

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO DE PATOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E ÍNDICE
PROLIFERATIVO (Ki-67) DAS DISPLASIAS ACENTUADAS/
CARCINOMAS *IN SITU* NAS PREGAS VOCAIS**

ELISÂNGELA BARROS SOARES

RECIFE, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO DE PATOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E ÍNDICE
PROLIFERATIVO (Ki-67) DAS DISPLASIAS ACENTUADAS/
CARCINOMAS *IN SITU* NAS PREGAS VOCAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), para obtenção do título de Mestre em Patologia. Professora Orientadora: Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima. Professora co-orientadora: Adriana Maria da Silva Telles

ELISÂNGELA BARROS SOARES

RECIFE, 2008

Soares, Elisângela Barros
Caracterização histomorfométrica e índice proliferativo (Ki-67) das displasias acentuadas/carcinomas in situ nas pregas vocais / Elisângela Barros Soares. – Recife : O Autor, 2009.
163 folhas. Il: fig., graf e tab.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Carcinoma de Laringe. 2. Carcinoma in situ. 3. Prega vocal. 4. Antígeno Ki-67. I. Título.

616-006.6	CDU (2. ed)	UFPE
616.99422	CDD (22.ed.)	CCS2009-004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

AUTOR: ELISÂNGELA BARROS SOARES

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA GERAL

NOME DA DISSERTAÇÃO: "CARACTERIZAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E ÍNDICE PROLIFERATIVO (Ki-67) DAS DISPLASIAS ACENTUADAS / CARCINOMAS *IN SITU* NAS PREGAS VOCAIS"

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA DO CARMO CARVALHO DE ABREU E LIMA

CO-ORIENTADO: PROFA. DRA. ADRIANA MARIA DA SILVA TELLES

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

DATA: 19 DE DEZEMBRO DE 2008.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho _____

Prof. Dr. Hilton Justino da Silva _____

Profa. Dra. Sandra Lopes de Souza _____

DEDICATÓRIA

A Deus que foi e tem sido o encorajador para todas as decisões que devo tomar e tem tornado realidade os meus sonhos.

Aos meus Pais, Edvaldo Rosendo e Elenilda Soares, pelo incentivo e apoio em todas as horas

Ao meu amado Gleydson pelo seu companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, principalmente, a quem me guia pela vida: **Deus**. Aquele que deu a vida e que colocou todas essas pessoas em minha vida.

Agradeço a todos aqueles que colaboraram na realização desse trabalho. Minha gratidão a cada pessoa que me ajudou a construir essa pesquisa.

Aos meus pais que, desde o início de tudo, apoiaram-me.

A meu irmão pelo apoio e ajuda técnica e a todos meus familiares, que me ajudaram com sua compreensão.

Aos meus orientadores que me receberam e acreditaram que tudo seria possível.

À Prof^a Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima, que me orientou, mas também pelas fotomicrografias e pelo incentivo e ensino durante a realização desse estudo.

A Prof^a Adriana Maria da Silva Telles pelo incentivo em todas as etapas desse trabalho e por ter me recebido no estágio de docência.

À Prof^a Dr^a Luciana Gurgel da Trindade Meira Henriques pela disposição na realização dos exames imuno - histoquímicos.

Ao Prof^o Hilton Justino da Silva que foi um amigo, incentivando, animando-me para concretização dessa pesquisa.

Ao Professor Tetsuo Tashiro pela realização da estatística dessa pesquisa e pelo ensino

Aos professores do Mestrado em Patologia por seus ensinamentos.

Ao Profº Roberto Vieira de Mello, com seus ensinamentos de vida, pela orientação no período de coleta no Serviço de Verificação de Óbitos.

Ao Profº Luciano Tavares Montenegro, sempre bem humorado, contribuiu inicialmente, na coleta no Hospital de Câncer de Pernambuco.

Aos colegas do Mestrado em Patologia: Sandrelli Virginio de Vasconcelos, Renata Campina, Taciana Figueirêdo de Luna Calado e Sidcley Bernardino Araújo, que ajudaram na realização do Mestrado e na concretização dessa pesquisa.

À Doutoranda Iracema Hermes Pires de Melo pelo ensino do programa *Scion Image* e apoio em momentos difíceis da pesquisa.

Ao Dr. Adonis R. L. de Carvalho pela oportunidade de utilizar os casos do Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Pernambuco, tornando possível essa pesquisa.

À Rose e Marciana, funcionárias do Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Pernambuco, que colaboraram comigo na busca de material necessário para pesquisa.

À Sylvania pela ajuda no preparo do material histológico.

À Paula Carvalho de Abreu e Lima pelo *abstract*.

E a todas as pessoas, que encontrei ao longo desse caminho e, que de alguma forma, me instruíram, e me ajudaram a tornar real essa dissertação.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

“Podemos confiar que Deus provê tudo de que precisamos no momento certo. Essa segurança nos manterá buscando sua vontade e nos ajudará a viver alegremente com aquilo que ele nos der”. Sandy Larsen

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histologia da Laringe e das pregas vocais 18

1.2. Câncer da laringe e das pregas vocais 25

1.3. Estadiamento e tratamento do carcinoma glótico 28

1.4. Displasia do epitélio da laringe e pregas vocais..... 32

1.5. Fatores de risco 37

1.6. Exame Imuno – histoquímico (Ki – 67) 39

1.7. Análise digital de imagens em Patologia..... 45

2. OBJETIVOS 50

3. MATERIAL E MÉTODO 52

3.1. Tipo de estudo. 52

3.2. Seleção do material 52

3.3. Processamento macroscópico das peças de laringe do grupo controle..... 54

3.4. Estudo Imuno - histoquímico..... 55

3.5. Análise Morfométrica 56

3.6. Análise Estatística. 58

3.7. Considerações finais 59

4. RESULTADOS 61

5. DISCUSSÃO 69

6. CONCLUSÃO..... 85

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 88

ANEXOS..... 113

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Anc - Área ocupada pelos núcleos corados por Ki-67(μm^2)

CEC - Carcinoma escamocelular

Dnc - Densidade de núcleos corados por Ki-67

HCP - Hospital de Câncer de Pernambuco

H/E - Hematoxilina – Eosina

NIC - Neoplasia intraepitelial-cervical

Nnc - número de núcleos corados por Ki-67

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAP – Peroxidase antiperoxidase

PDT - Terapia Fotodinâmica

SIN - Neoplasia intra-epitelial escamosa

SIL - Lesão intra-epitelial escamosa

SVO - Serviço de Verificação de Óbitos

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

UICC - União internacional contra o Câncer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Epitélio cilíndrico ciliado pseudo-estratificado (epitélio respiratório). O aspecto assemelha-se ao epitélio de transição (figura 7), porém com epitélio colunar ciliado em superfície. Grupo controle, nº 2 (HE – 100X; 400X).

Figura 2: Epitélio escamoso da prega vocal. Notar maturação das células epiteliais com núcleos predominantes na camada basal e para basal e núcleos pequenos nas células mais superficiais. Grupo controle, nº 2 (HE - 400X).

Figura 3: Epitélio de transição. Os núcleos são preponderantes em toda espessura do epitélio, porém, uniformes, de cromatina delicada. Grupo controle, nº 1 (HE - 400X).

Figura 4: Glândulas mucosas do cório. Em “**A**” e “**B**” notar revestimento por epitélio colunar cúbico mucosecretante (seta). Em “**C**” observa-se glândula mucosa em processo de metaplasia escamosa (setas). Notar semelhança do epitélio metaplásico com o de transição (figura 7). Grupo controle, nº 1 (HE - 400X).

Figura 5: 1. Epitélio escamoso normal; 2. Lâmina própria (camadas superficial, intermediária e profunda); 3. Músculo vocal (Tireoaritenóideo). Grupo controle nº 1 (HE - 25X).

Figura 6: Músculo estriado vocal (tireoaritenóideo) (seta). Grupo controle, nº 1 e 3 (HE - **A** - 25x e **B** - 400X).

Figura 7: **A** - Visão anterior da laringe fixada em formol tamponado a 10%, após 7 dias, **B** - Visão posterior.

Figura 8: **A** e **B** - Corte longitudinal na região média da prega esquerda C-Prega vocal esquerda retirada após 7 dias

Figura 9: Mensuração da área com programa *Scion Image* Beta 4.0.2: A – epitélio escamoso normal , B – epitélio escamoso de transição, C - epitélio escamoso displásico (HE - 40x)

Figura 10: Mensuração do diâmetro do núcleo no epitélio escamoso normal. **A** - na camada basal e intermediária **B** - na camada intermediária e superficial (HE - 400x).

Figura 11: **A** - Mensuração do diâmetro dos núcleos nas camadas basal, intermediária e superficial no Epitélio escamoso de transição em **A** e **B**) (HE - 400x).

Figura 12: Mensuração do diâmetro do núcleo no epitélio escamoso displásico. **A** – no 1/3 inferior, **B** - na camada intermediária (HE- 400x).

Figura 13: Mensuração do diâmetro do núcleo a camada superficial no epitélio escamoso displásico (HE - 400x)

Figura 14: Determinação do número dos núcleos corados em epitélio escamoso de transição. A. Área aferida para contagem onde foram vistos apenas dois núcleos marcados(Ki-67, 40X).. B. Notar núcleo corado na camada basal (Ki-67 - 400X).

Figura 15: Determinação do número de núcleos corados no epitélio escamoso displásico no 1/3 inferior do epitélio (Ki-67 - 400X).

Figura 16: Displasia acentuada. Em “**A**” e “**B**” notar hipercelularidade em toda espessura do epitélio escamoso. Em “**C**” as células superficiais tem núcleos aumentados. A perda da polaridade e pleomorfismo nuclear são evidentes em “**D**”. Grupo caso, nº 2 (HE - 25X; 100X;400X; 400X).

Figura 17: Displasia acentuada. O aspecto é semelhante ao descrito nas figuras 7 e 8. Grupo caso, nº 3 (HE - 100X e 400X).

Figura 18: Displasia acentuada. Grupo caso, nº 4 (HE - 100X; 400X; 25 X; 400X).

Figura 19: Displasia acentuada. Grupo caso, nº 5 (HE - 100X e 400X).

Figura 20: Displasia acentuada. Notar núcleos aumentados de volume em toda espessura do epitélio escamoso com paraqueratose em “A” (seta). Em “B” e “C” observa-se hipercromasia, variação de tamanho e forma dos núcleos e figura de mitose (seta). Grupo caso, nº 1 (HE - 400X).

Figura 21: Variações do epitélio escamoso da prega vocal. Em “A” e “B” notar maturação das células epiteliais com núcleos predominantes na camada basal e para-basal e núcleos pequenos com predomínio de citoplasma acidófilo nas células mais superficiais. Em “C” observa-se discreta queratinização em superfície. Grupo controle, nº 2 (HE - 400X). Em “D”, o epitélio escamoso é hipotrófico, delgado. As células da camada basal mostram núcleos preponderantes e ficam mais próximas da superfície. O cório tem aspecto hialinizado. Grupo controle, nº 4 (HE - 400X)

Figura 22: Epitélio de transição. Os núcleos são preponderantes em toda espessura do epitélio, porém, uniformes, de cromatina delicada. Grupo controle, nº 1 e 2 (HE - 400X).

Figura 23: Exame imuno - histoquímico: displasia acentuada. Notar grande aumento de núcleos corados, em vários níveis do epitélio, até o estrato escamoso. Grupo caso, nº 1. (Ki-67 - 100X; 400X; 400X).

Figura 24: Exame imuno - histoquímico: displasia acentuada. Nesse caso o epitélio é pouco espesso mas notam-se núcleos corados em toda espessura do mesmo. Grupo caso, nº 2. (Ki-67 - 400X).

Figura 25: Exame imuno - histoquímico: displasia acentuada. Os núcleos são volumosos com variação de tamanho e há núcleos corados em todos os níveis do epitélio. Grupo caso, nº 3. (Ki-67 - 400X).

Figura 26: Exame imuno - histoquímico: displasia acentuada. Notar aumento da espessura do epitélio com grande número de núcleos corados em toda espessura do mesmo. Note o contraste com as figuras 34 e 35. Grupo caso, nº 4. (Ki-67 - 400X).

Figura 27: Exame imuno - histoquímico: displasia acentuada. Núcleos corados em todos os níveis do epitélio. Grupo caso, nº 5. (Ki-67 - 100; 400X).

Figura 28: Exame imuno - histoquímico: epitélio escamoso normal. Notar ausência de núcleos corados em “**A**” e raros núcleos corados em “**B**”, os quais limitam-se a camada basal. Grupo controle, nº 2 e 3 (Ki-67 - 400X).

Figura 29: Exame imuno - histoquímico: epitélio de transição. Observar raros núcleos corados na camada basal e para-basal, semelhante a figura 34 no epitélio escamoso normal. Grupo controle, nº 1 (**A, B**) e 4 (**C**). (Ki-67 - 400X).

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1: Distribuição dos casos e controles quanto à idade (anos)	62
Tabela 2: Média de núcleos corados (Ki-67) por epitélio	67
Gráfico 1: Área (μm^2) – diferença significativa entre as médias dos epitélios	64
Gráfico 2: Diâmetro (μm) – diferença significativa entre as médias dos epitélios	65

RESUMO

As displasias da laringe são lesões precursoras do carcinoma escamocelular invasivo e constituem lesões pouco comuns, pois, a maior parte dos casos é diagnosticada como carcinoma invasor. Frequentemente, utilizam-se os critérios de cérvix uterina para graduação das displasias na prega vocal. Todavia, existem diferenças histopatológicas, patogênicas e epidemiológicas entre as lesões intra-epiteliais cervicais e laríngeas. O epitélio de transição na prega vocal pode ocasionar problemas diagnósticos. Os autores procuram caracterizar as displasias acentuadas/carcinoma *in situ* da prega vocal quanto aos aspectos histopatológicos, morfométricos (área do epitélio e diâmetro dos núcleos) e índice proliferativo (Ki-67), comparando estes dados com os obtidos no epitélio escamoso normal e de transição. Dentre 1400 casos de carcinoma de laringe (1994 a 2006), 5 casos (0,35%) de displasia acentuada/carcinoma *in situ* foram estudados. O grupo controle constituiu-se de dois indivíduos masculinos, não tabagistas e não etilistas de 52 e 78 anos. Observaram-se nos pacientes com displasia predomínio do sexo masculino, na 6ª década e associação com tabagismo e etilismo. Comparando-se o epitélio displásico com o epitélio normal e de transição verificou-se que foi maior a área ocupada pelo primeiro, bem como o diâmetro do núcleo das células displásicas. O diâmetro dos núcleos por camada mostrou diferenças significativas no epitélio escamoso normal, mas não no epitélio displásico e de transição. O índice proliferativo foi maior no epitélio displásico que no escamoso normal e de transição com núcleos corados na camada basal/parabasal no epitélio escamoso normal e de transição e em todos os níveis no epitélio displásico. Palavras - Chaves: Laringe, carcinoma *in situ*, prega vocal, antígeno Ki-67

ABSTRACT

Laryngeal dysplasia is the precursor lesion to invasive squamous cell carcinoma. Dysplasia is an uncommon lesion; most cases is diagnosed as invasive squamous cell carcinoma. The criteria used to grade dysplasia in the uterine cervix are frequently applied in vocal cord dysplasia. However, there are histopathologic, pathogenetic and epidemiologic differences between intra-epithelial lesions in the cervix and larynx. The transitional epithelium in the vocal cord can cause diagnostic problems. The authors aim at characterizing severe dysplasia/carcinoma in situ of the vocal cord, evaluating its histopathologic and morphometric aspects (epithelial area and diameter of the nuclei), and proliferative index (ki-67), comparing the data with normal squamous and transitional epithelia. Among the 1400 cases of laryngeal carcinoma (1994-2006), 5 cases (0.35%) of severe dysplasia/carcinoma in situ were identified. The control group included 2 men who did not smoke or drink, and were 52 and 78 years old. The patients with dysplasia were predominantly of the male gender, in their 60s, and had smoking and drinking habits. When comparing dysplastic with normal and transitional epithelia, they noted that the former occupied a larger area in the epithelium, and had larger nuclei. The diameter of the nuclei per cell layer had significant differences in normal squamous epithelium, but not in dysplastic and transitional epithelia. The proliferative index was greater in dysplastic epithelium when compared to normal and transitional epithelia; staining was observed in the basal and parabasal nuclei in normal and transitional epithelia, whereas staining was observed in all layers in dysplastic epithelium.

Key-Words: larynx, carcinoma in situ, vocal cord, antigen ki-67

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histologia da laringe e das pregas vocais

A laringe é formada por epitélio respiratório, ou seja, epitélio cilíndrico ciliado pseudo-estratificado (Figura 1), pelo o epitélio pavimentoso e estratificado e pelo epitélio de transição por células que sofre diferenciação progressiva das camadas profundas para as superficiais (LE HUCHE; ALLALI, 2005).

As zonas de fortes pressões físicas como a mucosa da face anterior e superior da face posterior da epiglote, a porção superior das pregas ariepiglóticas e a face medial das pregas ventriculares e das pregas vocais são revestidas por epitélio escamoso estratificado não queratinizado (SANTOS *et al*, 2003; FECHNER; MILLS, 1992; MILLS; GAFFEY *et al*, 2000; GALE; PILCH *et al*, 2005).

O restante da laringe é revestido por epitélio respiratório ciliado (Figura 1), cujos cílios ajudam a remover os acúmulos de muco e material estranho da parte inferior do trato respiratório em movimentos na direção das pregas vocais (ZEMPLIN, 2000; LE HUCHE; ALLALI, 2005).

Em um epitélio respiratório ou epitélio cilíndrico ciliado pseudo-estratificado, várias camadas de núcleos sugerem várias camadas celulares, mas na realidade, todas as células estão em contato com a matriz extracelular subjacente (Figura 1) (STEVENS; LOWE, 2001).

O epitélio respiratório da laringe tem camadas com células achatadas na camada basal, com pouca variação nos núcleos e podem variar de espessura e

as células muco serosas podem ser numerosas ou raras (Figura 1) (FECHNER; MILLS, 1992; MILLS; GAFFEY *et al*, 2000).

Normalmente, a laringe tem paraqueratose na superfície, pois com a continuada exposição a agentes irritantes como a fumaça de cigarro leva a focos de paraqueratose (FECHNER; MILLS, 1992; MILLS; GAFFEY; *et al*, 2000).

No epitélio da laringe verificam-se figuras mitóticas na camada basal e sua espessura pode variar com de 5 a 25 células (FECHNER; MILLS, 1992; MILLS, GAFFEY *et al*, 2000).

Já o epitélio pavimentoso e estratificado ou escamoso é composto por várias camadas celulares, de forma que as células superiores do epitélio não estão em contato direto com a matriz extracelular subjacente. As células da camada superficial desse epitélio são achatadas e as células da camada basal e intermediária são piramidais, poligonais ou não achatadas (Figura 2) (STEVENS; LOWE, 2001).

O epitélio escamoso normalmente é não queratinizado, mas aumenta a quantidade com o aumento da idade (STEVENS; LOWE, 2001).

A mucosa escamosa não queratinizada das pregas vocais possui cerca de 5 a 10 células. As glândulas muco serosas são abundantes na supraglote e infraglote, mas são ausentes nas pregas vocais verdadeiras (GALE; PILCH *et al*, 2005).

O epitélio do tipo escamoso estratificado é formado mitoticamente a partir das células mais basais que são levadas, pela proliferação contínua, em direção a superfície do epitélio (STIBLAR-MARTINCIC, 1997).

Segundo Martins, Braz *et al* (2006), o epitélio de revestimento das pregas vocais é composto por várias camadas de células planas e células basais ovais que estão orientados perpendicularmente a superfície e citoplasma escasso (Figura 2).

As células das camadas mais superficiais encontram-se em constante renovação e apresentam microprojeções. O epitélio repousa sobre uma membrana basal que acompanha o seu pregueamento e o separa da lamina própria (Figura 2) (FECHNER; MILLS, 1992; BEHLAU, 2001).

É importante saber que cerca da metade dos sujeitos adultos não fumantes tem partes de epitélio escamoso intercalado com epitélio respiratório na supraglote e infraglote. Nos fumantes, o epitélio respiratório ciliado da laringe é totalmente substituído por epitélio escamoso (FECHNER; MILLS, 1992; MILLS; GAFFEY *et al*, 2000).

O epitélio de revestimento da borda livre da prega vocal corresponde a um epitélio escamoso, enquanto que o epitélio próximo ao ventrículo laríngeo (supraglote) ou a subglote é do tipo respiratório ciliado, com uma região de transição entre eles (COLTON; CASPER, 1996; MELO, 2005).

A junção entre o epitélio respiratório e o epitélio escamoso das pregas vocais pode ser abrupta, mas usualmente há uma zona transitória com variação das diversas células para a largura de 1 a 2 mm (FECHNER; MILLS, 1992).

A zona transitória consiste de células colunares que são gradualmente substituídas por células escamosas imaturas desorganizadas (Figura 3 e 4) (FECHNER; MILLS, 1992; MILLS; GAFFEY *et al*, 2000).

Essa zona metaplásica escamosa imatura é análoga as freqüentes mudanças encontradas no colo uterino (MILLS; GAFFEY; FRIERSON, 2000).

No colo do útero verifica-se que entre o epitélio colunar do canal endocervical e o epitélio pavimentoso do ectocérvix encontra-se a junção escamo-colunar da cérvix, região de transformação propensa a comprometimentos patológicos induzindo um carcinoma, pois nele ocorre: perda do padrão estratificado regular, proporção núcleo-citoplasma elevada e variação de forma e tamanho, aumentando a atividade mitótica. Essas características citológicas são típicas de células malignas e quando estão sem invadir, são conhecidas como carcinoma *in situ* ou neoplasia intra-epitelial (NIC) (STEVENS; LOWE, 2001).

Microscopicamente, esta zona é desorganizada quando comparado ao epitélio escamoso e epitélio respiratório ciliado adjacentes. As células dessa área têm núcleos uniformes com mitoses confinadas à camada basal (Figura 3). O padrão normal pode ser confundido com displasia ou carcinoma *in situ*. (FECHNER; MILLS, 1992; MILLS; GAFFEY *et al*, 2000).

As glândulas muco-serosas (Figura 4) estão presentes abaixo e acima do epitélio escamoso da prega vocal, mas podem estar presente no músculo vocal subjacente (FECHNER; MILLS, 1992; MILLS; GAFFEY *et al*, 2000).

A prega vocal é composta de mucosa e músculo (Figura 5 e 6) (RAMOS, SIMÕES, *et al*, 2005; HIRANO, 1981; HIRANO, 1993). A mucosa é dividida em epitélio escamoso estratificado, em sua borda livre e lâmina própria (RAMOS, SIMÕES, *et al*, 2005). Uma importante estrutura do epitélio é a membrana basal que se encontra em íntimo contato com a lâmina própria. Observam-se pequenos vasos sangüíneos na mucosa da prega vocal, que correm paralelamente à sua borda livre. Não se notam glândulas na mucosa (HIRANO, 1981; HIRANO, 1993).

Hirano (1991) considera o epitélio como uma fina cápsula vibratória capaz de conter a prega vocal durante a fonação. Membrana basal é uma fina camada de matriz extracelular especializada, sintetizada pelas células epiteliais e fibroblastos da lâmina própria. Faz parte do epitélio e representa a transição para a camada superficial da lâmina própria. Juntamente com o arcabouço fibroso da lâmina própria, forma a sustentação da mucosa da prega vocal. É uma estrutura importante para vibração da mucosa, pois, assim como a lâmina própria, promove elasticidade e, ao mesmo tempo, resistência às pregas vocais (GRAY; HIRANO; SATO, 1993; ABRAHAMSON, 1986).

A membrana basal normal não é observada, com detalhes, por meio de coloração pela técnica da hematoxilina-eosina, rotineiramente utilizadas na microscopia óptica (NEVES; NETO *et al*, 2004).

A lâmina própria é subdividida em três camadas (superficial, intermediária, e profunda), com aumento crescente em rigidez: superficial, média e profunda (YAMASHITA, 1997; RAMOS, SIMÕES *et al*, 2005; COLTON; CASPER, 1996; MELO, 2005). Esta estrutura estratificada é para facilitar a fonação (YAMASHITA, 1997).

Segundo Hirano (1975), a prega vocal é uma estrutura composta por cinco camadas; epitélio de revestimento, lâmina própria, com camada superficial, intermediária e profunda e músculo vocal (porção medial do músculo tireoaritenóideo) (Figura 5).

A lâmina própria é composta principalmente por tecido extracelular: fibras elásticas e colágenas, vasos sanguíneos e estroma, (COLTON; CASPER, 1996; MELO, 2005). A camada superficial é uma camada solta e flexível e é denominada de espaço de Reinke, sendo a que mais se desloca e vibra

durante a fonação, apresentando colágeno frouxo, poucas células, alguns fibroblastos e raros capilares. Esse espaço permite o movimento ondulatório do muco sobre as lâminas superficiais, importantes na determinação da qualidade vocal (COLTON; CASPER, 1996; MELO, 2005; RAMOS, SIMÕES *et al*, 2005; HIRANO, 1974; HIRANO, 1993).

A camada superficial contém inúmeras fibras elásticas pequenas, imaturas, compostas predominantemente de *elaunin* e *oxytalan*. Por não se distenderem e por serem mais resistentes ao estresse mecânico, as fibras *oxytalan* seriam mais abundantes na camada superficial (HAMMOND, ZHOU *et al*, 1997). Enquanto, as fibras de *elaunin* concentram-se principalmente na camada intermediária da prega vocal (HAMMOND, ZHOU *et al*, 1997).

A camada intermediária da lâmina própria fica abaixo da superficial é mais densa, composta de fibras elásticas (RAMOS, SIMÕES *et al*, 2005; COLTON; CASPER, 1996; MELO, 2005). A camada profunda é mais rígida, sendo formada por fibras colágenas contendo vasos sanguíneos e tecido linfático difuso (RAMOS, SIMÕES *et al*, 2005; COLTON; CASPER, 1996; MELO, 2005).

A camada intermediária e profunda não define entre si esse limite, sendo chamado então, de ligamento vocal, possuindo um decréscimo de fibras elásticas e um crescimento de fibras colágenas em direção ao músculo vocal (tireoaritenóideo) (RAMOS, SIMÕES *et al*, 2005; COLTON; CASPER, 1996; MELO, 2005; HIRANO, 1974; HIRANO, 1993).

Porém, quando se utiliza a imuno - histoquímica se observa quantidade semelhante de fibras elásticas nas camadas, pois esse procedimento é capaz de identificar todas as formas de fibras elásticas (RAMOS, SIMÕES *et al*, 2005).

A distribuição dessas fibras é longitudinal e paralela a borda livre da prega vocal. Assim como os capilares sanguíneos da borda livre (RAMOS, SIMÕES *et al*, 2005). A lâmina própria da prega vocal é importante na produção da voz (RAMOS, SIMÕES *et al*, 2005).

