



**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**TESE DE DOUTORADO**

**PAPILOMATOSE DE VIAS AÉREAS SUPERIORES:  
ASSOCIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA TECIDUAL COM ASPECTOS  
CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DA  
INFECCÃO POR HPV**

**GENTILEZA SANTOS MARTINS NEIVA**

**Salvador – Brasil**

**2013**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**PAPILOMATOSE DE VIAS AÉREAS SUPERIORES:  
ASSOCIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA TECIDUAL COM ASPECTOS  
CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DA  
INFECCÃO POR HPV**

**GENTILEZA SANTOS MARTINS NEIVA**

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ – BA, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Eduardo A. Gonçalves Ramos  
Co-Orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

**Salvador – Brasil**

**2013**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

N397p Neiva, Gentileza Santos Martins  
Papilomatose de vias aéreas superiores: associação da resposta imunológica tecidual com aspectos clínicos, epidemiológicos, morfológicos e moleculares da infecção por HPV [manuscrito] / Gentileza Santos Martins Neiva. - 2013.  
119 f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

**Tese (Doutorado) Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, 2013.**

Orientador: Dr. Eduardo A. Gonçalves Ramos  
Co-orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

1. Papilomavirus. 2. Papilomatose laríngea recorrente e não recorrente. 3. Papiloma nasal e oral. 4. HPV. 5. Resposta imune tecidual. 6. Imuno-histoquímica I.Título.

CDU 616-006.52:578

## DEDICATÓRIA

**Aos meus pais Rita e Raimundo** (nos seus 101 anos de vida), exemplos de honestidade, dignidade e determinação, educaram-me e ensinaram-me os valores éticos e humanos ao longo da vida. Essas pessoas que com firmeza guiaram-me e incentivaram-me a prosseguir com humildade, respeito e perseverança. Meu eterno agradecimento a vocês que mesmo com as dificuldades e a saudade não pouparam esforços para a realização deste sonho... Quando pequena colocando eu para os meus primeiros estudos de português e matemática. Amo vocês.

**À minha irmã Geovana**, em especial, com seus primeiros incentivos, acreditando que eu podia chegar lá, e aí começou a ler os meus resumos, projetos, ajuda nas interpretações dos meus resultados, sempre do meu lado nos momentos mais difíceis, torceu pelo meu tão sonhado doutorado. Geo, hoje você não lê mais os longos textos para fazer suas correções, mas já aprendeu o que é papilomatose laríngea e HPV. Te amo!

**Ao meu irmão Raimundo e à minha irmã Mariléa** cujo apoio e incentivo foram essenciais em todas as etapas da minha vida, e não poderia ser diferente neste momento. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado. Amo muito vocês!

**À minha cadelinha Natasha** que tornou a vida mais alegre e divertida nos momentos de desânimo. Você é linda.

**Ao meu companheiro Fernando Ferraz**, continente amoroso, pelo carinho e incentivo que me foram dados para seguir em frente, por completar a minha vida me fazendo muito feliz e por me ensinar o significado da palavra felicidade.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades, sem ele, nada seria possível.

Ao meu orientador **Dr. Eduardo Ramos** por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa e pela oportunidade de me permitir partilhar de seu conhecimento científico na área. Obrigada pelo apoio nos momentos difíceis. Minha especial gratidão.

Ao **Dr. Davi Grego**, simplicidade no exercício da medicina, pelo apoio na busca de pacientes para o estudo e transmissão dos seus conhecimentos científicos e pela amizade. Uma pessoa excepcional e rara de se encontrar.

A **Dra Luisa Villa**, que me recebeu de braços abertos, com carinho, dedicação, pela confiança, apoio e constante aprendizado, exemplo de coerência, competência e profissionalismo, bom senso e beleza de docência, pelo sorriso acolhedor, disponibilidade e ensinamentos transmitidos, sejam no âmbito profissional com também no pessoal. A minha eterna admiração.

Ao **Dr. Mitermayer Galvão**, pelo exemplo de dedicação à pesquisa, e co-orientação deste trabalho.

Ao **Dr. Aristides Cheto** pelo fornecimento e liberação do Instituto Patologia da Bahia, pelos os blocos de parafina dos casos estudados nesse trabalho.

A **Ana Carvalho** pelo auxílio na padronização da metodologia e realização das imunohistoquímicas e a **Cristina Mota** que cortou as biópsias com rapidez e prontidão. Grandes amigas, obrigada pelo convívio diário e pela a amizade, a qual tem sido muito importante para mim.

