empregado na seleção dos casos para execução da pesquisa.

As respectivas amostras de tecido fixado em formalina e incluído em parafina foram levantadas junto ao Departamento de Patologia do HC-FMB. A existência de tecido em condições adequadas para realização das técnicas de IHQ, HIS e PCR foi considerada critério para inclusão do caso no estudo. Assim, do conjunto inicial de 230 casos de carcinomas de cabeça e pescoço, foram selecionados 110 casos de carcinoma de

---

laringe e 10 casos de carcinomas de nasofaringe provenientes do HC-FMB. A casuística de carcinomas de nasofaringe foi complementada com casos provenientes de arquivos de patologia cirúrgica dos laboratórios Consultoria em Patologia (Botucatu/SP) e Diagnóstika (São Paulo/SP), totalizando 25 casos.

Todas as amostras (i.e., 110 casos de carcinomas de laringe e 25 de nasofaringe) foram submetidas à análise histopatológica, pesquisa do EBV pela técnica de HIS e PCR, pesquisa do HPV pela PCR e estudo imunoistoquímico da expressão da proteína p53 e do antígeno de proliferação celular Ki-67.

## **IV.2 - Análise histopatológica**

Cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina (HE) foram revistos para confirmação e padronização dos diagnósticos anátomo-patológico. Os carcinomas espinocelulares de laringe foram graduados de acordo com o sistema simplificado de Broder, a saber: Grau I - carcinomas bem diferenciados; Grau II – carcinomas moderadamente diferenciados; Grau III – carcinomas pouco diferenciados a anaplásicos. Carcinomas de nasofaringe foram classificados segundo os critérios da OMS, que reconhece três entidades distintas: carcinomas queratinizados (OMS-1), carcinomas não-queratinizados (OMS-2) e carcinomas indiferenciados (OMS-3), na qual se enquadram carcinomas do tipo linfoepitelioma.

## **IV.3 - Estudo imunoistoquímico**

A detecção do produto do gene supressor tumoral *TP53* e do antígeno de proliferação celular Ki-67 foi realizada por meio de reação imunoistoquímica com os anticorpos monoclonais anti-p53 (DAKO Cód. M7001) e anti-Ki67 (DAKO Cód. M7187), res-

---

---

pectivamente, ambos produzidos em camundongos. O protocolo empregado está resumido a seguir:

Cortes com espessura aproximada de 3 $\mu$ m foram obtidos com micrótomo histológico e dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma Cód. P7886). Os cortes foram mantidos a 60°C em estufa por pelo menos 4 horas. A seguir foi realizada desparafinação com banhos sucessivos de xilol, hidratação em álcool etílico absoluto, lavagem com solução salina tamponada (PBS) e bloqueio da atividade de peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Foi empregado forno de microondas convencional na recuperação de epítomos, incubando-se os cortes em solução de citrato 0,01N pH 6,4 por 15 minutos em potência máxima (GOWN, WEVER & BATTIFORA, 1993). Os cortes foram então mantidos a 4°C *overnight* com os respectivos anticorpos primários (anti-p53 1:400; anti-Ki-67 1:100) e, após nova lavagem com PBS, foram incubados por 60 minutos com anticorpo biotilado contra IgG de camundongo (Vector Cód. BA2000; 1:160). Para amplificação do sinal, empregou-se kit ABC Elite<sup>®</sup> (Vector Cód. PK6100) conforme instruções fornecidas pelo fabricante. Seguiu-se tratamento com solução 3,3' diaminobenzidina (DAB 1mg/mL / Tris-Cl 1M pH 7,4) acrescida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentração final de 0,1%), contracoloração com verde de metila e montagem com resina histológica Permunt (Fischer Scientific Cód. SP15-500). Os resultados do ensaio foram avaliados em microscópio óptico comum. A reação positiva é representada pela deposição do cromógeno nos sítios de ligação antígeno-anticorpo, conferindo marcação nuclear às células que expressam os antígenos estudados.

#### **IV.4 - Extração de DNA para os ensaios baseados em PCR**

Após avaliação de alguns protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formalina e incluído em parafina (JACKSON et al, 1990; HOWE, KLIMSTRA &

---

---

CORDON-CADO, 1997; MERKELBACH et al, 1997; MIES, 1994; SEPP et al, 1994; SHIBATA, 1994), foi padronizado o procedimento a seguir para obtenção das amostras de DNA para os ensaios de PCR:

Com o emprego de micrótomo histológico (exclusivo para processamento de amostras para PCR), foram obtidos de 2 a 4 cortes de 25µm de espessura do tecido fixado em formalina e incluído em parafina, tomando-se todos os cuidados necessários para se evitar contaminação cruzada. Os cortes foram acondicionados em tubos de microcentrífuga devidamente identificados, sendo então submetidos à desparafinação em banhos repetidos com xilol, desidratação com etanol 100% e secagem do material em banho seco a 56°C durante 15 minutos. A digestão protéica foi realizada em solução de digestão (Tris-Cl 10mM / NaCl 100mM pH 8,5 / EDTA 1mM pH 8,0 / Tween 20 0,5%) acrescida de proteinase K (concentração final de 0,4µg/µL). As amostras foram mantidas a 56°C *overnight* ou até digestão completa do tecido, acrescentando-se nova alíquota de proteinase K quando necessário. A purificação do DNA obtido foi feita com solução CTAB/NaCl (CTAB 0,88M / NaCl 0,35M), seguindo-se precipitação em etanol, secagem e ressuspensão do DNA em solução TE (Tris-Cl 1M pH 7,5/EDTA 250mM). A quantidade e qualidade do DNA obtido foram avaliadas, respectivamente, através de leitura espectrofotométrica e corrida em gel de agarose 2% corado pelo brometo de etídio.

#### **IV.5 - Pesquisa do EBV**

Para detecção do EBV foi realizada hibridação *in situ* com sonda biotinilada complementar ao transcrito do gene viral EBER-1, altamente expresso em praticamente todas as células infectadas (aproximadamente 10<sup>7</sup> cópias por núcleo) (GLICKMAN et

---

---

al, 1988). O protocolo experimental é baseado naquele descrito por WEISS e colaboradores (1991):

Cortes colocados sobre lâminas de vidro pré-tratadas com poli-D-lisina foram incubados em estufa a 60°C *overnight*. A seguir, foram desparafinados em xilol e hidratados de maneira rotineira. O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%. Seguiu-se digestão enzimática por 15 minutos com proteinase K (concentração final de 0,02 µg/µL); o bloqueio da atividade enzimática foi obtido por meio tratamento dos cortes em solução de glicina (Glicina 0,2% / Tris-Cl 100mM / NaCl 100mM) por 10 minutos. Os cortes foram então desidratados em álcool 95%, seguindo-se secagem e pré-hibridação dos tecidos com solução de pré-hibridação (NaPO<sub>4</sub> 20mM / Solução Denhardt 1x / Sulfato Dextran 0,1%) durante 1 hora a 37°C. Após acréscimo da sonda para detecção do EBV (concentração final: 0,25 ng/mL), os cortes foram mantidos em câmara úmida a 37°C *overnight*. Amplificação do sinal de hibridação foi realizada através do método avidina-biotina-peroxidase, e a revelação realizada com solução contendo 3,3'-diaminobenzidina (DAB). A contracoloração foi feita com verde de metila, seguindo-se desidratação dos cortes em gradientes sucessivos de álcool e posterior montagem das lâminas com Permount. A leitura das reações foi realizada ao microscópio óptico comum. Células revelando positividade quanto à presença do EBV apresentam marcação nuclear, resultado da precipitação do cromógeno nos sítios de ligação da sonda ao RNA viral. Controle positivo (caso de linfoma de Burkitt EBV-positivo) foi empregado em todas as reações.

Além de submetidos à HIS, os carcinomas de nasofaringe foram avaliados quanto à frequência da deleção de 30pb descrita em segmento terminal do gene BNLF-1 do EBV (CHEN et al, 1992; HU et al, 1991), que codifica a LMP-1. Após extração de DNA dos tecidos (conforme protocolo apresentado no item IV.4), as amostras de DNA foram

---

submetidas à amplificação por PCR de segmento de 161pb do gene BNLF-1, que gera amplicons com tamanhos distintos quando há deleção e na sua ausência (131pb e 161pb, respectivamente) (HAYASHI et al, 1997). Os componentes da reação de PCR, iniciadores e perfil de ciclagem empregados estão indicados na tabela abaixo; os resultados do ensaio foram analisados após corrida eletroforética do produto de PCR em gel de acrilamida 7% corado pelo método de impregnação pela prata.

TABELA 3 – Iniciadores, constituintes de reação e perfil de ciclagem para avaliação de deleção no gene BNLF-1 do EBV através da PCR

INICIADORES	CONSTITUINTES DA REAÇÃO	PERFIL DE CICLAGEM
LMP1S – CGGAAGAGGTGGAAAACAAA	Tampão contendo Tris-Cl 20mM	94°C - 5' (1x); 94°C -
LMP1A - GTGGGGGTCGTCATCATCTC	pH 8,4 / KCl 50mM / MgCl <sub>2</sub>	30", 58°C - 45", 72°C -
	3mM, 0,2mM cada dNTP, 1U	1' (40x); 72°C - 7' (1x).
	Taq e 0,4 µM cada iniciador	

#### IV.6 - Pesquisa do HPV

Inicialmente, a detecção do HPV nos carcinomas de laringe e nasofaringe estudados foi realizada através da amplificação por PCR de segmento conservado de 140-150pb da região L2 do genoma viral. Foram empregados os iniciadores genéricos GP5+/GP6+, que permitem detecção de amplo espectro de tipos de HPV já identificados (DE RODA HUSMAN et al, 1995).

Para certificação dos resultados obtidos com os iniciadores genéricos, todas as amostras foram submetidas à primeira PCR (triagem) e as amostras positivas foram submetidas à segunda reação, com pequenas alterações com relação à primeira visando a aumento da especificidade. Amostras que não exibiram amplificação do segmento de 145-150pb do genoma viral foram submetidas à PCR para amplificação de segmento de 123pb do gene que codifica a cadeia beta da globina humana com os ini-

---

ciadores PCO3+/PCO4+ (SAIKI et al, 1988). A amplificação dessa seqüência deve ser observada em todas as amostras passíveis de avaliação pela PCR; assim, esse procedimento permitiu identificação de amostras de DNA sem condições de amplificação, consideradas inconclusivas, portanto, quanto aos resultados da detecção do HPV.

Todas as amostras foram também submetidas à reação de PCR *multiplex* com iniciadores específicos para detecção de HPV tipos 6 ou 11 (SOLER et al, 1990), 16 e 18 (VAN DEN BRULE et al, 1992). Essa abordagem viabilizou determinação do genótipo viral nas amostras que se revelaram HPV-positivas na reação com os iniciadores GP5+/GP6+, bem como possibilitou identificação de casos falso-negativos por ausência de amplificação do segmento flanqueado pelos iniciadores genéricos.

Durante a detecção do HPV por PCR, foram empregadas amostras de DNA de duas linhagens de células de carcinoma de cérvix como controles positivos para infecção por HPV de alto grau: HeLa (até 4 cópias de HPV-18 por célula; ATCC #CCL-2) e CaSki ( $\approx$ 600 cópias de HPV-16 por célula, ATCC #CRL-1550) (BOSHART et al, 1984; PATER & PATER, 1985; YEE et al, 1985). Adicionalmente, amostra de DNA extraído de biópsia de condiloma acuminado perianal foi empregada como controle positivo para HPV de baixo grau (tipo 6/11). Eventos esporádicos de contaminação das reações de amplificação foram monitorados por meio de inclusão de amostra contendo todos os reagentes exceto DNA em todas as reações de PCR; adicionalmente, em algumas reações com os iniciadores genéricos foi também acrescentada amostra de DNA reconhecidamente HPV-negativa extraída de linfoma de Burkitt.

As tabelas 4 e 5 apresentam os iniciadores empregados nas PCRs para detecção e genotipagem de HPV, bem como constituintes das reações e os respectivos per-

---

fis de ciclagem. O produto das PCRs foi analisado em corrida eletroforética em gel de agarose 2% corado pelo brometo de etídio.

TABELA 4 – Constituintes da reação e perfil de ciclagem nas PCRs empregadas para detecção do HPV

PCR	INICIADORES (AMPLICON)	CONSTITUINTES DA REAÇÃO	PERFIL DE CICLAGEM
Triagem HPV (reação com iniciadores genéricos)	GP5+/GP6+ (140-150pb)	Tampão (Tris-Cl 28mM pH 8,4/KCl 70mM), 3mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2mM cada dNTP, 1U Taq, 0,5 μM cada iniciador, 10% glicerol.	94°C - 5' (1x); 94°C - 30", 45°C - 45", 72°C - 1' (45x); 72°C - 7' (1x).
Confirmação HPV (reação com iniciadores genéricos)	GP5+/GP6+ (140-150pb)	Tampão (Tris-Cl 28mM pH 8,4/KCl 70mM), 2mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2mM cada dNTP, 1U Taq*, 0,3μM cada iniciador.	Idem anterior
Segmento do gene da β-globina humana	PCO3+/PCO4+ (123pb)	Tampão (Tris-Cl 28mM pH 8,4/KCl 70mM), 3mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2mM cada dNTP, 1,25U Taq, 0,5μM cada iniciador.	94°C - 5' (1x); 94°C - 30", 55°C - 45", 72°C - 1' (40x); 72°C - 7'(1x).

Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen Cód. 10966-026)

TABELA 5 – Iniciadores empregados, constituintes da reação e perfil de ciclagem de PCR *multiplex* para genotipagem de HPV.

INICIADORES (AMPLICON)	SEQÜÊNCIA (5' – 3')*	CONSTITUINTES DA REAÇÃO	PERFIL DE CICLAGEM
SL6/11 (302pb)	S: TAC ACT GCT GGA CAA CAT GC A: GTG CGC AGA TGG GAC ACA C	Tampão (Tris-Cl 28mM pH 8,4/KCl 70mM), 3mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2mM cada dNTP, 1,25U Taq, 0,5μM cada iniciador.	94°C - 5' (1x); 94°C - 1', 55°C - 1', 72°C - 1' (40x); 72°C - 7' (1x).
VdB16 (152pb)	S: TGC TAG TGC TTA TGC AGC AA A: ATT TAC TGC AAC ATT GGT AC		
VdB18 (216pb)	S: AAG GAT GCT GCA CCG GCT GA A: CAC GCA CAC GCT TGG CAG GT		

\* S: iniciador sense; A: iniciador antisense

Levando-se em conta as características das abordagens de detecção do HPV empregadas (e.g., estringência da reação de PCR, sensibilidade e amplitude de genótipos virais detectados), foram consideradas HPV-positivas as amostras que apresentaram amplificação em duas reações de triagem ou duas de tipagem. Essa estratégia

---

permitiu descartar resultados de experimentos nos quais se insinuasse possibilidade de contaminação da reação de PCR, evitando também resultados falso-negativos decorrentes de infecção por HPV com genótipo diferente daqueles pesquisados (6/11, 16 e 18), muito embora amostras nessa situação tivessem que ser consideradas inconclusivas quanto ao tipo de HPV detectado.

#### **IV.7 - Análise de imagem e estimativa da proliferação celular**

Análise semi-automatizada de imagem a partir de lâminas coradas com o anticorpo monoclonal MIB-1, empregando o software KS-300<sup>®</sup> (Carl Zeiss Vision Inc.), foi empregada para cálculo do Índice de Proliferação Celular (IPC). A Figura 9 ilustra resultados de cada uma das etapas do procedimento, descrito a seguir:

I – Captura de imagens: cada lâmina corada pelo anticorpo MIB-1 foi visualizada em microscópio óptico Nikon Microphot-FXA ligado ao equipamento de análise de imagem (microcomputador compatível com padrão IBM-PC e software KS300). Em aumento de 250x, foram definidas áreas representativas do tumor na qual se observou o maior número de células expressando o antígeno de proliferação celular Ki-67. Toda a análise, entretanto, foi realizada em campos visualizados em aumento de 500x. Imagem de 640x480 pixels, equivalente ao campo visualizado no microscópio e exibida pelo software KS300, foi gravada em arquivo formato TIFF, sendo que no total cinco campos distintos são definidos e os respectivos arquivos TIFF gerados. Ao final desta etapa, portanto, cada caso é representado por cinco arquivos TIFF seqüencialmente identificados por seu número seguido pelas letras A, B, C, D ou E. Exemplo de imagem obtida ao final dessa etapa é apresentada na Figura 9-A. II - Pré-processamento: consiste na geração de “máscaras”, que auxiliam o software a executar a análise considerando apenas os objetos desejados nas

---

imagens capturadas. Para cada imagem capturada foi gerada uma “máscara” através da ferramenta *Threshold RGB*, no menu *Segmentation* do software. Esse procedimento permitiu seleção de parcela de núcleos das células que expressam o antígeno Ki-67, reconhecidos pela coloração acastanhada. Através da seleção manual de região do núcleo de uma célula positiva, foi possível ao software buscar outros elementos da imagem com tonalidades semelhantes àquela indicada (Figura 9-B). A fim de estender ou restringir a seleção automática, ajustes foram realizados nos canais das cores vermelho, verde ou azul a fim de que o mínimo de células positivas fossem negligenciadas. Ao final, a “máscara” obtida consiste em uma nova imagem da qual foram suprimidas as regiões que não atendem aos critérios de seleção gerados pelas configurações realizadas na ferramenta *Threshold RGB* (Figura 9-C).

III – Análise preliminar: a seleção executada na etapa anterior requer refinamento para que o software avalie somente as células marcadas na imagem capturada. Esse refinamento foi obtido a partir de critérios matemáticos para exclusão de elementos que, embora selecionados pela “máscara”, não são células marcadas. A expressão abaixo, incluída na ferramenta *Set* do menu *Measurement*, mostrou-se a mais adequada para esse propósito:

$$\underbrace{\text{MEAND} \leq 130}_{\substack{\text{Densidade} \\ \text{média (pontos} \\ \text{na escala de} \\ \text{cinzas)}}} \quad \underbrace{\&\&}_{\substack{\text{Operador} \\ \text{booleano} \\ \text{“E”}}} \quad \underbrace{\text{MIND} \leq 100}_{\substack{\text{Densidade mínima} \\ \text{(pontos na escala} \\ \text{de cinzas)}}} \quad \underbrace{\&\&}_{\substack{\text{Operador} \\ \text{booleano} \\ \text{“E”}}} \quad \underbrace{\text{AREAF} \geq 13}_{\substack{\text{Área do objeto} \\ \text{preenchido} \\ \text{(\mu m}^2\text{)}}}$$

Marcação homoganeamente fraca no tecido neoplásico, diferenças na morfologia da célula tumoral ou mesmo diferentes padrões de deposição do cromógeno em seu núcleo podem requerer exclusão de um ou mais termos da expressão para que células positivas não sejam deliberadamente eliminadas da análise realizada pelo

software na etapa seguinte. IV – Análise de imagem: A ferramenta *Automatic measurement* foi empregada para se obter o número de células positivas para marcação com o anticorpo monoclonal MIB-1 na imagem. O valor fornecido pelo software foi corrigido nos casos em que se verificou que duas ou mais células foram contadas em grupo, como se fossem uma única (normalmente em função de estreita proximidade entre elas), ou quando elementos distintos de núcleos de células marcadas foram incorporados à análise a despeito dos filtros empregados.