Na extremidade anterior e posterior da prega vocal, observam-se massas de fibras elásticas, fibroblastos e estroma, denominadas mácula flava anterior e posterior, respectivamente. As máculas flavas são continuação da camada intermediária da lâmina própria e parecem funcionar como amortecedores nas inserções da prega vocal, levando a uma mudança gradual na rigidez da estrutura das cartilagens rígidas para a mucosa flexível. Não se observa glândulas nem vasos calibrosos próximos a borda livre da prega vocal. Na camada superficial, observam-se apenas capilares, enquanto que na intermediária e profunda encontram-se arteríolas, vênulas, pequenas artérias e veias (HIRANO, 1981).

Rosenfield, Miller *et al* (1982) analisou o músculo vocal, através de técnicas de histoquímicas e mostra que este assemelha-se com os demais músculos estriados esqueléticos do corpo humano, mas apresenta uma grande especialização para as funções de fonação e proteção das vias aéreas superiores (função de esfíncter), com características morfológicas e metabólicas únicas.

Do ponto de vista mecânico, as cinco camadas histológicas podem ser reclassificadas em três secções: cobertura, consistindo do epitélio e da camada superficial da lâmina própria, que é a região que vibra durante a fonação, por ser uma estrutura frouxa e flexível; região de transição, representada pelo

ligamento vocal (camada intermediária e profunda) da lâmina própria e o corpo, consistindo do músculo vocal, que é uma estrutura densa, com propriedade contráteis que permitem o ajuste de rigidez e tensão do sistema (Figura 5 e 6) (BEHLAU, 2001; HIRANO; KAKITA, 1985).

1.2 Câncer de Laringe e das pregas vocais

O câncer da laringe é uma neoplasia pouco freqüente, representando 1 a 2% dos tumores malignos do homem. Sua importância se relaciona as modificações que traz ao órgão vocal, tanto pela sua presença, como por procedimentos cirúrgicos terapêuticos, modificando ou mesmo abolindo a voz falada (APRIGLIANO; MELLO, 2006).

Em certos pacientes, essas modificações levam as alterações psicossociais, podendo mesmo comprometer sua qualidade de vida (APRIGLIANO; MELLO, 2006).

O câncer da laringe é responsável por uma incidência de aproximadamente 136.000 novos casos e de 73.500 mortes por ano no mundo.

No Brasil, ocorreram aproximadamente 2.400 óbitos pela doença no ano de 2000, em sua maioria, carcinomas de células escamosas, que representa cerca de 2,7% de todos os casos de câncer e 2,2% dos óbitos por câncer (DIAS; KLIGERMAN *et al*, 2001).

O carcinoma escamoso de laringe é mais freqüentemente encontrado em indivíduos da 6º a 7º década de vida (BARNES; SERTON *et al* , 2001; OHLMS; MCGILL *et al*, 1994; BOUGUOT; KUILAND *et al*, 1991; MILLS; GAFFEY *et al* , 2000).

Eles são mais comuns em homens, embora as mulheres tenham sido cada vez mais afetadas porque tem aumentado a prevalência de fumo entre elas, tendo uma relação de incidência por sexo é de 7:1 (masculino – feminino) (DE RIENZO; GREENBERG *et al*, 1991; MENEZES, HORTA *et al*, 2002; OLIVEIRA; CURADO *et al*, 2001; THOME; THOME *et al*, 2001; DIAS; KLIGERMAN *et al*, 2001; MILLS; GAFFEY *et al*, 2000).

Além disso, a incidência é ligeiramente mais comum na área urbana do que na rural (CATTARUZZA; MAISONNEUVE *et al*, 1996; RAFFEERTY; FENTON *et al*, 2001).

Mundialmente, 10% dos tumores malignos são de cabeça e pescoço. Dentre estes, 90% são carcinomas escamocelular (CEC) (HOSSFELD *et al*, 1993). No câncer de pregas vocais, o tipo carcinoma escamo celular é o mais comumente encontrado (FILHO, 2004).

Segundo Mcquarrie, Gibson *et al* (1986), Rice; Spiro (1989) e Dias, Kligerman (2001), a distribuição relativa dos locais do tumor é de 42% cavidade oral, 25% laringe, 15% orofaringe e hipofaringe, 7% glândulas salivares maiores, entre outros. Dos 25% que acometem a laringe, aproximadamente 2/3 desses tumores surgem na glote e 1/3 acomete a laringe supraglótica. (PARKIN; PISANI *et al*, 1990).

Em um estudo feito sobre a epidemiologia do tumor de laringe no Brasil no período de 1995 a 2000 foi observado que em Recife o risco é de 5 a 10 /100.000 habitantes (FILHO, 2004).

Na dissertação de Mestrado de patologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), na pesquisa de Guerra (1991), a qual utilizou 27 laringes do Serviço de Verificação de Óbitos da (SVO-UFPE) e buscou saber as

diferenças do epitélio das pregas vocais entre fumantes e não fumantes e não verificou diferenças significativas quanto à área do epitélio e a área média dos núcleos. Ela referenciou a dificuldade na coleta por causa das variáveis, já que a faixa etária era de 50 a 68 anos, em homens.

Em outra pesquisa do Mestrado de patologia realizada por Paes (2002) fez um estudo comparativo com 80 laringes, sendo 60 de senescentes e 20 de adultos jovens do sexo masculino retirados do Serviço de Verificação de Óbitos da (SVO-UFPE), observando o comprimento da laringe e das pregas vocais. Em seus achados, houve diferença significativa em relação ao comprimento da porção membranosa das pregas vocais. No grupo senescente constatou assimetria entre as pregas vocais, mas correlação entre o comprimento das pregas vocais. Ela não abordou o fumo ou qualquer outra doença, apenas verificou sexo e idade e excluiu carcinomas ou doenças relacionadas à laringe.

O carcinoma é uma das doenças neoplasias mais comuns observadas na prega vocal. Ele originalmente ocorre no epitélio e invade outras estruturas como a lâmina própria e o músculo. Geralmente ele é unilateral, provocando uma assimetria nas pregas vocais (COLTON; CASPER, 1996; CRUZ; DEDIVITIS *et al*, 2003).

A displasia laríngea é identificada nas pregas vocais verdadeiras, e aparecem na maioria das vezes unilateral, mas pode ser bilateral em 30% dos casos (GALE; PILCH *et al*, 2005; BARNES, 2001; MILLS; GAFFEY *et al*, 2000).

O câncer glótico (pregas vocais) tem como sintoma comum, a rouquidão, responsável pela procura imediata do centro diagnóstico e quando encontrado nessa fase, geralmente são pequenos (OLIVEIRA; CURADO *et al*, 2001;

GALE; PILCH *et al*, 2005; BARNES, 2001; MILLS; GAFFEY *et al*, 2000; CARREY; WENNENBERG, 2001).

1.3 Estadiamento e Tratamento para o carcinoma glótico

O estadiamento pelo sistema TNM da União internacional contra o câncer (UICC) (1989) e da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2005) para o carcinoma glótico é o seguinte:

Para todos os sítios:

pTx – impossibilidade de avaliação do tumor primário

pT0 – sem evidências de tumor primário

pTis – carcinoma *in situ*

T1 – Tumor limitado à (s) corda(s) vocai(s), pode estender a comissura anterior ou posterior, com mobilidade;

T1a – Tumor confinado à uma corda vocal ;

T1b – Tumor compromete ambas as cordas vocais;

T2 – Tumor estende-se á supraglote e/ ou glote, e/ou com mobilidade diminuída da corda vocal;

T3 – Tumor confinado á laringe, com fixação da corda vocal;

T4 – Tumor invade cartilagem tireóide e/ou estende-se a outros tecidos.

Quanto a Linfonodos regionais (N):

NX – linfonodos regionais não podem ser avaliados;

N0 – ausência metástase em linfonodos regionais;

N1 – metástase em um único linfonodo homolateral com 3 cm ou menos sem sua dimensão;

N2 – metástase em um único linfonodo homolateral com mais de 3 cm e ate 6 cm;

N3 – metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua dimensão.

Quanto á metástase à distancia:

MX – não avaliável;

M0 – ausência de metástase à distância;

M1 – metástase à distância

Dependendo do estadiamento existem diferentes indicações cirúrgicas. As laringectomias parciais são indicadas para o câncer glótico T1, T2 ou T3 e as laringectomias totais são indicadas em casos de T4, ao qual ocorre a retirada do órgão (BEHLAU, 2005; PODESTÁ; SÁ, 1994).

As laringectomias parciais podem ser horizontal (transversal) ou vertical (longitudinal). Nas modalidades horizontais, pode ser laringectomias supra glóticas e laringectomia supracricoídea, ocorre a manutenção das estruturas do nível glótico. Já as verticais, classificam-se em cordectomia, com ou sem remoção da cartilagem aritenóide; laringectomia frontal anterior, ressecção da quilha da cartilagem tireóide, com terço anterior de ambas as pregas vocais; laringectomia frontolateral, quando a ressecção é na quilha da cartilagem tireóide, mais uma prega vocal, com ou sem aritenoidectomia; hemilaringectomia, a qual as estruturas ressecadas incluem a comissura anterior, toda prega vocal, com ou sem aritenoíde, ventrículo, prega vestibular e terço anterior da prega contralateral. As laringectomias totais são a remoção de todo arcabouço cartilágneo da laringe, músculos e outras estruturas contidas nele (CAMARGO, 1998).

A cordectomia consiste na ressecção de uma prega vocal, com margem no pericôndrio interno, com ou sem aritenoidectomia. Após a cordectomia, a voz resultante melhora em médio prazo, quando se forma uma fibrose no local da prega vocal ressecada, denominada de neocorda, que passará a atuar como muro de apoio da prega vocal remanescente (BEHLAU, 2005).

Quando essa neoplasia é diagnosticada precocemente, ela é curável, na maioria dos casos, por métodos cirúrgicos, conservadores, irradiação, ou esta combinada à cirurgia e a quimioterapia, com bons resultados quanto à sobrevida do paciente e a preservação de sua voz. As taxas de sobrevida alcançam 90%, independentemente da terapêutica conservadora ser cirúrgica ou radioterápica. O objetivo primordial é a conservação da função laríngea (respiratória e fonatória) e a reabilitação fonoaudiológica limitando as seqüelas terapêuticas (OLIVEIRA; CURADO *et al*, 2001; APRIGLIANO; MELLO, 2006; ARCHER; YEAGER, 1982).

Barnes (2005) refere que o carcinoma glótico pode ter um tratamento conservador por radioterapia com boa sobrevida, associada ou não a quimioterapia.

Para o carcinoma *in situ*, o tratamento é a decorticação, com a remoção da mucosa contendo a área ulcerada. Com menos freqüência, pode-se deparar com lesões que comprometem a mucosa das pregas vocais e nesses casos, a radioterapia pode ser utilizada, quando não é possível ter certeza de que toda lesão foi removida com a remoção da mucosa (BEHLAU, 2005).

O tratamento do câncer das pregas vocais tem sofrido mudanças importantes nos últimos vinte anos, devido tanto à melhoria das técnicas

cirúrgicas, como também um melhor entendimento da disseminação tumoral (GOMES, 2000; HERNANDEZ; MARCHEZAN, 2001).

È realizado por uma equipe multidisciplinar formada por médicos otorrinolaringologistas, enfermeiros, nutricionistas, psicólogos, fisioterapeutas, assistentes sociais e fonoaudiólogos, tendo este último à função de observar e tratar as disfagias comumente encontradas nesses casos e reabilitar a capacidade da comunicação (GOMES, 2000; HERNANDEZ; MARCHEZAN, 2001).

Segundo Aprigliano, Mello (2006), todas as medidas profiláticas em relação ao câncer da laringe são da maior importância.

As principais são: a) o abandono do tabagismo, um dos principais irritantes que leva a transformações no epitélio, com o aparecimento de lesões malignas, b) diminuição do consumo de bebidas alcoólicas, não só pela sua irritante ação local, como também pelo efeito debilitante, c) evitar trabalho em ambiente altamente poluído, d) tratamento de pacientes com lesões laríngeas de potencial maligno, como: hiperqueratose, papiloma do adulto, e) a disфонia ou rouquidão, sintoma mais freqüente nos tumores glóticos (todo paciente que, sem causa aparente, ficar disfônico por mais de duas semanas, f) qualquer dificuldade na deglutição que perdure, como também escarro sangüíneo, são sinais que merecem atenção imediata, g) nódulos ou qualquer endurecimento nos tecidos do pescoço.

1.4 Displasia do epitélio da laringe e pregas vocais

Na laringe, as lesões precursoras são definidas como alterações progressivas do epitélio escamoso até carcinoma *in situ*. Essas alterações mostram uma variedade de mudanças arquiteturais e citológicas que tem sido tradicionalmente agrupada com o termo displasia (GALE; PILCH *et al*, 2005).

A classificação das lesões precursoras mais adotada é a da OMS (2005), mas há outras classificações sendo utilizadas. Uma delas utiliza a nomenclatura (Neoplasia intra-epitelial escamosa - SIN) de forma assemelhada a NIC proposta por Richart (1968) para as neoplasias intra-epiteliais da cérvix uterina. Outra classifica as lesões precursoras como lesão escamosa intra-epitelial (Ljubljana) de forma análoga a classificação do sistema Bethesda para citologia cervico-vaginal (GALE; PILCH *et al*, 2005).

Essa classificação é de autoria de Kambic - Lenart, que optou por usar o sistema de graduação de cérvix, criando em 1971 a classificação em laringe (Ljubljana).

A classificação da OMS (2005) subdivide as lesões precursoras em: hiperplasia de células escamosas, displasia leve, displasia moderada, displasia severa e carcinoma *in situ*. Na classificação que utiliza o termo SIN: displasia leve corresponde a SIN 1; displasia moderada a SIN 2, displasia severa e carcinoma *in situ* a SIN 3. Já na classificação de Ljubljana (lesão escamosa intraepitelial – SIL) subdivide-se em: hiperplasia escamosa simples, hiperplasia das células basal e para basal, hiperplasia atípica e carcinoma *in situ*. Fazendo uma analogia entre as classificações, observa-se que na classificação de

Ljubljana classifica a hiperplasia atípica corresponde a SIN 2 e 3 e a displasia moderada e severa respectivamente.

Neste trabalho adotamos a classificação da OMS dos tumores de cabeça e pescoço (2005). A classificação histológica da OMS (2005) descreve os critérios arquiteturais e citológicos para diagnóstico das displasias que são:

Arquiteturais: estratificação epitelial irregular, perda da polaridade das células basais, forma de gota das papilas do epitélio escamoso, aumento do número de mitoses, mitoses anormais na superfície, queratinização prematura de células escamosas isoladas (disqueratose).

Citológicos: variação anormal do tamanho (anisonucleose) e da forma (pleomorfismo nuclear) dos núcleos, variação no tamanho das células (anisocitose), variação na forma das células (pleomorfismo celular), aumento da razão núcleo/ citoplasma, figuras mitóticas atípicas, hiper cromasia e aumento do número e tamanho dos nucléolos.

O epitélio das lesões precursoras geralmente é espessado, contudo não há evidências de invasão (GALE; PILCH *et al*, 2005).

Na classificação da OMS (2005), tem-se que a hiperplasia é o aumento do número de células, e isso pode estar presente nas células da camada basal/parabasal ou/ e em todas as camadas. Sua arquitetura mostra estratificação regular e não há atipia celular. Já a displasia, um distúrbio arquitetural acompanhado por atipia citológica.

No entanto, é difícil o reconhecimento das primeiras manifestações da displasia, e por isso devem ser observadas todas as características para fazer a distinção consistente entre hiperplasia e as primeiras etapas da displasia, que se dividem em:

- Displasia leve: distúrbio arquitetural limitado ao terço inferior do epitélio acompanhado de atipia citológica e isso define o critério mínimo de displasia.
- Displasia moderada: distúrbio arquitetural que se estende até ao terço médio do epitélio, critério inicial para reconhecer essa categoria. Contudo, consideração no grau de atipia citológica pode requerer reclassificação. Observa-se uma presença maior de núcleos irregulares, com cromatina condensada e nucléolos proeminentes, além de mitoses que estão presentes em 2/3 do epitélio.
- Displasia severa: caracteriza-se por alterações presentes em mais de terços do epitélio mostrando perturbação arquitetural com citologia atípica. Entretanto, se essa perturbação estender-se até a metade do epitélio, mas com citologia atípica, a lesão deveria ser enquadrada com displasia moderada a severa. Observam-se células com disqueratose, mitoses atípicas e com atividade aumentada e com queratinização acima da superfície.

Existe também o carcinoma *in situ*, que se caracteriza pela transformação maligna, todavia sem a existência de fenômenos invasivos. O diagnóstico de carcinoma *in situ* é formado quando há anormalidades arquiteturais acompanhadas por atipia citológica na espessura completa ou quase completa do epitélio. Mitoses atípicas, inclusive na camada superficial são comumente vista no carcinoma *in situ*, mas a lesão não ultrapassa a membrana basal. Esta é uma lesão maligna limitada ao epitélio escamoso da mucosa. Porém, quando pequenos brotos epiteliais partindo da basal invadem a submucosa, ele é denominado carcinoma *in situ* com microinvasão, todavia a classificação da

OMS não estabelece “ponto de corte” para diferenciar um carcinoma microinvasivo do invasivo, tampouco a classificação UICC do sistema TNM.

Uma diferenciação muito importante deve ser feita entre o carcinoma *in situ* e o microinvasivo. O primeiro não ultrapassa a membrana basal do epitélio e o segundo já invade a membrana basal num pequeno foco. Tanto o carcinoma *in situ* quanto a displasia grave, indicam risco de transformação para carcinoma invasivo (SENNES; DOMINGOS *et al*, 2002).

As lesões displásicas ocorridas em cabeça e pescoço, freqüentemente conservam um maior componente de células queratinizadas, mesmo as de alto grau (AGATHANGGELOU; NIEDOBITEK *et al*, 1995). Essas displasias queratinizadas são menos comuns na área ginecológica.

Não se deve definir atipia como sinônimo de presença de displasia, pois ela está presente na inflamação, mas nesse contexto refere-se às mudanças citológicas que podem ou não ter nas lesões pré- malignas (GALE; PILCH *et al*, 2005; MILLS; GAFFEY *et al*, 2000).

Segundo Aprigliano, Mello, (2006), os tumores da região glótica são os mais freqüentes entre as lesões malignas da laringe, de evolução lenta, com principal sintoma, a disfonia.

Queratose

A queratose pode ser presente sem está associada à displasia pode ser vista na mucosa de cabeça e pescoço, mas freqüentemente em áreas preexistentes do epitélio escamoso, mas ocasionalmente sobreposta sobre a mucosa escamosa metaplásica (MILLS; GAFFEY *et al*, 2000).

Na laringe, hiperqueratose é veementemente associado com o fumo e tem predileção pela pregas vocais. Microscopicamente, a queratose é caracterizada por uma mucosa escamosa normal ou de espessura aumentada, com camada celular granular proeminente (MILLS; GAFFEY *et al*, 2000).

A superfície queratinizada não é sugestiva de um melhor prognóstico ou menor risco para subseqüente carcinoma invasivo (MILLS; GAFFEY *et al*, 2000).

A queratinização é mais freqüentemente encontrada no carcinoma escamoso bem ou medianamente diferenciado, mas não pode ser considerada como critério histológico para graduação das displasias (GALE; PILCH *et al*, 2005).

Epitélio com queratose sem displasia carrega um risco muito baixo de progressão para carcinoma invasivo com incidência de 1 a 5%, ao contrário do epitélio com queratose associada à displasia onde há alto risco de evoluir para carcinoma com incidência de 11% a 18% (BARNES, 2001; GALE; PILCH *et al*, 2005; BARNES, 2001).

Norris, Peale (1963) estudaram 30 pacientes com queratose laríngea desprovidos de displasia e notou que apenas um desenvolveu um carcinoma invasivo.

A detecção das displasias da laringe não é importante apenas para prevenir a evolução para carcinoma invasivo, mas também poderia conduzir a uma cuidadosa pesquisa clínica para o carcinoma invasivo. É sabido que carcinomas invasivos descobertos no prazo de seis meses após o diagnóstico de displasia quase certamente estavam presentes no momento da

apresentação inicial, não representando um avanço rápido das lesões displásicas (MILLS; GAFFEY *et al*, 2000).

1.5 Fatores de risco

Os casos de câncer de laringe estão relacionados com o uso do tabaco ou associação deste com o álcool (DIAS; KLIGERMAN *et al*, 2001; APRIGLIANO; MELLO, 2006).

No Brasil, verifica-se que o consumo de bebidas alcoólicas bem como o hábito de fumar tem aumentado progressivamente, sendo cada vez mais precoce, alcançando, também, as mulheres (WAGNER; STEMPLIUK *et al*, 2007; SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS, 2007).

O risco do desenvolvimento do câncer laríngeo é potencializado pela ação sinérgica do fumo e do álcool, aumentando o risco de desenvolvimento desse câncer em cerca de 100% (NORONHA, 1997).

Outros fatores relacionados ao fumo aumentam o risco para o carcinoma escamoso na laringe tais como: o fumo na idade jovem, longa duração, número elevado de cigarros por dia e a profunda inalação da fumaça (BENHAMOU; LARAQUI *et al*, 1992; HEDBERG; VAUGHAN *et al*, 1999).

Carey, Wennenberg (2001), Barnes (2001) e Mills, Gaffey *et al* (2000) referem que a etiologia incluem o tabagismo e abuso do álcool e que o risco de displasia aumenta com o tempo de uso de fumo e/ou álcool

A influência do tabaco é confirmada entre os não etilistas (BURCH; HOWE *et al*, 1981; WYNDER; COVERY *et al*, 1976). Evitar o uso do cigarro e álcool poderia prevenir cerca de 90% do carcinoma de laringe (FARCHI,

1992). Estudos revelaram que o risco de desenvolvimento dessas neoplasias é 14,3 vezes maior em indivíduos que fumam em comparação com os que não fumam (DIAS; KLIGERMAN *et al*, 2001).

Cerca de 90% dos carcinomas epidermóides na região da cabeça e pescoço ocorrem em fumantes e a maioria destes pacientes consome álcool em moderada ou grande quantidade (BRUGUERE; GUENEL *et al*, 1971).

Levando-se em consideração o número de pessoas expostas ao tabaco e ao álcool, existem poucos casos de câncer de cabeça e pescoço e isto sugere que os fatores genéticos são importantes para o desenvolvimento da doença (COOPER; JOVANOVIC *et al*, 1995).

As displasias são lesões reversíveis, após remoção dos fatores de risco, como a retirada do fumo (MILLS; GAFFEY *et al*, 2000; AUERBACH; HAMMOND *et al*, 1970).

Num estudo por Auerbach, Hammond (1970) notou-se que entre os 644 pacientes, 16% eram fumantes e tinham displasia acentuada ou carcinoma *in situ*, 25% ex - fumantes tinham uma leve atipia sem a presença de carcinoma *in situ* e 59% nunca fumaram. Os achados nos ex - fumantes foram semelhantes aos que nunca fumaram e foi concluído que as lesões nos ex- fumantes regrediram após a cessação do tabagismo.

Outros fatores também são citados como responsáveis pelo desenvolvimento de lesões displásicas como: infecções crônicas, exposição ambiental em indústrias, exposição ocupacional com hidrocarbonetos aromáticos e aos asbestos, radiação ionizante, deficiência de vitamina A, distúrbio hormonal, a presença do refluxo gastroesofágico, além do vírus papiloma humano (HPV (GALE; PILCH *et al*, 2005; CAREY; WENNENBERG,

2001; SCHANTZ; YU, 2001; FREIZE; BEATTY *et al*, 1996; MILLS; GAFFEY *et al*, 2000; NORONHA, 1997).

Freize, Beatty *et al* (1996) referem que o refluxo gastresofágico pode atuar como promotor na presença do tabaco e álcool.

1.6 Imuno - histoquímica / Marcador (Ki – 67)

A imuno - histoquímica é o método mais simples para identificação de substâncias presentes nas células tumorais. O método emprega anticorpos dirigidos contra a substância que se pretende identificar. A reação antígeno-anticorpo é revelada por método de coloração, avaliada à microscopia óptica e em material embocado em parafina (INOUE; AMAR *et al*, 2005).

Em relação aos marcadores utilizados para aferição da proliferação celular, o anticorpo anti Ki -67 é considerado, atualmente, o de maior acurácia, sendo analisado em diversos tipos de neoplasias. Identifica-se a presença deste antígeno em tumores embocados em parafina mediante o anticorpo MIB-1 (ISOLAN, 2004).

O Ki-67 é uma proteína não histônica, com peso molecular aparente de 345 a 349 Kd, presente em todas as fases do ciclo celular (exceto G0), sendo sua denominação decorrente de sua identificação em Kiel (Alemanha) na 67ª placa de cultura tecidual, tratando-se de uma IgG₁ de camundongo produzida contra uma fração nuclear da linhagem celular L428 da doença de Hodgkin, alcançando sua maior expressão nas fases G2 e M (GERDES *et al*, 1991; BROWN; GATTER, 1990; SASAKI; MURAKAMI *et al*, 1987).

O marcador tumoral Ki-67 é uma proteína associada à cromatina nuclear que atua na fase ativa do ciclo celular. Sua expressão ocorre apenas nas

células em proliferação, atingindo um pico na fase G2 e não sendo expresso na fase G0 (GERDES; LEMKE *et al*, 1984).

Sendo um antígeno monoclonal, de vida média de uma hora, o cromossomo 10 parece ser aquele envolvido na síntese protéica determinante deste antígeno no ciclo celular (DARZYNKIEWIKZ, 1992; GARRIDO, CORDELL *et al*, 1992; KEY, PETERSEN *et al*, 1993).

Assim, vários trabalhos referenciam o Ki-67 como preditor clínico do comportamento biológico das neoplasias malignas, por estimar o índice de proliferação (GERDES, 1991; SASAKI; MURAKAMI *et al*, 1987).

Outro aspecto que merece ser ressaltado é que o aumento da positividade pelo Ki-67 está associado a mau prognóstico (BARBOSA; ROSAS *et al*, 2003).

Diante da presença de neoplasias indiferenciadas, o Ki-67 é o melhor marcador de proliferação celular atualmente disponível, que se relaciona com o prognóstico do paciente (ALVES, 1999; NEGRÃO; ISOLAN *et al*, 2006).

Ao marcar o comportamento de crescimento populacional, permite estabelecer uma relação direta com o prognóstico, o qual deverá de toda a forma, ser acrescido daquelas células (G0) não marcadas. Alguns autores obtiveram um índice de marcação de 25,09% nas neoplasias indiferenciadas, outros autores referem valores menores para neoplasias diferenciadas como 14% para o carcinoma epidermóide, 13,6% para o adenocístico (MURAKAMI; OHTANI *et al*, 1992).

Isto permite prever a utilização do marcador como diagnóstico diferencial entre neoplasias benignas e malignas, nos pacientes onde a dúvida persiste, em situações que a histopatologia não consegue diferenciá-los.