A **Antonieta Androeli**, pelo suporte técnico nos ensaios de genotipagem pelo Kit INNO-Lipa, que sempre teve total presteza, gentileza, atenção e especialmente pela sua amizade, pelo carinho maternal.

A **Cecília Costa** que gentilmente colaborou com as análise da genotipagem.

Aos **Doutores Edson Duarte e Nilvano Andrade** pelas valiosas considerações no processo de qualificação, muitas delas incorporadas a esta tese.

A **Dra Viviane Boaventura**, na colaboração desse trabalho.

Ao **Dr. Jackson Costa** por compartilhar dessa trilha e fidelidade aos princípios éticos da amizade.

A **Rebeca Costa** pela dedicação e apoio na realização das imuno-histoquímicas.

Aos médicos residentes **Marília Vasconcelos, Thiago Alcântara, Tiago Barros, Juliana Veloso, Adriana Burgos**, pela espontânea colaboração.

Aos funcionários do laboratório de Histopatologia da Fiocruz, **Claudia Stutz e Marcio Ferreira** que sempre estiveram prontos para me auxiliar.

Aos funcionários da Pós-Graduação, **Tauar Figueireido e Taíse Coutinho** pelas orientações necessárias e atenção.

Aos prestativos funcionários da Biblioteca **Adelvani de Araujo, Ana Maria Fiscina e Eliana Garcia** pelo auxílio na localização dos artigos científicos.

A **Profa. Conceição Almeida** pela consultoria na análise estatística dos resultados.

Aos **mestres** que compõem o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

Ao **Hospital Santa Izabel**, referencia em Otorrinolaringologia, no estado da Bahia.

À **Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – CPqGM/BA** e a todos os seus integrantes pela estrutura que me proporcionou à realização deste trabalho.

À **Universidade Federal de Alagoas/ICBS** na pessoa da sua Diretora à **Professora Theresinha Calado**, sua presença amiga e exemplo de profissionalismo foram essenciais na minha formação profissional. O meu eterno carinho.

Aos colegas do **Departamento de Embriologia e Histologia** do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS-UFAL), pelo receptivo ambiente de trabalho proporcionado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas – **FAPEAL**, pelo apoio financeiro.

Ao primo **Fausto Martins**, exemplo de simplicidade e humildade, pela simpatia e solícitude apresentadas em todos os momentos. E por ter acreditado neste trabalho. Obrigada pelo seu carinho!

A minha **tia Deuzelina**, mesmo quando separada pela distancia não me faltou com suas palavras de conforto e ânimo. Obrigada pela as suas bênçãos.

Ao casal amigo **José Barbosa e Rosa Topázio**, pelo incentivo nas horas mais difíceis que passei durante essa etapa da minha vida. Obrigada pelas palavras de conforto e ânimo, sempre prontos para me ajudar. Meu eterno carinho.

Aos meus amigos (as) **Fabíola Cardilho, Ronam Batista, Elza Granja, Manuela Telles, Francisca Conceição, Cida Pacheco, Leide Silva, Cristina Carrera, Vera Pedrosa, Fernando Raton**, cujo apoio e as palavras de carinho em todos os momentos foram importantes.

Aos **pacientes** por aceitarem contribuir com o progresso da ciência.

E a **todos aqueles** que não estando ligados pelos laços da família, certamente estão pelos laços do coração, e que direta ou indiretamente, colaboraram para que este trabalho fosse realizado com sucesso. E que se não estão citados explicitamente, cujo carinho e afeto jamais me faltaram, meu sincero pedido de desculpas e a certeza de que a omissão se restringe a estas paginas.

A todos, minha eterna gratidão!

## *DURANTE ESTE TRABALHO...*

*As dificuldades não foram poucas...*

*Os desafios foram muitos...*

*Os obstáculos, muitas vezes, pareciam intransponíveis.*

*Muitas vezes nos sentimos só, e, assim, o estivemos...*

*O desânimo quis contagiar, porém, a garra e a tenacidade foram mais fortes, sobrepondo esse sentimento, fazendo nos seguir a caminhada, apesar da sinuosidade do caminho.*

*Agora, ao olharmos para trás, a sensação do dever cumprido se faz presente e podemos constatar que as noites de sono perdidos, o cansaço da digitação, os longos tempos de leituras realizadas, a ansiedade em querer fazer o melhor e a angústia de muitas vezes não o conseguir; não foram em vão.*