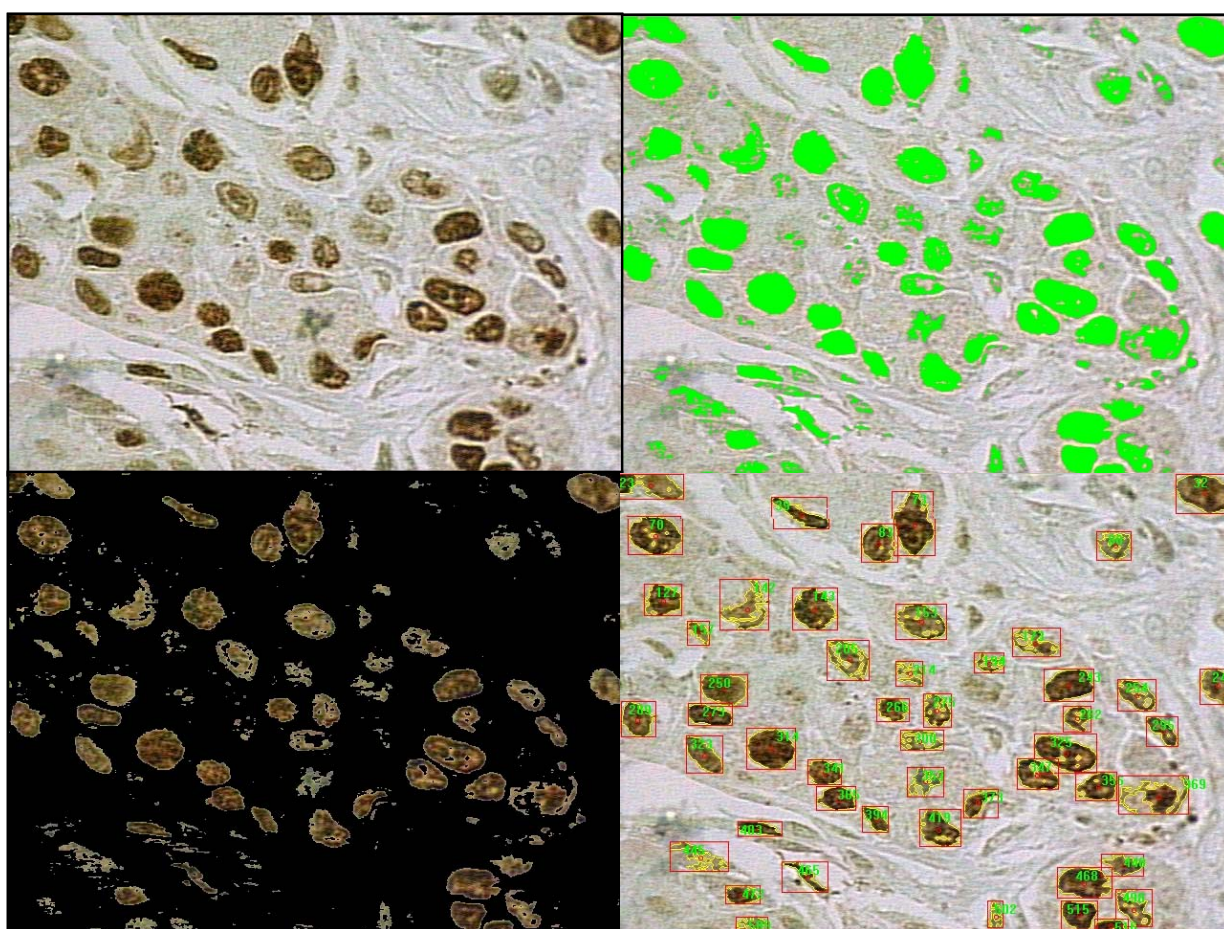


FIGURA 9 – Análise de Imagem de lâminas marcadas com anticorpo monoclonal MIB-1 para avaliação da proliferação celular. A – Campo de carcinoma de laringe capturado no software de análise de imagem KS-300. Os núcleos das células que expressam o antígeno de proliferação celular Ki-67 apresentam-se corados em marrom pela deposição de cromógeno nos sítios de ligação antígeno-anticorpo. B – Seleção preliminar dos elementos da análise (ver texto). C – Resultado da seleção preliminar dos elementos da análise. A imagem gerada é denominada “máscara”. D – Conclusão da análise após refinamento da seleção dos núcleos marcados através do emprego de critérios de exclusão de elementos que não devem ser computados.

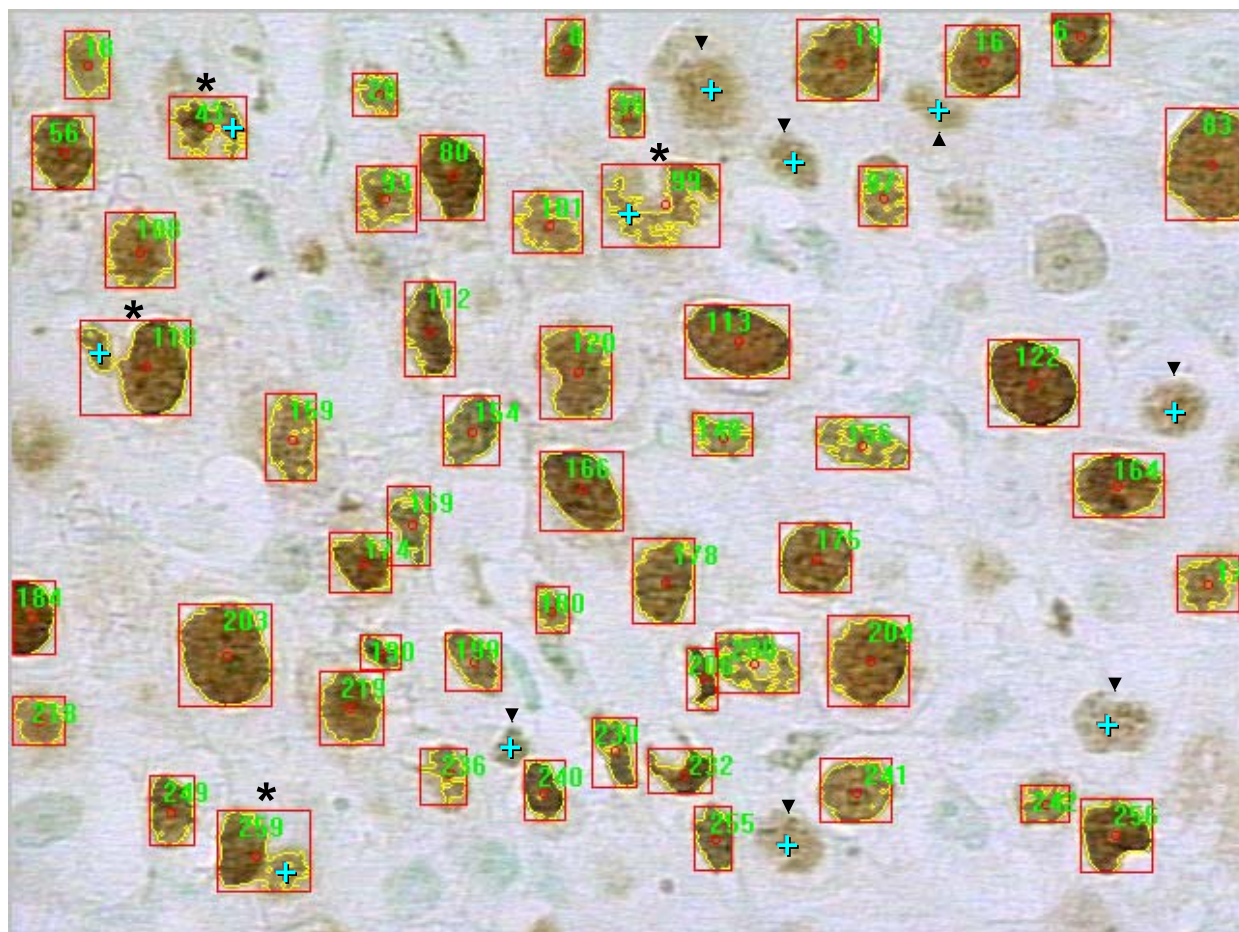


FIGURA 10 – Exemplo da intervenção do operador ao final da análise de imagem automática. Alguns núcleos que expressam Ki-67 não foram computados, pois não foram incluídos na seleção preliminar, ou não atenderam aos critérios definidos para exclusão de elementos da análise (cabeça de setas). Também é possível que dois ou mais núcleos muito próximos sejam considerados pelo software como um único elemento (asteriscos). As células marcadas com “+” são contadas manualmente, sendo que o número total obtido é acrescido ao resultado da contagem realizada pelo software. Procedimento análogo permite eliminar elementos erroneamente computados na contagem automática.

Para simplificação desses procedimentos, criou-se algoritmo contendo as configurações do software KS300 (arquivo *IPC\_O45F125.MS*, compatível com o sistema discriminado acima), comandos necessários para a automação da análise de imagem e critérios de seleção de elementos para cálculo do IPC (arquivo *IPC.MCR*). A listagem desses arquivos é apresentada no quadro 1.

QUADRO 1 – Listagem dos arquivos de configuração do sistema (IPC\_O40F125.MS) e de comandos do software KS300 (IPC.MCR) para análise semi-automatizada de imagem para determinação do IPC a partir de lâminas coradas com o anticorpo monoclonal MIB-1.

IPC_O40F125.MS	IPC.MCR
\$V KS 2.0	#-----
\$P SCALEX 0.235294	# Primeira Execução Somente
\$P SCALEY 0.238095	#-----
\$P UNIT micrometer	imgpath="c:/ks300/conf/images/capturadas"
\$P DISTANCEX 20	Imagem=""
\$P DISTANCEY 20	MSload "ipc_o40f125"
\$P DENSTABLE grey	#-----
\$P DENSFACOR 1	# Definindo ambiente
\$P DENSOFFSET 0	#-----
\$P DENUNIT grey	imgdelete ""
\$P FRAMEMODE 0	Gclear 0
\$P FRAMESTARTX 0	imgdisplay 1
\$P FRAMESTARTY 0	#-----
\$P FRAMESIZEX 100	# Definir diretório de Imagens
\$P FRAMESIZEY 100	#-----
\$P FRAMECENTERX 50	read imgpath," Confirma diretório?"
\$P FRAMECENTERY 50	while( fexist(imgpath) != 2 ) # check for existing path
\$P FRAMERADIUS 50	read imgpath," Diretório inválido!\nEntre diretório (use '/')"
\$P MINAREA 4	endwhile
\$P CONNECT 8	#-----
\$P CONDITION MEAND<=130&&AREAF>=13&&MIND<=100	# Carregar Imagem
\$P REGIONFEAT LABEL,MEAND,MIND,MAXD,STDD,AREAF,FCIRCLE	#-----
\$P FIELDFEAT FLDCOUNT[#]=SUM(1),AREA,MEAND,MIND,MAXD,SUMQD,STDD	read Imagem,"Nome do arquivo TIFF (sem extensão)"
\$P POINTFEAT COUNT	NomelImagem = imgpath+"/"+Imagem+".tif"
\$P DRAWFEAT DRCONTOUR,DRCGRAV,DRBOUNDBOX,LABEL	imgload NomelImagem, 1
\$P NSPACE 1	imgdisplay 1
\$P NFERETS 32	#-----
\$P CLASSIFIER	# Segmentação
\$P CLASSNAME0 class0	#-----
\$P CLASSNAME1 class1	dislevrgb 1,2,0,0,0,255,0,255,0,120,10,"RGB"
\$P CLASSNAME2 class2	MSmeasmask 2,1,"DATABASE",0,2,10
\$P CLASSNAME3 class3	#-----
\$P CLASSNAME4 class4	# Cálculos automáticos
\$P CLASSNAME5 class5	#-----
\$P CLASSNAME6 class6	MSmeasmask 2,1,"DATABASE",0,0,1
\$P CLASSNAME7 class7	datalist "DATABASE",0,0
\$P CLASSNAME8 class8	#-----
\$P CLASSNAME9 class9	# Ajustes manuais
\$P CLASSNAME10 class10	#-----
\$P CLASSNAME11 class11	imgdisplay 1
\$P CLASSNAME12 class12	MSdrawmask 2,1
\$P CLASSNAME13 class13	Beep
\$P CLASSNAME14 class14	
\$P CLASSNAME15 class15	
\$P WINDOW 3	
\$P PROFILES 1	
\$P THRESHOLD 10	
\$P SPACE 1	
\$P MODE 4	

Com base na metodologia aqui descrita foi calculado o IPC, expresso em células por milímetro ao quadrado ( $\text{mm}^2$ ), e definido pelo somatório do número de células neoplásicas expressando Ki-67 dividido pela área de tecido avaliada ( $0,0860505\text{mm}^2$ ).

---

## IV.8 - Análise dos resultados

Foi empregada análise estatística descritiva para avaliação das informações anátomo-clínicas disponíveis. A avaliação dos dados experimentais empregou análise de variância (ANOVA) para o estudo de correlação entre variáveis categóricas (e.g., topografia da lesão, estadiamento, estágio clínico e graduação, infecção pelo HPV ou EBV, expressão de p53, etc.) e variáveis contínuas (e.g., idade ao diagnóstico, *pack-years* para tabagistas, índice de proliferação celular). O estudo de variáveis categóricas com discriminação de grupos empregou tabelas de contingência 2x2 e teste de  $\chi^2$  sempre que possível.

A discussão sobre os resultados apresentados leva em consideração  $\alpha < 5\%$ , sendo consideradas tendências as associações com  $\alpha$  entre 5% e 10%.

---

# V - RESULTADOS

## **V.1 - Carcinomas de Nasofaringe**

Em função do pequeno número de casos de carcinomas de nasofaringe em nossa instituição, foi necessário obter casos adicionais de provenientes de outros serviços de saúde. Isso inviabilizou levantamento de dados clínicos objetivos e realização de algumas das análises disponíveis para os carcinomas de laringe. Desse modo, as correlações aqui apresentadas são baseadas principalmente na avaliação anátomo-patológica dos tumores e nos ensaios de imunohistoquímica e biologia molecular realizados.

### **V.1.1 - Caracterização geral da amostra de estudo**

Dos 25 casos de carcinomas de nasofaringe estudados, 19 (76%) pacientes sexo masculino e 6 (24%) no feminino. Ao diagnóstico, a média das idades foi 47,2 anos (desvio padrão de 19,1 anos), sendo que as idades mínimas e máximas foram, respectivamente, 17 e 77 anos. Não foi observada diferença nas médias das idades com relação ao sexo. Histologicamente todos os casos avaliados eram carcinomas indiferenciados tipo linfoepitelioma (OMS-3).

### **V.1.2 - Infecção pelo EBV e HPV**

Através da HIS com sonda biotinilada dirigida ao transcrito viral EBER-1, o EBV foi detectado em 13/25 (52%) carcinomas de nasofaringe (Figura 11), sendo mais frequente em pacientes masculinos ( $p=0,0469$ ;  $OR=8,57$ ,  $IC=0,7-239,4$ ). A PCR com iniciadores específicos para amplificação de segmento do gene viral BNLF-1 revelou que 6/13 (46,2%) dos casos EBER-positivos exibiam a versão não deletada do gene, enquanto 5/13 (38,5%) apresentavam a deleção descrita de 30pb e 2/13 (15,4%) casos foram inconclusivos quanto à pesquisa de BNLF-1 (Figura 12). Saliente-se ainda que 3/12 (25%) casos EBER-negativos apresentaram amplicon de 131pb, dado que sugere

---

infecção pelo EBV na amostra de DNA estudada, bem como presença de deleção no gene que codifica a LMP-1. Esses resultados são apresentados na tabela 6. Não foram observadas diferenças significativas quanto à frequência da deleção em BNLF-1 segundo o sexo ou idade do paciente.

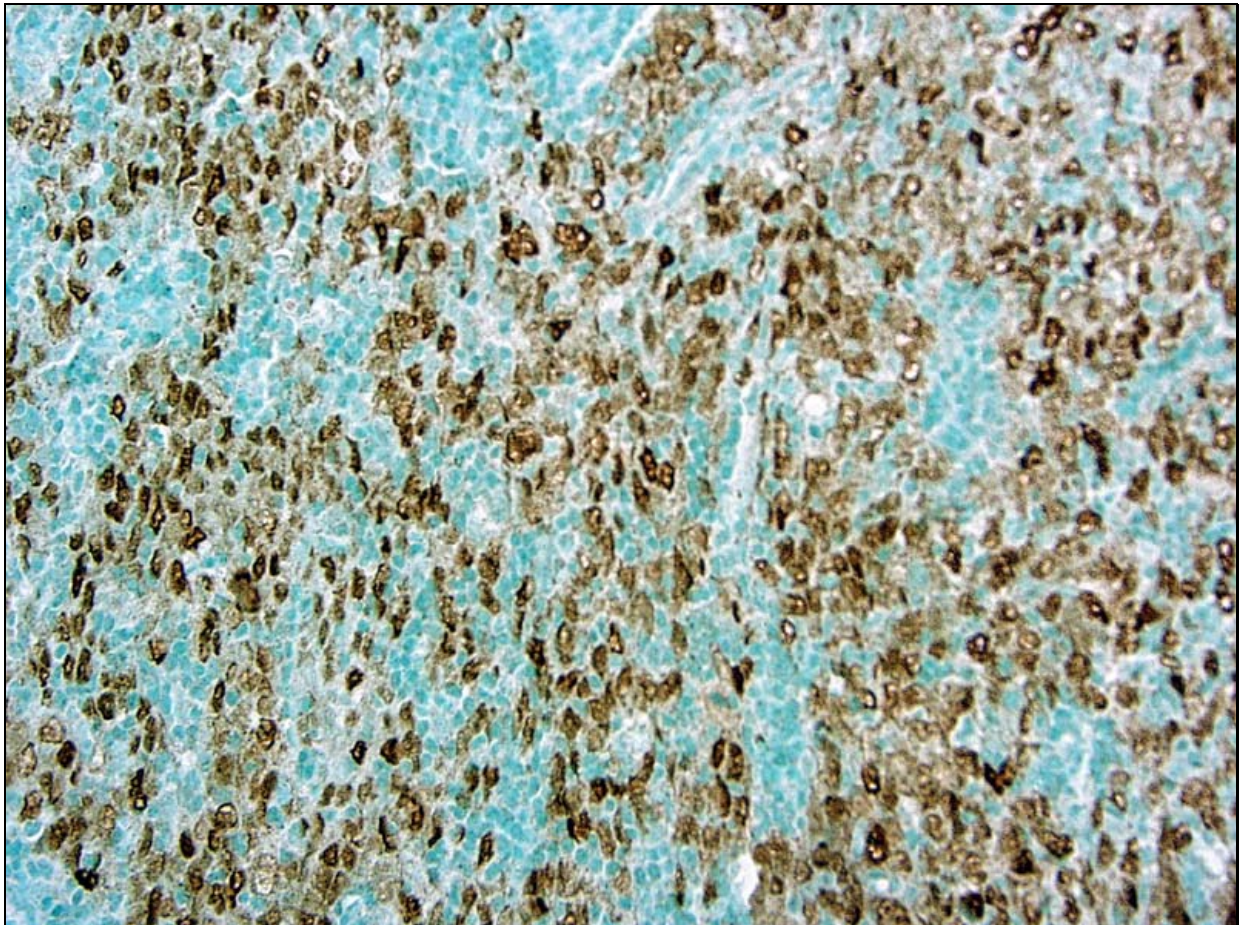


FIGURA 11 – Hibridação *in situ* para detecção do EBV em carcinoma indiferenciado de nasofaringe. Virtualmente todas as células neoplásicas exibem marcação nuclear com sonda biotinizada complementar a segmento do transcrito viral EBER-1, ativamente expresso nas células infectadas pelo EBV (Aumento de 100x; contra coloração com verde de metila).