Vale salientar que o emprego do Ki-67 poderia ser útil como indicador prognóstico das neoplasias malignas em geral e das lesões displásicas.

Num estudo com 128 pacientes com carcinomas de laringe em estágio T2, concluíram que altos valores de Ki-67 se relacionam com melhor prognóstico quando se realiza radioterapia (KROPVELD; SLOOTWEG *et al*, 1998).

Nos últimos anos, o anticorpo monoclonal MIB-1 tem sido bastante utilizado pelos pesquisadores para estudo retro e prospectivo, pela possibilidade de se obter um índice de proliferação de fragmentos tumorais conservados em parafina (FERRARI; ARAÚJO *et al*, 2003).

Segundo Van Dierendonck *et al* (1989), um marcador de proliferação celular deve apresentar os seguintes critérios: a presença contínua do antígeno durante o ciclo celular em todos os tipos de células, e o desaparecimento deste quando a célula passa para um estado não proliferativo.

Em relação a estes critérios, o Ki-67 encontra-se presente em todas as fases do ciclo celular, com exceção de G0, e em todos os tipos de células com capacidade proliferativa. Quanto ao segundo critério, entretanto, existem certas dificuldades na conceituação teórica em definir o que seja uma célula não proliferativa, pois o tempo entre as mitoses pode variar consideravelmente, dependendo das condições do meio extracelular, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Dessa forma, o marcador poderá ser detectado sem a célula de fato encontrar-se em proliferação. No que tange a outro aspecto, o termo marcador de proliferação está se referindo somente ao potencial da célula de se dividir, e não a evento final da divisão celular, pois em um tumor que expresse células imunopositivas para Ki-67, essas podem não se duplicarem quando

submetidas, por exemplo, à quimioterapia, permanecendo a imunomarcacão (VAN OIJEN *et al*, 1998).

Independentemente destes exemplos, é inquestionável que a expressão da proteína Ki-67 e a proliferação celular estão estritamente relacionadas (SCHOLZEN; GERDES, 2000; NEGRAÕ; ISOLAN *et al*, 2006).

Em outras palavras, Ki-67 é, teoricamente, um parâmetro do estado fisiológico da célula, porém, não da sua capacidade de proliferação, pois não fornece informações relativas ao tempo necessário entre as mitoses. Isso se explica pela complexidade dos fatores que atuam no ciclo de uma célula, tanto internos (produtos de genes supressores de tumor, entre outros) quanto externos (quimioterapia, entre outros). Apesar de todas estas considerações, o Ki-67 é considerado o melhor marcador de proliferação, atualmente, porque foi encontrada forte correlação entre este e o prognóstico de diversos tumores (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

Em relação à detecção do Ki-67, no passado o maior empecilho para os estudos referentes a esta proteína era a incapacidade do anticorpo original se expressar em materiais emblocados em parafina. Este fato foi superado com o surgimento do anticorpo monoclonal MIB-1, que tem mais sensibilidade e facilidade metodológica, quando comparado à contagem do número de células em mitose (índice mitótico), e mais especificidade, quando comparado com o PCNA. Este último, de acordo com Prosperi (1997), não é recomendado como marcador de proliferação celular porque se apresenta positivo mesmo em células em G0. Em suma, Ki-67 é considerado o marcador de proliferação celular de maior acurácia, sendo utilizado muitas vezes como fator prognóstico em

neoplasias benignas (SCHOLZEN; GERDES, 2000; NEGRAÕ; ISOLAN *et al*, 2006).

Estrutura e Funções do Ki- 67

Sua função ainda não foi esclarecida, mas acredita-se que o gene Ki-67 mantém a estrutura do DNA organizada durante a mitose (SAWHNEY; HALL, 1992).

O Ki-67 atua na síntese de duas isoformas da proteína Ki-67, uma com 320 kD e outra com 359 kD, relacionadas com a presença ou a ausência, respectivamente, do exon 7 deste gene. Até a presente data, nenhuma outra proteína exibiu similaridade com o Ki-67 (STARBORG *et al*, 1996; SCHOLZEN; GERDES, 2000; KAUSCH, LINGNAU *et al*, 2003).

Apesar de recentes estudos relacionarem a proteína Ki-67 com fenômenos de fosforilação e transporte nuclear, sua função permanece desconhecida. Atualmente, tem sido sugerido que Ki-67 tem um papel crucial na proliferação celular porque a administração de anticorpos contra este antígeno tem diminuído a taxa de divisão celular (STARBORG *et al*, 1996; SCHOLZEN; GERDES, 2000; KAUSCH, LINGNAU *et al*, 2003).

Em relação à expressão da proteína Ki-67 dentro do ciclo celular, Gerdes, Lemke *et al* (1984), analisando detalhadamente a estimulação do ciclo celular de leucócitos sangüíneos mononucleares pela fitohemoglutina, verificou que o antígeno Ki-67 estava presente no final da fase G1 e durante o período total das fases S, G2 e M, estando ausente na fase G0. Alguns autores (LOPEZ, BELLOC *et al*, 1991; DARZYNKIEWICZ, 1992), entretanto, discordam quanto à presença do Ki-67 em G1.

Essa discrepância pode ser esclarecida parcialmente pela hipótese de Du Manoir, Guillaud *et al* (1991), na qual são propostas três diferentes vias em G1. Em uma primeira há diminuição da proteína Ki-67 e a célula, provavelmente, entrará em G0; em uma segunda, sendo a célula estimulada por fatores de crescimento, haverá um aumento do Ki-67 e a célula entrará na fase S. Na última, o Ki-67 encontra-se estável, exibindo intensidade constante durante G1, correspondendo a ótimas condições de proliferação celular.

A intensidade da presença do Ki-67 nas diferentes fases do ciclo celular, ela aumenta durante as fases S e G2, adquirindo máxima intensidade na metáfase e começando a diminuir na telófase. Essas observações são sugestivas do período de atuação do Ki-67 no ciclo celular (DU MANOIR, GUILLAUD *et al*, 1991; DARZYNKIEWICZ, 1992; STARBORG *et al*, 1996).

Em relação à meia-vida da proteína Ki-67 é de, aproximadamente, 90 minutos (HEIDEBRECHT *et al*, 1996). A localização do Ki-67 no ciclo celular depende da fase em que este se encontra, estando presente como numerosos focos no núcleo celular durante G1, no nucléolo durante S e G2, na superfície dos cromossomos durante a metáfase e distribuída difusamente no citoplasma após a quebra da membrana nuclear (DU MANOIR, GUILLAUD *et al*, 1991; STARBORG *et al*, 1996; KILL, 1996).

Entretanto, outros autores (BRAUN; PAPADOPOULUS *et al*, 1988; VAN DIERENDONCK *et al*, 1989) encontraram Ki-67 no citoplasma durante a fase S. Estas discrepâncias podem ser devido aos diferentes protocolos de fixação e técnica imuno-histoquímica, bem como aos diferentes tipos celulares utilizados nestes estudos (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

Por fim, a atividade proliferativa pode ser avaliada por imuno- histoquímica usando o anticorpo monoclonal para o antígeno Ki-67 (MIB-1), que marca proteína não histona presente no núcleo das células em ciclo. Assim sendo, o índice de proliferação é expresso pela porcentagem de células positivas para Ki-67 em cada tumor (LIMA; FILHO *et al*, 2003).

1.7 Análise digital de imagens em Patologia

No apoio à interpretação dos resultados obtidos pela histopatologia e imuno-histoquímica de células tumorais, os sistemas computadorizados de análise de imagens tem fornecido dados qualitativos e quantitativos mais refinados e objetivos esclarecendo assim, vários aspectos histomorfométricos das neoplasias (DERMIRKAYA , 1999).

A computação digital tem trazido grandes benefícios na armazenagem, discriminação e estudo estatístico de dados numéricos. A habilidade do computador em apresentar gráficos complexos, avaliar padrões de cor e armazenar imagens, tem sido amplamente utilizada nas análises morfométricas de padrões histológicos e citológicos (HAMILTON; ALLEN, 1997; LAMBERT; LAPIDUS *et al*, 2001).

Várias técnicas morfométricas foram elaboradas durante as últimas décadas com a expectativa de introduzir na prática de patologia critérios objetivos e reprodutíveis concernentes ao diagnóstico e ao prognóstico de doenças. Todavia, os estudos quantitativos não foram, inicialmente, considerados práticos, em face da complexidade das técnicas e ao longo tempo envolvido no processo (BARTELS; THOMPSON, 1994).

O desenvolvimento de métodos para processamento de imagens tem facilitado aos interessados em extrair cada vez mais informações devido a capacidade de se realçar, excluir e delimitar certas características obtidas pela imagem digital. Estas imagens digitais são representadas por uma matriz cujos elementos são chamados pixels (*picture elements*) que representam a unidade fundamental de análise de uma figura através de tonalidades específicas de cor (SYNOPSIS, 1996).

Com o advento dos programas computacionais especializados em análise de parâmetros microscópicos, cada vez mais esta prática tem se tornado freqüente nos laboratórios seja para pesquisa ou diagnóstico de rotina (HAMILTON; ALLEN, 1997; BARBOSA; JUNIOR, 2001).

As vantagens da mensuração das estruturas biológicas na histopatologia incluem: 1) diminuição da variabilidade na quantificação dos aspectos celulares e teciduais, 2) promoção de uma escala numérica e reproduzível dos aspectos qualitativos, 3) aumento da sensibilidade na detecção de alterações mínimas, 4) avaliação dos efeitos de diferentes métodos de processamento histológico, 5) emprego no controle da qualidade, 6) determinação de forma e tamanho e padrão para ensino e diagnóstico, 7) maximização como ferramenta de pesquisa (HAMILTON; ALLEN, 1995; TRUE, 1996).

Através da análise computadorizada de imagens podem ser processadas medidas lineares, contagem de objetos, determinação de forma, estereologia, além de mensurações mais complexas e multiparamétricas (BARTELS; THOMPSON, 1994; TRUE, 1996; OBERHOLZER; OSTREICHER *et al*, 1996).

Estes novos parâmetros tem servido como auxiliares no diagnóstico de neoplasias dos mais variados tipos (HERMAM, 1996; WALDMAN; SAUTER *et al*, 1996; NOVIK, 2000; RUNEGNI; CEVENINI *et al*, 2001).

Avaliações histológicas através da Imuno-histoquímica (WEINBERG, 1994), imunofluorescência (WAGGONER *et al*, 1996), densitometria do DNA (COHEN, 1996) e reconstrução tri- dimensional de estruturas (WHIMSTER; COOKSON, 1995) conjugadas a métodos morfométricos computadorizados, tanto no modelo experimental murino (FIGUERÊDO; SILVA *et al*, 1999), como em seres humanos (MAIA; FIGUEREDO-SILVA *et al*, 1999) tem fornecido resultados mais precisos e completos para as mais diversos tipos de alterações morfológicas nos tecidos.

Através da captação de imagens histológicas pelo computador novas aplicações têm surgido no intuito de agilizar o fluxo de informações sobre temas e problemáticas no campo da interpretação das diversas alterações morfológicas e até bioquímicas dos ambientes celulares durante as mais variadas situações de estresse, resultando em mais precisão aos resultados obtidos (RASHBASS, 2000; FURNES; RASHBASS, 2000; PETERSEN; WOLF *et al*, 2000).

A seleção de imagens histológicas registradas pelo computador tem servido para o ensino através da criação de sistemas de instrução computadorizada como: roteiros de apoio ao diagnóstico do melanoma, carcinomas basocelulares e sistema de estadiamento de tumores segundo o critério TNM (MASSAD; BOHM *et al*, 1998).

Esta opção metodológica tem se apoiado cada vez mais em novas tecnologias permitindo a troca de informações e resultados de estudos em

tempo real através da captação de imagens utilizando-se da rede mundial de computadores/*Internet* (EUSEBI; ROSHINI *et al*, 1997; STRAUCHEM, 2000; DEMARTINES; BATTEGAY *et al*, 2000).

No Programa de Pós Graduação em Patologia da UFPE, a morfometria tem sido largamente utilizada como método investigativo com várias teses publicadas desde 1984 (Ver neves MTW: Estudo morfométrico dos folículos linfáticos do baço na esquitossomose hepato-esplênica, orientada por Carvalho ARL).

Dois métodos básicos para realizar as medições aplicando-se sistemas computacionais são: sistema interativo de análise de imagens de um operador para definir as estruturas de interesse usando cursores ou canetas digitais; sistema automático de análise de imagens que através de vídeo câmera acoplada captura as imagens histológicas para serem armazenadas na memória do computador (HAMILTON, ALLEN, 1997, LAMBERT *et al* , 2001).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Caracterizar a displasia acentuada/carcinoma escamocelular *in situ* nas pregas vocais em seu aspecto histopatológico, morfométrico e índice proliferativo (Ki - 67).

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

Comparar cada epitélio escamoso displásico do grupo caso com o epitélio escamoso normal e de transição dos respectivos casos controles, em relação:

- aos aspectos citológicos e arquiteturais;
- á área ocupada por cada tipo de epitélio por μm^2 determinada por análise morfométrica;
- á média do diâmetro dos núcleos das células epiteliais em toda espessura do epitélio, avaliado por morfometria
- á média do diâmetro dos núcleos das células epiteliais nas camadas basal/parabasal; intermediária e superficial, determinado por morfometria;
- ao índice proliferativo (Ki-67) determinado por imuno-histoquímica e análise quantitativa (densidade dos núcleos corados por área), bem como localização dos núcleos marcados em relação as camadas do epitélio.

MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Tipo de Estudo:

O Estudo é do tipo retrospectivo, observacional do tipo caso-controle.

3.2 Seleção do material:

Grupo Caso:

Proveniente do banco de dados informatizado e do arquivo de blocos e preparações histológicas do Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP).

No período de janeiro de 1994 a dezembro de 2006 foram diagnosticados 1400 casos, em material de biópsias e peças cirúrgicas de laringe: 1374 casos de carcinoma escamocelular invasivo de laringe, quatro casos de carcinoma *in situ* da laringe, 10 de displasia acentuada da laringe, dois casos de carcinoma *in situ* de pregas vocais e 10 casos de displasia de pregas vocais, estes últimos assim distribuídos: quatro casos de displasia acentuada, quatro casos de displasia moderada e dois casos de displasia leve.

Foram aplicados os seguintes critérios de inclusão para presente pesquisa:

- 1) Diagnóstico de lesão escamosa intra-epitelial de alto grau (displasia acentuada e carcinoma escamocelular *in situ*) limitados exclusivamente às pregas vocais.
- 2) Casos que não tiveram diagnóstico de invasão ao exame clínico ou no acompanhamento posterior, por um período de até um ano após a biópsia inicial.

3) Existência de material embocado em parafina em quantidade suficiente para a realização de exame imuno-histoquímico e recortes corados em HE, quando necessários.

Essa seleção resultou em cinco casos correspondentes a cinco pacientes do sexo masculino, tabagistas e etilistas com idade de 53, 55, 72, 81 e 85 anos, todos com diagnóstico histopatológico de displasia acentuada/ carcinoma escamocelular in situ das pregas vocais, os quais constituíram o grupo caso.

Os casos foram revistos pelas pesquisadoras e analisados de acordo com os critérios estabelecidos na classificação histológica da OMS dos tumores de cabeça e pescoço (2005).

Grupo controle:

O grupo controle consistiu em preparações histológicas de prega vocal obtidas de peças de laringe dissecadas no Serviço de Verificação de Óbitos (SVO), da Secretaria Estadual de Saúde e Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), a partir de quatro corpos necropsiados, no período de novembro de 2007 à fevereiro de 2008, com idades de 52, 63 e 78 anos (2 casos).

A seleção do grupo controle obedeceu aos seguintes critérios de inclusão: indivíduos do sexo masculino, não fumante e não etilistas, em faixa etária semelhante aquela do grupo caso, com ausência de lesões macroscópicas da laringe e pregas vocais. A retirada das laringes foi autorizada pelos familiares após a assinatura do termo de consentimento livre e

esclarecido, os quais também forneceram as informações relacionadas à idade e ausência de tabagismo e etilismo (Anexo 2 e 3) .

Das quatro laringes, apenas duas foram utilizadas como grupo controle por corresponderem a indivíduos com idade de 52 e 78 anos, mais aproximados das idades dos pacientes no grupo caso.

O indivíduo nº 1(52 anos) foi utilizado como controle dos casos nº 1 e 2 de 53 e 55 anos, respectivamente; o indivíduo nº 2(78 anos) foi utilizado como controle para os pacientes nº 3, 4 e 5, de 72, 81 e 85 anos, respectivamente.

3.3 Procedimento macroscópico das peças de laringe do grupo controle

Durante a necropsia do cadáver, a laringe foi removida através da incisão na pele da região torácica alta e levantamento do retalho cutâneo tóraco-cervical pelo técnico responsável. A laringe foi removida em bloco após secção sobre o osso hióide superiormente e ao nível do quarto anel traqueal inferiormente. Logo após a remoção da laringe, foi realizada na sala de necropsia do SVO a dissecação da laringe com a utilização de material básico apropriado para dissecação constando de bisturi, tesoura e pinça.

As laringes foram dissecadas e fixadas em formolaldeído a 10%. Após sete dias foi realizado corte pela face posterior, para melhor retirada das pregas vocais, (Figura 7). Procedeu-se a cortes coronais, perpendiculares a prega vocal (Figura 8) (MARCELINO; OLIVEIRA, 2005).

O material foi levado ao Laboratório de Histotecnologia do Programa de Pós Graduação em Patologia da UFPE e processado como de rotina, corado pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE).

Foram selecionados as lâminas histológicas e respectivos blocos de parafina que continham representação do epitélio escamoso, do epitélio de transição e do epitélio colunar pseudo-estratificado ciliado (epitélio do tipo respiratório).

3.4 Estudo imuno - histoquímico:

As reações imuno - histoquímicas foram processadas em laboratório privado de imuno - histoquímica (Imunopat – Recife-PE), tanto no grupo caso como no grupo controle. Utilizou-se o anticorpo anti Ki-67 (Clone MIB-1, DAKO). O exame imuno - histoquímico foi realizado pela técnica peroxidase-antiperoxidase (PAP). Esta consiste nas seguintes etapas: foram obtidos cortes histológicos de 3µm do material embocado em parafina correspondente as lâminas histológicas escolhidas anteriormente, sendo esses estendidos sobre lâminas silanizadas. As amostras foram submetidas à desparafinização em xilol com duração de dez minutos cada e a desidratação do material com etanol absoluto e, na seqüência, banho de dez minutos.

Seguiu-se a recuperação antigênica em solução a base de citrato em calor úmido e o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As lâminas foram incubadas com anticorpo primário (Ki-67) no processamento de revelação pelo streptoavidina-biotina marcada. Utilizou-se

na revelação o cromógeno diaminobenzidima - 4 HCl (DAB) para evidenciar a positividade da reação.

Utilizou-se cortes histológicos de linfonodos normais para controle externo da técnica de imuno - histoquímica.

3.5 Análise morfométrica

A análise quantitativa foi realizada utilizando-se o programa *Scion Image Beta* 4.0.2 com fotomicrografias, capturadas por microcâmera acoplada a microscópio óptico *Olympus BX41* e transferidas ao computador através de um *software* de captura de imagem, ATI-Tv Player (DUARTE et al, 2006).

A fundamentação teórica para a utilização da estereologia foi obtida nos textos de Weibel (1979), Baak, Oort (1983) e Elias, Hyde(1983).

A mensuração e as contagens foram feitas pelas pesquisadoras.

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- 1) Média da área ocupada pelo epitélio displásico (grupo caso).
- 2) Média da área ocupada pelo epitélio escamoso maduro e epitélio de transição (grupo controle).
- 3) Média do diâmetro dos núcleos no epitélio displásico, de transição e escamoso normal na espessura do epitélio como um todo.
- 4) Média do diâmetro dos núcleos das células epiteliais displásicos (grupo caso) no 1/3 inferior, área intermediária e superficial do epitélio.
- 5) Média do diâmetro dos núcleos das células epiteliais no epitélio escamoso maduro e no de transição (grupo controle) nas camadas basal/parabasal, intermediária e superficial.

6) Número de núcleos com imunopressão do Ki-67 (densidade dos núcleos corados) no epitélio displásico (grupo caso).

7) Número de núcleos com imunopressão do Ki-67 (densidade dos núcleos corados) no epitélio escamoso maduro e no de transição (grupo controle).

Para mensuração da área dos epitélios displásicos (grupo caso), de transição e escamoso maduro (grupo controle) utilizou-se fotomicrografias tomadas no aumento de 40x (Figura 9) e capturadas pela microcâmara acoplada a microscópio óptico.

A mensuração do diâmetro foi realizada no maior e menor eixo dos núcleos em fotomicrografias tomadas no aumento de 400 x e capturadas conforme descrito acima.

Foram medidos 10 núcleos em cada camada (basal/ parabasal; intermediária e superficial) tanto no grupo controle como no grupo caso (Figura 10,11,12 e 13). Os dados foram anotados em ficha-padrão (Anexo 4).

A contagem do número de núcleos com imunopressão do Ki-67 foi realizada após seleção das áreas com maior número de núcleos corados verificada no aumento de 40X. Após a marcação da área (Figura 14 A), procedeu-se a contagem dos núcleos corados no aumento de 400X (Figura 14 B e 15) (Anexo 5). Foi anotado, ainda, a localização dos núcleos corados, na espessura do epitélio (superficial, intermediária e basal/parabasal).

O cálculo da densidade de núcleos corados Ki- 67 foi feito utilizando a seguinte fórmula:

$$Dnc = \frac{Nnc}{Anc}$$

Onde:

Dnc= Densidade de núcleos corados por Ki-67

Nnc- número de núcleos corados por Ki-67

Anc = Área ocupada pelos núcleos corados por Ki-67 μm^2

Os dados foram anotados numa ficha-padrão (anexo 5).

3.6 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao estudo estatístico utilizando os testes paramétricos ANOVA para a comparação entre as médias oriundas de grupos diferentes com relação ao diâmetro dos núcleos por camada, seguido do teste de Turkey.

Para comparação das áreas, média do diâmetro dos núcleos das células epiteliais em toda espessura e da densidade de núcleos corados pelo Ki-67 nos diferentes epitélios, em amostras independentes (uma só variável, comparações múltiplas), foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, e quando havia significância, seguia-se com o teste de Dunn para área e t - Student Newman-Keuls para densidade. Em todos os casos foi considerado como nível de significância um valor de $p < 0,05$ para rejeição da hipótese nula. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o programa Bioestati 5.0.

3.7. Considerações éticas:

A presente pesquisa foi submetida previamente ao Comitê de Ética do Hospital de Câncer de Pernambuco e aprovada conforme o protocolo de nº21/2007. No projeto consta a declaração de permissão do chefe do departamento de Patologia (UFPE) para realização da coleta do grupo controle no Serviço de Verificação Óbitos (SVO). As informações de cada paciente foram preservadas, os nomes mantidos em sigilo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Características da amostra

O grupo caso caracterizou-se por cinco amostras de pacientes com idades de 53, 55, 72, 81 e 85 anos, com média de 69,2 anos \pm 14,67. Todos os pacientes eram do sexo masculino, tabagistas e etilistas. Quatro residiam na região metropolitana do Recife (Paulista, Olinda e Recife) e um residente na cidade de Panelas, com profissões variadas (motorista, vigilante, telegrafista, agricultor e aposentado).

O sintoma clínico em todos os casos foi o de rouquidão. Foram submetidos à laringoscopia direta e biópsia por lesão na prega vocal direita em três casos e na prega vocal esquerda em dois casos.

Três pacientes foram tratados apenas com radioterapia e dois submetidos a radioterapia associada a laringectomia parcial (cordectomia), em um caso, e, a laringectomia total em outro, realizada aos 18 e 13 meses após o diagnóstico, respectivamente.

O grupo controle correspondeu a duas amostras de indivíduos do sexo masculino com idade de 52 e 78 anos, com média de 69,3 \pm 15,01 anos, não fumantes, não etilistas. Ambos residentes na região metropolitana do Recife, aposentados. A certidão de óbito registrava como causa de morte em ambos: cardiopatia e enfarte agudo no Miocárdio.

A distribuição etária do grupo caso e grupo controle pode ser vista na tabela 1.

O Total de casos do estudo correspondeu a 0,35% do total de câncer e displasias de laringe diagnosticados no período.

Tabela 1: Distribuição dos casos e controles quanto à idade (anos)

Grupo caso (cinco)	Grupo controle (dois)
53	52
55	52
72	78
81	78
85	78

4.2 Descrição histopatológica do epitélio escamoso displásico (grupo caso):

O epitélio escamoso displásico das amostras dos cinco casos estudados, de um modo geral, caracterizou-se por aumento da espessura (Figura 9 C) em comparação com o epitélio escamoso normal e de transição do grupo controle (Figura 9 A, 9 B). Notou-se ainda hipercelularidade em todos os casos (Figura 16 a 20) com queratinização ou paraqueratose na superfície (três casos) (Figura 17 A e 20 A, respectivamente).

Percebeu-se perda da maturação das células escamosas com núcleos aumentados e preponderantes em toda espessura do epitélio, com variação de forma e tamanho e hipercromáticos (Figura 16 a 20). As mitoses estavam presentes em vários níveis do epitélio e em número aumentado (Figura 20 C).

4.3 Descrição histológica do epitélio escamoso normal e de transição (grupo controle):

As amostras dos controles apresentavam epitélio escamoso de espessura normal (controle nº 1, 52 anos) (Figura 21 A, B, C) ou delgado, hipotrófico (Controle nº 2, 78 anos) (Figura 21 D).

A maturação estava preservada, no controle nº 1 (52 anos), isto é, núcleos maiores nas células da camada basal e para-basal e núcleos progressivamente menores com citoplasma acidófilo dominante nas células superficiais (Figura 21 A e B). Todavia, notou-se perda da maturação superficial no controle nº 2 (78 anos) dada a hipotrofia do epitélio (Figura 21 D).

Já o epitélio de transição não mostrava diferença aparente na espessura, em relação ao epitélio escamoso maduro, todavia, os núcleos eram preponderantes em toda espessura do epitélio, porém uniformes, sem pleomorfismo e com cromatina delicada. Não foram observadas mitoses. (Figura 22 A e B).

4.4 Análise Morfométrica dos epitélios

4.4.1 Comparações das áreas dos epitélios

O epitélio displásico apresentou diferença significativa nas médias das áreas em relação ao epitélio escamoso normal e de transição (Gráfico 1). A média das áreas do epitélio de transição foi menor que do epitélio escamoso normal, todavia, essa diferença não foi significativa. A média do epitélio de

displásico foi de 675.567,605 μm^2 , epitélio escamoso maduro foi de 108.600,766 μm^2 e o epitélio de transição foi de 69.248,666 μm^2 .