*Aqui estamos, como sobreviventes de uma longa batalha, porém, muito mais fortes e hábeis, com coragem suficiente para mudar a nossa postura, apesar de todos os percalços...*

*Como dizia Antoine Saint Exupéry em sua obra prima*

*“O Pequeno Príncipe”:*

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



## RESUMO

**Introdução:** O Papiloma Vírus Humano (HPV) é agente etiológico de um grupo extenso de lesões do qual fazem parte a papilomatose laríngea recorrente (PLR) e os papilomas de cavidade nasal e oral, além de câncer cervical uterino, pênis e de região anal. **Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi descrever a resposta imune celular tecidual dos pacientes com PLR e não recorrente e naqueles portadores de papilomas de cavidade nasal e oral, identificando os tipos de HPV nas lesões. **Material e Método:** Foram incluídos nesta pesquisa 125 pacientes cujos laudos anatomopatológicos e blocos teciduais parafinizados foram oriundos dos arquivos anatomopatológicos do Hospital Santa Izabel no período de 2004 a 2008; e amostras teciduais dos pacientes atendidos no ambulatório do mesmo Hospital entre 2009 a 2012. A análise morfológica das lesões foi realizada pelo HE e Sirius Red. Para a avaliação imuno-histoquímica foram selecionados 36 pacientes cujas lesões apresentavam infiltrado inflamatório graduado como moderado e intenso. Foram pesquisados os seguintes marcadores celulares: CD1a, CD3, CD4, CD8, CD15, CD20, CD68, CD117, VS38, Ki-67. A detecção do DNA do HPV e a identificação dos tipos virais foram realizadas pela técnica de polimerização em cadeia (PCR) usando o Kit INNO-Lippa. **Resultados:** Os parâmetros clínico-morfológicos foram avaliados, entretanto não foi observada nenhuma diferença clínica ou histológica significativa nas três localizações avaliadas. De um modo geral, foi observada uma baixa frequência de células CD68 nas amostras examinadas. A expressão de células de Langerhans através da pesquisa de CD1a foi negativa em todas as lesões. Os linfócitos T CD4 estiveram negativos na maior parte das amostras de PLR, papiloma nasal e oral. Os genótipos de HPV mais prevalentes nas lesões de PLR foram: HPV 6, 11, 16; nos papilomas nasais foram: HPV 11, 16, 52 e nos papilomas orais foram: HPV 16, 52, 58. **Conclusões:** Este estudo demonstrou uma baixa expressão de células T CD4, CD68 e de células de Langerhans CD1a positivas no infiltrado inflamatório das lesões papilomatosas. A frequência do HPV nos 36 casos submetidos a imuno-histoquímica foi de 77,8%. Tais peculiaridades da resposta imune tecidual encontradas no presente estudo poderiam facilitar a persistência da infecção pelo HPV e, no seu conjunto, possibilitariam uma redução na quantidade de células de Langerhans CD1a positivas.

Descritores: 1.Papilomavírus; 2.Papilomatose laríngea recorrente e não recorrente; 3.Papiloma nasal e oral; 4.HPV; 5.Resposta imune tecidual; 6.Imuno-histoquímica.

## ABSTRACT

**Introduction:** The Human Papilloma Virus (HPV) is the etiological agent of an extensive group of injuries which comprises the recurrent laryngeal papillomatosis (RLP) and papillomas of the nasal and oral cavities; and cancer of uterine cervix, penis and anal region as well. **Objective:** The aim of this study was to describe the tissue cellular immune response of patients with non-recurring and RLP and those having papillomas of the nasal and oral cavities and identifying the types of HPV at the lesions. **Material and Methods:** The study included 125 patients whose pathology reports and paraffin embedded tissue blocks were coming from the pathology files of the Santa Izabel Hospital in the period 2004-2008; and tissue samples of patients of the same Hospital between the years of 2009-2012. The morphological analysis of lesions was performed by HE and Sirius Red. To the immunohistochemical analysis were selected 36 patients whose inflammatory infiltrate at the lesions were graded as moderate and intense. We searched the following cell markers : CD1a , CD3 , CD4 , CD8 , CD15 , CD20 , CD68 , CD117 , VS38 ; and Ki -67 proliferation antigen . The detection of HPV DNA and identification of viral types were performed by the technique of polymerase chain reaction (PCR) using the kit INNO – Lippa. **Results:** The clinical and morphological parameters were assessed; however there has been no clinical or histological significant difference in the three locations evaluated. In general, there was a low frequency of CD68 in the examined samples. The presence of CD1a positive Langerhans was negative in all lesions at different locations. The CD4 + T lymphocytes were negative in most PLR, nasal and oral papillomas samples. The most prevalent HPV genotypes in RLP lesions were HPV 6, 11, 16; in the nasal papillomas were HPV 11, 16, 52; and in oral papilloma were HPV 16, 52, 58. **Conclusions:** This study showed a low expression of CD4, CD68 and CD1a positive Langerhans cells in the inflammatory infiltrate of the lesions. The frequency of HPV in 36 cases undergoing immunohistochemistry was 77.8 %. These peculiarities of the impaired tissue immune response found in this study might facilitate the persistence of HPV infection, and as a whole, could allow a reduction in the number of Langerhans cells CD1a positive.