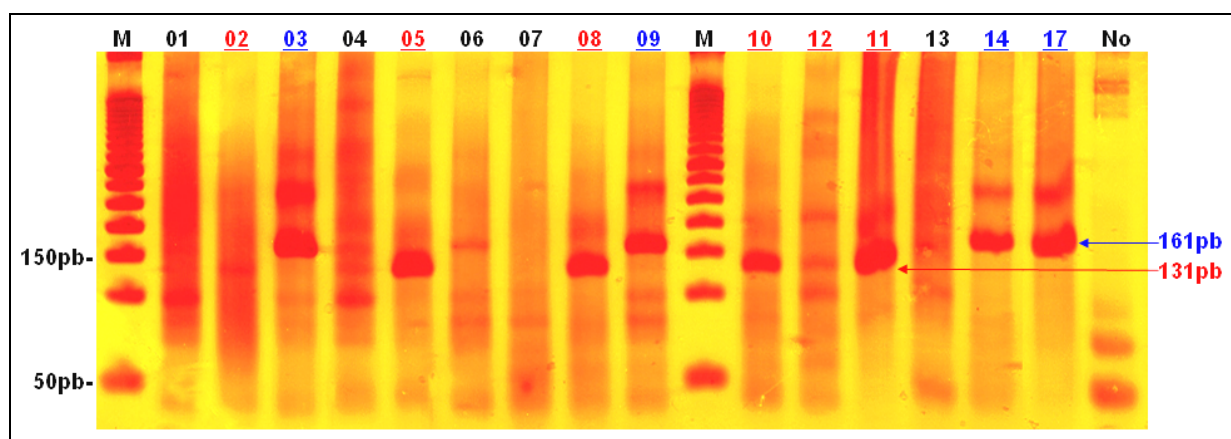


FIGURA 12 – Avaliação por PCR da deleção de 30pb no gene viral BNLF-1 (que codifica a LMP-1 do EBV), em carcinomas de nasofaringe. Amplificação de segmento do gene viral pode ser observada nas amostras destacadas, sendo que casos com e sem deleção apresentam amplicons de 131pb (em vermelho) e 161pb (em azul), respectivamente. M – Marcador de peso molecular de 50pb; No – controle negativo da reação (sem DNA).

TABELA 6 – Resultados da pesquisa de infecção pelo EBV em carcinomas de nasofaringe através de hibridação in situ (HIS) dirigida ao transcrito viral EBER-1 e avaliação da deleção do gene BNLF-1 através de PCR (ver texto).

HIS EBER-1	BNLF-1 131PB	BNLF-1 161PB	BNLF-1 NEG.	TOTAL HIS
Positivo	5/25 (20%)*	6/25 (24%)*	2/25 (8%) <sup>†</sup>	13/25 (52%)
Negativo	3/25 (12%) <sup>†</sup>	0/25 (0%)*	9/25 (36%)*	12/25 (48%)
Total PCR	8/25 (32%)	6/25 (24%)	11/25 (44%)	25/25 (100%)

\* Resultados concordantes quanto à detecção do EBV através das técnicas de HIS e PCR; <sup>†</sup> Resultados discordantes entre as metodologias empregadas (ver discussão).

Apenas 1 caso de carcinoma de nasofaringe dos 25 avaliados (4%) apresentou amplificação com iniciadores genéricos para detecção do HPV. Em reação subsequente com iniciadores específicos para HPVs 6/11, 16 e 18, foi demonstrada presença de dois genótipos virais na amostra de DNA deste único caso positivo para HPV: HPVs 16 e 18 (Figura 13). Este mesmo caso não revelou presença concomitante do EBV nas células neoplásicas por meio da HIS, tampouco amplificação de BNFL-1 pela PCR.

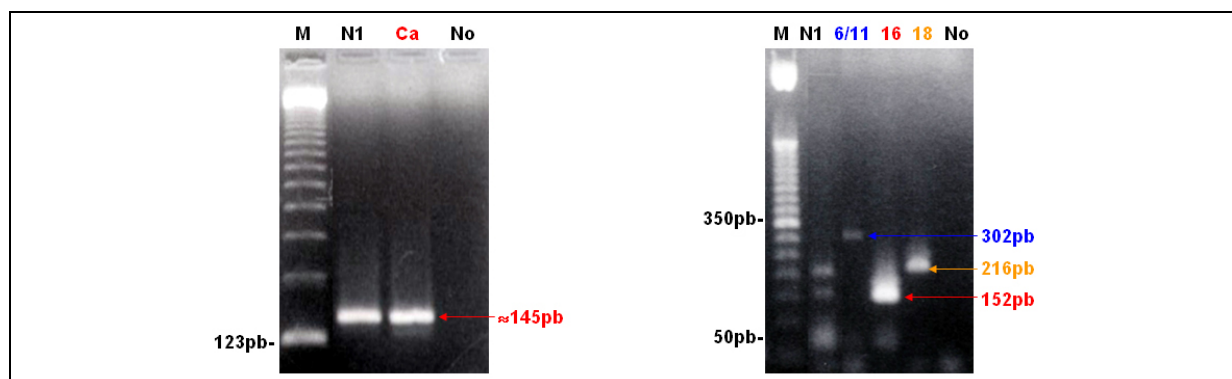


FIGURA 13 – Carcinoma de nasofaringe (N1) apresentando amplificação de segmento do genoma do HPV através de PCR com iniciadores genéricos (à direita), e de segmentos de 152pb e 216pb com iniciadores específicos (à esquerda), resultados compatíveis com infecção concomitante por HPVs 16 e 18. Ca – Controle positivo (amostra de DNA extraído de células CaSki); No – Controle negativo (sem DNA); HPV-6/11 – amostra de DNA extraído de condiloma acuminado (302pb); HPV-16 – DNA extraído de linhagem celular CaSki (152pb); HPV-18 – DNA extraído de linhagem celular HeLa (216pb).

### V.1.3 - Expressão de p53 e Ki-67: proliferação celular e suas correlações

Exceto por 2 casos (8%), virtualmente todos os carcinomas de nasofaringe avaliados apresentaram marcação imunohistoquímica para p53 (Figura 14), o que tornou impraticável avaliar diferenças na taxa de proliferação celular estimada através do IPC com base na vigência de acúmulo dessa proteína.

A análise de variância não revelou diferenças entre o IPC calculado para carcinomas de nasofaringe EBER-positivos e casos EBER-negativos; da mesma maneira, carcinomas de nasofaringe exibindo deleção de 30pb em BNL1-1 comportaram-se de maneira equivalente àqueles sem a deleção. Entretanto, carcinomas de nasofaringe apresentaram IPCs maiores que carcinomas de laringe ( $p=0,0019$ ), fenômeno independente da expressão de p53. Maiores taxas de proliferação celular em carcinomas de nasofaringe são também observadas quando consideradas as topografias de carcinomas laríngeos, particularmente em relação a tumores glóticos e transglóticos (Figura 15).

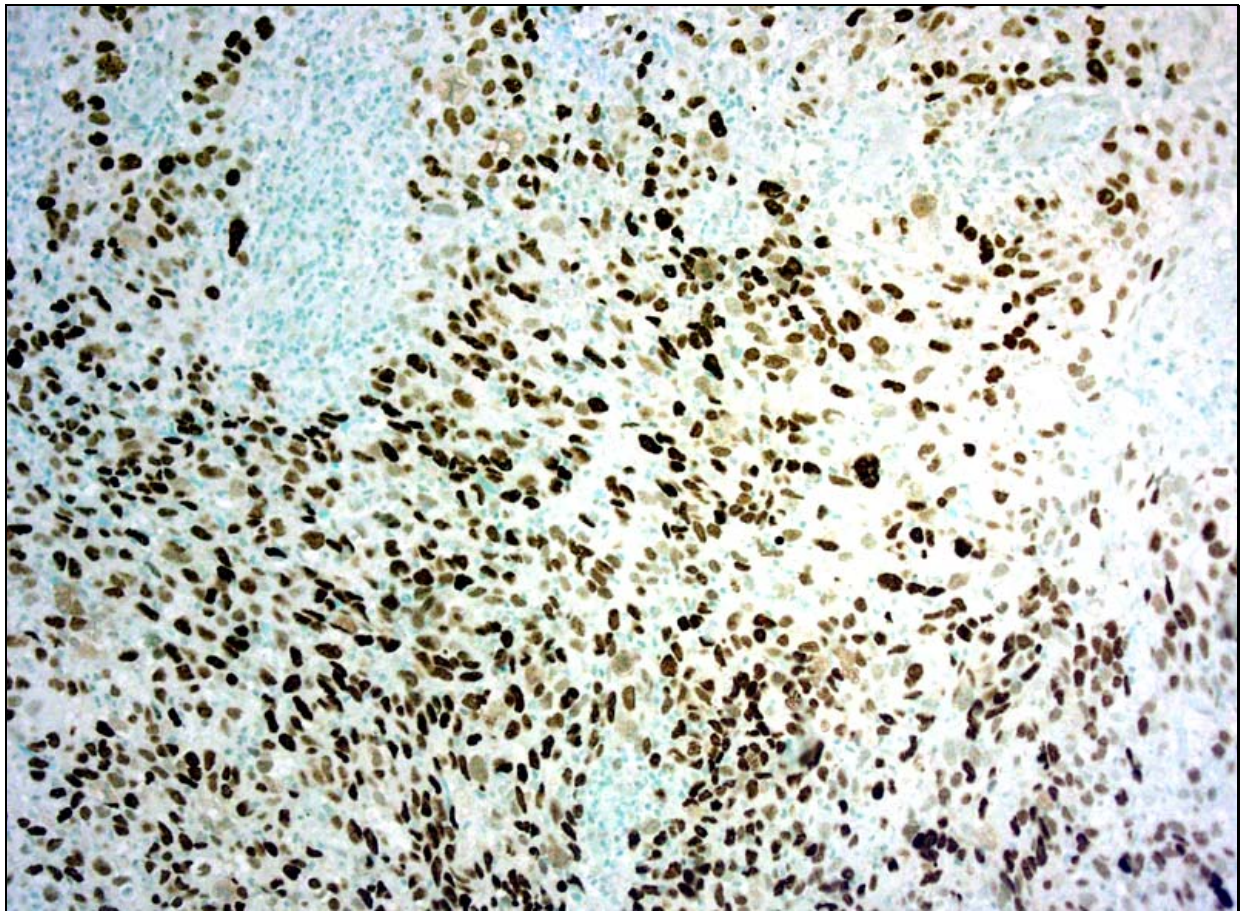


FIGURA 14 – Expressão do produto do gene supressor tumoral TP53 em caso de carcinoma indiferenciado de nasofaringe (Aumento de 200x; contra coloração com verde de metila).

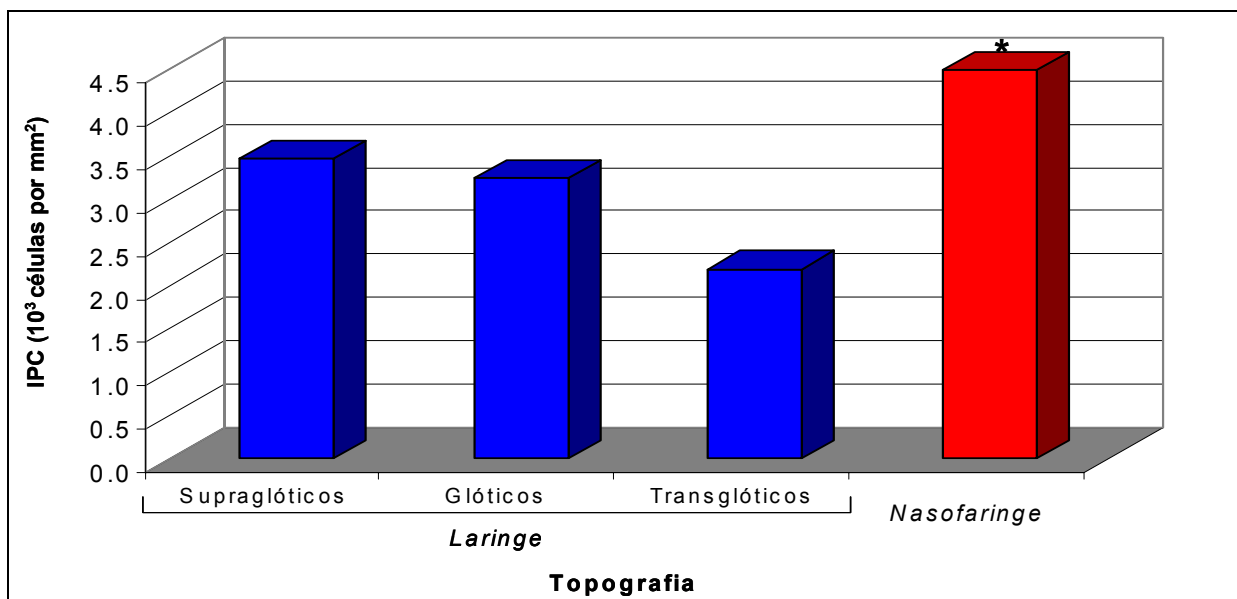


FIGURA 15 – Comparação entre a média dos Índices de proliferação celular (IPC) de carcinomas de laringe (supraglóticos, glóticos e transglóticos) e carcinomas de nasofaringe.

## V.2 - Carcinomas de Laringe

### V.2.1 - Caracterização geral da amostra de estudo

#### V.2.1.1 - Epidemiologia

Dos 110 casos de carcinomas de laringe avaliados, 89 (80,9%) eram pacientes do sexo masculino e 21 (19,1%) do feminino. A idade ao diagnóstico oscilou de 25 a 86 anos, sendo a média igual a 59,4 anos (Tabela 7; item topografia V.2.1.2). Dentre as queixas que motivaram a consulta médica, destacaram-se disfonia (79,1% dos casos), odinofagia (33,6%), disfagia (25,5%) e dispnéia (21,8%); presença de nódulos linfáticos palpáveis e otalgia representaram queixas menos frequentes (7,3% e 2,3% dos casos, respectivamente).

A quase totalidade dos pacientes era tabagista (100 casos; 91,0%), e em 67 casos foi possível estimar a quantidade cumulativa de cigarros consumidos, expressa em *pack-years* (py, definido pelo produto do número de maços de cigarro consumidos diariamente pelo número de anos na condição de fumante). Com base nessa informação, o conjunto de carcinomas de laringe pôde ser subdividido em pacientes não-tabagistas (py=0, n=10), tabagistas leves (py<40, n=25), tabagistas moderados (40≤py<80, n=30), tabagistas pesados (py≥80, n=12) e tabagistas sem outras especificações (SOE, n=33), conforme ilustrado na Figura 16.

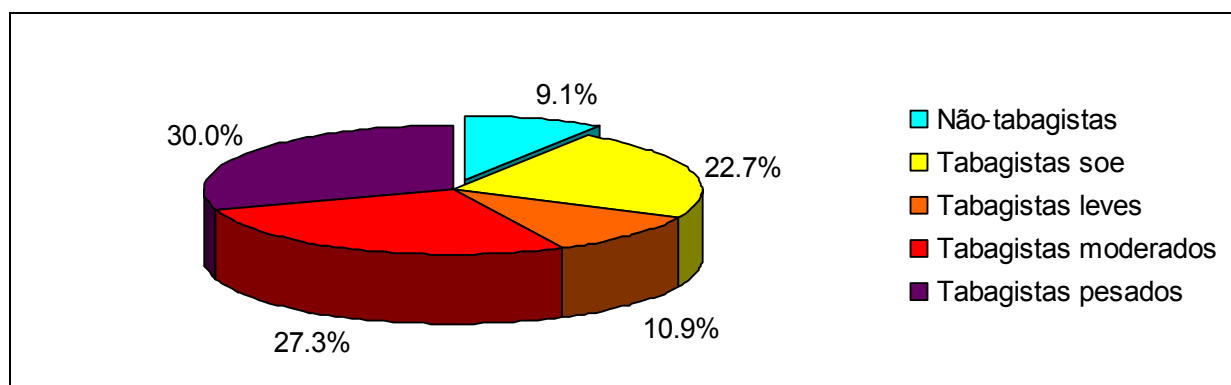


FIGURA 16 – Distribuição dos casos de carcinomas de laringe com relação ao tabagismo (n=110).

Foram observados números equivalentes de pacientes etilistas (59 casos, 53,5%) e pacientes que não consumiam bebidas alcoólicas (51 casos, 46,4%), sendo que 59,0% dos pacientes tabagistas também referiam etilismo. Bebidas destiladas destacaram-se como as mais freqüentemente consumidas (22/59 casos, 37,3%). Adicionalmente, 3/59 pacientes (5,1%) indicavam ingerir exclusivamente bebidas fermentadas, 2/59 (3,4%) admitiam consumo de ambos os tipos, e informações sobre o tipo de bebida ingerida não estavam disponíveis em 32/59 casos (54,2%). A freqüência de consumo de bebidas alcoólicas variou de ocasional (11/59 casos, 18,6%) a diária (35/59 casos, 59,3%), em quantidades também variáveis de menos de 500mL (15/59 casos, 25,4%), 500mL até 1L (12/59, 20,3%), ou mais de 1L (6/59, 10,2%).