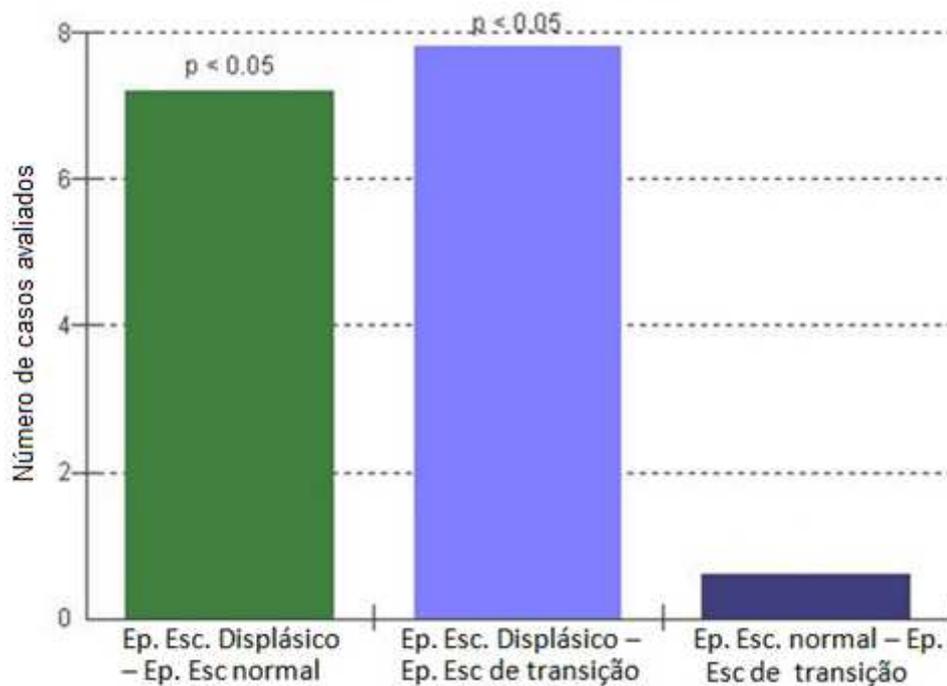


Gráfico 1: Área (μm^2) – diferença significativa entre as médias dos epitélios

4.4.2 Diferenças entre as médias do diâmetro dos núcleos nos epitélios displásico, de transição e escamoso normal

Houve diferenças entre as médias dos diâmetros dos núcleos, tanto entre o epitélio escamoso displásico (média 8,55 μm^2) com o escamoso normal (média 6,55 μm^2), como entre o escamoso displásico e escamoso de transição (média 7,30 μm^2) e entre o escamoso normal e escamoso de transição.

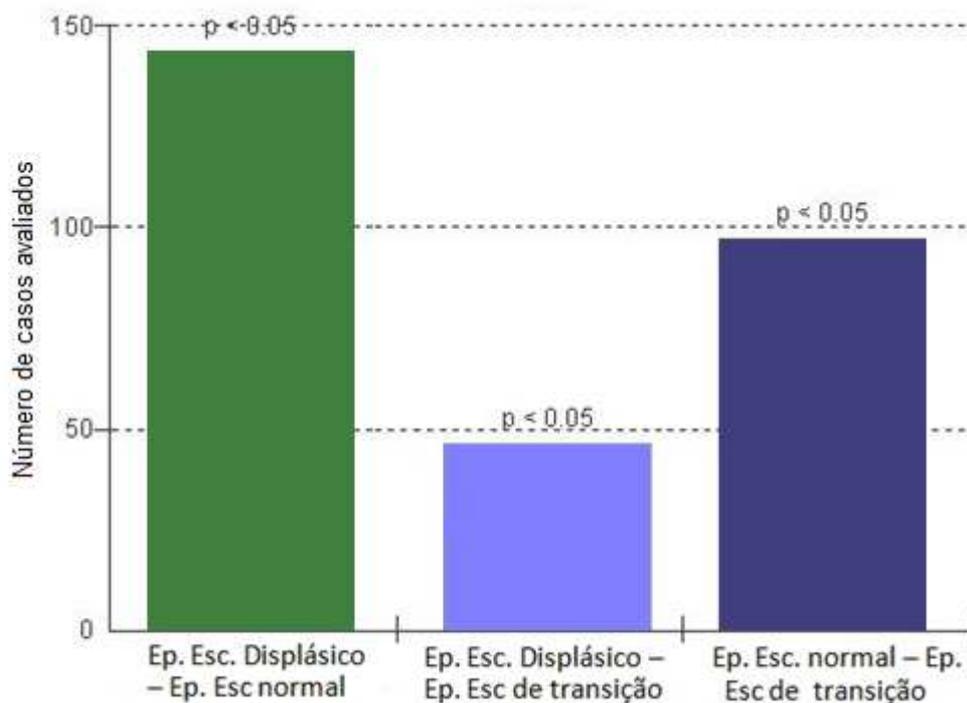


Gráfico 2: Diâmetro (μm) – diferença significativa entre as médias dos epitélios

4.4.3 Diferenças entre as médias do diâmetro dos núcleos por camada entre os diferentes epitélios

Foi analisada a média do diâmetro dos núcleos no epitélio escamoso displásico, escamoso normal e escamoso de transição, avaliada separadamente nas camadas basal/parabasal, intermediária e superficial.

Verificou-se que não houve diferenças significativas entre as médias dos diâmetros da camada basal entre os epitélios estudados e médias dos diâmetros dos núcleos da camada intermediária.

Observou-se significância apenas entre a média do diâmetro dos núcleos da camada superficial nos epitélios escamoso displásico em comparação ao epitélio escamoso normal do grupo controle, com predomínio de núcleos maiores nos casos de displasia acentuada/ carcinoma *in situ*, em

comparação com os núcleos da camada superficial do epitélio escamoso normal.

4.4.4 Diferenças entre as médias do diâmetro dos núcleos nas diferentes camadas de um mesmo tipo de epitélio.

Não houve diferença no diâmetro dos núcleos das células epiteliais entre as camadas do epitélio escamoso displásico e o epitélio escamoso de transição. Todavia, no epitélio escamoso normal verificou-se diferença significativa entre o diâmetro do núcleo da camada intermediária (média 7,95 μm) e a superficial (média 5,71 μm) e entre a camada basal (média 6,01 μm) e a intermediária (média 7,95 μm).

4.5 Índice proliferativo (índice Ki-67)

Em relação à densidade dos núcleos corados pelo Ki-67, verificou-se que o epitélio escamoso displásico tinha sempre núcleos corados em maior quantidade por área (Figura 23 a 27), com média de 23,4 núcleos corados no epitélio displásico e dois, tanto no epitélio escamoso normal como no epitélio de transição. Essa diferença foi significativa entre o epitélio displásico e o escamoso normal e de transição.

No epitélio escamoso normal e de transição predominou áreas com pouco ou nenhum núcleo corado (Figura 28 A e B, 29 A, B, C respectivamente). Os núcleos corados estavam presentes apenas na camada basal/ para-basal no epitélio escamoso normal e no epitélio escamoso de transição.

No entanto, não houve diferença significativa entre o epitélio escamoso de transição e escamoso comum quanto ao número de núcleos corados.

Tabela 2: Média de núcleos corados (Ki-67) por epitélio

Epitélio	Escamoso	Epitélio	Escamoso	Epitélio	Escamoso
displásico		Escamoso normal		de transição	
	23,4		2		2

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 Características da amostra

No estudo verifica-se que todos os pacientes com displasia acentuada eram do sexo masculino, com idade variando de 53 a 85 anos e média de idade de 69,2 anos. Estes dados estão de acordo com a literatura, já que as estatísticas do Brasil estimam que a incidência do câncer de cabeça e pescoço é maior entre homens do que nas mulheres, numa razão de 5:1 e a faixa etária acima de 50 anos de idade é a mais acometida (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2001; ABDO; GARROCHO *et al*; 2002; FILHO, 2004; MOREIRA; CESSE, 1993).

As lesões ocorreram na prega vocal direita em três casos e na esquerda em dois casos. A literatura tem mostrado lesão unilateral na maior parte dos casos, todavia pode ocorrer bilateralmente em cerca de 30 % dos pacientes (BARNES, 2001).

Uma característica evidente é a presença de tabagismo e de etilismo no grupo caso, hábitos comuns nesse tipo de enfermidade (CURIONI; CARVALHO *et al*, 2002; APRIGLIANO; MELLO, 2006).

É sabido que o álcool isoladamente não pode ser responsável pela fase iniciadora de carcinogênese, mas pode promovê-la ao potencializar os efeitos carcinogênicos do tabaco. (MACPHERSON *et al*, 2003).

Todos os pacientes do grupo caso realizaram a laringoscopia e biópsia, procedimento necessário para saber a extensão da lesão e pode determinar a melhor terapêutica, com mínimo de disfunção e máximo de qualidade de vida após o tratamento (CURIONI; CARVALHO *et al*, 2002).

A realização de traqueostomia em pacientes submetidos a laringectomias fornece mais segurança pela manutenção da permeabilidade das vias aéreas superiores. No entanto, pode estar relacionada a uma maior morbidade, como fonte de contaminação, além de retardar a introdução de dieta por via oral e aumentar o tempo cirúrgico (COSTA; DUPRAT *et al*, 2004).

A displasia acentuada/ carcinoma escamocelular *in situ* limitado às pregas vocais é pouco comum, particularmente em Hospital público como no presente trabalho. Pode-se notar que em um total de 1400 casos de carcinoma de laringe/ pregas vocais, tivemos apenas cinco casos de displasia acentuada/carcinoma escamocelular *in situ* limitados à prega vocal, após utilizados os critérios de exclusão. Esse total correspondeu a apenas 0,35% do total de câncer diagnosticados no período de doze anos (1994-2006).

Esse dado deve-se, principalmente, ao fato da maior parte dos pacientes chegarem ao Departamento de Cabeça e Pescoço do HCP já em estadio avançado da doença. A literatura nacional tem mostrado o mesmo tipo de problema, como conseqüência é também relativamente pequeno o número de trabalhos que tratam das lesões intra-epiteliais escamosas na prega vocal.

Em estudo retrospectivo com 1055 casos de câncer de laringe, detectados em período de 35 anos (1955-1990), verificou-se que apenas 54 foram pacientes portadores de carcinoma *in situ* ou microinvasor da prega vocal, onde 30 casos eram de carcinoma *in situ*, 19 de carcinoma *in situ* com microinvasão e cinco apresentavam pequenas lesões invasivas, limitadas ao terço médio das pregas.(APRIGLIANO; MELLO, 2006).

Wenig (2008) descreveu um caso semelhante aos descritos na presente pesquisa. Tratava-se de indivíduo também do sexo masculino, de 67 anos com

sintoma de rouquidão, cuja lesão apresentou-se sobre forma de placa leucoplásica plana de prega vocal.

Junior, Buzaid (2006) referiram a utilização de terapia fotodinâmica (PDT), em oito pacientes com carcinomas. Apenas um desses casos correspondeu a carcinoma *in situ* de laringe, os outros corresponderam a carcinomas basocelulares de pele, carcinoma escamocelular/ displasias graves de pele (doença de Bowen), um carcinoma escamocelular de borda de língua, uma carcinoma *in situ* de recesso piriforme.

Outra pesquisa envolveu 24 pacientes portadores de lesões glóticas comprometendo a comissura anterior, os quais foram submetidos a laringectomia frontal anterior (Técnica de Tucker) entre os anos de 1991 e 2003. Desses casos, 22 apresentavam carcinoma epidermóide nos estádios T1b e T2 (95,2%) e apenas dois casos corresponderam a carcinomas *in situ* (4,8%). (CAMPOS, REIS *et al*, 2004).

No artigo de Dedivitis (2008) percebe-se que foram encontrados 24 casos classificados como carcinoma glótico *in situ* e carcinoma escamocelular glótico estadiado como T1, nos anos de 1996 a 2003. O autor não cita quantos casos de carcinoma *in situ* havia dentro dos 24 casos encontrados, no entanto referiu que para essas lesões recomendava-se a realização de cordectomia endoscópica. A radioterapia exclusiva foi oferecida como opção aos pacientes. Esse estudo tinha como objetivo avaliar o resultado oncológico e complicações de pacientes após a laringectomia parcial.

Na pesquisa de Haddad, Abrahão *et al* (2006) foram encontrados, no período entre janeiro e maio de 2004, 15 pacientes, 12 do sexo masculino e três do feminino, submetidos à cordectomia com laser de CO₂, por

apresentarem carcinoma escamocelular inicial de prega vocal. Os casos foram estadiados como Tis e T1 de prega vocal. Os carcinomas *in situ* corresponderam a apenas três casos.

Como se pode notar a literatura é muito pobre no que se refere às displasias acentuada / carcinoma *in situ* da prega vocal e o número de casos é bem reduzido, mesmo quando avaliados longos períodos de tempo. Do mesmo modo, não encontramos muitos estudos utilizando histomorfometria e/ ou avaliando o índice proliferativo (Ki-67).

5.2 Aspectos histopatológicos e correlações com lesões displásicas da cérvix uterina

Na rotina do patologista geral, é baixa a prevalência das lesões displásicas da prega vocal, em contraste com o grande número de lesões escamosas intra-epiteliais da cérvix uterina. Assim, é comum que os patologistas freqüentemente utilizem os mesmos critérios usados para graduar as lesões do colo uterino na interpretação das lesões do trato aero-digestivo superior, por estarem muito arraigados na sua memória visual.

Embora, de fato, as alterações sejam semelhantes há algumas diferenças que podem afetar a correta avaliação e o diagnóstico histopatológico dessas lesões no trato aerodigestivo superior. Por isso, consideramos importante a descrição detalhada das displasias da prega vocal e dos aspectos histológicos do epitélio escamoso normal, sobretudo o de transição.

Na laringe e pregas vocais, as lesões displásicas são freqüentemente acompanhadas de hiperqueratose, paraqueratose e alongamento das papilas

do epitélio escamoso em direção à submucosa. A queratinização e maturação superficial que pode ocorrer nesses casos, podem levar a uma graduação subestimada do grau da displasia na prega vocal, desde que, no colo uterino, queratinização e paraqueratose não são freqüentes e quando ocorrem associam-se a maturação superficial e são graduadas como displasia moderada (NIC 2) ou leve (NIC 1), de acordo com o nível de comprometimento das camadas do epitélio escamoso.

Embora a classificação da OMS (2003) para lesões da cérvix uterina permita o diagnóstico de lesão escamosa de alto grau (NIC 2 ou NIC 3) em lesões com maturação na camada superficial e até intermediária, mas com atipia significativa e mitoses anormais no terço inferior do epitélio, isso não é comumente visto. Já na laringe e pregas vocais, a qualidade das alterações citológicas parece ser mais valorizada que o nível do epitélio envolvido, a exemplo do caso descrito por Wenig (2008) diagnosticado como “displasia severa queratinizante”, cujas alterações limitavam-se as camadas profundas, nas áreas de alongamento das papilas do epitélio escamoso.

No nosso material, pode-se notar queratinização no caso nº 3 (Figura 23 A) e paraqueratose associada à alguma maturação superficial no caso nº 1 (Figura 26 A) e maturação superficial exclusivamente no caso nº 5 (Figura 25 A). Apesar da existência da maturação superficial nos casos nº 1 e 5, o atipismo significativo nas camadas intermediária e profunda permitiu o diagnóstico de displasia acentuada (Figuras 25 B, 26 B e C).

O alongamento das papilas do epitélio escamoso, não foi marcante nos nossos casos, porém é citado por outros autores. Esse achado não deve ser tomado como invasão incipiente. O mesmo tipo de problema pode ocorrer no

colo uterino pela extensão do epitélio displásico às glândulas endocervicais. Em ambos os casos, o contorno relativamente regular e arredondado dessas projeções auxiliam o patologista na exclusão da invasão.

Problemas de interpretação também surgem na avaliação do epitélio escamoso de transição ou no epitélio escamoso hipotrófico da prega vocal.

Dificuldades semelhantes ocorrem no colo uterino tanto em relação ao epitélio escamoso metaplásico imaturo como na interpretação do epitélio hipotrófico da pós-menopausa, esse último particularmente no exame citopatológico.

Tanto o epitélio de transição na prega vocal, quanto o epitélio metaplásico imaturo do colo uterino podem ser confundidos com epitélio displásico dado ao tamanho aumentado do núcleo em toda espessura do epitélio, sem a maturação progressiva verificada no epitélio escamoso maduro (MILLS; GALLEY *et al*, 2000; ROBBOY; ANDERSON *et al*, 2002). Todavia, como chamamos atenção nesse trabalho, tanto em um caso como no outro, os núcleos são regulares, arredondados ou ovais, relativamente uniformes, sem pleomorfismo, com cromatina delicada, sem hiper cromasia. Do mesmo modo, as figuras de mitose são incomuns, confinadas a camada basal e nunca anormais. Esses aspectos podem ser visto nas figuras 7, 8C e 28 A e B.

As dificuldades de interpretação do epitélio de transição na prega vocal e do epitélio metaplásico imaturo na cérvix uterina são maiores quando esse epitélio estende-se às glândulas mucosas no primeiro caso ou às glândulas endocervicais no segundo. Os aspectos de “lingüetas” aprofundadas na submucosa pela substituição do epitélio glandular podem ser interpretados como invasão, sobretudo quando não restam remanescentes do epitélio

glandular. Novamente, as características acima citadas de núcleos relativamente uniformes sem pleomorfismo e o contorno bem delimitados das projeções epiteliais excluem microinvasão.

No colo uterino, esse achado é muito comum. Na prega vocal, o epitélio de transição pode ser visto eventualmente substituindo o epitélio das glândulas mucosas (Figura 8C).

O epitélio escamoso hipotrófico também pode ser causa de erro de interpretação. No colo uterino, na pós-menopausa, a deficiência estrogênica leva a redução da espessura do epitélio malpighiano e a falta de maturação, além da camada basal/ parabasal. Assim, o epitélio escamoso tem aspecto delgado e formado por células para-basais/ basais, as quais têm núcleos preponderantes. Essas células ao exame citopatológico preventivo podem ser tomadas como indicativas de NIC pela sua alta relação núcleo- citoplasma. O nosso caso controle de 78 anos mostrou epitélio escamoso hipotrófico (Figura 27 D) com alguma falha na maturação epitelial. Todavia, erros de interpretação nesse caso não ocorrem em biopsias cirúrgicas, pois o adelgaçamento do epitélio e uniformidade dos núcleos pode ser verificado, tanto na prega vocal quanto na cérvix uterina

5.3 Morfometria: comparação entre os diferentes tipos de epitélio

A morfometria fornece um parâmetro objetivo para o estudo, tanto do Epitélio displásico, quanto do epitélio escamoso normal e de transição. A sua utilização associada ao índice proliferativo (Ki-67) e biologia molecular têm sido referida como útil para melhorar a acurácia diagnóstica e para previsão do

comportamento biológico em lesões escamosas de laringe (GALE, KAMBIC *et al*, 2000). De um modo geral, no nosso estudo a quantificação referendou os achados histopatológicos e histológicos, contribuindo para os diagnósticos diferenciais comentados no item 5.2.

Assim, ficou evidente que a área de epitélio escamoso displásico é maior que a dos epitélios escamoso e de transição. A maior espessura reflete o crescimento acelerado das células displásicas consistente com a sua alta taxa de mitose.

O epitélio escamoso de transição obteve menor área que o escamoso normal, no entanto essa característica não foi significativa. Apesar da não significância desse achado, o mesmo pode ser explicado pela alta faixa etária de um dos pacientes do grupo controle com conseqüente hipotrofia do epitélio escamoso.

O achado significativo de núcleos de diâmetros maiores no epitélio escamoso displásico (média 8,55 μm) em comparação com o epitélio de transição (média 7,30 μm) e o escamoso normal (média 6,55 μm), conforme os achados verificados de forma subjetiva na avaliação histopatológica. Os núcleos no epitélio de transição são maiores que os do epitélio escamoso normal e esse aspecto associado à ausência de diferenças significativas no diâmetro dos núcleos nos diferentes níveis de profundidade, podem levar a erro de interpretação diagnóstica. Assim, na análise desse epitélio, a espessura menor, no nosso estudo por morfometria e ausência de pleomorfismo celular e nuclear são os critérios mais importantes para distinção de displasia

Comparando-se a média do diâmetro dos núcleos entre o epitélio escamoso displásico, comum e de transição notou-se diferença significativa

entre os núcleos da camada superficial do epitélio displásico e escamoso normal, com núcleos maiores no epitélio displásico.

Cor, Galé *et al* (1997) por exemplo, mostraram que a medida do diâmetro nuclear foi critério de maior utilidade na diferenciação entre os três tipos de lesões hiperplásicas da laringe na classificação de Kambic-Lenart (1971): hiperplasia simples, anormal, atípica e carcinoma *in situ*, examinando um total de 40 casos, 10 casos em cada grupo de lesão.

No nosso trabalho, quando se comparou a média dos diâmetros dos núcleos nas diferentes camadas de cada tipo de epitélio verificou-se que entre as camadas basal e intermediária e esta com a superficial no epitélio escamoso normal havia diferenças significativas entre a média dos diâmetros dos núcleos. Esse dado reflete a maturação do epitélio onde as células basais são ovóides de núcleos preponderantes com citoplasma escasso, na intermediária são maiores que as basais pela maior quantidade de citoplasma, mas com núcleos aproximadamente de mesmo tamanho ou discretamente menores e as superficiais são achatadas como núcleos muito pequenos, conforme a literatura (FECHNER; MILLS, 1992; MILLS; GAFFEY *et al*, 2000, MARTINS, BRAZ *et al*, 2006).

Todavia, foi curioso notar que essas diferenças no diâmetro nuclear, nas diferentes camadas do epitélio escamoso normal, só foram estatisticamente significativa entre a camada basal e intermediária e entre a intermediária e superficial, não sendo significativa entre a camada basal e superficial, conforme seria esperado. O fato da média do diâmetro dos núcleos entre a camada basal e superficial não terem mostrado diferenças pode estar relacionado a forma de obtenção dessa medida. A mensuração foi realizada no maior eixo e menor

eixo do núcleo. Nos núcleos da camada basal esses dois eixos são semelhantes por serem ovais em seu formato. Por outro lado, na camada superficial, as células são achatadas com conseqüente alongamento dos núcleos de forma que o eixo maior é desproporcional ao menor eixo. Ao se obter, dessa forma, a média do diâmetro desses núcleos, na camada basal e superficial, não houve diferenças significativas.

O conhecimento de que o epitélio escamoso normal tem as suas células da camada superficial achatadas em contraste com as células da camada basal e intermediária, que são piramidais, poligonais ou não achatadas está de acordo com os comentários acima especificados (Figura 16 B). Não era esperado encontrar significância entre os diâmetros dos núcleos da camada basal e intermediária, já que elas possuem morfologia semelhante, no entanto o resultado estatístico revelou diferenças.

Entre os epitélios escamoso displásico e escamoso de transição, não houve diferenças no diâmetro dos núcleos nas diferentes camadas, pois em ambos os núcleos são preponderantes. Portanto, a distinção entre o epitélio displásico e o de transição é mais de natureza qualitativa dada pela atipia, pleomorfismo celular e nuclear, hiper Cromasia etc., expressa no epitélio displásico e ausente no de transição.

Mas existe diferença na média do diâmetro nuclear na camada superficial entre o epitélio displásico e o epitélio escamoso normal com predomínio de núcleos maiores nos casos de displasia acentuada/carcinoma *in situ* .

5.4 Índice proliferativo (Ki-67)

Em Anatomia Patológica, o índice proliferativo ou a contagem mitótica, muitas vezes são critérios definidores de benignidade ou malignidade em neoplasias. São também freqüentemente utilizados na graduação das neoplasias malignas.

O índice proliferativo tem sido, ainda citado como útil, não só na avaliação prognóstica das neoplasias, como também, no diagnóstico diferencial entre lesões simuladoras de displasia como, por exemplo, o epitélio metaplásico imaturo e epitélio escamoso hipotrófico na cérvix uterina. Na laringe pode também ser útil no diagnóstico das displasias e na avaliação do epitélio de transição da prega vocal. Ainda, na cérvix uterina, o índice proliferativo tem sido também utilizado na avaliação de epitélio escamoso afetado por artefatos hipertérmicos em margem de cone obtido por alça diatérmica, permitindo a distinção entre esses artefatos e NIC 3 em margem cauterizada (MITTAL, 1999). Acreditamos, por analogia que em laringectomia, também pode ser útil na avaliação do epitélio escamoso com artefatos de cauterização.

No nosso trabalho, houve diferenças significativas entre a densidade dos núcleos corados pelo Ki-67 quando se comparou o epitélio displásico com o epitélio escamoso normal e de transição.

No epitélio displásico foi comum grande número de núcleos com imunoexpressão do Ki-67, os quais estavam presentes em todos os níveis do epitélio (Figuras 29 a 33).

Esse dado reflete o alto índice proliferativo da displasia consistente com seu potencial de crescimento e risco de invasão e estão de acordo com os achados verificados na cérvix uterina (RESNICK; LESTER *et al*, 1995) e laringe(

URANO; TWATA *et al*,1996; ZIDAR, GALE *et al*,1996; PIGNATARO; CAPACCIO *et al* , 1998; COR; GALE *et al* ,1997; KAMBIC-LENART, 1971) .

São poucos os estudos de índice proliferativo em displasias da laringe. Urano, Twata et al (1996) estudaram a atividade proliferativa de todo um espectro de lesões da laringe, incluindo 14 casos de carcinomas escamocelulares invasivos, 12 de displasias leves, 10 de displasias moderadas e oito de displasias severas. Utilizando os anticorpos anti- PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e MIB- 1 (anti – Ki-67), verificaram aumento da imunexpressão desses marcadores nas displasias, a medida que o grau de atipia aumentava, bem como naquelas lesões que recorreram ou progrediram. Consideraram que o alto índice proliferativo poderia ser indicativo de maior probabilidade de recorrência ou progressão para malignidade nas lesões pré-cancerosas da prega vocal. Por outro lado, não acharam correlação do índice proliferativo com o grau histológico ou diâmetro tumoral nos carcinomas escamocelulares invasivos.

Resultados semelhantes foram verificado por Zidar, Gale *et al* (1996) usando os mesmos marcadores e também estudando lesões desde a hiperplasia simples até carcinoma escamocelular invasivo com um total de 50 casos, 30 correspondendo a lesões benignas e displasias. Mas, diferentemente de Urano, Twata et al (1996) encontraram correlação entre o índice proliferativo e o grau histológico do carcinoma escamocelular invasivo.

Pignataro , Capaccio et al (1998) estudando 32 lesões de baixo grau (displasia leve) na laringe, das quais dez progrediram para câncer, encontraram positividade para Ki-67 em mais de 10% das células displásicas em 11 (34%) dos casos. Desses onze casos, 10 (90%) corresponderam

áquelas lesões que evoluíram para carcinoma invasor. Sugeriu que o índice proliferativo poderia ser utilizado nas biópsias de lesões displásicas da laringe para seleção de pacientes que vão requerer um *follow-up* mais cuidadoso.