Keywords: 1. Papilomavírus; 2. Recurrent laryngeal papillomatosis and non-recurring; 3. Papilloma nasal and oral; 4. HPV; 5. Tissue immune response; 5. Imuno-histochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida do HPV .....	22
Figura 2	Ciclo celular do HPV adaptado .....	23
Figura 3	Árvore filogenética dos papilomavírus com base na análise da sequência do gene L1 .....	25
Figura 4	Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata utilizando os primers PCO3/PCO4 para amplificação da região do gene (110pb) .....	50
Figura 5	Hibridização em linhas .....	51
Figura 6	Diagrama de interpretação – genótipos de HPV .....	52
Figura 7	Aspectos morfológicos das lesões em estudo. (A) Papilomatose laríngea com evidências de epitélio acantótico e coilocitose (setas) intensa (HE, 200X). (B) Papiloma de cavidade nasal com eixos conjuntivo fibroso revestido por epitélio acantótico (papilomatose) (HE, 100X). (C) Paraceratose intensa na superfície epitelial de papiloma de cavidade oral (HE, 400X). (D) Hiperceratose intensa e grânulos de cerato-hialina, eixo abundante de papiloma de cavidade oral (HE, 400X) .....	63
Figura 8	Aspectos morfológicos das lesões em estudo. (A) Epitélio acantótico com disqueratose (setas) intensa e infiltrado inflamatório mononuclear na lâmina própria (HE, 400X). (B) Caso com displasia moderada em PLR (HE, 400X). (C) Caso de PLR mostrando o infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (HE, 400X). (D) Fibrose intensa na lâmina própria em paciente com PLR (PIFIG, 100X) .....	64
Figura 9	Distribuição proporcional da positividade para os marcadores imuno-histoquímicos nas lesões das cavidades nasal, oral e laríngea. Salvador, Bahia, 2004 a 2012. (A) CD1a (B) CD3 (C) CD4 (D) CD8 (E) CD15 (F) CD20 (G) CD68 (H) CD117 (I) VS38 .....	66
Figura 10	Reação de imuno-histoquímica usando o kit do Sistema EnVision™ para CD3, CD4, CD8, CD15, CD20, CD1a, VS38, CD68, DC117 no infiltrado inflamatório de lesões de laringe, cavidade nasal e oral infectadas por HPV com marcação castanha	

nas células inflamatórias. A) Marcação de CD3 em PLR em grau intenso (400X) B) Marcação de CD68 em papiloma nasal em grau intenso (400X) C) Marcação de CD4 em papiloma nasal em grau moderado (400X) D) Marcação de CD8 em papiloma nasal em grau intenso (400X) E) Marcação de CD15 em PLR em grau intenso (400X) F) Marcação de CD20 em papiloma nasal em grau intenso (400X) G) Marcação de CD1a em papiloma oral em grau intenso (400X) H) Marcação de VS38 em papiloma nasal em grau intenso (400X) I) Marcação de CD68 em papiloma nasal em grau intenso (400X) J) Marcação de CD117 em papiloma nasal em grau intenso (400X) ..... 69