#### V.2.1.2 - Topografia

A avaliação clínica da topografia da lesão permitiu classificar os carcinomas de laringe em supraglóticos (52/110 casos; 47,3%), glóticos (53/110 casos, 48,2%) e transglóticos (5/110 casos; 4,5%). Embora esses casos sejam predominantemente indivíduos do sexo masculino, houve variações importantes na razão entre pacientes masculinos e femininos de acordo com o sítio do tumor primário. Além disso, nossos dados permitem aferir a importância da topografia da lesão na sintomatologia apresentada, uma vez que pacientes com tumores glóticos apresentaram principalmente disfonia como queixa principal (49/53 casos, 92,5% -  $p = 0,0007$ ; OR=6,49, IC: 1,84-25,05), enquanto pacientes com tumores supraglóticos exibiram mais freqüentemente odinofagia (23/52 casos, 44,2% -  $p=0,0102$ ; OR=3,03, IC: 1,18-7,86) e disfagia (19/52, 36,5% -  $p = 0,0120$ ; OR=3,24, IC: 1,16-9,26). A tabela 7 apresenta a distribuição dos casos avaliados de carcinomas de laringe segundo topografia do tumor, sexo e idade.

TABELA 7 – Distribuição dos 110 casos de carcinoma de laringe segundo topografia da lesão, idade e faixa etária.

TOPOGRAFIA	N (%)	SEXO ♂:♀	IDADE	
			MÉDIA ± DESVIO	FAIXA ETÁRIA
Supraglóticos	52 (47,3%)	2,3:1	58,5 ± 9,7 anos	25 – 86 anos
Glóticos	53 (48,2%)	12,3:1*	60,1 ± 11,8 anos	41 – 83 anos
Transglóticos	5 (4,5%)	1,5:1	62,0 ± 11,4 anos	47 – 77 anos
<b>Total</b>	<b>110 (100%)</b>	<b>4,2:1</b>	<b>59,4 ± 10,8 anos</b>	<b>25 – 86 anos</b>

\* $\chi^2$ : p=0,0046; OR=4,97, IC: 1,38-19,47

### V.2.1.3 - Estadiamento TNM e estágio clínico

O estadiamento TNM dos casos estudados revelou que a maioria dos pacientes apresentava doença avançada, evidenciada pelo elevado número de tumores T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> (31,8% e 20,0%, respectivamente); entretanto, comprometimento de nódulos linfáticos regionais não foi achado freqüente (37/110, 33,6%). Mais da metade dos pacientes apresentou estágio clínico elevado: estágios 3 e 4 em, respectivamente, 24/110 casos (21,8%) e 40/110 casos (36,4%) (Figura 17). Pacientes com carcinomas glóticos tendem a se enquadrar nos estágios 1 ou 2 (26/53 casos, 49,1%), enquanto parece predominar nos pacientes com carcinomas supraglóticos os estágios 3 ou 4 (33/52 casos, 63,5% - p=0,0718).

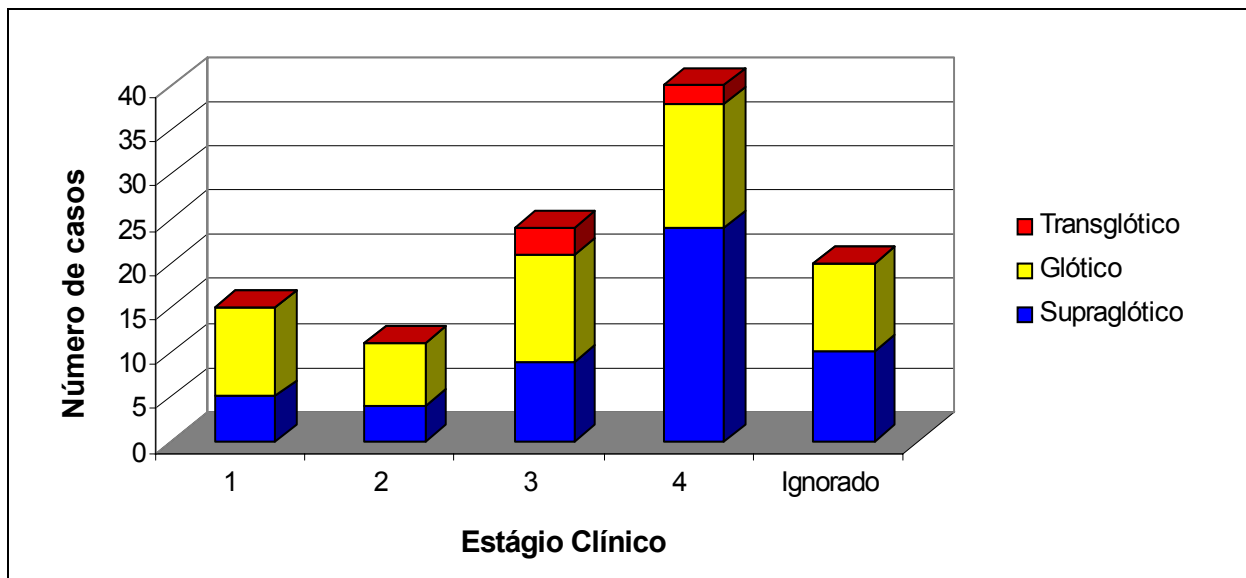


FIGURA 17 – Distribuição dos casos de carcinomas de laringe (n=110) com relação à topografia da lesão e estágio clínico, avaliado com base no estadiamento TNM.

#### V.2.1.4 - Histopatologia

Histologicamente os tumores de laringe estudados foram carcinomas espinocelulares, graduados conforme se segue: 37/110 casos (33,6%) grau I, 45/110 casos (40,9%) grau II e 28/110 casos (25,5%) grau III (Figura 18). A presença de metástases em nódulos linfáticos correlacionou-se com o tamanho do tumor e grau histológico ( $p=0,0048$  e  $p=0,0041$ , respectivamente), ou seja, carcinomas pouco diferenciados a anaplásicos (grau III) exibiram mais frequentemente metástases em nódulos linfáticos quando comparados a carcinomas bem diferenciados (grau I) ( $p=0,0010$ ; OR=7,35, IC: 1,85-31,04).

Conforme demonstrado na tabela 8, houve correlação importante entre grau histológico e topografia da lesão ( $p=0,0013$ ): carcinomas glóticos frequentemente exibiram boa diferenciação celular, enquanto tumores supraglóticos apresentavam grau histológico mais elevado. Evidenciando a associação entre topografia da lesão e severidade da doença, tumores glóticos apresentaram menor taxa de comprometimento de nódulos linfáticos pela neoplasia quando comparados aos tumores supraglóticos.

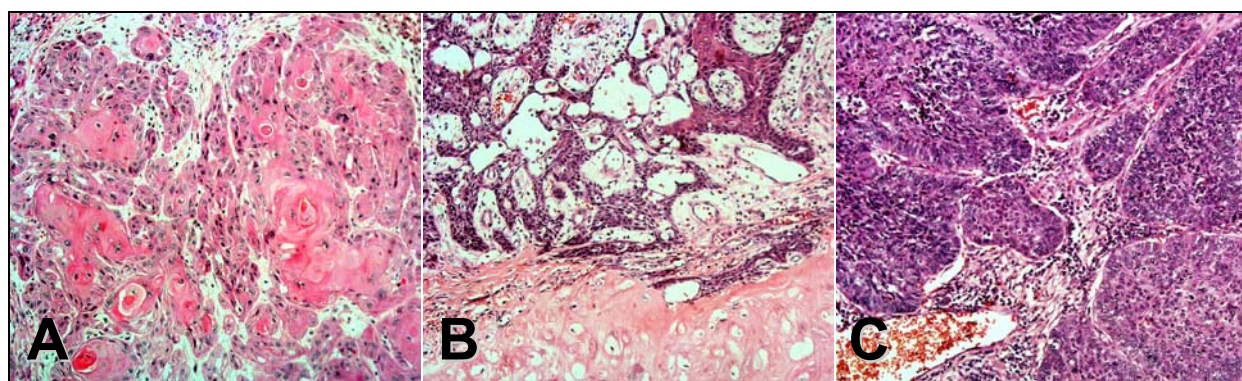


FIGURA 18 – Graduação dos casos estudados de carcinomas espinocelulares de laringe. A - Grau I (carcinoma bem diferenciado; 200x); B - Grau II (carcinoma moderadamente diferenciado; 100x); C – Grau III (carcinoma pouco diferenciado; 200x)

TABELA 8 – Distribuição dos carcinomas de laringe estudados segundo topografia do tumor primário, grau histológico e número de nódulos linfáticos com metástases (N+)

TOPOGRAFIA (N)	GRAU I (%)	GRAU II (%)	GRAU III (%)	N+ (%)
Supraglóticos (52)	9 (17,3%)	27 (51,9%) <sup>§</sup>	16 (30,8%) <sup>†</sup>	22 (42,3%)*
Glóticos (53)	27 (50,9%) <sup>†§</sup>	15 (28,3%)	11 (28,8%)	13 (24,5%)*
Transglóticos (5)	1 (20,0%)	3 (60,0%)	1 (20,0%)	2 (40,0%)
<b>Total (110)</b>	<b>37 (36,6%)</b>	<b>45 (40,9%)</b>	<b>28 (25,5%)</b>	<b>37 (33,6%)</b>

<sup>†</sup>p = 0,0232 (OR=2,82, IC: 1,05-7,71); <sup>†</sup>p < 0,0063 (OR=0,23, IC: 0,07-0,76); <sup>§</sup>p<0,0005 (OR=0,19, IC: 0,06-0,55)

### V.2.2 - Infecção pelo EBV e HPV

Através da HIS com sonda dirigida ao transcrito viral EBER-1 não foram identificados casos de carcinoma de laringe cujas células neoplásicas apresentavam o EBV. Através dos métodos baseados em PCR, previamente apresentados, infecção por HPV foi detectada em 41/110 (37,3%) dos casos. Dentre os casos HPV-positivos, 15/41 (36,6%) revelaram infecção por HPV-16 e 18/41 (43,9%) revelaram infecção por HPV-18; não foi observada infecção pelos genótipos pesquisados de baixo grau (6 e 11), e em 8/41 (19,5%) casos a determinação do genótipo viral foi inconclusiva (Figura 19).

Maior taxa de infecção viral foi observada nos carcinomas glóticos (24/53, 45,3%) em relação aos carcinomas supraglóticos (14/52, 26,9%) ( $p=0,0274$ ;  $OR=0,39$ ,  $IC: 0,16-0,98$ ). Entretanto, não foram observadas associações entre infecção por HPV e grau histológico da neoplasia, tamanho do tumor (parâmetro T do estadiamento TNM), comprometimento neoplásico de nódulos linfáticos, estágio clínico da doença ou tabagismo. Do mesmo modo, frequências de infecção pelos HPV 16 e 18 nas topografias avaliadas se mostraram equivalentes.

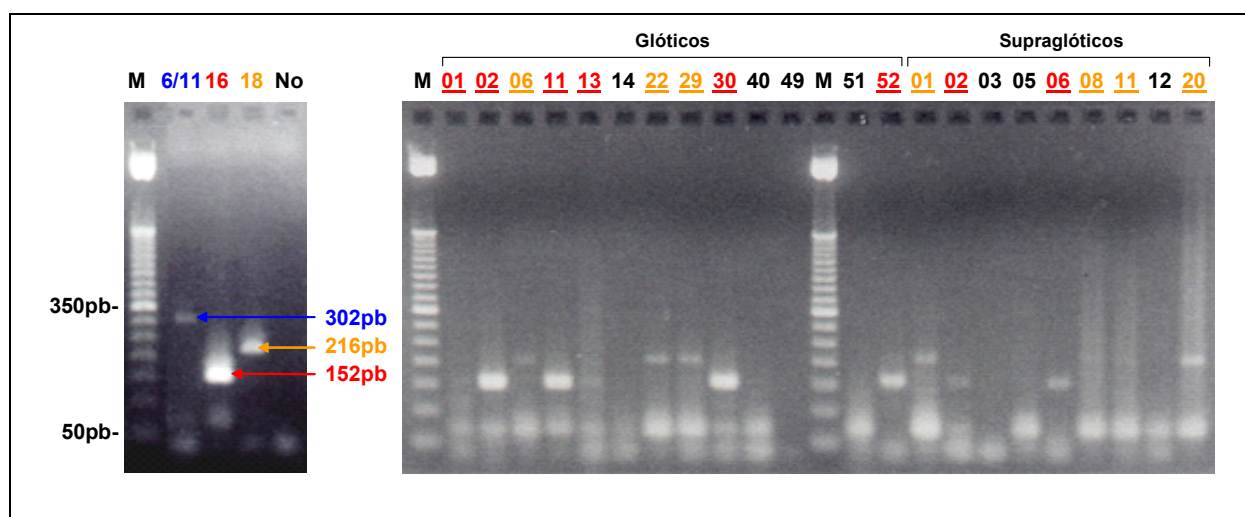


FIGURA 19 – Genotipagem do HPV por PCR *multiplex*, com emprego de iniciadores específicos para os tipos 6/11, 16 e 18. À esquerda, controles da reação: HPV-6/11 – amostra de DNA extraído de condiloma acuminado (302pb); HPV-16 – DNA extraído de linhagem celular CaSki (152pb); HPV-18 – DNA extraído de linhagem celular HeLa (216pb); No – controle negativo (sem DNA). À direita, avaliação de amostras de carcinoma de laringe glóticos e supraglóticos. Amostras HPV-positivas estão destacadas.

### V.2.3 - Expressão de p53 e Ki-67: proliferação celular e suas correlações

A maior parte dos tumores de laringe avaliados (86/110 casos; 78,2%) apresentou acúmulo de p53 detectável à IHQ (Figura 20); em 5/110 casos (4,5%) a marcação limitou-se a células basais, e 19/110 casos (17,3%) foram negativos. Não foram observadas diferenças na expressão de p53 com relação ao estágio clínico, topografia da lesão, grau histológico, tamanho do tumor, infecção por HPV ou presença de metástases em nódulos linfáticos.

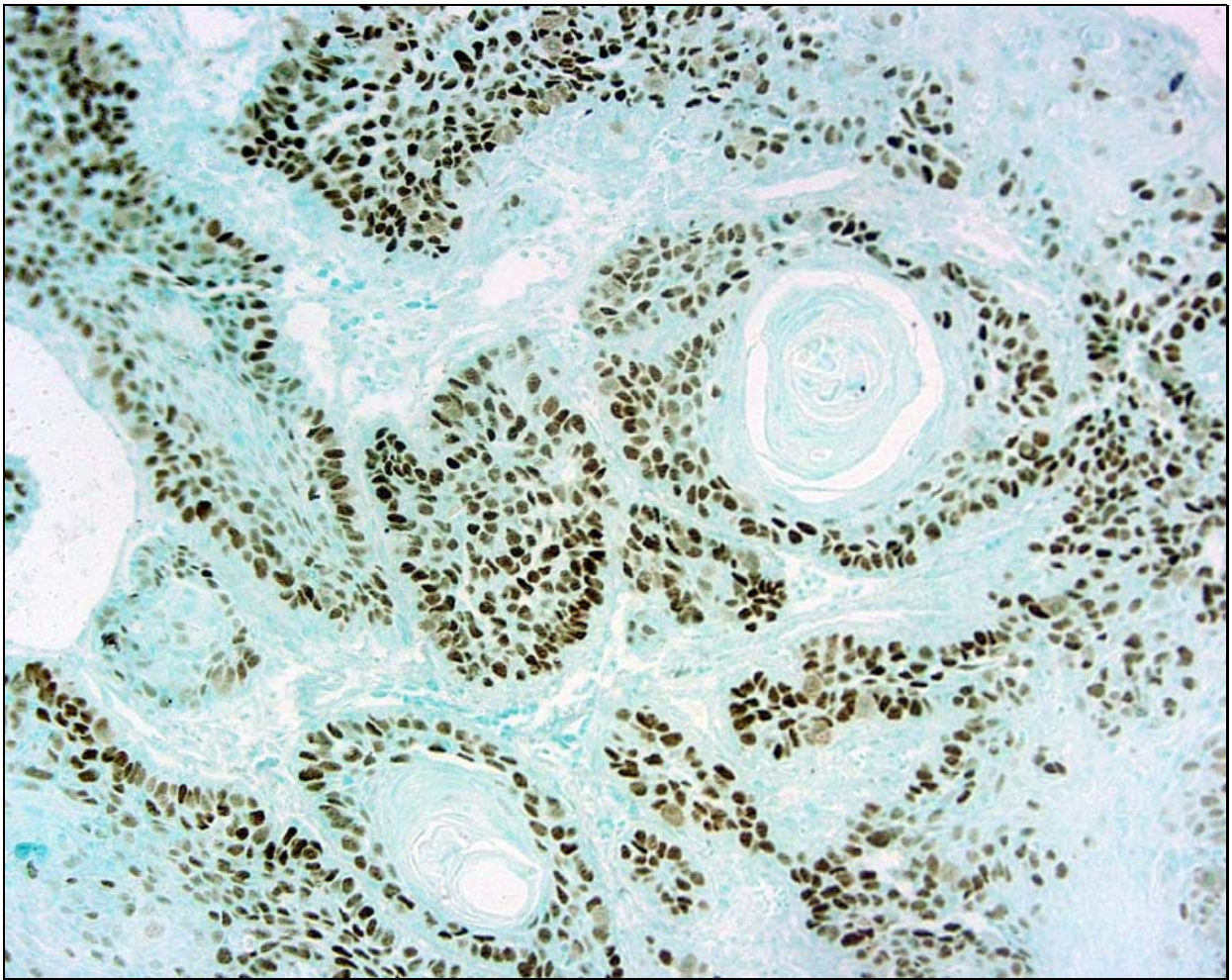


FIGURA 20 – Carcinoma espinocelular bem diferenciado de laringe revelando marcação imunoistoquímica para acúmulo nuclear do produto do gene supressor tumoral *TP53* nas células neoplásicas (Aumento de 100x; contra coloração com verde de metila).

Através de marcação imunoistoquímica do antígeno Ki-67 (Figura 21) e análise semi-automatizada de imagem, foi possível estimar o IPC para 104 dos 110 casos (94,5%) de carcinomas de laringe estudados. Foi observada relação entre marcação de p53 e proliferação celular, uma vez que tumores p53-positivos apresentaram IPCs mais elevados quando comparados a tumores p53-negativos ( $p=0,0375$ ).

A taxa de proliferação celular correlacionou-se também com o grau histológico do tumor: Neoplasias bem diferenciadas apresentaram IPCs menores que neoplasias moderadamente diferenciadas ( $p=0,0237$ ) ou pouco diferenciadas/anaplásicas (Figura 22). Não foram observadas diferenças significativas no IPC ao se agrupar os casos estuda-

dos de carcinomas de laringe segundo topografia da lesão, estágio clínico, tabagismo, tamanho do tumor, presença de metástases em nódulos linfáticos ou infecção por HPV. Contudo, dentre os casos HPV-positivos foi observada tendência ( $p=0,0866$ ) de que carcinomas com infecção por HPV-16 apresentassem IPC maior que aqueles com HPV-18 (Figura 23).