Cor, Gale *et al* (1997) como Zidar , Gale (1996) usaram a classificação de Kambic-Lenart (1971) quando estudaram 40 biópsias de laringe com hiperplasia simples, anormal, atípica e carcinoma *in situ*, dez casos para cada grupo. Usando morfometria e estudando o índice proliferativo (PCNA e Ki-67) consideraram que o diâmetro nuclear era o parâmetro mais importante para discriminar as lesões e que o índice proliferativo aumentava de acordo com o grau de atipia encontrado.

A imunopressão do Ki-67 foi mínima ou ausente tanto no epitélio escamoso de espessura normal ou hipotrófico como no de transição consistente com proliferação celular controlada pelos mecanismos normais de crescimento e renovação epitelial.

Na cérvix uterina, o epitélio escamoso hipotrófico exibe pouca ou nenhuma positividade para Ki-67, e o mesmo foi verificado no epitélio hipotrófico da laringe em nosso trabalho.

Na cérvix, a metaplasia escamosa imatura, não associada a NIC tem baixo índice proliferativo (RESNICK; LESTER *et al*, 1995). Resnick, Lester *et al* (1995) estudando as neoplasias intra-epitelial cervicais encontraram discreto aumento do número de núcleos positivos no epitélio metaplásico, mas nunca mais de 25% de núcleos corados. No nosso trabalho não observamos aumento do número de núcleos corados quando comparamos o epitélio normal da prega vocal com o de transição.

No caso do epitélio de transição, aonde a morfometria não demonstrou diferença significativa no diâmetro dos núcleos nas diferentes camadas em comparação com o epitélio escamoso normal, o índice proliferativo é capaz de excluir displasia, com clareza irrefutável, desde que no epitélio de transição o índice proliferativo é muito baixo e limitado as camadas profundas.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

No protocolo utilizado no nosso estudo de displasia de prega vocal observou-se:

- 1) Baixa frequência das displasias da prega vocal, predomínio no sexo masculino e na sexta década e relação com tabagismo e etilismo.
- 2) Confirmou-se as alterações cito-arquiteturais já estabelecidas que caracterizam as displasias da prega vocal.

Comparando o epitélio escamoso displásico, normal e de transição quanto aos parâmetros morfométricos e índice proliferativo (Ki-67) observou-se que:

- 3) O epitélio displásico ocupa maior área por μm^2 que o epitélio escamoso normal e de transição.
- 4) A média do diâmetro dos núcleos foi maior no epitélio displásico, seguida do epitélio de transição e do epitélio escamoso normal.
- 5) Não há diferença no diâmetro dos núcleos nos diferentes níveis de profundidade tanto no epitélio escamoso displásico quanto no escamoso de transição
- 6) O diâmetro dos núcleos do epitélio escamoso normal é maior na camada intermediária que na basal e maior na camada intermediária que na superficial.

7) O índice proliferativo é alto no epitélio displásico com imunomarcagem para Ki-67 em todos os níveis do epitélio.

8) O índice proliferativo é baixo do epitélio normal e de transição com imunoexpressão do Ki-67 limitada a camada basal/para-basal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO, E.N.; GARROCHO, A.A.; AGUIAR, M.C.F. Perfil do paciente portador de carcinoma epidermoíde da cavidade bucal em tratamento no hospital Mário Penna em Belo Horizonte. Revista Brasileira de Cancerologia, v.48, n.3, p. 357-362, 2002.

ABRAHAMSON, D.R. Recent Studies on the Structure and Pathology of Basement Membranes. J Pathol., v.149, p. 275-8,1986.

AGATHANGGELOU, A.; NIEDOBITEK, G.; CHEN, R.; NICHOLLS, J.; JUN, W.; YOUNG, L.S. Expression of immune regulatory molecules in Epstein-Barr virus associated nasopharyngeal carcinoma with prominent Lymphoid stroma. Evidence for a functional interaction between epithelial tumor cells and infiltrating lymphoid cells. Am j. Pathol., v.147, p. 1152-1160, 1995.

ALVES, V.A.F. Manual de imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

AMERICAN CANCER SOCIETY. CLINICAL ONCOLOGY. American câncer society (us) laryngeal and hypopharyngeal câncer. Philadelphia: ACS, 2001.

APRIGLIANO, F.; MELLO, L.F.P. Tratamento Cirúrgico do Câncer da Laringe .Análise de 1055 casos. Arg. Int. Otorrinolaringol. , v.10, n.1, p. 36-45, 2006.

ARCHER, C.R.; YEAGER, V.L. Computed tomography of laryngeal cancer with histopathological correlation. Laryngoscope, v. 92, p.1173 -80, 1982.

AUERBACH, O.; HAMMOND, E.C.; GARFINKEL, L. Histologic changes in the larynx in relation to smoking habits. Cancer, v.25, p. 92-104, 1970.

BAAK, J.P.A.; OORT, J. A manual of morphometry in diagnostic pathology. Berlim: Springer-Verlag, 1983, 205 p.

BARBOSA, J.A.A. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. J. Bras. Patol., v. 37, n. 3, p. 197-200, 2001.

BARBOSA, T.V.; ROSAS, M.P.; COSTA, A.C.; RAPOPORT, A. Valor prognóstico do ki-67 no carcinoma indiferenciado de grandes células de glândula salivar maior: estudo de 11 casos. Rev. Bras. Otorrinolaringol., v. 69, n.5, 2003.

BARNES, L. Diseases of the larynx, hypopharynx and esophagus In: BARNES, L. Surgical pathology of the head and neck. New York: Marcel Dekker, 2001.

BARNES, L. Keratosis with and without atypia and carcinoma in situ In: BARNES, L. Surgical Pathology of the Head and Neck. New York: Marcel Dekker, p.154-161, 2001.

BARNES, C.; SERTON, M.; SIZELAND, A.; TREDEMANN, K.; BERKOWITZ, R.G.; WATERS, K. Laringo-pharyngeal carcinoma in childhood. Int j. pediatr Otorhinolaryngol., v. 61, p.83-86, 2001.

BARTELS, P.H.; THOMPSON, D. The video photometer image analysis In: MARCHEVSKY , A.M.; BARTELS, P.H. A primer for pathologists. Raven press, ltd, p. 29-56. 1994:

BEHLAU, M. Voz: O livro do especialista . Rio de Janeiro: Revinter, 2005. v.2.

BENHAMOU, C.A.; LARAQUI, N.; TOUHANI, M.; CHEKKOURY, A.; BENCHI, K.Y.; SAMLALI, R.; KAHLAIN, A. Tobacco and câncer of the larynx: a prospective survey of 58 patients. Rev. Laryngol. Otol. rhinol , v. 113, p. 285-288, 1992.

BOUGUOT, J.E.; KUILAND, L.T; WEILAND, L.H. Laryngeal keratoses and carcinoma in the Rochester, MN, population 1935-1984. Cancer Detect Prev., v. 15, n.2, p. 83-91, 1991.

BOUSSON, V.; MARSOT-DUPUCH, K.; LASHIVER, X.; TUBIANA, J.M. Post-radiation necrosis of the cricoid cartilage: an uncommon case. J.Radiol.,v.76, n.8, p.517-20, 1995.

BRAUN, N.; PAPADOPOULOS, T.; MULLER -HERMELINK. Cell cycle dependent distribution of the proliferation- associated ki-67 antigen in human

embryonic lung cells. Virchows arch. B cell pathol. Incl. Mol. Pathol., v.56, p.25-33,1988.

BROWNW, D.C.; GATTER, K.C. Monoclonal antibody ki-67: its use in histopathology. Histopathology., v.17, p. 489-503,1990.

BRUGUÈRE, J.; GUENEL, P.; LEURERC, A.; RODRIGUEZ, J.Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx and mouth. Cancer , v. 57, p. 391-5, 1986.

BURCH, J.D.; HOWE, G.R.; MILLER, A.B.; SEMENCIW,R. Tobacco alcohol, asbestos, and Nickel in the etiology of cancer of the larynx: a case control estudio. J. Natl. Cancer Inst. ,v. 67, p. 1219-1224, 1981.

CAMARGO, Z.A. Reabilitação fonoaudiológica em câncer de laringe. In: PINHO, S.R. Fundamentos da Fonoaudiologia - tratando dos distúrbios da voz.Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1998.

CAMPOS, G.G.; REIS, J.G.V.; HADJ, L.A.E.; ARAUJO, M.L.; MELLO, P.P.; MELLO, L.F.P. Laringectomia frontal anterior: Técnica de Tucker. Estudo retrospectivo. Rev. Bras. Otorrinolaringol., v.70, n.2, p. 171-176, 2004.

CAREY, T.E.; WENNENBERG, J. Cellular and molecular biology of the cancer cell In: FUY. S., WENIG, B.M.; ABEMAYOR, E. ET AL. Head and neck Pathology with clinical correlations. New York: CHURCHILL-LIVING-STONE. p. 3-37,2001.

CATTARUZZA, M.S.; MAISONNEUVE, P.; BOYLE, P. Epidemiology of laryngeal cancer. Eur J Cancer oral oncol, v. 32, p. 293-305, 1996.

COHEN, C. Large cytometry analysis in pathology. Hum. Pathol, v. 27, p. 428-493.1996.

COLTON, R.H.; CASPER, J.K. Compreendendo os problemas da voz: uma perspectiva fisiológica ao diagnóstico e ao tratamento. Porto alegre: Artes médicas, 1996.

COOPER, M.P.; BRAAKHUIS ,B.J.M.; DE VRIES, N.; VAN, D.G.; NAUTA J.J.P.; SNOW, G.B. A panel of biomarkers of carcinomarkers of carcinogenesis of the upper aerodigestive tract as potential intermediate andpoints in chemopreventions trials. Cancer, v. 71, p.825-30,1993.

COR, A.; GALE, N.; KAMBIC, V. Quantitative pathology of laryngeal epithelial hyperplastic lesions. Acta Otolaryngol., v. 527, p.57-61, 1997.

COSTA, H.O. O.; DUPRAT, A. C.; ECKLEY, C.A.; DUTRA, S. R. F.; CAVALCANTI, C. M. Análise comparativa de laringectomias parciais com e sem realização de traqueostomia .Rev. Bras. Otorrinolaringol., v.70, n.3, 2004.

CURIONI, O.A.; CARVALHO, M.B.; SOBRINHO, J.A.; RAPOPORT, A. Resultados oncológicos da laringectomia parcial no carcinoma glótico inicial. Rev Bras Otorrinolaringol., v..68, n.5, p.673-7, 2002.

CRUZ, W.P; DEDIVITIS, R.A; SEMETILLI, A.; RAPOPORT, A. Estudo histológico da cartilagem tireóidea. Rev. Bras. Otorrinol., v. 69, n.6 p. 734-738, 2003.

DARZYNKIEWIKZ, B.S.Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by ki-67 antibody in hl-60 cells. Cell prolifer., v. 25, p. 31-40. 1992.

DEDIVITIS, R.A. Resultados na cirurgia conservadora do carcinoma espinocelular de laringe. Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço, v. 37, nº 1, p. 48 - 50, 2008.

DEMARTINES, N.; BATTEGAY, E.; LIEBERMANN, J.; OBERHOLZER, M.; RUFLI, T.; HARDER F. Telemedicine: Perspectives and multidisciplinary approach. Schweiz. Med. Wochensch., v. 130, n.9, p.314-323, 2000.

DEMIRKAYA, O. Automated identification of stained cells in tissue sections using digital image analysis. Anal. Quant. Cytol. Histol., v.2192, p. 93-102. 1999.

DE RIENZO, D.P.; GREENBERG, S.D.; FRAIRE, A.E. Carcinoma of the larynx. Changing incidence in women. Arch Otolaryngol. Head Neck Surg., v.117, p. 681-684, 1991.

DIAS, F.L.; KLIGERMAN, J. ; CERVANTES, O., TAVARES, M.R.;CARVALHO, M.B.; FREITAS, E.Q. Diagnóstico e Tratamento do Câncer da Laringe.Projeto

Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, 2001. 14 p.

DU MANOIR, S. *et al.* Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different ki-67 pathways within the 2c compartment. Cytometry, v.12, p.455-463,1991.

ELIAS, H.; HYDE, D.M. A guide to practical stereology. Basel: kaiger, 1983, 148 p.

EUSEBI, V.; ROSSHINI, I.; ERDE, S.; ROSAI, J. Transcontinental consults in surgical pathology via the internet. Hum. Pathol., v.28, p. 13-16. 1997.

FARCHI, G. Estimation of the impact of cigarette smoking reduction on mortality from tumors of the lung and larynx. Ann Ist. Super Sanita., v. 28, p.147-153,1992.

FARIA, S.M; MARTINS, A.C.P.; LLORACH-VELLUDO, M.A.S; SUAID, H. J.; ADAUTO. S.T.; COLOGNA, J.; OKANO, N. Immunoexpression of Ki-67 antigen in carcinoma of the penis. Acta Cir. Bras. ,v.15, 2000.

FECHNER, R.E; MILLS, S.E. Histology for pathologists. New York: Raven Press, 1992.

FERRARI, A. F.; ARAÚJO, M. B. M.; AGUIAR, P.H.; PLESE, J.P.
Meduloblastoma: avaliação do padrão proliferativo pelo anticorpo monoclonal

Mib-1, correlação prognóstica e implicações terapêuticas. Arq. Neuro-psiquiatr., v. 61, n.3, 2003.

FIGUEREDO – SILVA, J.; PONTES, F.N.T.; MONTENEGRO, I.T.; SANTANA, J.W.; FREITAS, S.B. Esquistossomose mansônica experimental: estudo morfométrico e experimental das células calciformes intestinais. Na. Fac. Med. Unive. Fed. Pe., v.44, p. 21-25, 1999.

FILHO, V.W. The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. Medical journal., v.122, n.5, p188-94, 2004.

FISHER, J.; SCOTTC, SCARANTINO CW, LEVEQUE FG, WHITE RL, ROTMAN M ET AL, Phase III quality of life study results : impacto patients quality of life to reducing xerostomia after radiotherapy for head and neck cancer. Int Radiat Oncol Biol Phys., v. 56, n.3, p.832-6, 2003.

FREIZE, J.E.; BEATTY, T.W.; CAMPBELL, B.H.; WOODSON, B.T.; SCHULTZ C.J.; TOOHILL, R.J. Carcinoma of the larynx in patients with gastroesophageal reflux. Am j. Otolaryngol., v.17, p. 386-390, 1996.

FURNESS, P.; RASHBASS J. The virtual double-head edmicroscope: telepathology for all ? . Histopathol., v.36, n.2, p. 182-183, 2000.

GARRIDO, M.C.; CORDELL, J.L.; BECKER, M.H.G.; KEY, G.; GERDES, J.; JONES, M.; GATTER, K.C.; MAJON, D.Y. Monoclonal antibody jc1. New reagent for studying cell proliferation. J clin pathol., v. 45, p.860-5, 1992.

GALE, N.; PILCH, B.Z.; SIDRANSKY, D. et al. Epithelial precursor lesions In: BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P; SIDRANSKY, D. Who Classification. World health Organization (OMS): Classification of tumors pathology e genetics. Head and neck tumors. Lyon: IARC Press(International Agency for Research on Cancer), 2005.

GALE,N.; KAMBIC, V.;MICHAELS, L.; CARDESA, A.; HELLQUIST, H.; ZIDAR, N.; POLJAK, M. The Ljubljana classification: a practical strategy for the diagnosis of laryngeal precancerous lesions. Advances in Anatomic Pathology., v.7, n. 4, p. 240-251, 2000.

GERDES, J *et al.* Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen definid by monoclonal antibody ki-67. J. Immunol., v. 133, p.1710: 1715, 1984.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H.H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. 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.

GERDES, J.; SCHLUETER, C.L.L.; DUCHROW, M.; WOHLLENBERG, C.; GERLACH, C.; STAHRMER, I.; KLOTH, S.; BRANDT, E.; FLAD, H.; Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody ki-67. Am j pathol., v. 238, p.867-73, 1991.

GOMES, C. O papel do fonoaudiólogo no tratamento oncológico In: BARACAT, F.F.; FERNANDES, J.R.; SILVA, M.J. Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar. São Paulo: Roca, p.205-221, 2000.

GUERRA, M.C.G. Epitélio das cordas vocais em fumantes: Estudo Morfométrico dos Perfis Nucleares. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Mestrado de Patologia, 1991. 55 p.

GRAY, S.D.; HIRANO, M.; SATO, K. Molecular and Cellular Structure of Vocal Fold Tissue. In: TITZE, J.R. Vocal Fold Physiology: Frontiers in Basic Science. San Diego: Singular Publishing Group, p. 1-35, 1993.

HADDAD, L.; ABRAHÃO, M; CERVANTES, O.; PUPOCECCON, F.; GIELOW, I.; CARVALHO, J.R.; LEONHARDT, F.D. Avaliação da voz em pacientes submetidos à cordectomia com laser de CO₂. Rev. Bras. Otorrinolaringol., vol.72, n.3, 2006.

HAMILTON, P.W.; ALLEN, D.C. Interactive computer-aided morphometry In: PETER, W. Quantitative clinical pathology. 1997, 342p.

HAMMOND, T. H.; ZHOU, R.; HAMMOND, E. H.; PAWLAK, A.; GRAY, S. D. The intermediate layer: a morphologic study of the elastin and hyaluronic acid constituents of normal human vocal folds. J Voice., v. 11, n. 1, p. 59-66, 1997.

HEDBERG, K.; VAUGHAN, T.L.; WHITE, E.; DAVIS, S.; THOMAS, D.B. Alcoholism and cancer of the larynx: a case-control study in western Washington (United States). Cancer. v.5, p. 3-8, 1999.

HEIDEBRECHT, H.J *et al.* Monoclonal antibodies ki-s3 and ki-s5 yield new data on the “ki-67”proteins. Cell prolif., v.29, p.413-425,1996.

HERMAN, C.J. Image cytometry in pathology. Hum. Pathol., v.27, p.435-436, 1996.

HERNANDEZ, A.M.; MARCHEZAN, I.Q. Atuação fonoaudiológica no ambiente hospitalar. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

HIRANO, M. Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. Folia Phoniatica, v. 26, p.89-94,1974.

HIRANO, M. Phonosurgery: basic and clinical investigations. Otologia, v.1, n.21, p.239-442,1975.

HIRANO, M. Phonosurgical Anatomy of the Larynx. In: FORD, C.N.; BLESS, D.M. Phonosurgery: Assessment and Surgical Management of Voice Disorders. New York: Raven Press. p. 25-41, 1991.

HIRANO, M. Surgical Anatomy and Physiology of the Vocal Folds In: GOULD, W.J.; SATALLOF, R.T; SPIECCEL, J.R. Voice Surgery. St.Louis: Mosby, 1993.

HIRANO, M. Structure of the vocal fold in normal and disease states: an anatomical and physical studies. Asha reports., v.11, p.11-30,1981.

HIRANO, M.; KAKITA, Y. Cover-body theory of vocal fold vibration. In: DANILOLL, R.G.. Speech science: recent advances. San Diego: College hill press. p 1-46, 1985.

KAMBIC, V.; LENART, I. Notre classification des hyperplasies de L' epithelium do larynx an point de vue prognostic. JPORL, v. 20, p. 1145-50, 1971.

KEY, G.; PETERSEN, J.L.; BECKER, M.H.G.; DUCHROW, M.; SCHLUTER, C.; ASKAA, J.; GERDES, J. New antiserum against ki-67 antigen suitable for double immunostaining of parinf wax sections. J. clin pathol., v. 46, p.1080-4, 1993.

KROPVELD, A.; SLOOTWEG, P.J.; BLANKENSTEIN, M.A.;TERHAARD, C.H.J.; HORDIJK, G. Ki-67 and p53 in T2 laryngealcancer. Laryngoscope, v. 108, p.1548-52, 1998.

HYDE, L. Imagination and the Erotic Life of Property. Vintage Book, 1983.

HOSSFELD *et al.* Câncer de cabeça e pescoço In: Manual de oncologia clínica. SPRINGER-VERLAG: UICC, 1993.

ISOLAN, G.R. R.F. Relação entre imunomarcção das proteínas ki-67 e p53 com grau de malignidade e variante histológica em neoplasias astrocitárias. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde, 2004.

KAUSCH, K *et al.* Anti-sense treatment against ki-67 inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. Int. J. Cancer., v. 105, n.5, 2003.

KILL, J.R. Localization of the ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillary in deficient region of the dense fibrillar component. J. Cell Sci., v.109, p.1253-1263,1996.

KUTTA, H.; STEVEN, P.; PAULSEN, F. Anatomical definition of the subglottic region. CellsTissues Organs., v. 184, n. 3-4, p. 205-214, 2006.

JUNIOR, O.P; BUZAID, A.C.Terapia fotodinâmica – Uma nova opção de tratamento dos carcinomas superficiais de cabeça e pescoço Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço, v. 35, n. 2, p. 121 - 125 , 2006.

LAMBERT, W.C.; LAPIDUS, A.; RAO, B.K. Melanoma diagnosis by computerized analysis of clinical imagens. Arc. Dermatol., v.137, n.3 , p.377, 2001.

LIMA, M.A.; FILHO, L.C.M.; ALMEIDA, H.C.; SANTOS, M.C.; BORGES, M.F. Caracterização molecular das variantes do carcinoma papilífero de tiróide. Arg bras endocrinol metab., v.47, n.3 , p.237-242, 2003.

LOPEZ, F. *et al.* Modalities of synthesis of ki67 antigen during the stimulation of linphocytes. Cytometry., v.12, p.42-49,1991.

MACPHERSON, L.M.D.; GIBSON, J.; BINNIE, V.I.; CONWAY, D.I. Oralcancer: aetiology. Glasgow: University of Glasgow, 2003.

MAIA, I.C.; FIGUEREDO-SILVA, I.; SILVA, E.C.C.; SOUZA, B.R.; CAVALCANTI, C.L.B. Estudo morfométrico da rede arteriolar miocárdica em indivíduos alcoolistas crônicos. Na. Fac. Méd. Univ. Fed. Pe., v.44, p. 31-33, 1999.

MARCELINO, F.C.; OLIVEIRA, D.T. Histopathological changes of vocal folds induced by chronic pollutant exposure: An experimental study. J. Voice., v. 19, p. 529- 533, 2005.

MARTINS, R.H.G.; BRAZ, J.R.C.; DIAS, N.H.; CASTILHO, E.C.; BRAZ, L. G.; NAVARRO, L. H.C. Rouquidão após intubação traqueal. Rev. Bras. Anestesiol., v.56, n.2, 2006.

MASSAD, E.; BOHM, G.M.; WEN, C.L.; SILVEIRA, P.S.P. O universo da informática e o ensino médico In : MARCONDES, E. Educação médica. 1 edição. São Paulo, 1998.

MELO, E.C.M. Histologia e ultra-estrutura da prega vocal humana. Rev. Vox brasiliis., v. 11, n.12, 2005.

MENEZES, A.M.B.; HORTA, B.I.; OLIVEIRA, A.I.B.; KAUFMANN, R.A.C.; DUQUIA, R.; DINIZ, A.; MOTTA, I.H.; CENTENO, M.S.; ESTANISLAU, G.;

GOMES, I. Risco de câncer de pulmão, laringe e esôfago atribuível ao fumo. Rev de saúde pública, v. 36, n.2, 2002.

MCQUARRIE, D.G.; ADAMS, G.L.; SHONS, A.R.; BROWNE, G.A. Objectives of care en head and neck malignancy In: MCQUARRIE, D.G. Head and neck cancer: clinical decisions an management principles. Chicago: Year book medical publishers, 1986.

MILLS, S.E.; GAFFEY, M.J.; FRIERSON, H.F. Tumors of the upper aerodigestive tract and ear. New York: Armed Forces Institute of Pathology ,2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. TNM – Classificação dos tumores malignos. União interna contra o câncer (UICC). 4 ed, Brasília, 1989.

MITTAL, K. Utility of proliferation- associated marker MIB-1 in evaluating lesions of the uterine cervix. Adv. Anat. Pathol., v.4, n.4, p. 177-185, 1999.

MOREIRA, F.J.; CESSE, E.A.P. Morbi mortalidade do câncer na cidade do Recife na década de 90. Revista Brasileira de cancerologia., v.71, p.825-30, 1993.

MULLER, R. Quality of life of patients with laryngeal carcinoma: post treatment study. Eur Arch Otorhinolaryngol., v. 258, n.6, p.276-80, 2001.

MURAKAMI, M.; OHTANI, I.; HOJO, H.; WAKASA, H. Immunohistochemical evaluation with ki-67: na application to salivary gland tumours. J. laryngol. Otol., v.106, p.35-8, 1992.

NEGRÃO, A.W.; ISOLAN, G.R.; RIBAS-FILHO, J.M.; MALAFAIA, O.; MULINARI, C.; DORL, A. The importance of the cell proliferation markers in the tumor study: The model of the astrocytic neoplasm. Rev. Méd. Paraná, v.64, n.1, p. 7-11, 2006.

NEVES, M.T.W. Estudo morfométrico dos folículos linfáticos do baço esquistossomose hepatoesplênica. Tese (Mestrado). Departamento de Mestrado de patologia . Universidade Federal de Pernambuco. 1984.

NEVES, B.M.; NETO, J.G.; PONTES, P. Diferenciação histopatológica e imunohistoquímica das alterações epiteliais no nódulo vocal em relação aos pólipos e ao edema de laringe. Rev Bras Otorrinolaringol., v.70, n.4, 2004.

NORRIS, C.M.; PEALE, A.R.; Keratoses of the larynx. The Journal of Laryngology & Otology., v.77, p.635- 647, 1963.

NORONHA, M.J.R.; DIAS, F.L. Epidemiologia – etiopatogenia e fatores etiológicos do câncer da laringe – potencial para quimioprevenção. In: NORONHA, M,J,R.; DIAS, F.L. Câncer da laringe: uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: Revinter, p. 4-7, 1997.

NOVIK, V.I. The use of computer technology in the cytologic diagnosis of neoplasms. Vopr onkol., v.46, n.2, p. 239-42, 2000.

OBERHOLZER, M.; OSTREICHER, M.; CHRISTEN, H.; BRUHLMANN, M. Methods in quantitative image analysis. Histochem. Cell. Biol., v.105, p. 333-355. 1996.

OHLMS, L.A.; MCGILL, T.; HEALY, G.B. Malignant Laryngeal tumors in children: a 15 year experience with fours patients. Anm Otol Rhinol Laryngol. v.103, p. 686-692, 1994.

OKINO, S.N.; MARQUES, A.D.; ZAGO A.A.F. O efeito da radioterapia sobre a qualidade de vida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Revista Brasileira de Cancerologia, v.52, n.4, p.323-329, 2006.

OLIVEIRA, J.C.; CURADO, M.P.; RAPOPORT, A.; SILVA, M.R.B. Fatores prognósticos de sobrevida no câncer glótico inicial. Revista brasileira de otorrinolaringologia. v. 67, n.5, 2001.

PAES, C. Mensuração da altura da laringe e das pregas vocais membranosas do adulto e do senescente: um estudo comparativo. Dissertação (Mestrado). Departamento de Mestrado de Patologia. Universidade Federal de Pernambuco, 2002.