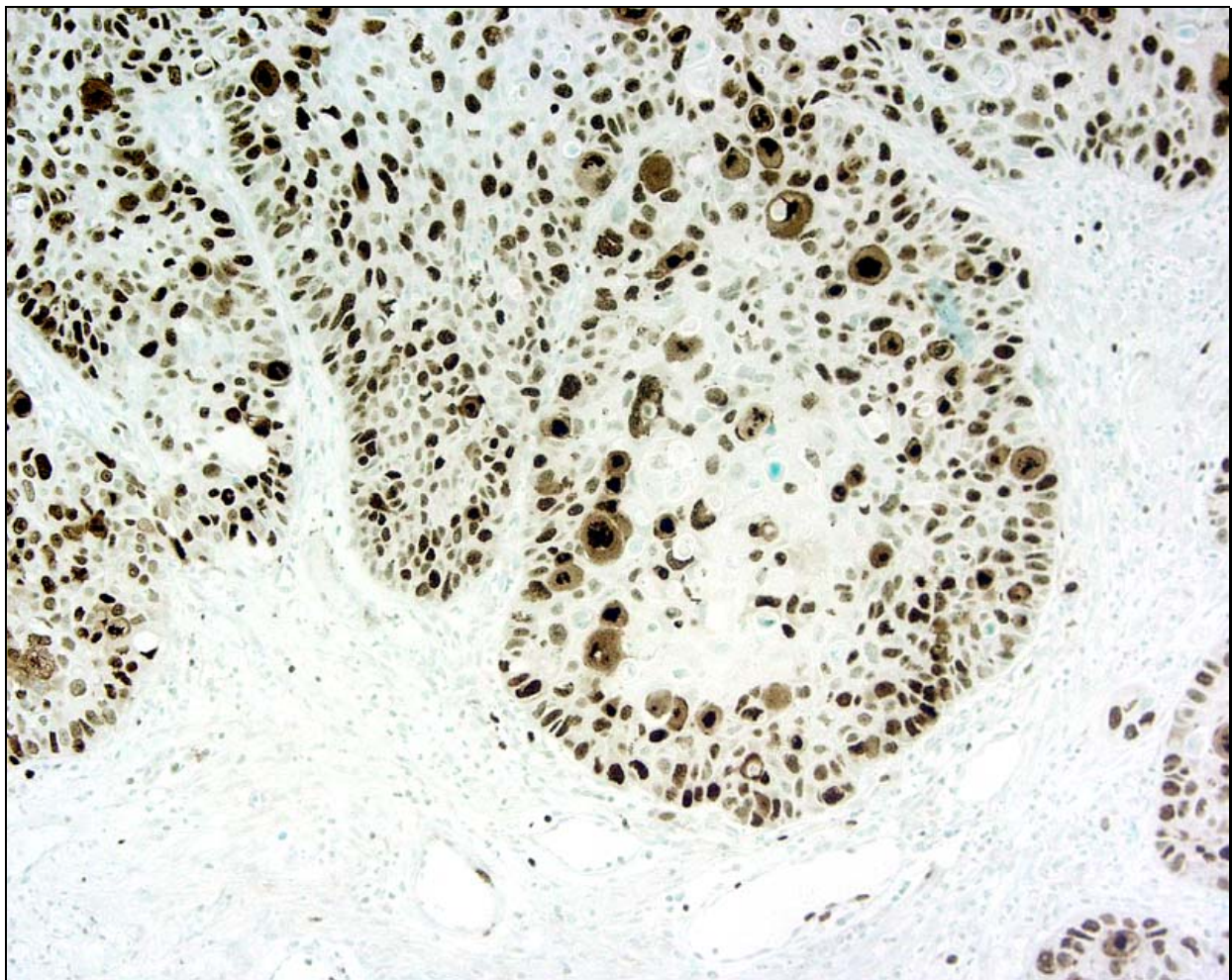


FIGURA 21 – Carcinoma moderadamente diferenciado de laringe exibindo elevada expressão nuclear do antígeno de proliferação celular Ki-67, avaliada através de imunohistoquímica com anticorpo monoclonal MIB-1 (contracoloração com verde de metila; aumento 200x).

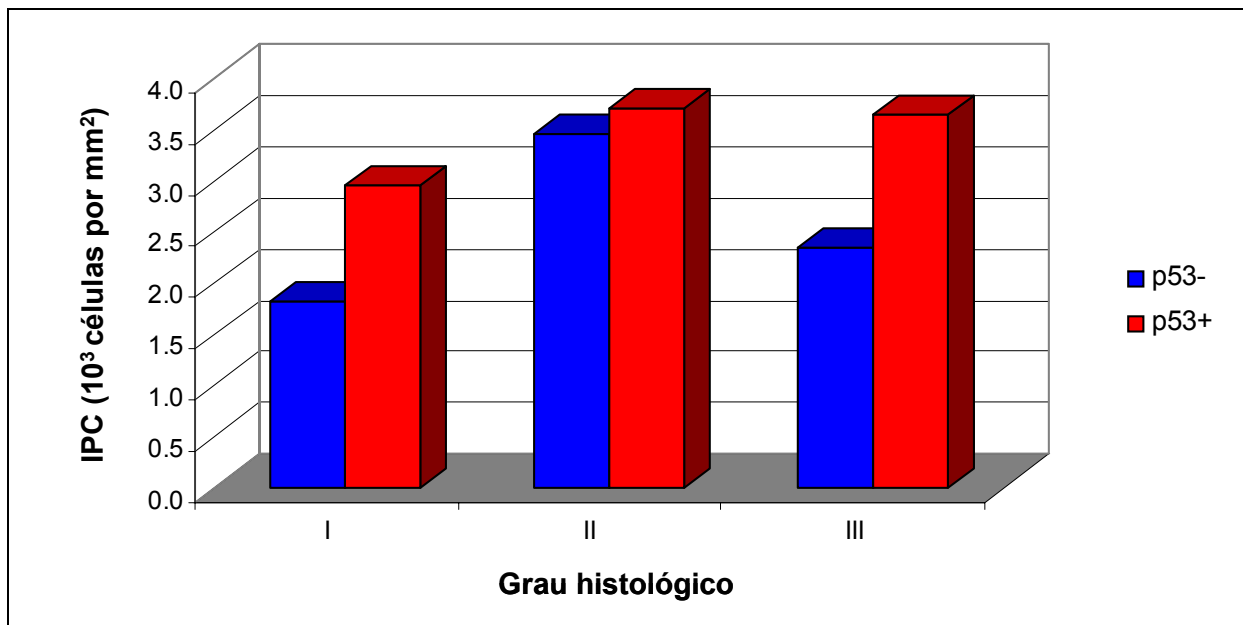


FIGURA 22 – Índice de proliferação celular (IPC) segundo grau histológico e acúmulo de p53 em 104 casos de carcinomas de laringe

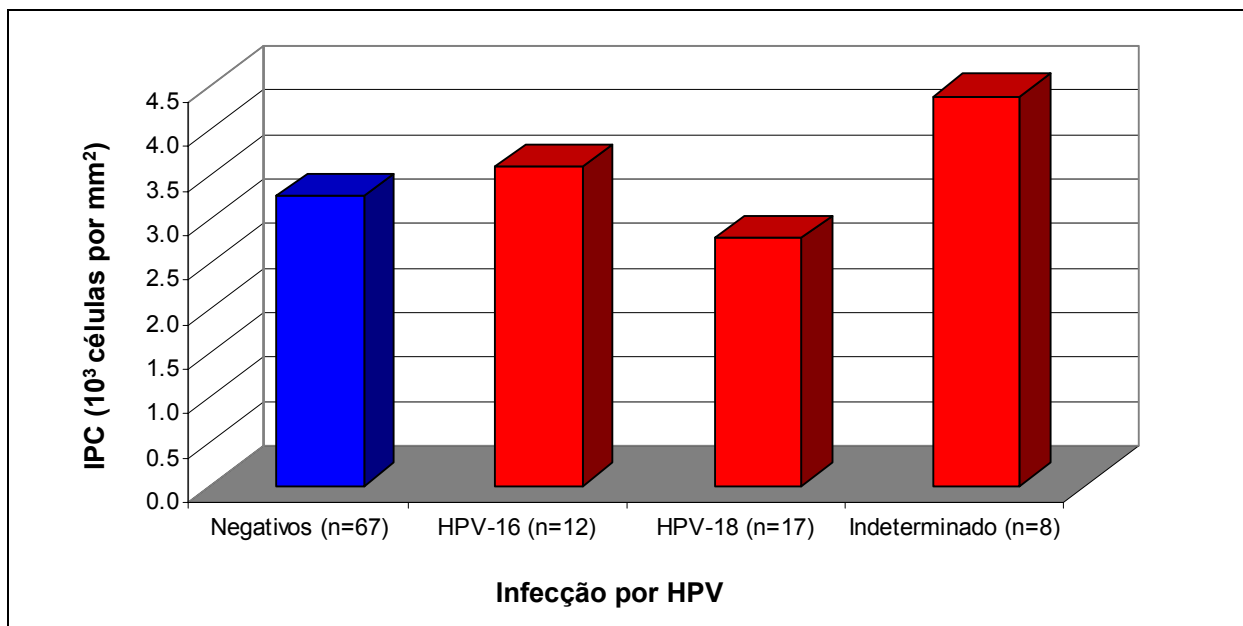


FIGURA 23 – Índice de proliferação celular (IPC) avaliado segundo infecção por HPV em 104 casos de carcinomas de laringe.

## VI - DISCUSSÃO

---

## VI.1 - Carcinomas de Nasofaringe

Carcinomas e linfomas, nessa ordem, são as neoplasias malignas mais frequentes em nasofaringe. Os sintomas decorrentes de crescimento tumoral nesse sítio anatómico são tardios, e em geral conseqüentes à invasão de estruturas adjacentes ou mesmo através das metástases. As neoplasias malignas tendem a se disseminar através da parede lateral da nasofaringe, podendo ocasionar complicações sérias como ruptura ou trombose de artéria carótida, trombose de seios cavernosos e aumento de pressão intracraniana por comprometimento neoplásico do sistema nervoso central. Embora esses tumores apresentem boa resposta à radioterapia, essa abordagem terapêutica apresenta sucesso limitado na erradicação da doença (MARKS, PHILIPS & MENK, 1998).

Carcinomas de nasofaringe acometem predominantemente adultos jovens e, mesmo quando apresentam pequenas dimensões, o envolvimento de nódulos linfáticos é achado freqüentemente da doença. Homens são mais atingidos que mulheres em proporções de 2 a 4:1. Sua distribuição geográfica (notadamente carcinomas indiferenciados) é característica, sendo que carcinomas de nasofaringe são responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade em regiões da China, Norte da África, Filipinas e Malásia, e em menores taxas no Caribe, África Central e Arábia Saudita (CVITKOVIC, BACHOUCHI & ARMAND 1991). Infelizmente, não há informações sobre achados epidemiológicos do carcinoma de nasofaringe em população brasileira.

De acordo com o padrão histológico predominante, a classificação de carcinomas de nasofaringe da OMS reconhece três entidades distintas: OMS-1 - carcinoma de células escamosas, cujo grau histológico pode variar desde neoplasias bem diferenciadas

---

---

a neoplasias pouco diferenciadas; OMS-2 - carcinoma não-queratinizante, que possui escassos indícios de diferenciação escamosa à microscopia óptica; e OMS-3 - carcinoma indiferenciado de nasofaringe, que representa a maior parcela dos casos em população menor de 20 anos e cujo exame microscópico revela limites imprecisos entre componentes do estroma e células neoplásicas.

Casos de carcinomas indiferenciados nos quais o tumor exhibe rico infiltrado linfocitário são comumente denominados linfoepiteliomas, ou carcinoma indiferenciado linfoepitelioma-*like*. O diagnóstico histopatológico seguro dessas lesões freqüentemente requer estudo imunoistoquímico para se estabelecer diagnóstico diferencial com linfomas não-Hodgkin. Menos de 5% das neoplasias epiteliais em nasofaringe representam outros tumores epiteliais, como adenocarcinomas e carcinoma adenóide cístico.

A freqüência dos tipos histológicos do carcinoma de nasofaringe difere significativamente conforme grupo étnico e origem do paciente. Em trabalho publicado em 1998, foram estudados retrospectivamente 5.069 casos de carcinomas de nasofaringe obtidos junto à *National Cancer Data Base* (NCDB), nos EUA. Os autores verificaram alta prevalência de carcinomas indiferenciados em Chineses nascidos em Hong Kong, Taiwan e Macau (63%), além de japoneses, independente do local de nascimento (45%). Nesses grupos, carcinomas escamosos (OMS-1) representaram 37% e 32% dos casos, respectivamente. A situação é oposta, entretanto, em indivíduos de etnia hispânica e afro-americanos nascidos nos EUA (aproximadamente 23% OMS-3 e 69% OMS-1), americanos brancos não hispânicos (15% OMS-3 e 78% OMS-1) e hispânicos nascidos no México (11% OMS-3 e 83% OMS-1) (MARKS, PHILIPS & MENCK, 1998).

Embora as formas histológicas do carcinoma de nasofaringe acima indicadas sejam amplamente reconhecidas na literatura, PATHMANATHAN e colaboradores (1995)

---

---

propõem que elas representam variantes morfológicas de doença invariavelmente associada à infecção pelo EBV. Segundo os autores, essa hipótese é fortalecida pela demonstração de clonalidade das células EBV-positivas nos carcinomas OMS-1, além da observação de padrão semelhante de expressão dos produtos virais nas três formas do carcinoma de nasofaringe. Entretanto, a baixa frequência de infecção pelo EBV em carcinomas OMS-1 contrastada à forte associação do vírus com carcinomas OMS-3 sugere mecanismos patogênicos distintos para os diferentes tipos histológicos do carcinoma de nasofaringe.

Dentre os fatores de risco para desenvolvimento do carcinoma de nasofaringe estão etnia, fatores ambientais, constituintes da dieta e infecção pelo EBV. Dados da literatura sugerem associação universal do EBV com carcinomas OMS-3, embora indivíduos de etnia asiática apresentem predisposição genética à doença, que pode ser triada através da expressão de determinados antígenos do CPH (GOLDENBERG et al, 2001). BURT e colaboradores (1996) indicaram relação entre determinados haplótipos do CPH e aumento do risco (e.g, HLA-A28 e HLA-B8) ou risco diminuído (e.g, HLA-A11) para o desenvolvimento da doença em indivíduos caucasianos.

Neste estudo, observamos infecção pelo EBV em 52% dos carcinomas de nasofaringe, frequência inferior à relatada em outros trabalhos na literatura (PEARSON, 1993). Duas estratégias distintas foram empregadas para detecção do vírus: HIS não isotópica, dirigida ao transcrito EBER-1, e amplificação por PCR de segmento do gene viral BNLF-1. Embora tenham apresentado resultados semelhantes, através da PCR 3/12 casos EBER-negativos revelaram amplificação de BNLF-1; por outro lado, 2/13 casos EBER-positivos não exibiram banda compatível com presença desse segmento do genoma viral.

---

---

Ambas as situações encontram justificativas vinculadas às peculiaridades das técnicas utilizadas. Em geral, a PCR é mais sensível que a HIS, mas não deve ser empregada como técnica exclusiva para pesquisa do EBV em tumores por gerar resultados falso-positivos em virtude de amplificação de segmento do genoma viral em linfócitos não-neoplásicos presentes no tecido e latentemente infectados. Estima-se a existência de 1-50 linfócitos B infectados pelo EBV a cada  $10^6$  células circulantes em indivíduos adultos normais, número que permanece estável com o passar dos anos (BABCOCK et al, 1998). Por outro lado, casos negativos à PCR, mas que apresentaram marcação para o transcrito EBER-1 na HIS podem ser ocasionados por alterações (e.g., mutações de ponto, inserções e deleções) nos sítios de ligação dos iniciadores empregados, bem como baixa quantidade de alvos intactos no DNA usado como amostra.

A interpretação dos resultados obtidos tem como obstáculo maior a inexistência de trabalhos na literatura sobre infecção do EBV em carcinomas de nasofaringe em indivíduos brasileiros. Embora seja assumido que o EBV está presente em 100% dos carcinomas indiferenciados, essa assertiva é desfavorecida pelos resultados aqui apresentados. A validação desses dados requer estudo em maior número de casos de carcinomas OMS-3 em população brasileira, o que permitiria corroborar ou não a inexistência do componente étnico influenciando o desenvolvimento da doença.

Perda de heterozigossidade e mutações em *TP53* estão entre as alterações genéticas freqüentemente descritas nos carcinomas de nasofaringe (VAN TORNOUT et al, 1997). Contudo, a maioria dos casos revela manutenção da integridade desse gene supressor tumoral. As alterações parecem estar associadas aos processos de invasão

---

---

e metástase e/ou podem ser induzidas pelo tratamento radioterápico (KWOK-WAI, DOLLY & JOESPH, 1997).

Mesmo na ausência de alterações em *TP53*, tumores primários de nasofaringe freqüentemente exibem acúmulo da proteína nas células neoplásicas, fenômeno que parece se associar à infecção pelo EBV (GULLEY, BURTON & ALLRED, 1998; MURONO et al, 1999; NIEDOBITEK et al, 1993). Embora possa ser especulado que a expressão aumentada de *TP53* represente resposta celular à infecção viral, alguns estudos sugerem mecanismo epigenético de disfunção do gene graças à ação direta ou indireta de proteínas virais sobre a p53. Nesse sentido, um potencial candidato é o produto do gene BZLF1 do EBV, capaz de se ligar e inativar p53 *in vitro* (ZHANG, GUTSCH & KENNEY, 1994).

Em trabalho recentemente publicado, SHI e colaboradores (2002) estudaram a expressão de p53 e p21, densidade vascular, infecção por EBV e taxa de apoptose em 87 carcinomas de nasofaringe, 66 dos quais indiferenciados (75,9%). Os autores observaram infecção por EBV em 75% dos carcinomas de nasofaringe, sendo mais freqüente em pacientes de etnia asiática. Acúmulo de p53 nas células tumorais foi encontrado em 39% dos casos, correlacionando-se positivamente com presença de EBV e elevada vascularização do tumor. Carcinomas EBV-positivos apresentaram ainda maiores taxas de sobrevivência em 5 anos em comparação a carcinomas EBV-negativos (76% e 48%, respectivamente).

Nossos resultados demonstraram acúmulo do produto de *TP53* em praticamente todos os casos de carcinomas de nasofaringe estudados. Entretanto, embora seja assumido que esse evento está vinculado à expressão de proteína anômala, não pode ser descartada a possibilidade de expressão de p53 selvagem, uma vez que o anticor-

---

---

po empregado é capaz de se ligar a ambos os produtos. A ubiquidade da disfunção de *TP53* pode explicar as maiores taxas de proliferação celular observadas nos carcinomas de nasofaringe em comparação aos carcinomas de laringe estudados. Nossos dados não permitiram distinguir níveis significativamente distintos de proliferação celular entre carcinomas EBER-negativos e carcinomas EBER-positivos.

A presença da deleção de 30pb na porção terminal do gene BNLF-1 do EBV também parece não influenciar a proliferação celular nos tumores. Um possível papel dessa alteração na patogênese de neoplasias associadas à infecção pelo EBV é suspeitada pela participação da proteína LMP-1 na transdução de sinais mediada pelas mesmas moléculas que propagam o estímulo ocasionado pela ativação de receptores da família do receptor para TNF. A sinalização pelas vias NF- $\kappa$ B, JNK, p38/MAP-quinases e JAK/STAT pode ser efetivamente deflagrada *in vitro* pela porção carboxi-terminal da LMP-1; assim, mutações que comprometem essa região da proteína poderiam contribuir para sua maior ou menor eficiência na transformação celular (FIELDING et al, 2001; FISHER et al, 1999; KNECHT et al, 1993; KNECHT et al, 1995).

Em 1997, ROTHENBERGER e colaboradores demonstraram que a deleção de 30pb do gene BNLF-1 codifica variante da LMP-1 que mantém a propriedade de induzir transcrição mediada por NF- $\kappa$ B. Trabalhos publicados por grupo de pesquisadores da Universidade de Kanazawa, Japão, demonstraram que a LMP-1 é capaz de favorecer a invasão tumoral e metástases através do estímulo à produção de metaloproteinases (HORIKAWA et al, 2000), propriedade também conferida por domínios na porção carboxi-terminal da proteína (TAKESHITA et al, 1999). Tomados em conjunto, esses dados enriquecem a perspectiva de alterações LMP-1 apresentarem valor prognóstico e/ou preditivo nos tumores associados ao EBV. Entretanto, nossos dados desfavore-

---

---

cem essa hipótese, ao menos com relação aos carcinomas de nasofaringe, e estão em consonância com estudos que sugerem que a frequência da deleção de 30pb no gene BNLF-1 do EBV em células neoplásicas provavelmente reflete a frequência dessa deleção na população em geral numa dada localização geográfica (CHEN et al, 1996; HAYASHI et al, 1997; JOHNSON et al, 1998; KHAMIN et al, 1996).

Presença do HPV foi verificada em apenas um caso de carcinoma de nasofaringe, que revelou co-infecção por genótipos virais de alto grau (HPVs 16 e 18). Detecção do HPV em carcinomas de nasofaringe também é relatada por HORDING e colaboradores (1994), e co-infecção HPV/EBV nesses tumores é relatada em outros trabalhos (RASSEKH et al, 1998). Efeito sinérgico da infecção por múltiplos microorganismos na patogênese de neoplasias malignas tem sido sugerido, sendo que em cérvix uterina já havia sido indicado possível papel do EBV no favorecimento dos efeitos oncogênicos do HPV (LANDERS et al, 1993), hipótese questionada posteriormente (ELGUI DE OLIVEIRA et al, 1999). Não sendo usual a infecção da nasofaringe pelo HPV, sua participação na transformação celular nessa topografia provavelmente representa achado fortuito, respondendo por número pouco expressivo dos casos de carcinomas nasofaringe.

Embora seja forte a associação entre infecção pelo EBV e desenvolvimento do carcinoma de nasofaringe, a dificuldade de detecção do vírus em amostras de mucosa normal dificulta o entendimento do papel do EBV no desenvolvimento desses tumores (NEIDOBITEK, 2000). A habilidade de o vírus infectar epitélios é conhecida, justificando as hipóteses de associação do EBV com desenvolvimento de carcinomas em diferentes topografias. Contudo, ainda não está claro em que momento ocorreria a infecção

---

---

das células epiteliais que culminaria com o desenvolvimento do carcinoma de nasofaringe.

## **VI.2 - Carcinomas de Laringe**

Carcinomas de laringe representam 2,2% de todos os cânceres em homens e cerca de 0,4% dos cânceres em mulheres. De acordo com o sítio anatômico de origem, os tumores de laringe são divididos em quatro grupos: glóticos (60-65% dos casos), supraglóticos (30-35%), transglóticos e infraglóticos (menos de 10% dos casos). A distribuição heterogênea de vasos linfáticos nessas topografias (escassos na região glótica e em maior número nas regiões supra e infraglóticas), influencia no padrão de disseminação dos carcinomas laríngeos, e conseqüentemente prognósticos mais ou menos favoráveis. Em estudo retrospectivo publicado em 2000, KOWALSKI e CARVALHO observaram sobrevida nula em cinco anos para 93 pacientes brasileiros com carcinoma de laringe não tratado, evidenciando a alta agressividade da doença. Indivíduos com carcinoma de laringe possuem ainda risco aumentado para o desenvolvimento de outros carcinomas em trato aéreo superior e pulmões.

Tabagismo e etilismo são fatores de risco independentes para o desenvolvimento de carcinoma laríngeo e contribuem para o aparecimento das lesões de maneira dose-dependente (KOUFMAN & BURKE, 1997; MAIER & TISCH, 1997; RAITIOLA & PUKANDER, 1997). A coexistência desses hábitos provavelmente potencializa o processo carcinogênico em trato aerodigestivo superior. Além de possuírem características epidemiológicas distintas, carcinomas laríngeos de pacientes não-tabagistas/não-etilistas apresentam melhor curso clínico. Em estudo retrospectivo avaliando 933 casos de carcinomas laríngeos diagnosticados entre 1984 e 1993, AGUDELO e colaborado-

---

---

res (1997) observaram que pacientes não-fumantes/não-etilistas (3,3% da casuística) desenvolveram lesão mais tardiamente quando comparados ao grupo de tabagistas/etilistas. Os tumores eram predominantemente glóticos, o que favorece o diagnóstico precoce e justifica as altas taxas de sobrevida apresentadas por esses pacientes. No presente estudo, menor agressividade biológica de tumores glóticos foi demonstrada pela predominância de carcinomas com menor grau histológico nesse grupo, bem como menor frequência de comprometimento metastático de nódulos linfáticos.

A alta incidência de carcinoma escamoso entre pacientes com papilomatose laríngea recorrente levou alguns autores a sugerir que neoplasias malignas de laringe se desenvolvem por mecanismos análogos aos propostos para colo uterino. Isso justifica a pesquisa do HPV em carcinomas de cabeça e pescoço e suas lesões precursoras. NISHIOKA e colaboradores observaram aumento da incidência de HPV-16/HPV-18 em cânceres de laringe, cavidade e seios nasais, faringe e cavidade oral, em relação a lesões não-neoplásicas (OR=4,32;  $p < 0,05$ ) (NISHIOKA et al, 1999). POU e colaboradores (1995) sugerem que a presença de HPV em papilomas *per se* indica risco aumentado para o desenvolvimento do carcinoma laríngeo e a co-infecção por outros vírus (e.g., HSV, EBV ou CMV) está associada a curso mais agressivo da doença. Em hiperplasias, queratoses e displasias em laringe – indicadores precisos de agressão da mucosa – o HPV foi encontrado em até 14% dos casos. Esses trabalhos fortalecem a hipótese do HPV também representar fator de risco para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço; alguns autores sugerem que isso é particularmente verdade para pacientes não-fumantes (FOURET et al, 1997).

Nos carcinomas de laringe do presente estudo a infecção por HPV, exclusivamente por genótipos de alto grau, foi observada em 37,3% dos casos. Esta frequência al-

---

---

cança 45,3% quando considerados somente tumores glóticos. Estudos indicando alta ou baixa incidência de infecção pelo HPV em tecido normal, lesões pré-malignas e malignas de laringe são encontrados em freqüências equivalentes (Tabela 9). Embora aparentemente contraditórios, esses resultados podem ser parcialmente explicados por diferenças metodológicas. Taxas elevadas de infecção pelo HPV têm sido relatadas no carcinoma verrucoso, variante morfológica do carcinoma espinocelular de laringe que possui características anátomo-clínicas próprias (FLISS et al, 1994; HAIGEN, LYONS & HAINDEL, 1993). O DNA viral também já foi detectado no sangue periférico de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, incluindo tumores de laringe (CAPONE et al, 2000). Há de se ressaltar que a existência de vários fatores de risco na patogênese de neoplasias em trato aéreo superior indica mecanismo carcinogênico complexo. Em ensaios *in vitro*, por exemplo, a transformação maligna eficaz de células de epitélio laríngeo é possível em modelo experimental de carcinogênese em múltiplos estágios com emprego combinado do HPV-16 e N-metil-N'-nitro-N nitrosoguanidina, carcinógeno químico derivado do tabaco (TSUTSUMI, IWATAKE & SUZUKI, 1996).

Importante notar a predominância de infecção por HPV observada em carcinomas glóticos em comparação às demais topografias. Explicação para esse fenômeno pode ser aventada com base na histologia normal da laringe. No recém-nascido, o revestimento laríngeo é constituído por epitélio pseudo-estratificado ciliado (epitélio do tipo respiratório), exceção feita às cordas vocais, que são revestidas por epitélio pavimentoso estratificado. Em adultos não-tabagistas, as porções supraglóticas e subglóticas são revestidas por mosaico de tecido pavimentoso estratificado e epitélio respiratório; contudo, em tabagistas todo o epitélio respiratório da laringe é substituído por epitélio

---

---

pavimentoso estratificado, fenômeno denominado metaplasia escamosa, que pode se estender até porções da traquéia (MILLS, GAFFEY & FRIERSON, 1997).

Conforme discutido no item II.3, a infecção pelo HPV é mais eficiente nos epitélios estratificados; assim, a porção glótica da laringe, incluindo cordas vocais, são mais suscetíveis ao vírus. Essa observação encontra suporte na ocorrência mais freqüente de papilomas e lesões verrucosas associadas ao HPV nessas regiões, que conseqüentemente são mais vulneráveis à sua ação oncogênica e eventualmente desenvolvimento do carcinomas glóticos. Outra conseqüência dessa especulação está vinculada à metaplasia escamosa observada em pacientes tabagistas: à semelhança do que ocorre em cérvix, essas áreas representam focos de ativa proliferação celular e sob agressão crônica (influência da infecção viral e exposição do tecido aos constituintes do cigarro), podem apresentar prejuízo da diferenciação celular (com ocorrência de displasia), favorecendo a transformação maligna.

Dentre os casos HPV-positivos encontrados, surpreende a elevada freqüência de carcinomas laríngeos portadores de HPV-18. Não foram encontrados relatos semelhantes na literatura, de modo que essa informação deve ser interpretada com cautela. Curiosamente, esses casos parecem se comportar de maneira distinta quanto à proliferação celular se comparados aos carcinomas laríngeos portadores de HPV-16, dado compatível com o conhecimento atual sobre o potencial oncogênico desses dois genótipos virais. A confirmação desse dado requer avaliação de número maior de casos de carcinomas de laringe HPV-positivos, a fim de se verificar diferença estatisticamente significativa na proliferação celular conforme genótipo viral presente na célula neoplásica.

---

TABELA 9 – Associação do HPV com desenvolvimento de carcinomas de cabeça e pescoço e lesões precursoras avaliada por diferentes estudos na literatura.

ESTUDO	CASUÍSTICA*	MÉTODO(S) <sup>§</sup>	RESULTADO
BADARACCO et al., 2000 (Itália)	38 CEC oral, 4 CEC tonsila, 2 CEC farínge, 22 CEC laringe	PCR, RFLP	HPV positivos: 26,3% CEC oral, 50% CEC tonsila, 50% CEC faringe, 50% CEC laringe (27,3% HPV 16)
PINTOS et al, 1999 (Canadá)	101 CEC oral, faringe e laringe	PCR, SB	16,8% HPV positivos (10,3% CEC oral, 30,0% CEC faringe e 15,4% laringe)
GARCÍA-MILIÁN et al, 1998 (Cuba)	33 CEC laringe, 29 PL; 25 N	PCR, SB	N: 12,0% HPV-6, 4,0% HPV-6/16; PL: 55,2% HPV-6, 17,2% HPV-11, 10,3% HPV-6/11; CEC laringe: 3,0% HPV-6, 42,4% HPV-16, 3,0% HPV-16/18
MATZOW et al, 1998 (Noruega)	32 CEC oral, 13 CEC laringe	PCR	HPV-positivos: 3,1% CEC oral, 23,1% CEC laringe
MIGUEL et al, 1998 (Brasil)	45 CEC	PCR, DB	HPV positivos: 11,1% (1 caso base de língua, 3 tonsila, 1 seio piriforme).
SOTO et al, 1998 (Cuba)	40 CEC laringe (20 glóticos, 20 supraglóticos)	NESTED-PCR	HPV-16 positivos: 50% (20% glóticos, 30% supraglóticos).
POLJAK et al, 1997 (Eslovênia)	58 HP; 30 CEC laringe.	PCR, RFLP, HIS PCR-ELISA,	HP: 1,7% HPV-6; CEC: 3,3% HPV-16 (negativo à HIS)
WATTS et al, 1997 (EUA)	49 CEC/CV (várias topografias).	PCR, SB	HPV positivos: 69,6% CEC cavidade oral, 66,7% CEC faringe, 44,4% CEC laringe, 33,3% PIN.

\* N: mucosa normal, HP: hiperplasias (com ou sem atipias); PL: papiloma laringeo; CEC: carcinoma espinocelular; CV: carcinoma verrucoso, PIN: papiloma invertido nasal <sup>§</sup> PCR: reação em cadeia da polimerase; SB: *Southern Blot*, DB: *Dot blot*, RFLP: polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição; HIS: hibridação *in situ*.

Não foi observada infecção pelo EBV nos 110 carcinomas de laringe avaliados. A presença do genoma do EBV é relatada nos carcinomas linfoepitelioma-*like* de glândulas salivares, palato, timo, região sinonasal, seio piriforme, esôfago e estômago. Entretanto, carcinomas linfoepitelioma-*like* em laringe são incomuns e trabalhos recentes indicam que sua associação com infecção EBV não é freqüente (DRAY et al, 1998; FERLITO, WEISS & RINALDO, 1997). Avaliando 8 casos de carcinomas linfoepitelioma-*like* de laringe e hipofaringe acumulados durante 25 anos de prática em patologia cirúrgica, MacMILLIAN e colaboradores (1996) não observaram infecção pelo EBV; adicionalmente, 7/8 (88%) apresentavam marcação imunoistoquímica para p53, 5 dos quais revelaram mutação em ponto no respectivo gene supressor tumoral.

São escassos os trabalhos sobre participação do EBV no desenvolvimento de neoplasias malignas de cabeça e pescoço excetuando-se o carcinoma de nasofaringe. Avaliando somente tecidos normais de várias topografias em trato aerodigestivo superior, LIAVAAG e colaboradores (1998) detectaram genoma de EBV em menos de 1% do total de amostras de mucosa oral (1/13), tonsila palatina (0/96), glândulas salivares (1/50), laringe (0/7), nasofaringe (0/57) e nódulos linfáticos de cabeça e pescoço (0/8). Os autores concluem que esses tecidos (epitélios, principalmente) não representam reservatório de infecção crônica pelo vírus em indivíduos sem indícios de neoplasia ou lesões pré-neoplásicas nos sítios anatômicos analisados.

Em trabalho publicado em 1993, TYAN e colaboradores avaliaram a presença do EBV e HPV em 74 amostras de cânceres de cabeça e pescoço. Os autores detectaram o genoma do EBV através da PCR em 6/10 casos (60%) de carcinoma de laringe, e apenas 1/10 (10%) dessas amostras apresentou positividade para HPV. A presença do

---

EBV também pôde ser verificada em tumores de glândulas salivares (5/5, 100%), seios paranasais (3/3, 100%), nasofaringe (30/30, 100%) cavidade oral (4/9, 44,4%), hipofaringe (8/12, 66,7%), metástases em cabeça e pescoço (4/5, 80%) e 1/11 (9,0%) espécimes de tecido normal. Por outro lado, a freqüência de HPV nesses casos foi baixa em todas as topografias mencionadas, exceto em nasofaringe (14/30, 46,7%) e hipofaringe (7/12, 58,3%).

Em relação ao possível papel do EBV na patogenia desses tumores (exceto pelos carcinomas de nasofaringe), os dados apresentados por TYAN e colaboradores merecem avaliação cautelosa, uma vez que a metodologia empregada não permite diferenciar entre infecção de células neoplásicas ou presença do EBV em infiltrado linfocitário normal ou reativo. Explicação análoga, entretanto, não pode ser empregada para esclarecer a detecção de HPV em carcinomas de nasofaringe. No trabalho supracitado, chama a atenção a alta incidência de HPV nesses tumores: note-se que as 14 amostras em que os autores observaram amplificação de seqüência do HPV representam, na verdade, casos de co-infecção EBV/HPV.

Altas taxas de mutação em *TP53* são relatadas em carcinomas de cabeça e pescoço, e freqüentemente se correlacionam com história pregressa de tabagismo e/ou etilismo (BRACHMAN et al, 1992; OLSHAN et al, 1997; SOMERS et al, 1992). Estudos empregando imunistoquímica têm demonstrado alta freqüência de expressão de p53 em lesões malignas ou precursoras do carcinoma laríngeo (CALZOLARI et al, 1997; FOURET et al, 1995; GALE et al, 1997; LAVIEILLE et al, 1995). Avaliados em conjunto, esses achados indicam que alterações em *TP53* representam evento precoce na patogenia dos tumores de cabeça e pescoço e estão associadas à progressão da doença (BOYLE et al, 1993; GANLY et al, 2000; JIN, KAYSER & KEMP, 1998; NARAYANA et

---

---

al, 1998). LOGULLO e colaboradores (1997) encontraram expressão elevada de p53 nas células neoplásicas de espécimes de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço de indivíduos brasileiros, notadamente em lesões de laringe ( $p=0,0225$ ). Este resultado está em acordo com estudos que indicam que a quantidade e qualidade das alterações em *TP53* se correlacionam com etiologia diversa de tumores com sítios anatômicos distintos (LEVINE et al, 1995), ainda que relacionados, tais como cavidade oral e laringe (KIURU et al, 1997).

A conhecida interação entre produtos do HPV e a proteína p53 estimulou a realização de trabalhos que avaliam a condição do gene *TP53* e/ou seu produto em lesões pré-malignas e malignas, HPV-positivas e HPV-negativas, de laringe. Sugere-se relação inversa entre infecção pelo HPV e níveis de p53 detectáveis nas células neoplásicas, uma vez que a expressão da oncoproteína viral E6 inviabilizaria acúmulo da p53.

Embora vários estudos tenham se fundamentado nesse importante mecanismo carcinogênético associado à infecção pelo HPV, o entendimento da real importância do vírus na patogênese dos carcinomas de laringe é prejudicado por simplificações do processo e valorização excessiva da ação isolada dos produtos virais. SUZUKI e colaboradores demonstraram que linhagem de células de epitélio laríngeo podem ser transformadas *in vitro* quando induzida expressão do gene E7 do HPV (sem participação de E6), e que as células imortalizadas apresentavam alterações em *TP53* (SUZUKI et al, 1996). Esses dados indicam transformação baseada em eventos independentes, embora concomitantes, de atividade de E7 e mutação espontânea de *TP53*, conferindo vantagem adaptativa às células transformadas e tornando-as mais propensas à expansão clonal.