PADOVANI JUNIOR, JA; AZOUBEL, R; MARTINS, AT; et al. Value of Morfometry in the prognosis of laringuela neoplasms. Int. J. Morphol., v.23, p. 275-278, 2005.

PARKIN, D.M; PISANI, P.; FERLAY, J. Global cancer statistics., Cancer J Clin., v.49, n.33, 1999.

PAZ, ST. et al. Redução no tempo de processamento de pequenas biópsias para inclusão em parafina. In: XII Congresso Brasileiro de Histotecnologia - III Jornada do Mercosul de Histotecnologia. Salvador-BA, v.1, p.20, 2001.

PETERSEN, J.; WOLF, G.; ROTH, K.; SCHLUNS, K. Telepathology by the internet. J. Pathol., v. 191, n.1, p. 8-14, 2000.

PIGNATARO, L.; CAPACCIO, P.; PRUNERI, G.; CARBONI, N.; BUFFA, R.; NERI, A.; OTTAVIANI, A The predictive value of p53, MDM-2, cyclin D1 and Ki67 in the progression from low-grade dysplasia towards carcinoma of the larynx. J. Laryngol Otol., v.112, n.5, p.455-9, 1998.

PODESTÁ, J.R.; SÁ, G. M..A glândula tireóide no câncer do laringe. Rev. bras. Cir. Cabeça e pescoço, v. 18, n.1, p.33-5, 1994.

PROSPERI, E. Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: Dna replication, repair and cell cycle control. Prog. Cell cycle res., v.3, p.193-210, 1997.

RAFFEERTY, M.A.; FENTON, J.E.; JONES, A.S. The history, aetology and epidemiology of laryngeal carcinoma. Clin. Oto-Laryngol., v.26, p. 442-446, 2001.

RAMOS, H. V. L.; SIMÕES; M. J.; PONTES, P. A. L.; NEVES, L. R.; BARBOSA, L. H. F.; DEBIASE, N. G.; OSHIMA, C. T. S. Imunohistoquímica como método de estudo das fibraselásticas em prega vocal humana. Rev Bras Otorrinolaringol., v. 71, n. 4, p.486-491, 2005.

RASHBASS, J. The impacto fof information technology on histopathology. Histopathology., v.36, n.1, p. 1-7,2000.

RESNICK, M.; LESTER, S.; TATE, J.E. SHEETS, E.E. SPARKS C.; CRUM, C.P. Viral and Histopathologic Correlates of MN and MIB-1 Expression in Cervical Intraepithelial Neoplasia. Human Pathology., v.27 , n.3 ,p.234 – 239, 1995.

RICE, D.H.; SPIRO, R.H. General management guidelines In: CURRENT Concepts in head and neak cancer. New York: The american cancer society, 1989.

ROBBOY, S.J., ANDERSON, M.C.; RUSSEL, P. Pathology of the Famyle Reprodutive Tnct. London: Churchill Livingstone, 2002.

ROSENFELD, D.B.; MILLER, R.H.; SESSIONS, R.B.; PATTEN, B.M. Morphologic and hstochemical characteristics of laryngeal muscle. Arc otolaryngol., v.108, p. 662-6, 1982.

RUBEGNI, P.; CEVENINI, G.; BURRONI, M. Digital dermoscopy analysis of pigmented skin lesions: an important auxiliary for clinical decision and not for automatic diagnosis. Arch. Dermatol., v.137, n.3, p. 378, 2001.

SANTOS, F. C. C.; GRELLET, M.; JUNIOR, A. R.; JAMUR, M. C.; PINTO, J. A.; FOMIN, D.S. Estudo comparativo histológico da prega vocal após incisão com instrumental a frio e com laser de CO2 em modelo animal. Rev. Bras Otorrinolaringol., v. 6, p. 753-759, 2003.

SASAKI, K.; MURAKAMI, T.; KAWASAKI, M.; TAKAHASHI, M. The cell cycle associated a change of the ki-67 nuclear antigen expression. J cell phisiol., v.133, p.579-84,1987.

SAWHNEY, N.; HALL, P.A. Ki-67 structure, function and new antibodies. J Pathol., v. 168, p. 161-2, 1992.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J. Cell Physiol., v.182, p.311-322, 2000.

SCHANTZ, S.P.; YU, G. Epidemiology in: FU, Y.S, WENIG, B.M.; ABEMAYOR, E, et al. Head and neck Pathology with clinical correlations. New York: Churchill-Livingtone, p.38-61, 2001.

SENAD - Secretaria Nacional Antidrogas - I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população Brasileira. Brasília: 2007.

SENNES, L.U.; DOMINGOS, H. T.; GUIMARAES, J.R.R. Câncer de Laringe: Diagnóstico e Tratamento In: MATOS, B. J. Fonoaudiologia em Cancerologia. vol. 2 , nº 2 , 2000.

STARBORG, M. et al. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. J. Cell Sci., v.109, p.43-153, 1996.

STEVENS, A. ; LOWE, J. S. Histologia humana. Editora Manole, 2º ed, 2001.

STIBLAR-MARTINCIC, D.; STIBLAR-MARTINCIC, D. Histology of laryngeal mucosa. Acta Otolaryngol Suppl., v.527, p. 138-41, 1997.

STRAUCHEM, J.A. Further called for "Teleconsultation". Am. J.C Clin. Pathol., v.113, n.4, p. 595, 2000.

SYNOPSIS, A. Image and sign process. Year book of medical informatics. Hasnam ed, 1996.

TAVASSOLI, F.A.;DEVILEE, P. Who Classification. World health Organization (OMS): Classification of tumors pathology e genetics. Tumors of the breast and female genital organs. Lyon: IARC Press(International Agency for Research on Cancer), 2003.

THOMÉ, R.; THOMÉ, D.C.; ROYG, C.R.C. Tumores cartilagosos da laringe. Revista brasileira de otorrinolaringologia. v. 67, n.6, 2001.

TRUE. I.D. Morphometry applications anatomic pathology. Hum. Pathol., v. 27, p. 450-467,1996.

URANO, M.; IWATA, S.; TAKASU, A.; MORI, S.; SAKURAI, K.; KATOH, H.; YAMAMOTO, S.; KASAHARA, M.; KURODA, M.; HAKUNO, T. An immunohistochemical study of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and MIB-1 in epithelial hyperplasia and dysplasia of the vocal cords. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho., v. 99, n.3, p.395-401, 1996.

VAN DIERENDONCK, J,H *et al.* Nuclear distribution of the ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. Cancer res., v.49, p.2999-3006, 1989.

VAN OIJEN, M.G. *et al.* Positivity of the proliferation marker ki-67 in noncycling cells. Am. J. Clin. Pathol. , v. 110, p.24-31, 1998.

YAMASHITA, K. Age-related development of the arrangement of connective tissue fibers in the lamina propria of the human vocal folds--scanning electron microscopic examination with digestion method. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho., v. 100, n. 5, p. 499-511, 1997

ZIDAR, N.; GALE, N.; COR, A.; KAMBIC, V. Expression of Ki-67 antigen and proliferative cell nuclear antigen in benign and malignant epithelial lesions of the larynx. J Laryngol Otol., v. 110, n.5,p.440-5,1996.

WAGNER, G.A.; STEPLIUK, V.A.; ZILBERMAN, M.L.; BARROSO, L.P.; ANDRADE A.G. Alcohol and drug use among university students: gender differences. Rev Bras Psiquiatr., v. 29, n.2, p. 123-129, 2007.

WALDMAN, F.M.; SAUTER, G.; SUDAR, D. Thompson ct. Molecular cytometry of cancer. Hum. Pathol., v.27, p. 441-449,1996.

WEIBEL, E.R. Stereological methods: Practical Methods for Biological Morphometry. Toronto: Academic Press, 1979. v.1

WEINBERG, D.S. Quantitative immunocytochemistry in pathology In: IMAGE ANALYSIS. A primer for pathologists. Marchevsky: Raven press ltd, p. 235-260, 1994.

WENIG, B.M. Keratinizing Dysplasia of upper aerodigestive tract. Pathology case reviews, v. 13, n. 1, p.9-16, 2008.

WEINSTEIN, G.S.; EI-SAWY, M.M.; RUIZ, C.; DOOLEY, P.; CHALIAN, A, EI-SAYED, M.M.; GOLDBERG, A.M Laryngeal preservation with supracricoid partial laryngectomy results in improved quality of life when compared with total laryngectomy. Laryngoscope.,v.111,n.2,p.191-199,2001.

WHIMSTER, W.F.; COOKSON, M.J. Three- diemntional reconstruction. In: HAMILTON, P.W. Quantitative clinical pathology. Oxford: Blackwell science ltd, p. 289-300,1995.

WYNDER, E.L.; COVERY, L.S.; MABUCHI, K.; MUSHINSKI, M, Environmental factors in cancer of the larynx: a second look. Cancer, v. 38, p. 1591-1601, 1976.

ANEXOS

Anexo 1- FIGURAS REFERIDAS NA INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODO E RESULTADOS

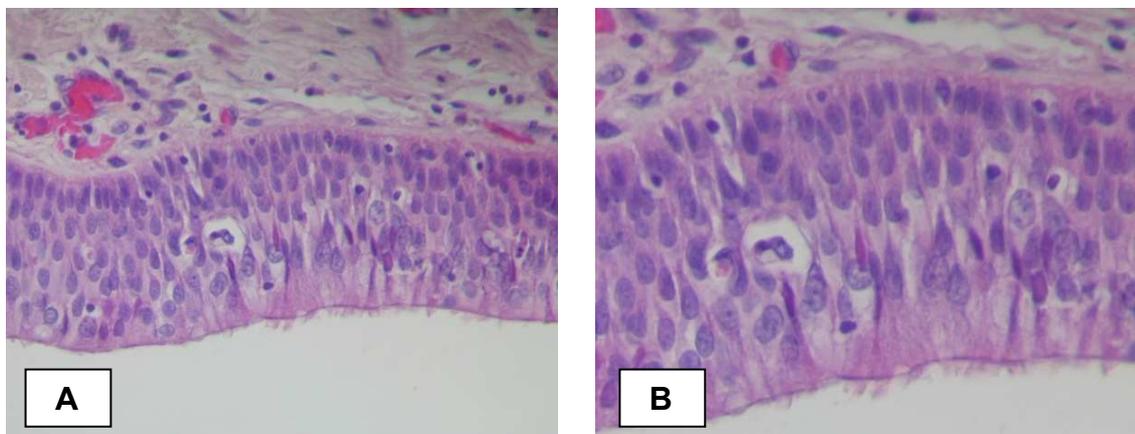


Figura 1: Epitélio cilíndrico ciliado pseudo-estratificado (epitélio respiratório). O aspecto assemelha-se ao epitélio de transição (figura 7), porém com epitélio colunar ciliado em superfície. Grupo controle, nº 2 (HE - 100x, 400X).

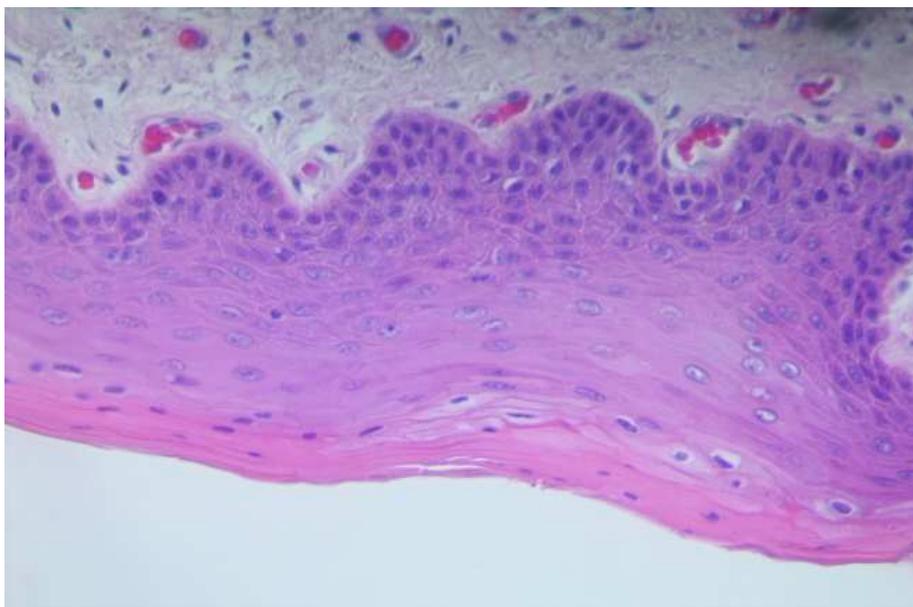


Figura 2: Epitélio escamoso da prega vocal. Notar maturação das células epiteliais com núcleos predominantes na camada basal e para basal e núcleos pequenos nas células mais superficiais. Grupo controle, nº 2 (HE - 400X).

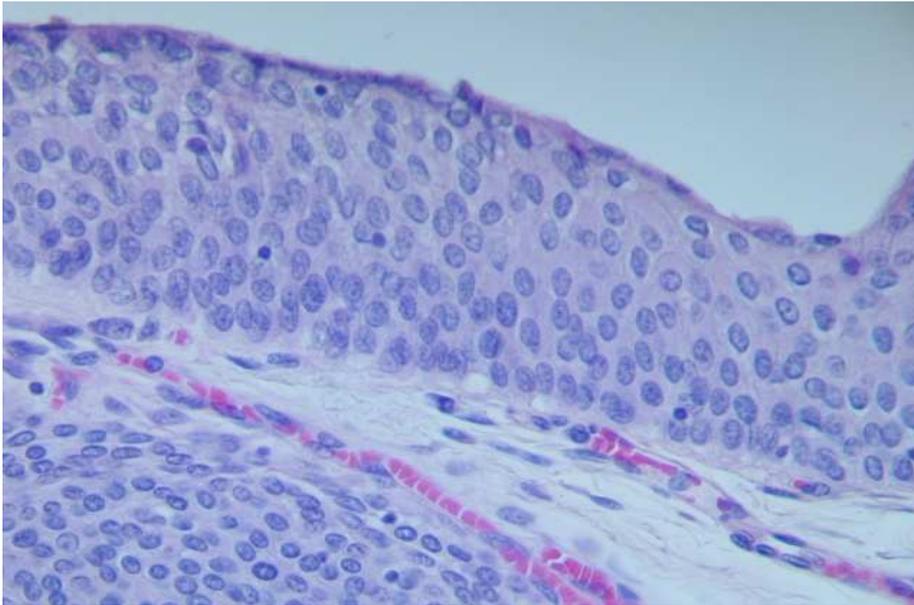


Figura 3: Epitélio de transição. Os núcleos são preponderantes em toda espessura do epitélio, porém, uniformes, de cromatina delicada. Grupo controle, nº 1 (HE - 400X).

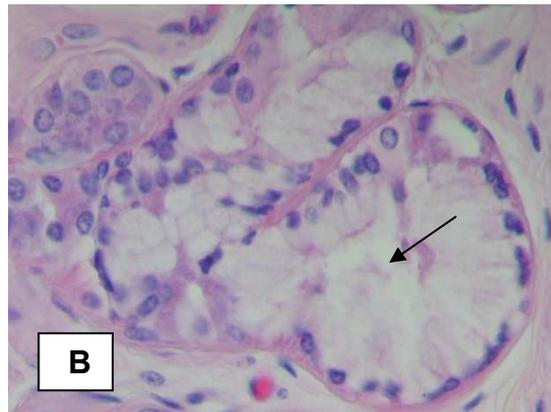


Figura 4: Glândulas mucosas do cório. Em "A" e "B" notar revestimento por epitélio colunar cúbico mucosecretante (seta). Em "C" observa-se glândula mucosa em processo de metaplasia escamosa (setas). Notar semelhança do epitélio metaplásico com o de transição (figura 7). Grupo controle, nº 1 (HE - 400X).

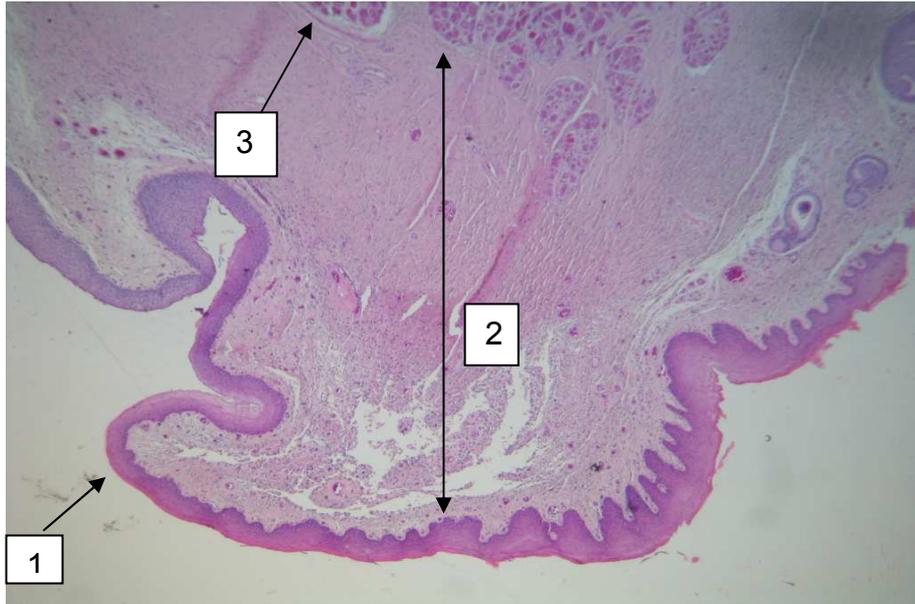


Figura 5: 1.Epitélio escamoso normal; 2.Lâmina própria (camadas superficial, intermediária e profunda); 3. Músculo vocal (Tireoaritenóideo). Grupo controle nº 1 (HE - 25X)

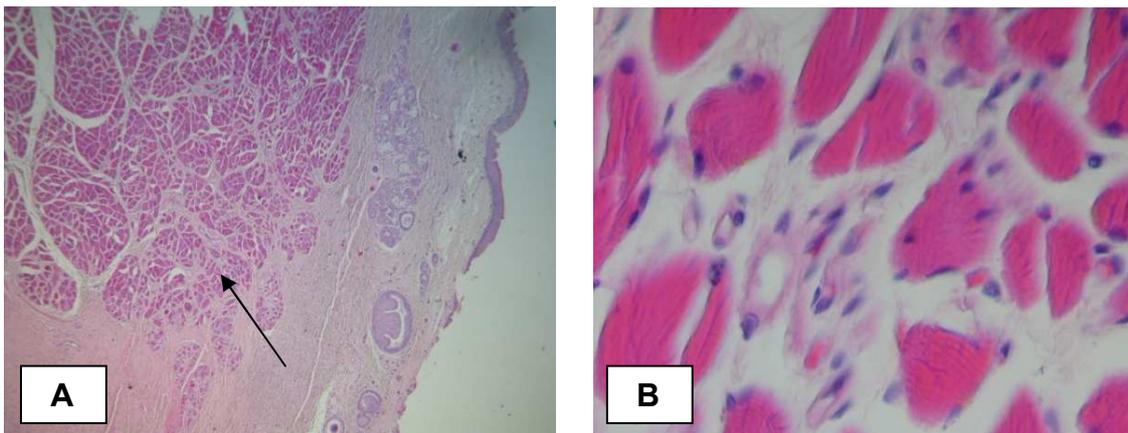


Figura 6: Músculo estriado vocal (tireoaritenóideo) (seta). Grupo controle, nº 1 e 3 (HE - **A** - 25x e **B** - 400X).

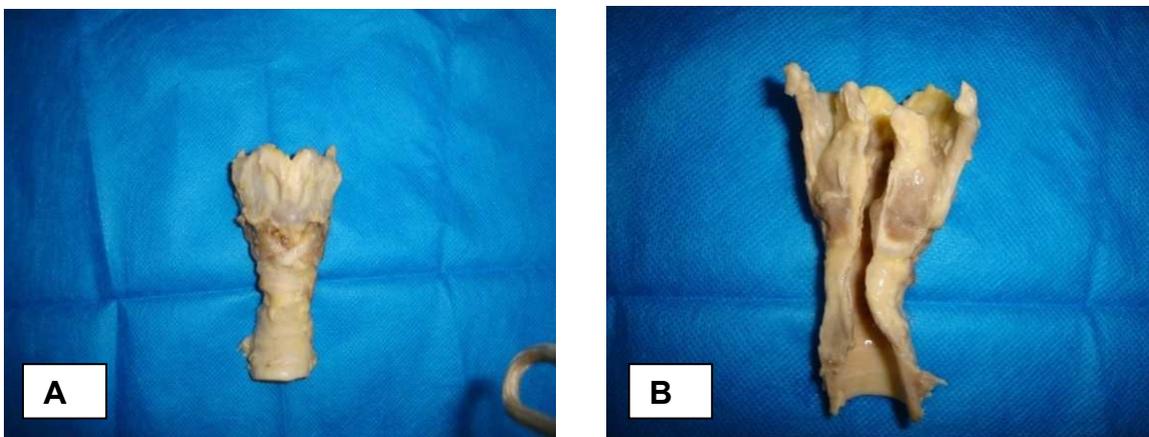


Figura 7: **A** - Visão anterior da laringe fixada em formol tamponado a 10%, após 7 dias, **B** - Visão posterior.

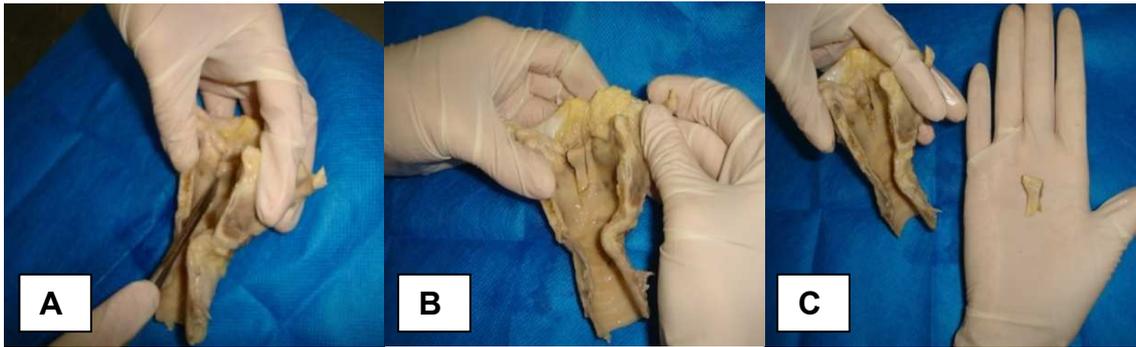


Figura 8: A e B - Corte longitudinal na região média da prega esquerda C-Prega vocal esquerda retirada após 7 dias

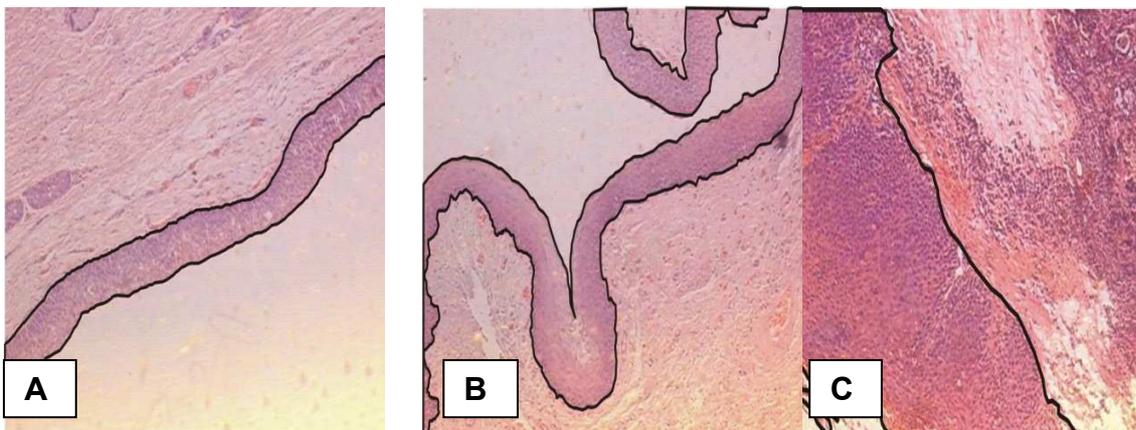


Figura 9: Mensuração da área com programa Scion Image Beta 4.0.2: A – epitélio escamoso normal, B – epitélio escamoso de transição, C - epitélio escamoso displásico (HE - 40x)

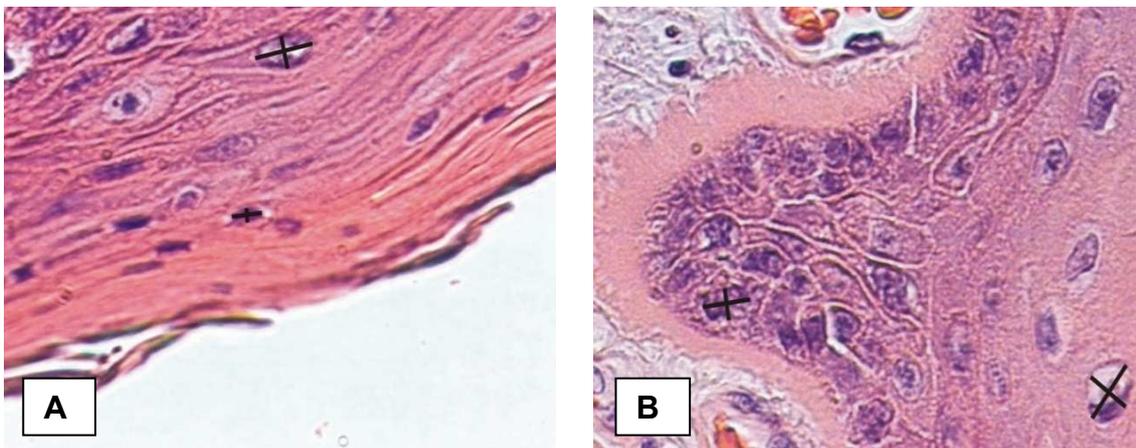


Figura 10: Mensuração do diâmetro do núcleo no epitélio escamoso normal. A - na camada basal e intermediária, B - na camada intermediária e superficial (HE - 400x)

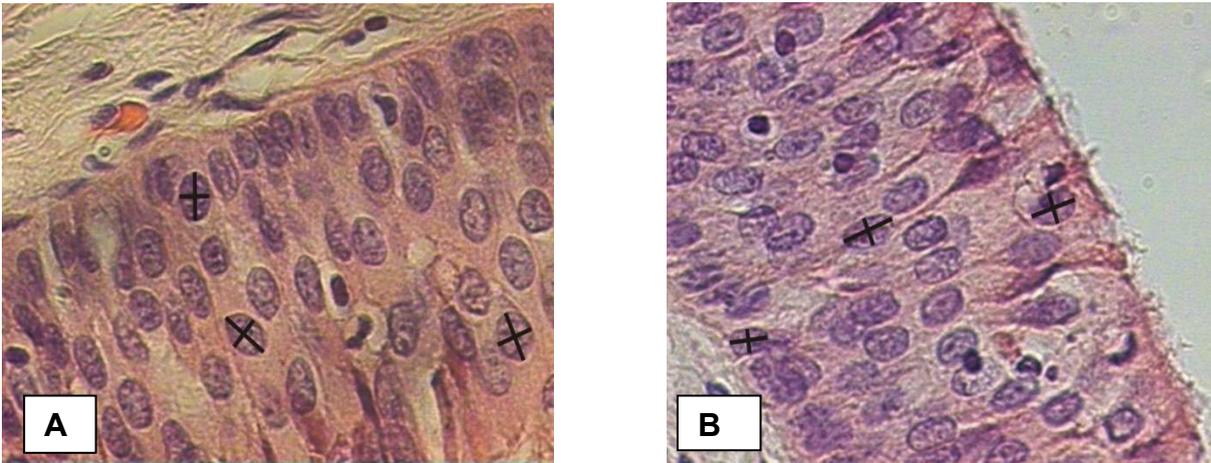


Figura 11: A - Mensuração do diâmetro dos núcleos nas camadas basal, intermediária e superficial no Epitélio escamoso de transição em A e B) (HE - 400x).