---

---

LEE e colaboradores avaliaram mutações em *TP53*, perda de heterozigosidade no gene *RB* e infecção pelo HPV em carcinomas de células escamosas de trato aerodigestivo superior. Os autores não observaram relação entre infecção viral e mutações em *TP53*; alterações em *RB* também não foram freqüentes. Entretanto, casos com *TP53* mutado exibiam achados histopatológicos de maior agressividade, desfavorecendo o prognóstico e, conseqüentemente, contribuindo para menor sobrevida do paciente (LEE, YUN-WEI & CHEN, 1993). Esses resultados não são compartilhados por HARAF e colaboradores que, ao avaliar alterações em *TP53* e infecção pelo HPV em carcinomas de cabeça e pescoço, não identificaram qualquer associação significativa entre presença de mutações e prognóstico ou aspectos clínicos da doença. Todavia, casos HPV positivos apresentavam menor sobrevida dos pacientes com carcinoma tonsilar HPV-positivos, predominantemente indivíduos de raça branca, não-fumantes e não-etilistas (HARAF et al, 1996).

A avaliação da proliferação celular em neoplasias malignas correlaciona-se fortemente com o curso clínico de vários tumores, conforme anteriormente discutido. Assim como ocorre na avaliação de outros fatores prognósticos (VAN DEN BRECKEL, 2002), a interpretação adequada dos dados disponíveis na literatura sobre proliferação celular em carcinomas encontra como obstáculo o emprego de avaliações subjetivas e diferentes sistemas de quantificação da expressão de produtos relacionados ao ciclo celular.

Em carcinomas de laringe, trabalhos avaliando proliferação celular são escassos. Alguns autores indicam que a proliferação celular influencia o prognóstico (LERA et al, 1998; WELKOBORSKY et al, 1995), mas essa conclusão não é consenso na literatura (SPAFFORD et al, 1996). Embora KRECICKI e colaboradores (1998) tenham observado maior sobrevida entre pacientes cujas lesões exibiam baixa positividade para Ki-67,

---

---

os autores ressaltam que esse resultado não apresentou significado estatístico. Não houve correlação entre marcação de Ki-67 e recorrência da neoplasia, estadiamento, idade ou sexo do paciente. A presença de metástases em nódulos linfáticos constituiu o único fator com importância prognóstica nesse estudo. Em trabalho posterior (KRE-CICKI et al, 1999), os autores observaram diferença entre expressão de Ki-67 entre lesões laríngeas não-malignas e malignas, sendo que, nestas, verificou-se que índice de proliferação celular (Ki-67-positivos) tende a se correlacionar com o grau histológico ( $p=0,08$ ).

Através de análise semi-automatizada de imagem em tecidos submetidos à marcação imunistoquímica com anticorpo monoclonal contra o antígeno de proliferação celular Ki-67, verificamos correlação entre a taxa estimada de proliferação celular das células neoplásicas e outros fatores prognósticos considerados importantes em neoplasias malignas de origem epitelial, como acúmulo de p53 e grau histológico do tumor. Até onde pudemos averiguar, esse é o primeiro trabalho no qual a abordagem empregada para avaliação de proliferação celular é baseada em critérios objetivos e mensuráveis, o que permite sua reprodução e fornece parâmetro para comparação de diferentes grupos de neoplasias ou de uma mesma neoplasia avaliada em diferentes séries. Desse modo, os dados aqui apresentados representam contribuição significativa à literatura, podendo estimular estudos que vinculem abordagem semelhante de avaliação da proliferação celular em carcinomas à análise da sobrevida dos pacientes e da resposta dos tumores às estratégias terapêuticas disponíveis. Acreditamos que isso possibilitará resolver discrepâncias sobre o valor prognóstico e preditivo da proliferação celular nos carcinomas de cabeça e pescoço e, eventualmente, em neoplasias distintas em outras topografias.

---

---

Isoladamente, a pesquisa da infecção pelo HPV, de alterações na estrutura ou expressão de *TP53* e do índice de proliferação celular em carcinomas de laringe têm apresentado resultados conflitantes para o entendimento do processo carcinogênico nesse sítio anatômico. Conseqüentemente, a repercussão biológica desses fenômenos ainda não pode ser adequadamente inferida, prejudicando o estabelecimento de critérios que permitam avaliar agressividade da doença. Também é importante salientar que a ação de mais de um agente na patogênese das neoplasias malignas laringe parece ser a regra, de modo que estudos que procurem avaliar associação entre infecção viral e câncer nessa topografia não podem dissociar informações laboratoriais de dados anátomo-clínicos e epidemiológicos.

---

## VII - CONCLUSÕES

---

Com relação aos **carcinomas indiferenciados de nasofaringe (OMS-3)**, os dados apresentados neste trabalho permitem inferir que:

1. Acúmulo do produto do gene supressor tumoral *TP53* é fenômeno importante em carcinomas indiferenciados de nasofaringe, tendo sido observado em virtualmente todos os casos avaliados
2. A associação de carcinomas indiferenciados de nasofaringe com o vírus de Epstein-Barr foi de 52%, sendo mais evidente em pacientes masculinos
3. Infecção pelo HPV (4,0%) é fenômeno raro nos carcinomas indiferenciados de nasofaringe
4. Carcinomas de nasofaringe EBV-positivos e EBV-negativos comportam-se de modo semelhante quanto à taxa de proliferação celular.
5. Carcinomas de nasofaringe EBV-positivos com deleção terminal de 30pb no gene de LMP-1 não apresentam proliferação celular aumentada em relação a casos sem a deleção.

Com relação aos **carcinomas de laringe**, os dados apresentados neste trabalho permitem inferir que:

6. O EBV não está associado ao desenvolvimento de carcinomas de laringe, independentemente da topografia do tumor.
  7. Cerca de 1/3 dos casos de carcinomas de laringe na amostra de população brasileira estudada apresenta associação com o HPV, sendo esse fenômeno mais expressivo em tumores glóticos.
-

8. Acúmulo do produto do gene supressor tumoral *TP53* é fenômeno comum em carcinomas de laringe, tendo sido observado em 78,2% dos casos
  9. Carcinomas de laringe com acúmulo da proteína p53 detectável pela imunohistoquímica apresentam maiores taxas de proliferação celular que carcinomas p53-negativos
  10. A taxa de proliferação celular correlaciona-se com grau histológico, sendo que neoplasias bem diferenciadas apresentam taxas menores que neoplasias com graus mais elevados
-

# VIII - ABSTRACT

---

The upper aerodigestive tract is often injured by environment agents that play a role in malignant transformation. Nasopharyngeal carcinomas and carcinomas of the larynx are aggressive neoplasms with peculiar association with Epstein-Barr virus (EBV) and Human Papillomavirus (HPV), respectively, which are known oncogenic virus for humans. Furthermore, impairment of TP53 tumor suppressor gene activity is commonly found in human cancers.

In this study, molecular biology techniques (*In situ* hybridization and PCR) were used to assess the frequency of EBV and HPV in 25 undifferentiated nasopharyngeal carcinomas (UNC) and 110 carcinomas of larynx, as well as to evaluate the anatomic distribution of viral infection. Accumulation of TP53 product (p53 protein) in malignant cells was evaluated by immunohistochemistry. Additionally, cellular proliferation rates were estimated using monoclonal MIB-1 antibody (which recognize the Ki-67 antigen) and semi-automated image analysis.

EBV infection was observed in 52% of UNC cases, whereas HPV infection was found in only 4% of the cases. All UNC exhibited increased levels of p53, and a proliferation index higher than that observed for carcinomas of larynx. Regarding to cellular proliferation, EBV-positive and EBV-negative tumors were equivalent. Likewise, we did not find differences in EBV-positive tumors that could be attributable to the presence of 30bp deletion in BNLF-1 gene, which encodes the viral LMP-1 protein. On the other hand, HPV infection was found in 37.3% of carcinomas of larynx, mainly glottic tumors, and none of the cases had demonstrable EBV infection. HPV-positive cases were high risk viral genotypes (HPV 16 and HPV 18), and we did not find favored distribution of HPV genotypes in relation to tumor topography. Accumulation of p53 protein was found

---

in malignant cells in 78,2% of the cases, and it was related to higher proliferation index as well as higher histological grade of tumors.

The results verify the association of EBV and UNC, as well the association of HPV and at least 1/3 of the carcinomas of larynx, mainly glottic tumors, in the population studied. Accumulation of p53 protein (due mutations or epigenetic events) was frequently found, and it was associated with increased cell proliferation in tumors. The analysis of cellular proliferation bears out the relationship between this parameter and other factors related to aggressive tumor behavior, such as histological grade and lymph node metastasis. Moreover, the protocol proposed to evaluate cell proliferation allowed us a reliable estimation of this phenomenon, and can be used in further studies on head and neck cancers as well as other neoplasms.

---

# IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUDELO, D. et al. Laryngeal carcinoma in patients without a history of tobacco and alcohol use. *Head Neck.*, v.19, p.200-4, 1997.
- ARMSTRONG, A. A. et al. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: further evidence for the three disease hypothesis. *Leukemia*, v.12, p:1272-6, 1998.
- BABCOCK, G. J. et al. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*, v.9, p.395-404, 1998.
- BACCHI, C. E., GOWN, A. M. Detection of cell proliferation in tissue sections. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, v.26, p.677-87, 1993.
- BADARACCO, G. et al. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. *Anticancer Res.*, v.20, p.1301-6, 2000.
- BAER, R. et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genoma. *Nature.*, v.310, p.207-11, 1984.
- BOSCH, F. X. et al. Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: A Worldwide Perspective. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.87, p.796-802, 1995.
- BOSHART, M. et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.*, v.3, p.1151-7, 1984.
- BOYLE, J. O. et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res.*, v.53, p.4477-4480, 1993.
- BRACHMAN, D.G. et al. Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. *Cancer Res.*, v.52, p.4832-6, 1992.
-

- 
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Óbitos p/ ocorrência por causa - CID-BR e região (1998). In: \_\_\_\_\_. *DATASUS - Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM)*, 2000. (<http://www.datasus.gov.br>)
- BURT, R. D. et al. Association between human leukocyte antigen type and nasopharyngeal carcinoma in Caucasians in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.5, p.879-87, 1996.
- CALZOLARI, A. et al. Immunohistochemical vs Molecular Biology Methods: complementary techniques for effective screening of p53 alterations in head and neck cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.107, p.7-11, 1997.
- CAPONE, R. B. et al. Detection and quantification of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, v.6, p.4171-5, 2000.
- CHANG, F. et al. Tumorigenesis associated with p53 tumor suppressor gene. *Br. J. Cancer.*, v.68, p.653-61, 1993.
- CHANG, Y. S. et al. Detection of mutations in the p53 gene in human head and neck carcinomas by single strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Lett.*, v.67, p.167-74, 1992.
- CHAO, T. Y. et al. Expression of Epstein-Barr virus-encoded RNAs as a marker for metastatic undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Cancer.*, v.78, p.24-9, 1996.
- CHEN, M-L et al. Cloning and characterization of the latent membrane protein (LMP) of a specific Epstein-Barr virus variant derived from the nasopharyngeal carcinoma in the Taiwanese population. *Oncogene.*, v.7, p.2131-40, 1992.
-

- 
- CHEN, W. G. et al. Genotyping of Epstein-Barr virus in Brazilian Burkitt's lymphoma and reactive lymphoid tissue-type A with a high prevalence of deletions within the latent membrane protein gene. *Am. J. Pathol.*, v.148, p.17-23, 1996.
- COHEN, J. I. Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.*, v.343, p.481-92, 2000.
- COX, L. S. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21<sup>Cip1/WAF1/Sdi1</sup>. *J. Pathol.*, v.183, p.134-40, 1997.
- CVITKOVIC, E., BACHOUCHI, M., ARMAND, J-P. Nasopharyngeal carcinoma – Biology, natural history and therapeutic implications. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, v.5, p.821-38, 1991.
- DE RODA HUSMAN, A. M. et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3'ends with adjacent conserved sequences improves human Papillomavirus detection by PCR. *J. Gen. Virol.*, v.76, p.1057-62, 1995.
- DECKER, J., GOLDENSTEIN, J. C. Risk Factors in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.*, v.306, p.1151-5, 1982.
- DELIUS, H. et al. The genomes of three of four novel HPV types, defined by differences of their L1 genes, show high conservation of the E7 gene and the URR. *Virology*, v.240, p.359-65, 1998.
- DOLCETTI, R., BOIOCCHI, M. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Biomed. Pharmacother.*, v.52, p.13-25, 1998
- DRAY, T. et al. Lymphoepitheliomas of Laryngohypopharynx. *Am. J. Otolaryngol.*, v.19, p.263-6, 1998.
- EFFERT, P. et al. Alterations of p53 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J. Virol.*, v.66, p.3768-75, 1992.
-

- 
- ELGUI DE OLIVEIRA, D. et al. Lack of Epstein-Barr virus infection in cervical carcinomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.123, p.1098-100, 1999.
- ELGUI DE OLIVEIRA, D. et al. Hodgkin Disease in Adult and Juvenile Groups From Two Different Geographic Regions in Brazil - Characterization of Clinicopathologic Aspects and Relationship With Epstein-Barr Virus Infection. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.118, 2002. [in press]
- ELIOPOULOS, A. G, YOUNG, L. S. LMP1 structure and signal transduction. *Sem. Cancer Biol.*, v.11, p.435-44, 2001.
- ENDL, E., GERDES, J. The Ki-67 protein: fascinating forms and unknown function. *Exp. Cell Res.*, v.257, p.231-7, 2000.
- EVANDER, M. et al. Identification of the alpha-6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.*, v.71, p.2449-56, 1997.
- EVANS, S. C., LOZANO, G. The Li-Fraumeni syndrome: an inherited susceptibility to cancer. *Mol. Med. Today.*, v.3, p.390-295, 1997.
- FARRELL, P. J, CLUDTS, I., STÜHLER, A. Epstein-Barr virus genes and cancer cells. *Biomed. Pharmacother.*, v.51, p.258-67, 1997.
- FERLITO, A., VASEF, M. A., WEISS, L. M. Nasopharyngeal carcinoma, with emphasis on its relationship to Epstein-Barr virus. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*, v.106, p.348-56, 1997.
- FERLITO, A., WEISS, L. M., RINALDO, A. Lymphoepithelial carcinoma of the larynx, hypopharynx, and trachea. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, v.106, p.437-44, 1997.
- FIELD, J. K. Genomic instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res.*, v.16, p.2421-32, 1996.
-

- 
- FIELDING, C. A. et al. Epstein-Barr Virus LMP-1 natural sequence variants differ in their potential to activate cellular signaling pathways. *J. Virol.*, v.75, p.9129-41, 2001.
- FINGEROTH, J. D. et al. Epstein-Barr virus receptor of human B-lymphocytes in C3d receptor CR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.81, p.4510-4, 1984.
- FISHER, N. et al. Functional analysis of different LMP1 proteins isolated from Epstein-Barr virus-positive carriers. *Virus Res.*, v.60, p.41-54, 1999.
- FLISS, D. M. et al. Laryngeal verrucous carcinoma: a clinicopathologic study and detection of human papillomavirus using polymerase chain reaction. *Laryngoscope*, v.104, p.146-52, 1994.
- FOSTER, J. R. The role of cell proliferation in chemically induced carcinogenesis. *J. Comp. Pathol.*, v.116, p.113-44, 1997.
- FOURET, P. et al. Expression of p53 protein related to the presence of human papillomavirus infection in precancer lesions of the larynx. *Am. J. Pathol.*, v.146, p.599-604, 1995a.
- FOURET, P. et al. Human papillomavirus infection in the malignant and premalignant head and neck epithelium. *Diag. Mol. Pathol.*, v.4, p.122-7, 1995b.
- FOURET, P. et al. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in nonsmokers. *Arch. Otolaryngol. Head. and Neck. Surg.*, v.123, p.513-6, 1997.
- FRANCESCHI, S. et al. Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.5, p.567-75, 1997.
-

- 
- GALE, N. et al. Epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 and p53 overexpressions in epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol. (Stockh) Suppl.*, v.527, p.105-10, 1997.
- GANLY, I. et al. P53 alterations in recurrent squamous cell cancer of the head and neck refractory to radiotherapy. *Brit. J. Cancer.*, v.82, p.392-8, 2000.
- GARCÍA-MILIÁN, R. et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in benign and malignant tumors of laryngeal epithelium. *Acta Otolaryngol. (Stockh)*, v.118, p.754-8, 1998.
- GARLICK, J. A.; TAICHMAN, L. B. Human papillomavirus infection of the oral mucosa. *Am J Derm.*, v.13, p.386-95, 1991.
- GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.*, v.133, p.1710-5, 1984.
- GLICKMAN, J. N. et al Structural analysis of EBER1 e EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus infected cells. *J. Virol.*, v.62, p.902-11, 1988
- GOLDENBERG, D. et al. Epstein-Barr virus anc cancers of the head and neck. *Am. J. Otolaryngol.*, v.22, p.197-205, 2001.
- GOTTLIEB, T. M., OREN, M. p53 in growth control and neoplasia. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1287, p.77-102, 1996.
- GOWN, A. M., WEVER, N., BATTIFORA, H. Microwave-based antigenic unmasking: a revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem.*, p.256-66, 1993.
-

- 
- GRIFFIN, B. E., XUE, S. Epstein-Barr virus infection and their association with human malignancies: some key questions. *Ann. Med.*, v.30, p.249-59, 1998.
- GULLEY, M. L., BURTON, M. P., ALLRED, D. C. Epstein-Barr virus infection is associated with p53 accumulation in nasopharyngeal carcinoma. *Hum. Pathol.*, v.29, p.252-9, 1998.
- GUTIÉRREZ, M. I. et al. Epstein-Barr Virus in Nasal Lymphomas Contains Multiple Ongoing Mutations in the EBNA-1 Gene. *Blood*, v.92, p.600-6, 1998.
- HAGEN, P., LYONS, G. D., HAINDEL, C. Verrucous carcinoma of the larynx: role of human papillomavirus, radiation and surgery. *Laryngoscope*. v.103, p.253-7, 1993.
- HALL, P. A. et al. Proliferating cell nuclear antigen expression in non-cycling cells may be induced by growth factors *in vivo*. *Br. J. Cancer*, v.70, p.244-7, 1994.
- HARAF, D. J. et al. Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin. Cancer Res.*, v.2, p.755-62, 1996.
- HAYASHI, K. et al. Deletion of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene in United States and Brazilian Hodgkin's disease and reactive lymphoid tissue: high frequency of a 30-bp deletion. *Human Pathology*, v.28, p.1408-14, 1997.
- HEDRICK, J. A. et al. Interaction between Epstein-Barr Virus and a T Cell Line (HSB-2) via Receptor phenotypically Distinct from Complement Receptor Type 2. *Eur. J. Immunol.*, v.22, p.1123-31, 1992.
- HOLLSTEIN, M. et al. p53 mutations in human cancers. *Science*, v.253, p.49-53, 1991.
- HOPPE-SEYLER, F., BUTZ, K. Molecular mechanisms of virus induced carcinogenesis: the interaction of viral factors with cellular tumor suppressor proteins. *J. Mol. Med.*, v.73, p.529-38, 1995.
-

- 
- HORDING, U. et al. Human papillomavirus types 11 and 16 detected in nasopharyngeal carcinomas by the polymerase chain reaction. *Laryngoscope*. v.104, p.99-102, 1994.
- HORIKAWA, T. et al. Association of latent membrane protein 1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*, v.89, p.715-23, 2000.
- HOWE, J. R., KLIMSTRA, D. S., CORDON-CADO, C. DNA extraction from paraffin-embedded tissues using a salting-out procedure: a reliable method for PCR amplification of archival material. *Histol. Histopathol.*, v.12, p.595-601, 1997.
- HSU, D. H. et al. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF-1. *Science*, v.250, p.830-3, 1990.
- HU, L. F. et al. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J. Gen. Virol.*, v.72, p.2399-409, 1991.
- JACKSON, D. P. et al. Tissue Extraction of DNA and RNA and analysis by the Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Pathol.*, v.43, p.499-504, 1990.
- JENG, K. C. et al. Prevalence of Taiwan variant of Epstein-Barr virus in throat washings from patients with head and neck tumors in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, p.28-31, 1994.
- JIN, Y-T., KAYSER, S., KEMP, B. L. The prognostic significance of the biomarkers p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*, v.82, p.2159-65, 1998.
- JOHNSON, R. J. et al. The 30-base-pair deletion in Chinese variants of the Epstein-Barr virus LMP1 is not the major effector of functional differences between variant LMP1 genes in human lymphocytes. *J. Virol.*, v.72, p.4038-48, 1998.
-

- 
- KHAMIM, F. et al. Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus associated tumors from different geographic locations. *Blood*, v.88, p.3491-501, 1996.
- KHANNA, R., BURROWS, S. R., MOSS, D. J. Immune regulation in Epstein-Barr virus associated diseases. *Microbiol. Rev.*, v.59, p.387-405, 1995.
- KIEFF, E. Epstein-Barr virus – Increasing evidence of a link to carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, v.333, p.724-6, 1995.
- KIURU, A. et al. p53 mutations in human head and neck cancer cell lines. *Acta Otolaryngol. (Stockh) Suppl.*, v.529, p.237-40, 1997.
- KNECHT, H. et al. Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in Nasopharyngeal carcinoma. *Blood.*, v.82, p.2937-42, 1993.
- KNECHT, H. et al. Mutational hot spots within the carboxi terminal region of the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are frequent in lymphoproliferative disorders. *Oncogene*, v.10, p.523-8, 1995.
- KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.68, p.820-3, 1971.
- KOUFMAN, J. A., BURKE, A. J. The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. *Otolaryngol. Clin. North. Am.*, v.30, p.1-19, 1997.
- KOUZARIDES, T. Functions of pRb and p53: what's the connection? *Trends Cell. Bio.*, v.5, p.448-50, 1995.
- KOWALSKI, L. P., CARVALHO, A. L. Natural history of untreated head and neck cancer. *Eur. J. Cancer.*, v.36, p.1032-7, 2000.
-

- 
- KRECICKI, T. et al. Ki-67 immunostaining and prognosis in laryngeal cancer. *Clin. Otolaryngol.*, v.23, p.539-42, 1998.
- KRECICKI, T. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferation cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in laryngeal epithelial lesions. *Oral Oncol.*, v.35, p.180-6, 1999.
- KREITZ, S. et al. The proliferation human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin. *Exp. Cell. Res.*, v.261, p.284-92, 2000.
- KWOK-WAI, L., DOLLY, H. P. W. S., JOESPH, L. C. K. Genetic changes in nasopharyngeal carcinoma. *Chin. Med. J.*, v.110, p.548-59, 1997.
- LAICHALK, L. L. et al. The Dispersal of Mucosal Memory B Cells: Evidence from Persistent EBV Infection. *Immunity*, v.16, p.745-54, 2002.
- LANDERS, R. J. et al. Epstein-Barr virus in normal, premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *J. Clin. Pathol.*, v.46, p.931-5, 1993.
- LANE, D. P., CRAWFORD, L. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, v.278, p.261-3, 1979.
- LAVIEILLE, J. P. et al. Immunohistochemical detection of p53 protein in preneoplastic lesions and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Otolaryngol. (Stockh)*, v.115, p.334-9, 1995.
- LEE, N. K., YUN-WEI, Y., CHEN, J. p53, retinoblastoma, and human papillomavirus in squamous cell carcinoma and adjacent normal mucosa of the upper aerodigestive tract. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, v.119, p.1125-31, 1993.
- LERA, J. et al. Tumor proliferation, p53 expression, and apoptosis in laryngeal carcinoma – relation to the results of radiotherapy. *Cancer*. v.83, p.2493-2500, 1998.
-

- 
- LEUNG, S. Y., CHUNG, L. P., WONG, P. M. Epstein-Barr virus is present in a wide histological spectrum of sinonasal carcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.*, v.19, p.994-1001, 1995.
- LEVINE, A. J., MOMAND, J., FINLAY, C. A. The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, v.351, p.453-6, 1991.
- LEVINE, A. J. et al. The spectrum of mutations at the p53 locus – Evidence for tissue-specific mutagenesis, selection of mutant alleles, and a "gain of function" phenotype. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.768, p.111-28, 1995.
- LI, Q. et al. Epstein-Barr Virus Uses HLA Class II as a Cofactor for Infection of B Lymphocytes. *J. Virol.*, v.71, p.4657-62, 1997.
- LIAVAAG, P. G. et al. The Physiologic reservoir of Epstein-Barr virus does not map to upper aerodigestive tissues. *Laryngoscope*. v.108, p.42-6, 1998.
- LIN, S-Y. et al. Presence of Epstein-Barr vírus latent membrane protein 1 gene in the nasopharyngeal swabs from patients with nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck*, v.23, p.194-200, 2001.
- LINDEBERG, H. et al. Human papillomavirus type 11 DNA in squamous cell carcinomas and pre-existing multiple laryngeal papillomas. *Acta Otolaryngol.*, v.107, p.141-9, 1989.
- LOGULLO, A. F. et al. P53 overexpression in epidermoid carcinoma of the head and neck. *Rev. Paul. Med.*, v.115, p.1349-55, 1997.
- LOWE, S. W., LIN, A. W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, v.21, p.485-95, 2000.
-

- 
- MacMILLAN, C. et al. Lymphoepithelial carcinoma of the larynx and hypopharynx: study of eight cases with relationship to Epstein-Barr virus and p53 gene alterations, and review of the literature. *Hum. Pathol.*, v.27, p.1172-9, 1996.
- MAIER, H., TISCH, M. Epidemiology of laryngeal cancer: results of the Heidebelgerg case-control study. *Acta Otolaryngol. Suppl.*, v.527, p.160-4, 1997.
- MANTOVANI, F., BANKS, L. The interaction between p53 and papillomaviruses. *Sem. Cancer Biol.*, v.9, p.387-95, 1999.
- MARKS, J. E., PHILIPS, J. L., MENCK, H. R. The national cancer data base report on the relationship of race and national origin to the histology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*, v.83, p.583-8, 1998.
- MATZOW, T. et al. Low detection rate of HPV in oral and laryngeal carcinomas. *Acta Oncol.*, v.37, p.73-6, 1998.
- McCORMICK, D., HALL, P. A. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology*, v.21, p.591-4, 1992.
- McKAIG, R. G., ABRIC, R. S., OLSHAN, A. F. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck*, v.20, p.250-65, 1998.
- MERKELBACH, S. et al. Novel Enzyme Immunoassay and Optimized DNA Extraction for Detection of Polymerase-Chain-Reaction-Amplified Viral DNA from Paraffin-Embedded Tissue. *Am. J. Pathol.*, v.150, p.1537-46, 1997.
- MIES, C. Molecular Biological Analysis of Paraffin-Embedded Tissues. *Hum. Pathol.*, v.25, p.555-60, 1994.
- MIGUEL, R. E. V. et al. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. *Am. J. Surg.*, v.176, p.428-9, 1998.
-

- 
- MILLS, S. E., GAFFEY, M. J., FRIERSON, H. F. Tumors of the upper aerodigestive tract and ear: larynx. In:\_\_\_\_. Atlas of Tumor Pathology – Tumors of the upper aerodigestive tract and ear. Washington: Armed Forces Institute of Pathology (AFIP), p.9-12, 1997.
- MOMAND, J., WU, H. H., DASGUPTA, G. MDM2 - master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene*, v.242, p.15-29, 2000.
- MOORE, K. W. et al. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF-1. *Science*, v.248, p.1230-5, 1990.
- MOORE, P. S., CHANG, Y. Detection of Herpesvirus-like DNA sequence in Kaposi's Sarcoma in patients with and those without HIV infection. *N. Engl. J. Med.*, v.332, p.1181-91, 1995.
- MURONO, S. et al. Association of Epstein-Barr virus infection with p53 protein accumulation but not bcl-2 protein nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology*, v.34, p.432-8, 1999.
- NARAYANA, A. et al. Is p53 an independent prognostic factor in patients with laryngeal carcinoma? *Cancer*. v.82, p.286-91, 1998.
- NICHOLSON, L. J., MORRIS, D. H. Role of Epstein-Barr virus gene latent membrane protein in nasopharyngeal carcinoma. *Trends Microbiol.*, v.4, p.132-3, 1996.
- NIEDOBITEK, G. et al. p53 overexpression and Epstein-Barr virus infection in undifferentiated and squamous cell nasopharyngeal carcinomas. *J. Pathol.*, v.170, p.457-61, 1993.
- NIEDOBITEK, G. Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *J. Clin. Pathol: Mol. Pathol.*, v.53, p.248-54, 2000.
-

- 
- NIEDOBITEK, G., HERBST, H., YOUNG, L. S. Epstein-Barr virus and carcinomas. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, v.23, p.17-24, 1993.
- NIGRO JM, BAKER SJ, PREISINGER AC et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*. 342:705-8, 1989.
- NISHIOKA, S. et al. Human papillomavirus as a risk factor for head and neck cancers – a case-control study. *Acta Otolaryngol. (Stockh) Suppl.*, v.540, p.77-80, 1999.
- OLSHAN, A. F. et al. p53 mutations in head and neck cancer: new data and evaluation of mutational spectra. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.6, p.499-504, 1997.
- PARKIN, D. M., BRAY, F. I., DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000 - The global picture. *Eur. J. Cancer*, v.37, p.S5-S66, 2001.
- PATER, M. M., PATER, A. Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology*, v.145, p.313-8, 1985.
- PATHMANATHAN, R. et al. Undifferentiated, nonkeratinizing, and squamous cell carcinoma of the nasopharynx – variants of Epstein-Barr virus-infected neoplasia. *Am. J. Pathol.*, v.146, p.1355-67, 1995.
- PEARSON, G. R. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *J. Cell Biochem. Suppl.*, v.17F, p.150-4, 1993.
- PINTOS, J. et al. Human papillomavirus and prognoses of patients with cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer*, v.85, p.1903-9, 1999.
- POLJAK, M., GALE, N., KAMBIC, V. Human papillomaviruses: a study of their prevalence in the epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol. (Stockh) Suppl.*, v.527, p.66-9, 1997.
-

- 
- POU, A. M., RIMELL, F. L., JORDAN, J. A. Adult respiratory papillomatosis: human papillomavirus type and viral coinfections as predictors of prognosis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, v.104, p.758-62, 1995.
- PURTILLO, D. T. et al. Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders. *Lab. Investigation.*, v.67, p.5-23, 1992.
- RAITIOLA, H. S., PUKANDER, J. S. Etiological factors of laryngeal cancer. *Acta Otolaryngol. (Stockh) Suppl.*, v.529, p.215-7, 1997.
- RASSEKH, C. H. et al. Combined Epstein-Barr virus and human papillomavirus infection in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope*, v.108, p.362-7, 1998.
- ROTHENBERGER, S. et al. Natural 30 base pair and 69 base pair deletion variants of the LMP1 oncogene do stimulate NF- $\kappa$ B-mediated transcription. *Oncogene*, v.14, p.2123-6, 1997.
- SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v.239, p.487-91, 1988.
- SCHEFFNER, M. et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, v.63, p.1129-36, 1990.
- SCHMIDT, C. W., MISKO, I. S. The ecology and pathology of Epstein-Barr virus. *Immunol. Cell Biol.*, v.73, p.489-504, 1995.
- SEPP, R., SZABÓ, I., UDA, H., SAKAMOTO, H. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *J. Clin. Pathol.*, v.47, p.318-23, 1994.
- SHAW, P. H. The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol. Res. Pract.*, v.192, p.669-75, 1996.
-

- 
- SHEFFNER, M. Ubiquitin, E6-AP, and their role in p53 inactivation. *Pharmacol Ther.*, v.78, p.129-39, 1998.
- SHI, W. et al. Molecular pathology parameters in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*, v.94, p.1997-2006, 2002.
- SHIBATA, D., WEISS, L. M. Epstein-Barr virus associated Gastric Adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.*, v.140, p.769-74, 1992.
- SHIBATA, D. Extraction of DNA from Paraffin-Embedded Tissue for Analysis by Polymerase Chain Reaction: New Tricks from an Old Friend. *Hum. Pathol.*, v.25, p.561-3, 1994.
- SHIVJI, M. K. K., KENNY, M. K., WOOD, R. D. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is required for DNA excision repair. *Cell*, v.69, p.1-20, 1992.
- SIXBEY, J. W., YAO, Q-Y. Immunoglobulin A-Induced Shift of Epstein-Barr Virus Tissue Tropism. *Science*, v.255, p.1578-80, 1992.
- SOLER, C. et al. Detection of human papillomavirus types 6, 11, 16 and 18 in mucosal and cutaneous lesions by the multiplex polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.*, v.35, p.143-57, 1991.
- SOMERS, K. D. et al. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Res.*, v.52, p.5997-6000, 1992.
- SOTO, Y. et al. Detection of type 16 human papillomavirus DNA in formalin-fixed invasive squamous cells from laryngeal cancer by polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.93, p.439-40, 1998.
-

- 
- SPAFFORD, M. F. et al. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, v.122, p.627-632, 1996.
- SPRUCK, C. H. 3rd et al. Absence of p53 gene mutations in primary nasopharyngeal carcinomas. *Cancer Res.*, v.52, p.4787-90, 1992.
- STUBENRAUCH, F., LAIMINS, L. A. Human papillomavirus cell cycle: active and latent fases. *Sem. Cancer Res.*, v.9, p.379-86, 1999.
- SUZUKI, T. et al. Spontaneous mutation of p53 gene in human papillomavirus type 16 E7-immortalized human laryngeal epithelial cells. *Acta Otolaryngol. (Stockh) Suppl.*, v.522, p.94-8, 1996.
- TAKADA, K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.*, v.53, p.255-61, 2000.
- TAKESHITA, H. et al. Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2. *J. Virol.*, v.73, p.5548-55, 1999.
- TEO, C. G., GRIFFIN, B. E. Epstein-Barr virus genomes in lymphoid cells: activation in mitosis and chromosomal location. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.84, p.8473-7, 1987.
- TSUTSUMI, K., IWATAKE, H., SUZUKI, T.. An experimental model of multistep laryngeal carcinogenesis: combined effect of human papillomavirus type 16 genome and N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Acta Otolaryngol. (Stockh) Suppl.*, v.522, p.89-93, 1996.
-

- 
- TYAN, Y-S., LIU, S-T., ONG, W-R. Detection of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in head and neck tumors. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, p.53-6, 1993.
- VAN DEN BREKEL, M. W. M., BINDELS, E. M. J., BALM, A. J. M. Prognostic factors in head and neck cancer. *Eur. J. Cancer*, v.38, p.1041-43, 2002.
- VAN DEN BRULE, A. J., et al. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, p.2739-43, 1992.
- VAN TORNOUT, J. M. et al. Presence of p53 mutations in primary nasopharyngeal carcinoma (NMPC) in non-asians of Los Angeles, California, a low-risk population for NPC. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.6, p.493-7, 1997.
- VOGELSTEIN, B., KINZLER, K. W. p53 function and dysfunction. *Cell*, v.70, p.523-6, 1992.
- VOKES, E. E. et al. Head and Neck cancer. *N. Engl. J. Med.*, v.328, p.184-94, 1993.
- VOUSDEN, K. H. Human papillomaviruses and cervical carcinoma. *Cancer Cells*, v.1, p.43-50, 1989.
- WALTER, M. A., MENARGUEZ-PALANCA, P., PEIPER, S. C. Epstein-Barr virus detection in neck metastases by polymerase chain reaction. *Laryngoscope*, v. 102, p.481-5, 1992
- WANG, X. W., HARRIS, C. C. p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *J. Cell Physiol.*, v.173, p.247-55, 1997.
- WATTS, S. L., BREWER, E. E., FRY, T. L. Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Surg. Oral Med. Oral Path.*, v.71, p.701, 1991.
-

- WEISS L. M. et al. Epstein-Barr virus and Hodgkin disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am. J. Pathol.*, v.139, p.1259, 1991.
- WELKOBORSKY, H. J. et al. Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, v.104, p.503-10, 1995.
- WERNESSE, B. A., LEVINE, A. J., HOWLEY, P. M. Association of Human Papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, v.248, p.76-9, 1990.
- YEE, C. et al. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.*, v.119, p.361-6, 1985
- ZHANG, Q., GUTSCH, D., KENNEY, S. Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol. Cell Biol.*, v.14, p.1929-38, 1994.
- ZUR HAUSEN, H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*, v.184, p.9-13, 1991.
- ZUR HAUSEN, H. The role of Epstein-Barr virus (EBV) in Burkitt's lymphomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, v.89, 1998.
-

A execução desta pesquisa recebeu parecer favorável do Comitê de Ética da Faculdade Medicina de Botucatu (UNESP) em reunião realizada aos 5 dias do mês de março de 2001 (Of. 069/2001-CEP).

Este trabalho obedece às normas para publicação da UNESP (COORDENADORIA GERAL DE BIBLIOTECAS E EDITORA UNESP. *Normas para publicações da UNESP*. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1994).

É permitida a reprodução total ou parcial das informações aqui apresentadas, desde que devidamente mencionada a fonte:

ELGUI DE OLIVEIRA D. Infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e vírus do papiloma humano (HPV), expressão da proteína p53 e proliferação celular em carcinomas de nasofaringe e laringe. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2002.