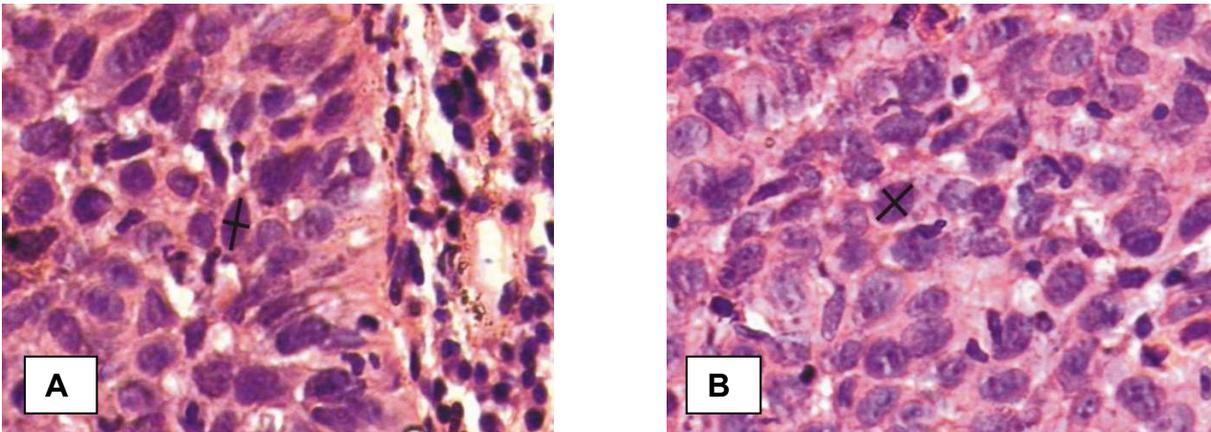


Figura 12: Mensuração do diâmetro do núcleo no epitélio escamoso displásico. A – no 1/3 inferior, B - na camada intermediária (HE - 400x).

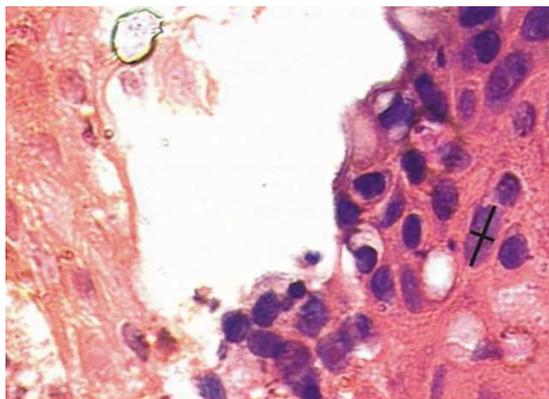


Figura 13: Mensuração do diâmetro do núcleo a camadasuperficial no epitélio escamoso displásico (HE - 400x)

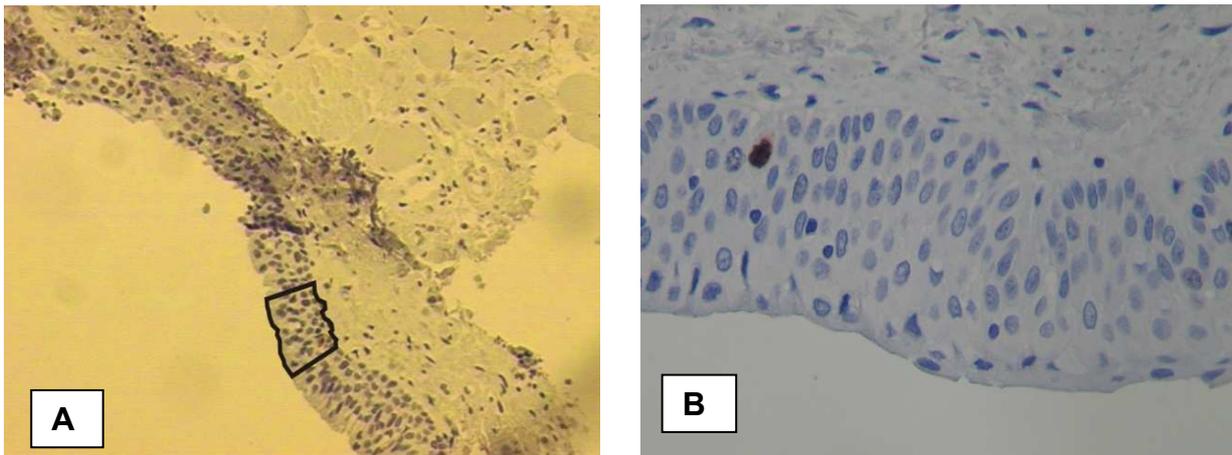


Figura 14: Determinação do número dos núcleos corados em epitélio escamoso de transição. **A.** Área aferida para contagem onde foram vistos apenas dois núcleos marcados(Ki-67, 40X).. **B.** Notar núcleo corado na camada basal (Ki-67 - 400X).

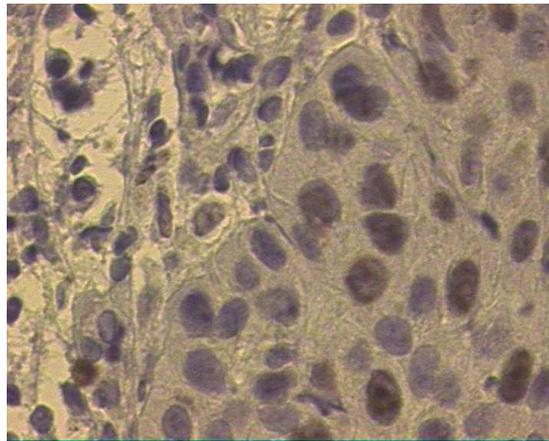


Figura 15: Determinação do número de núcleos corados no epitélio escamoso displásico no 1/3 inferior do epitélio (Ki-67 - 400X).

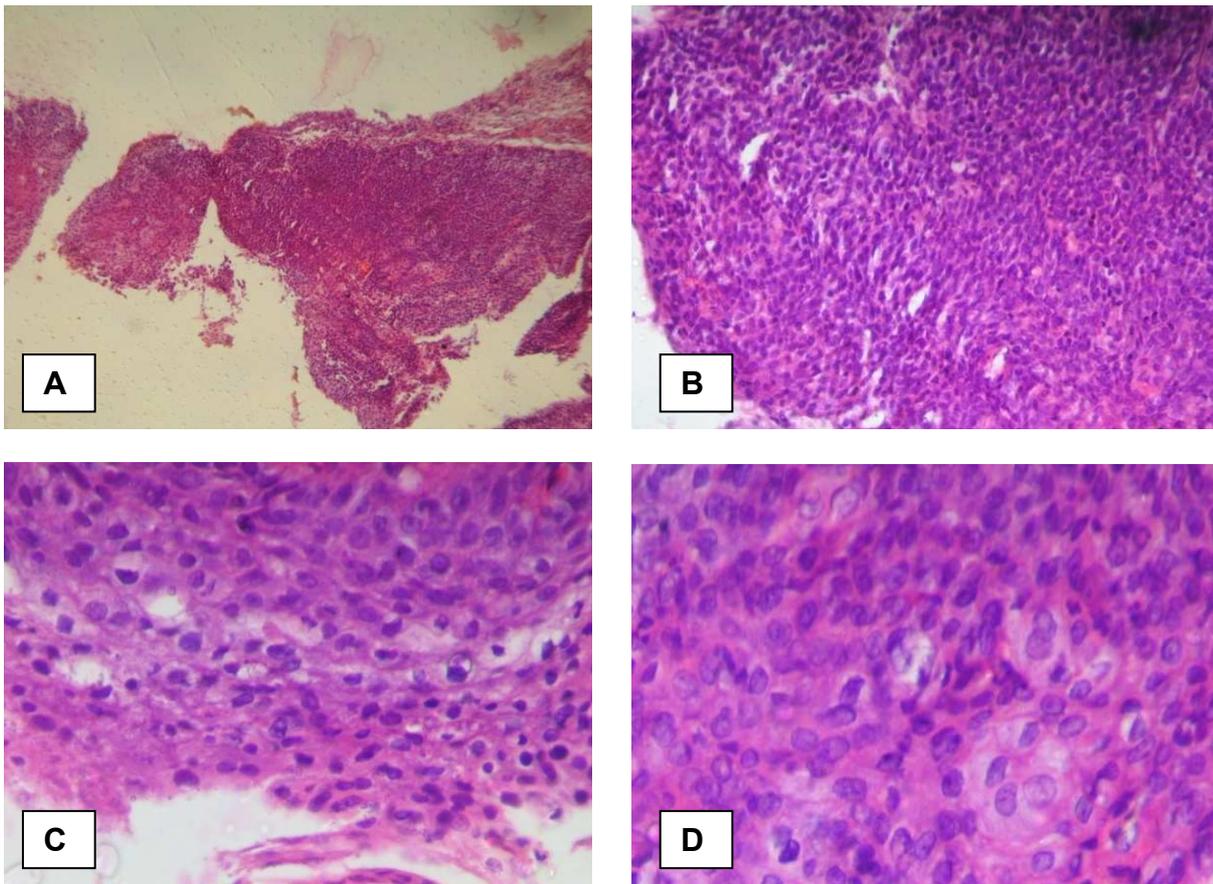


Figura 16: Displasia acentuada. Em "A" e "B" notar hiper celularidade em toda espessura do epitélio escamoso. Em "C" as células superficiais tem núcleos aumentados. A perda da polaridade e pleomorfismo nuclear são evidentes em "D". Grupo caso, nº 2 (HE - 25X; 100X;400X; 400X).

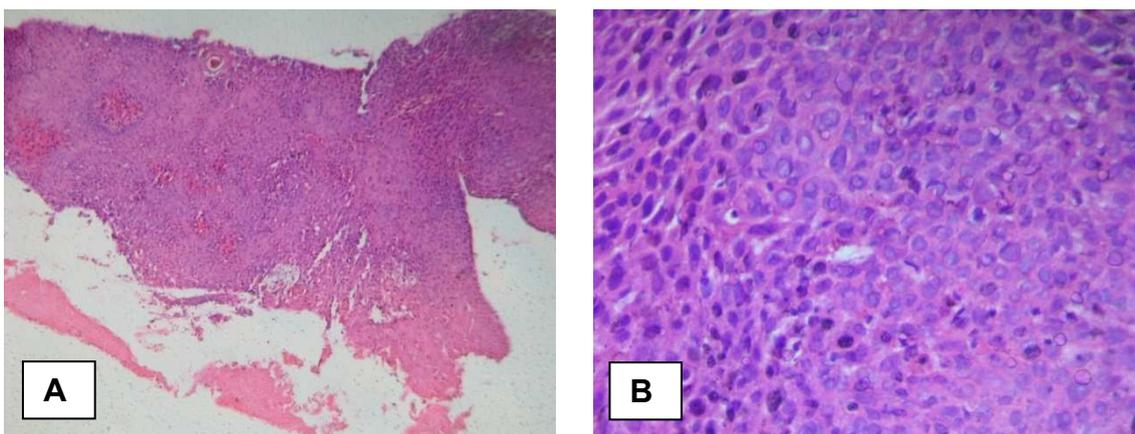


Figura 17: Displasia acentuada. O aspecto é semelhante ao descrito na figura 22. Grupo caso, nº 3 (HE - 100X e 400X).

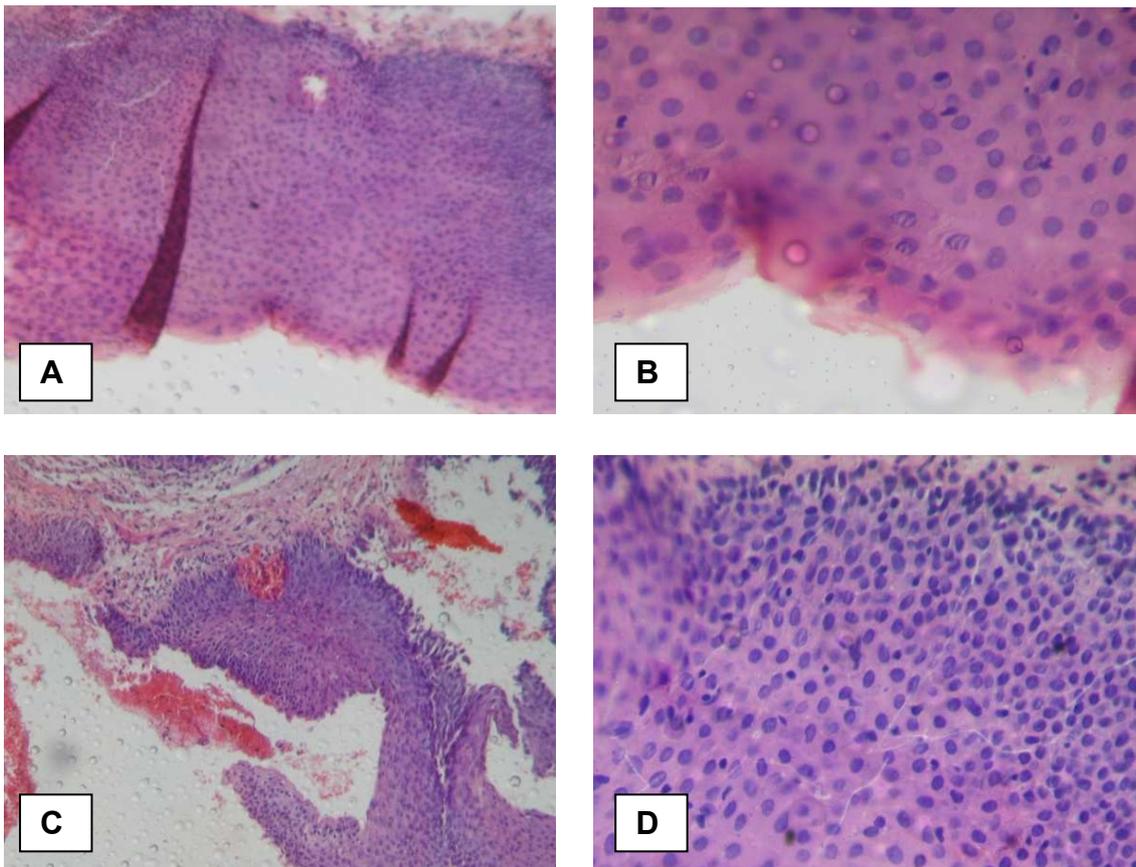


Figura 18: Displasia acentuada. Grupo caso, nº 4 (HE - 100X; 400X; 25 X; 400X).

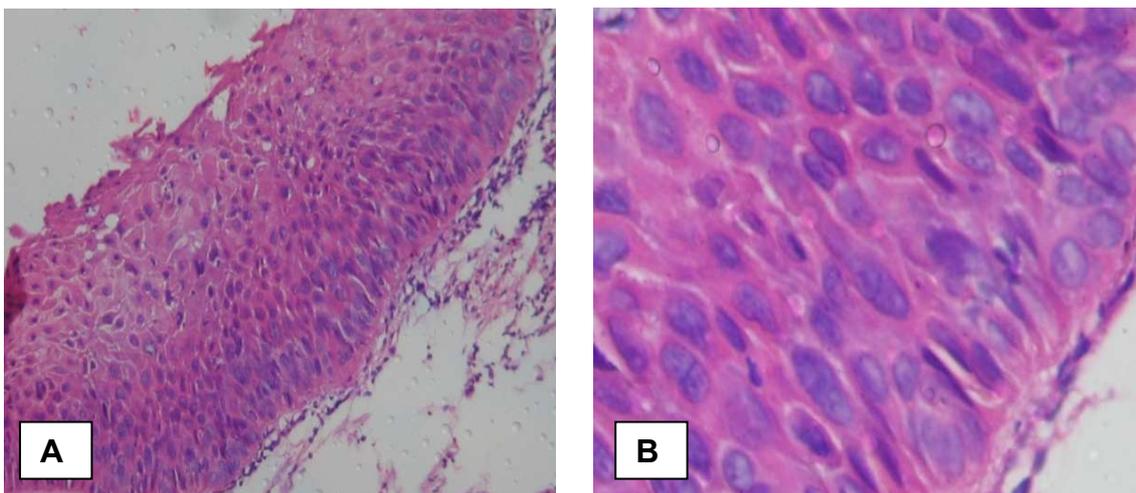


Figura 19: Displasia acentuada. Grupo caso, nº 5 (HE - 100X e 400X).

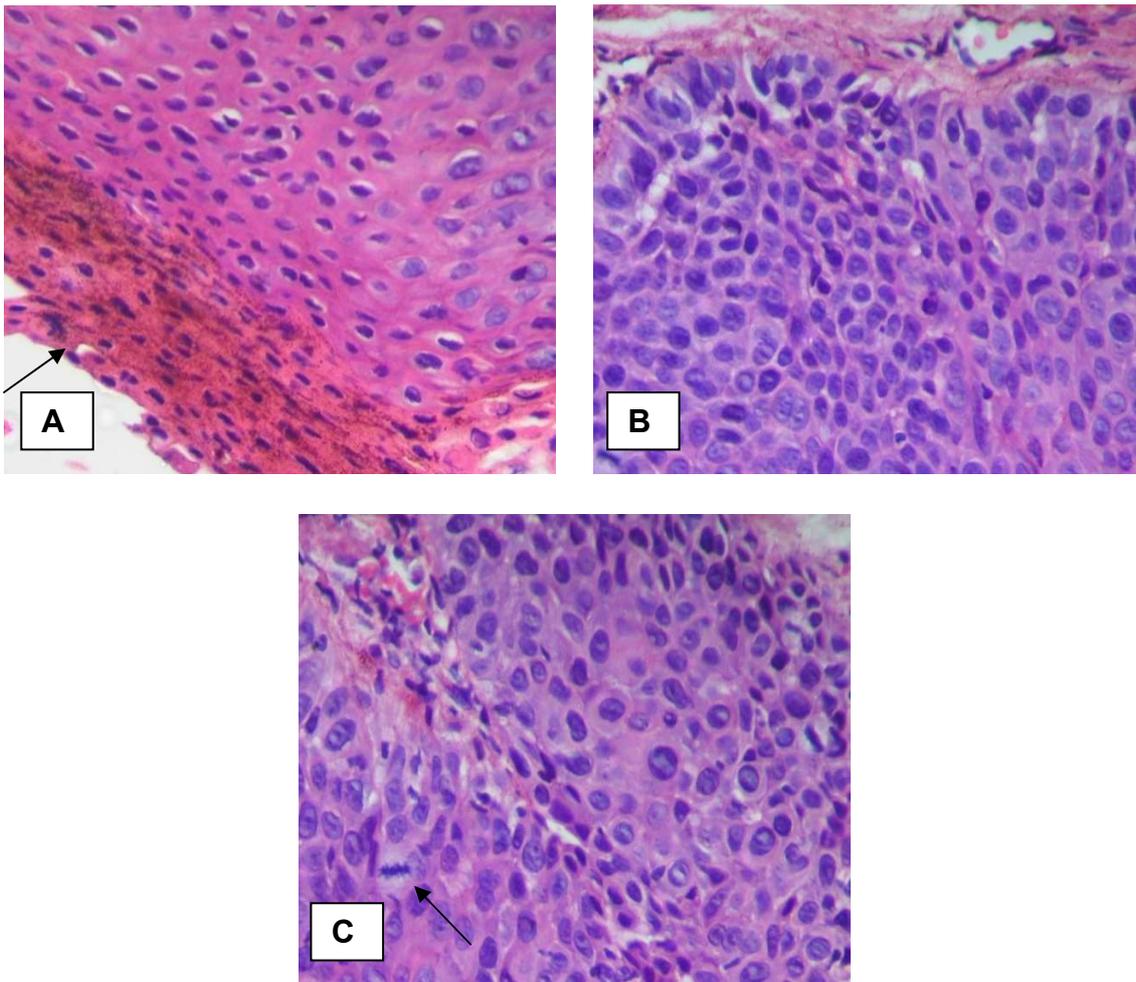


Figura 20: Displasia acentuada. Notar núcleos aumentados de volume em toda espessura do epitélio escamoso com paraqueratose em “A” (seta). Em “B” e “C” observa-se hipercromasia, variação de tamanho e forma dos núcleos e figura de mitose (seta). Grupo caso, nº 1 (HE - 400X).

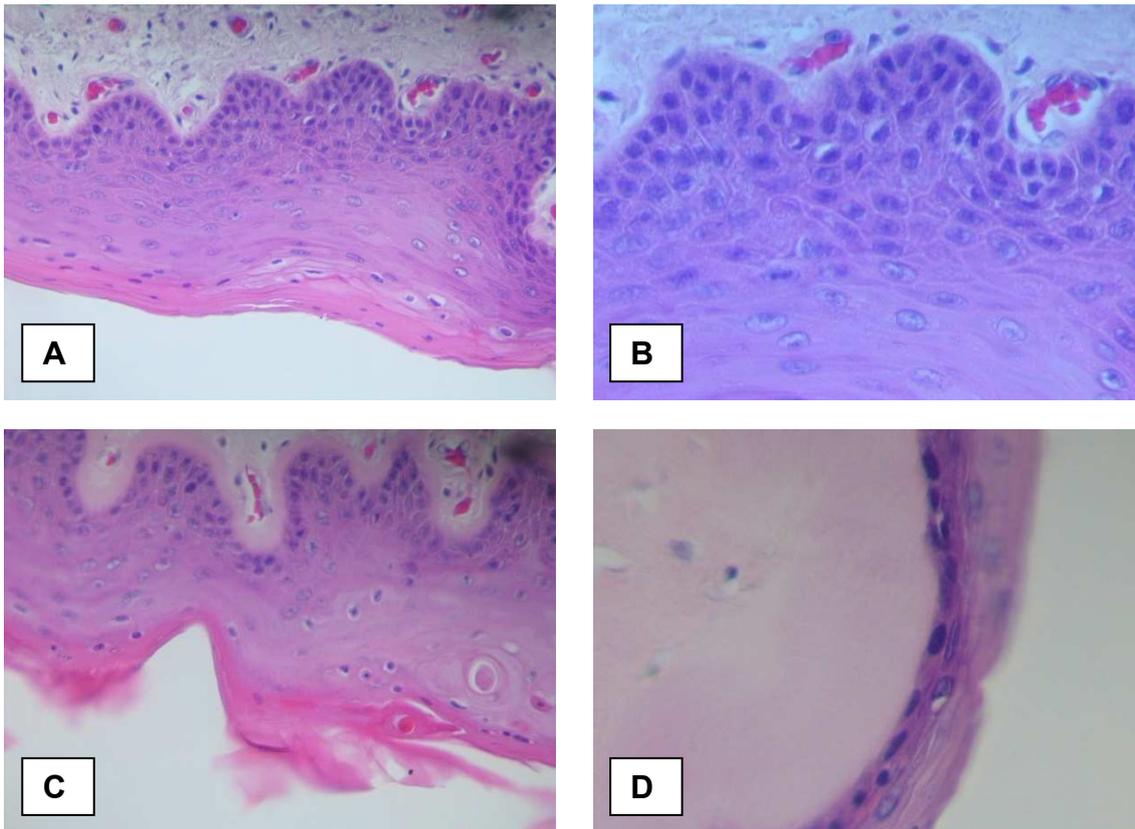


Figura 21: Variações do epitélio escamoso da prega vocal. Em “A” e “B” notar maturação das células epiteliais com núcleos predominantes na camada basal e para-basal e núcleos pequenos com predomínio de citoplasma acidófilo nas células mais superficiais. Em “C” observa-se discreta queratinização em superfície. Grupo controle, nº 2 (HE - 400X). Em “D”, o epitélio escamoso é hipotrófico, delgado. As células da camada basal mostram núcleos preponderantes e ficam mais próximas da superfície. O cório tem aspecto hialinizado. Grupo controle, nº 4 (HE - 400X)

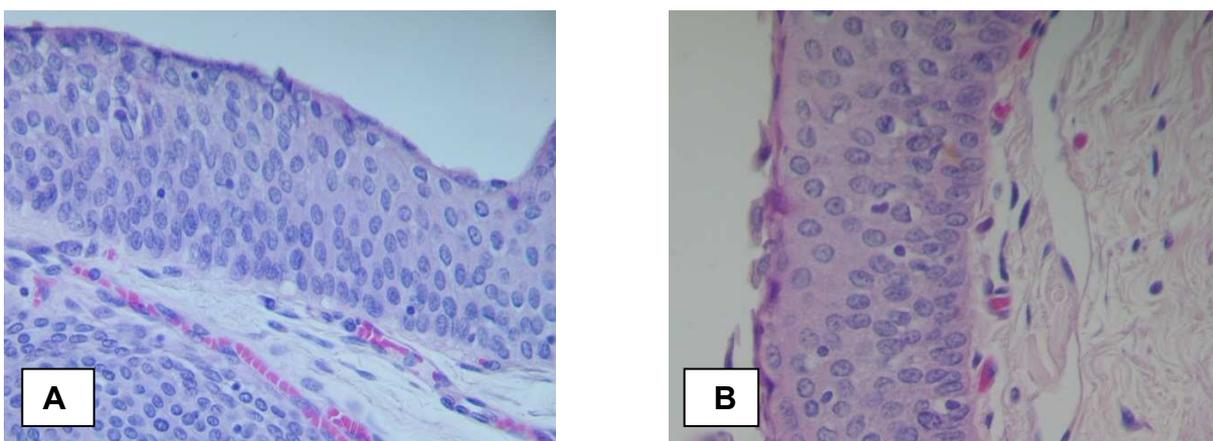


Figura 22: Epitélio de transição. Os núcleos são preponderantes em toda espessura do epitélio, porém, uniformes, de cromatina delicada. Grupo controle, nº 1 e 2 (HE - 400X).

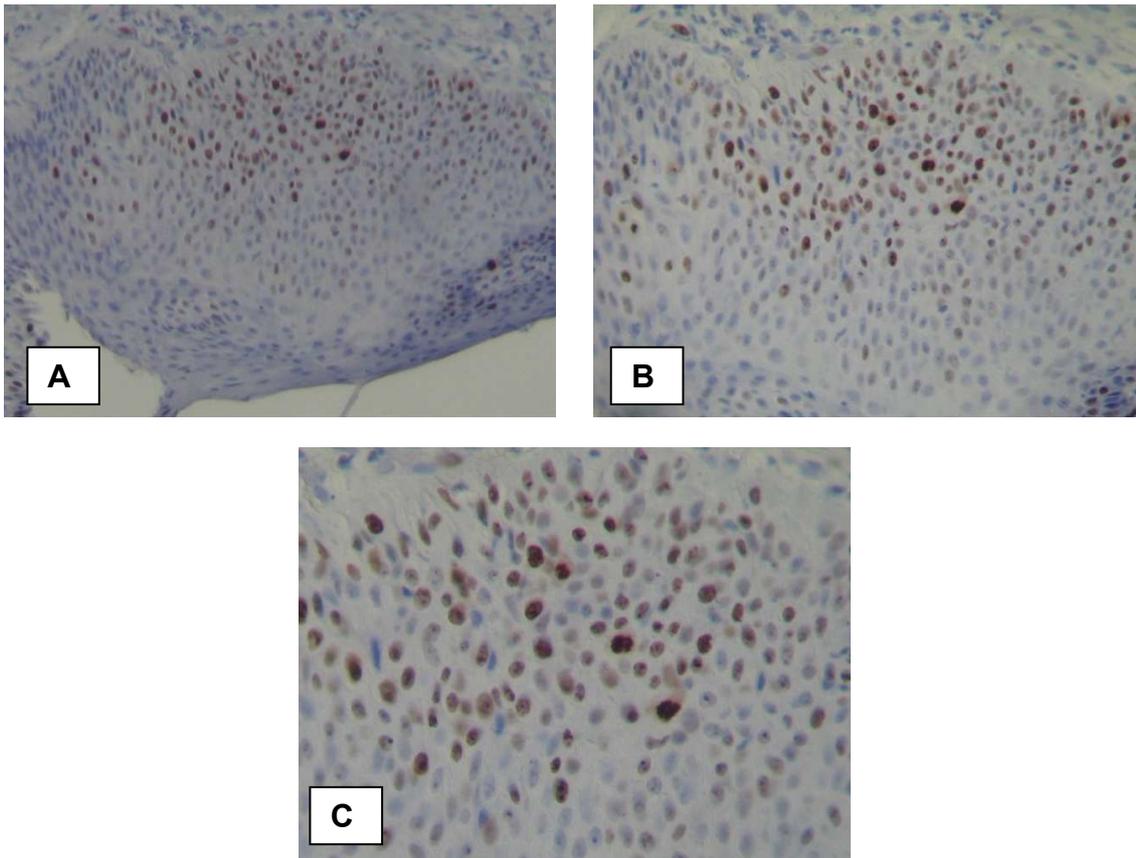


Figura 23: Exame imuno- histoquímico: displasia acentuada. Notar grande aumento de núcleos corados, em vários níveis do epitélio, até o estrato escamoso. Grupo caso, nº 1. (Ki-67 - 100X; 400X; 400X).

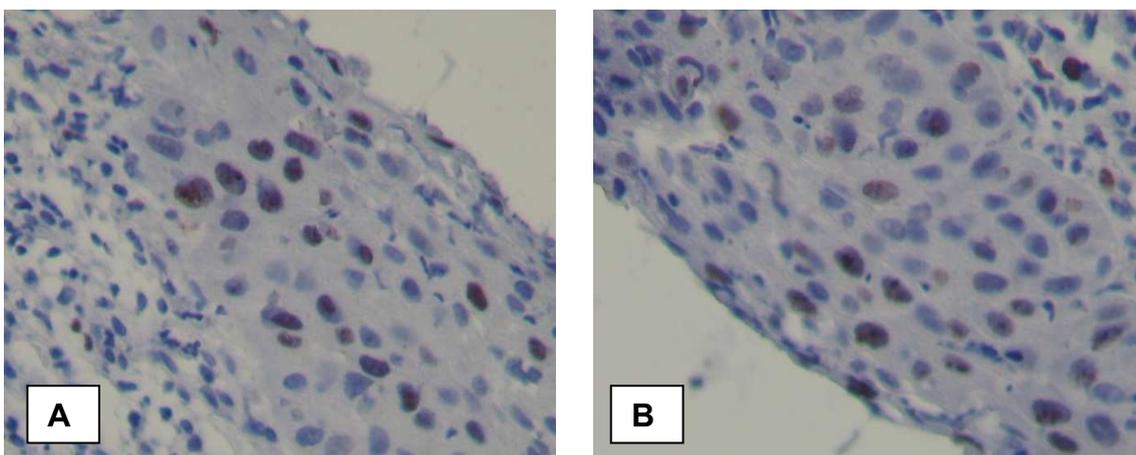


Figura 24: Exame imuno- histoquímico: displasia acentuada. Nesse caso o epitélio é pouco espesso mas notam-se núcleos corados em toda espessura do mesmo. Grupo caso, nº 2. (Ki-67 - 400X)

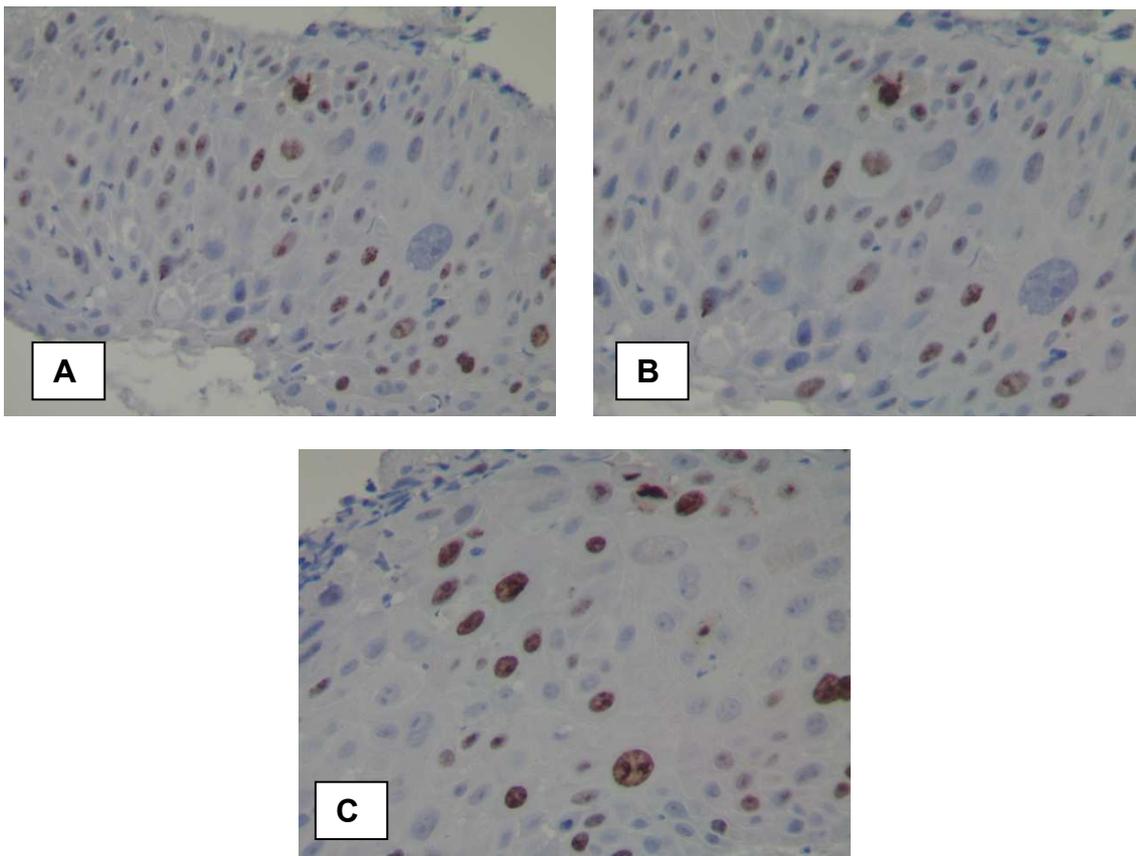


Figura 25: Exame imuno- histoquímico: displasia acentuada. Os núcleos são volumosos com variação de tamanho e há núcleos corados em todos níveis do epitélio. Grupo caso, nº 3. (Ki-67 - 400X).

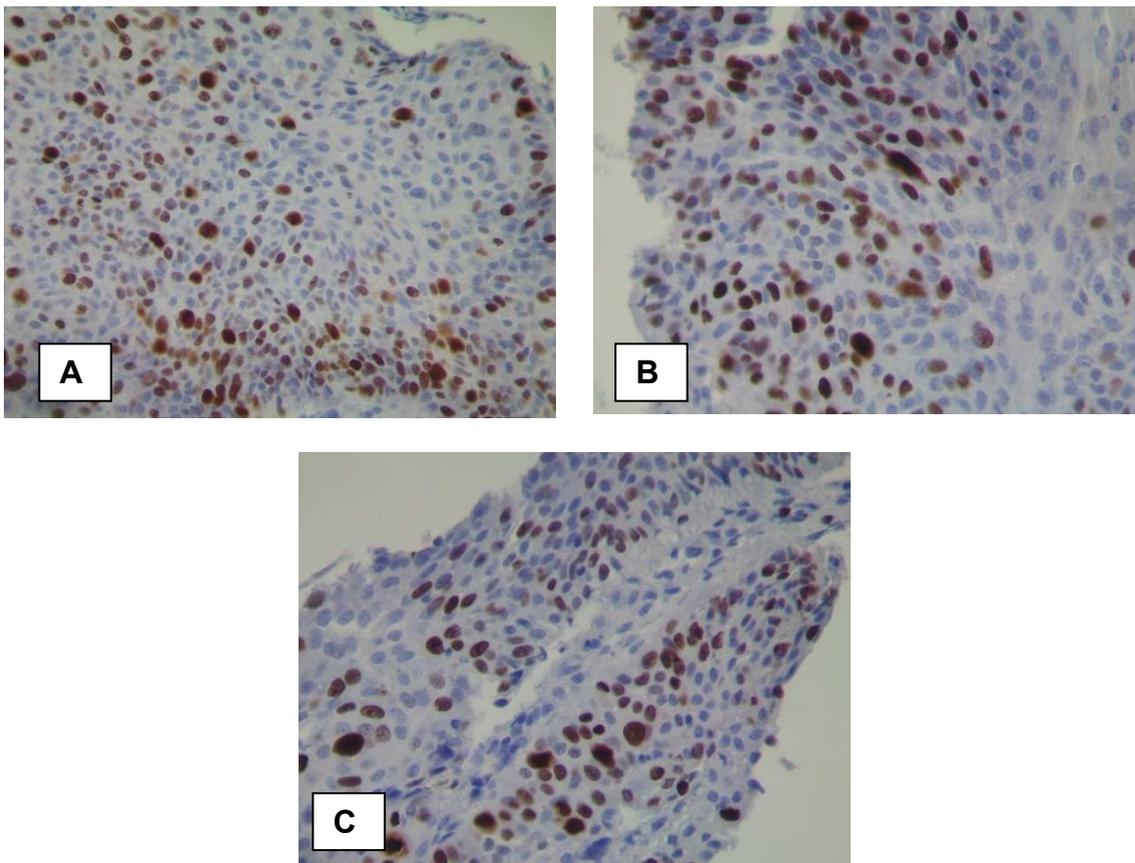


Figura 26: Exame imuno- histoquímico: displasia acentuada. Notar aumento da espessura do epitélio com grande número de núcleos corados em toda espessura do mesmo. Note o contraste com as figuras 34 e 35. Grupo caso, nº 4. (Ki-67 - 400X).

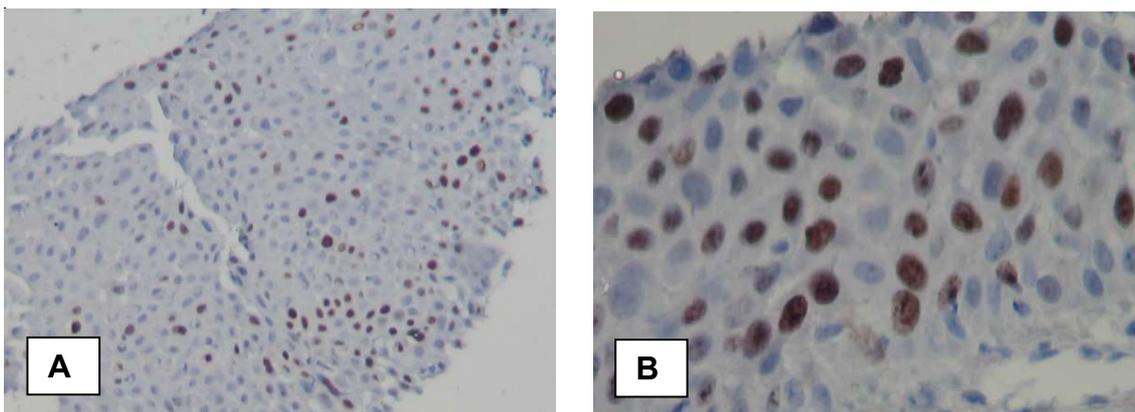


Figura 27: Exame imuno- histoquímico: displasia acentuada. Núcleos corados em todos os níveis do epitélio. Grupo caso, nº 5. (Ki-67 - 100; 400X).

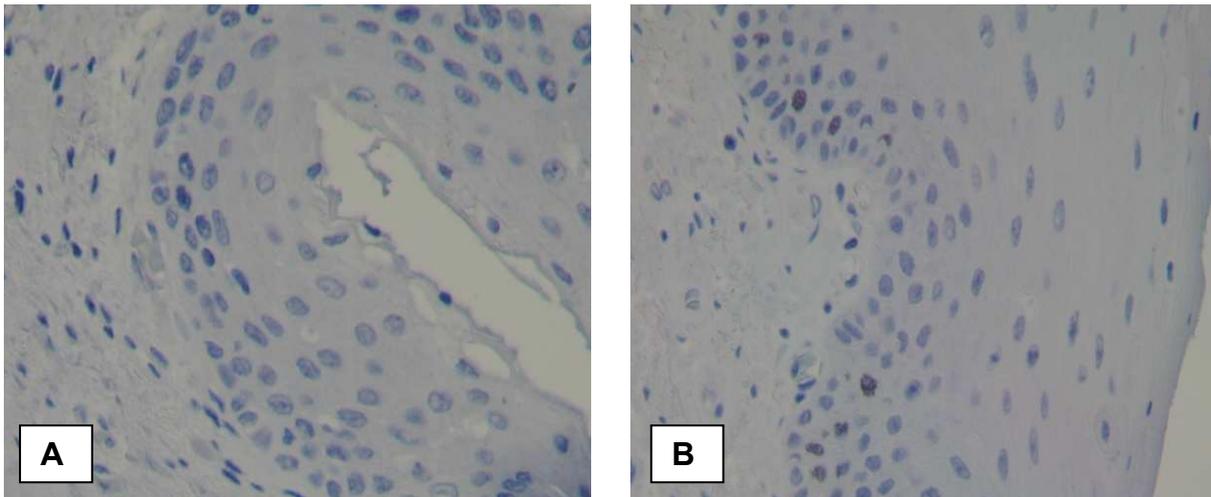


Figura 28: Exame imuno- histoquímico: epitélio escamoso normal. Notar ausência de núcleos corados em “A” e raros núcleos corados em “B”, os quais limitam-se a camada basal. Grupo controle, nº 2 e 3 (Ki-67 - 400X).

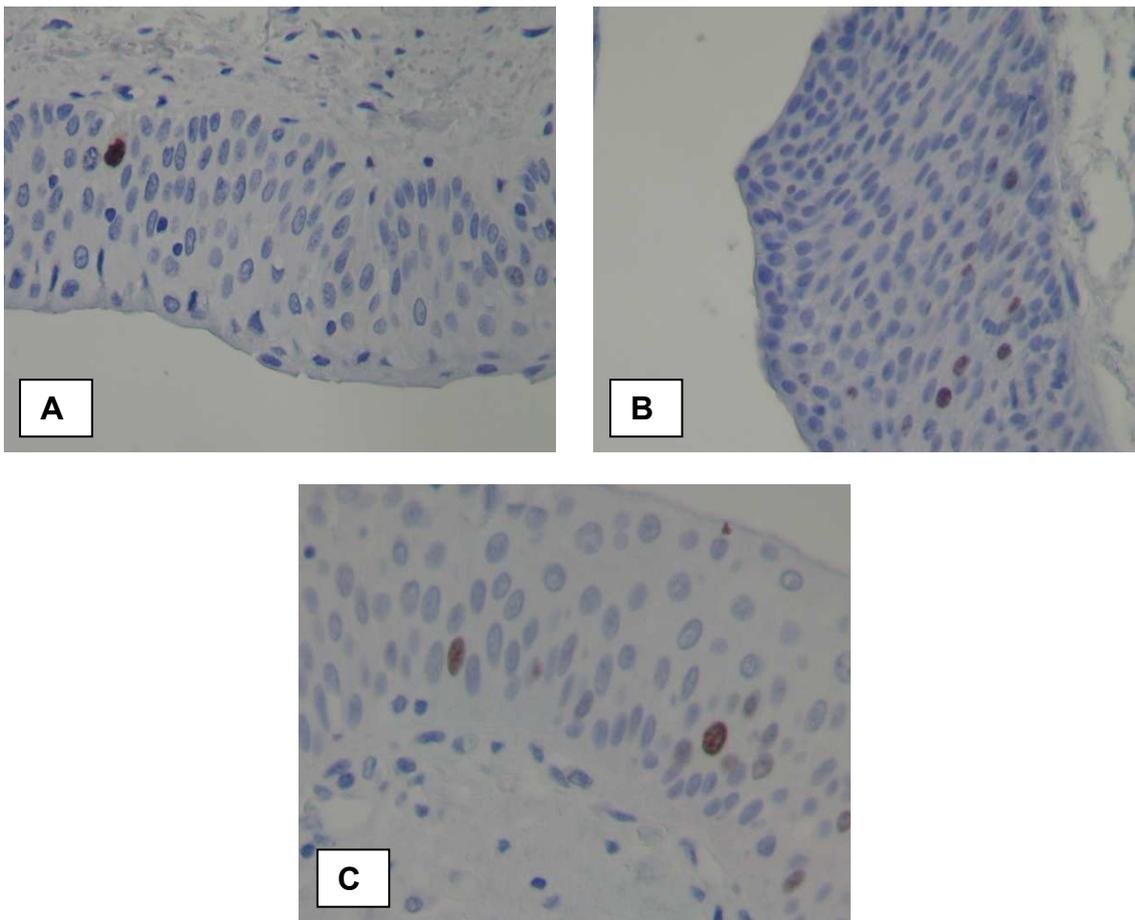


Figura 29: Exame imuno- histoquímico: epitélio de transição. Observar raros núcleos corados na camada basal e para-basal, semelhante a figura 34 no epitélio escamoso normal. Grupo controle, nº 1 (A, B) e 4 (C). (Ki-67 - 400X).

Anexo 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ RG:_____.Aceito, por vontade própria, deixar que sejam usados os dados obtidos da necropsia do meu familiar ou da pessoa de minha responsabilidade que se encontra no SVO (Serviço de Verificação de óbitos) para a pesquisa intitulada Caracterização histomorfométrica e índice proliferativo das neoplasias escamosas intra – epiteliais de alto grau (displasia acentuada/ carcinoma *in situ*) nas pregas vocais, realizada pela mestranda de Patologia da UFPE e sob orientação do professora Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima e co-orientadora Adriana M. S. Telles, para ser feita a dissertação de mestrado de Patologia.Aceito também participar respondendo algumas perguntas de um questionário sobre os hábitos diários da pessoa de minha responsabilidade (fumo, bebida alcoólica).

Este estudo avaliará as mudanças encontradas no órgão da laringe e das cordas vocais com a velhice. Entendemos sua dor pela perda do familiar/ amigo e nos sentimentalizamos com isso. Compreendemos que pode haver algum desconforto por aceitar participar deste estudo, mas acreditamos com isso que este trabalho trará benefícios, entre outros, uma melhor assistência à voz do idoso. O Senhor(a) terá direito a perguntas e respostas a qualquer momento, assim retirar o consentimento dado sem nenhum prejuízo para si ou para o corpo que está em estudo. Também não haverá gastos de sua parte. Não serão divulgados os nomes das pessoas no trabalho de pesquisa e temos o compromisso para que todas as informações da pessoa sejam mantidas em segredo. Em caso de dúvidas, a mestranda está pronta para esclarecer no endereço Rua Manoel Nascimento Torres, q-k, lote 01, n-30, Goiana, Fone 88174744 ou (81)36260713. Declaro que li e entendi este termo e como responsável, voluntariamente e autorizo a utilização dos dados obtidos da necropsia e do questionário para elaboração deste trabalho.

Responsável: _____

Testemunha _____ e _____

Pesquisadora:_____

n: _____

Anexo 3- PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS DOS PACIENTES DO HCP E SVO

1.Nome: _____ 2.Idade: _____ 3.Sexo: ()F ()M

4.Estado civil: ()solteiro(a) ()casado(a) ()viúvo(a) ()divorciado(a)

5.Profissão: _____ 6.Cidade: _____ 7. Cor: _____

8.Sintomas: _____ 9. Tempo: _____

10. O indivíduo é/ era :

10.1.() fumante ou ex-fumante. Tempo _____ 10.2.() não fumante.

11. o indivíduo é/ era::

11. 1.() etilista ou abandonou o hábito 11.2.() não era etilista

12. Método de tratamento

12.1() cirúrgico. Tipo: _____ 12.2() quimioterapia

12.3 () radioterapia 13.4 () outros _____

13. Registro do departamento de patologia do HCP:

13.1.Localização do tumor : () prega vocal direita () prega vocal esquerda

13.2Diagnóstico Histopatológico : _____

n: _____

Anexo 4 - MORFOMETRIA DOS EPITÉLIOS

Caso _____ Controle _____

1) Área Objetiva 40x (um):

Área do epitélio escamoso de transição : _____

Área do epitélio escamoso normal : _____

Área do epitélio escamoso displásico : _____

2) Diâmetro do núcleo nos epitélios (Objetiva 400x)**2.1 .camada basal e parabasal****Escamoso**

Nº de campos

p/ contagem: _____

1.	6.
2.	7.
3.	8.
4.	9.
5.	10.

Transição

Nº de campos

p/ contagem: _____

1.	6.
2.	7.
3.	8.
4.	9.
5.	10.

Displásico

Nº de campos

p/ contagem: _____

1.	6.
2.	7.
3.	8.
4.	9.
5.	10.

2.2 camada intermediária**Escamoso**

Nº de campos

p/ contagem: _____

1.	6.
2.	7.
3.	8.
4.	9.
5.	10.

Transição

Nº de campos

p/ contagem: _____

1.	6.
2.	7.
3.	8.
4.	9.
5.	10.

Displásico

Nº de campos

p/ contagem: _____

1.	6.
2.	7.
3.	8.
4.	9.
5.	10.

2.3 camada superficial**Escamoso**

Nº de campos

para contagem: _____

1.	6.
2.	7.
3.	8.
4.	9.
5.	10.

Transição

Nº de campos

para contagem: _____

1.	6.
2.	7.
3.	8.
4.	9.
5.	10.

Displásico

Nº de campos

para contagem: _____

1.	6.
2.	7.
3.	8.
4.	9.
5.	10.

n: _____

Anexo 5 - PROTOCOLO DA IMUNOHISTOQUIMICA COM O MARCADOR ki-67(Densidade)

Nº _____

- 1) **Nnc** no epitélio escamoso normal (objetiva 400x): _____
- 2) **Anc** no epitélio escamoso avaliado na contagem (Objetiva 40x): _____
- 3) **Dnc** no epitélio escamoso normal: _____
- 4) **Nnc** no epitélio escamoso de transição (objetiva 400x): _____
- 5) **Anc** no epitélio escamoso de transição avaliado na contagem (Objetiva 40x): _____
- 6) **Dnc** no epitélio escamoso transição: _____
- 7) **Nnc** no epitélio escamoso displásico (objetiva 400x): _____
- 8) **Anc** no epitélio escamoso displásico avaliado na contagem (Objetiva 40x): _____
- 9) **Dnc** no epitélio escamoso displásico: _____

Anexo 6 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ETICA**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto de Pesquisa nº 21/2007 intitulado “CARACTERIZAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS NEOPLASIAS ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS DE ALTO GRAU (DISPLASIA ACENTUADA/CARCINOMA IN SITU) NAS PREGAS VOCAIS”, apresentado pela pesquisadora Elisângela Barros Soares, foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco /HCP.

Os autores deverão remeter cópia do artigo publicado para arquivo na Biblioteca do HCP e terão que mencionar nas publicações a Instituição onde o trabalho foi realizado.

Recife, 13 de novembro de 2007.

Atenciosamente,

**Dra Fatima Matos
Coordenadora
Comissão de Ética em Pesquisa
Hospital de Câncer de Pernambuco**

Anexo 7 - TRABALHO DESENVOLVIDO DURANTE O MESTRADO

SBFa

Página 1 de 1



16º Congresso Brasileiro de Fonoaudiologia
Campos do Jordão - SP - 24 a 27 de setembro



Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado: **FUMO E PREGAS VOCAIS: UMA ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS DIMENSÕES MORFOLÓGICAS EM CADÁVERES DE IDOSOS DO SEXO MASCULINO** dos autores: HILTON JUSTINO DA SILVA, SANDRELLI VIRGINIO DE VASCONCELOS, ROBERTO JOSÉ VIEIRA DE MELLO, ELISÂNGELA BARROS SOARES, foi apresentado como Poster no 16º Congresso Brasileiro de Fonoaudiologia, realizado de 24 a 27 de setembro de 2008.

Campos do Jordão, 27 de setembro de 2008.

Ana Luiza Gomes Pinto Navas
Diretora Científica

Fernanda Dreux Miranda Fernandes
Presidente

Beatriz de Castro Andrade Mendes
Diretora Científica

Apoio Institucional



Anexo 8 – SUBMISSÃO DO ARTIGO**REVISTA CEFAC**
Atualização Científica em Fonoaudiologia e Educação

São Paulo, 05 de novembro de 2008

Prezados autoras Elisângela Barros Soares, Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima, Adriana Maria da Silva Telles,

Seu artigo intitulado: "HISTOPATOLOGIA DO CA IN SITU DAS PREGAS VOCAIS", foi recebido e iniciou processo de avaliação na Revista CEFAC sob número 167-08. As primeiras correções serão solicitadas em breve, após análise da equipe editorial.

Atenciosamente,

Kelly Ueda
Revista CEFAC