Figura 11 Distribuição dos tipos de HPV por local da lesão ..... 75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Funções dos genes do vírus do papiloma humano .....	22
Tabela 2	Conjunto de iniciadores utilizados para detecção do gene da globina ..	49
Tabela 3	Perfil dos pacientes atendidos no HSI de Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=125) .....	54
Tabela 4	Associação entre os sintomas e a localização da lesão nos pacientes do HSI, Salvador, Bahia. 2004 a 2011. (n=125) .....	55
Tabela 5	Sintomas apresentados pelos pacientes com recorrência do HSI. Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=19) .....	56
Tabela 6	Associação entre a localização da lesão e os aspectos morfológicos apresentados pelos pacientes do HSI. Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=125) .....	58
Tabela 7	Aspectos morfológicos das lesões dos pacientes com PLR recorrente do HSI. Salvador, Bahia, 2004 a 2012. (n=17) .....	60
Tabela 8	Aspectos morfológicos das lesões dos pacientes com recorrência nasal do HSI. Salvador, Bahia, 2004 a 2012. (n=2) .....	62
Tabela 9	Associação entre localização da lesão e presença de HPV nos pacientes do HSI de Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=125) .....	71
Tabela 10	Tipos de HPV presentes nos pacientes HPV positivos do HSI de Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=106) .....	72
Tabela 11	Genótipos de HPV e tipo de infecção em pacientes do HSI de Salvador, Bahia. 2004 a 2012 .....	73
Tabela 12	Genótipos de HPV segundo idade em pacientes do HSI de Salvador, Bahia. 2004 a 2012 .....	74
Tabela 13	Associação entre a localização da lesão e o tipo de HPV nos pacientes HPV positivos do HSI de Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=106) .....	76
Tabela 14	Associação entre contagem de células de Langerhans, linfócitos TCD4, CD3, CD8, CD15, CD20, CD68, CD 117, VS 38, Ki67 e pacientes com HPV positivo do HSI, Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=36) .....	77
Tabela 15	Tipos de HPV presentes nos pacientes com processo inflamatório grau moderado ou intenso do HSI, Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=36) .....	79

Tabela 16	Tipos de HPV presentes nos pacientes com recorrências do HSI, Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=19) .....	80
Tabela 17	Frequência dos marcadores CD1a, CD3, CD4, CD8, CD15, CD20, CD68, CD117, VS38 e Ki-67 e pacientes HPV positivo da laringe com recorrência do HSI, Salvador, Bahia. 2004 a 2012 .....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Antígeno
APC	Células Apresentadoras de Antígeno
CD	Cluster of differentiation
CLs	Células de Langerhans
°C	Graus Celsius
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatos
DP	Desvio padrão
E	Região precoce – early
E6	Gene da proteína E6 do Papilomavirus Humano
E7	Gene da proteína E7 do Papilomavirus Humano
EUA	Estados Unidos da América
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
G0	Fase de repouso
G2	Fase de crescimento pré-mitótico
HE	Hematoxilina–Eosina
HeLa	Linhagem de câncer cervical
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSI	Hospital Santa Izabel
IARC	Agencia Internacional para Pesquisa do Câncer
IL	Interleucina
INCTV	Internacional Council on the Taxonomy of Viruses
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
JORRP	Papilomatose Respiratória Recorrente Adulta Jovem
kDa	Quilodaltons
L	Região tardia – late
LTC	Linfócitos T citotóxicos
LCR	Longa Região de Controle
M	Molar
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade

Mm	Milimolar
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PBS – BSA	Phosphated buffered solution – Bovine serum albumin
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PH	Potencial Hidrogeniônico
PLR	Papilomatose Laríngea Recorrente
PRF1	Pore Forming Protein
PK	Proteinase K
Primers	Oligonucleotídeo iniciador
pRb	Proteína do retinoblastoma
PCO3/PCO4	Iniciadores para detecção do $\beta$ -globina
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
SDS	Dodeci Sulfato de Sódio
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SUS	Sistema Único de Saúde
TE	Tampão com Tris- HCL e EDTA
TGF	Fator de Crescimento Tumoral
TCRf	Receptor de célula T
Th	Linfócitos T helper
TNF- $\beta$	Fator $\beta$ Necrose Tumoral
URR	Upstream Regulatory Region
UI	Unidade Internacional
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrômetros



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
2.1	O Papilomavírus humano (HPV) .....	21
2.2	Estrutura e Organização do genoma .....	21
2.3	Replicação viral .....	23
2.4	Taxonomia .....	24
2.5	Potencial oncogênico .....	26
2.6	Papilomatose Laringea .....	27
2.6.1	Evolução da doença .....	28
2.6.2	Transmissão .....	29
2.6.3	Epidemiologia .....	31
2.6.4	Aspectos anatomopatológicos .....	32
2.7	Papiloma Oral .....	33
2.8	Papiloma Nasal .....	34
2.9	Perfil da resposta imunológica .....	35
2.10	Células de Langerhans .....	37
2.11	Proteína Ki-67 .....	39
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE.....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
4.1	Objetivo geral .....	42
4.2	Objetivos específicos .....	42
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>43</b>
5.1	Caracterização do estudo .....	43
5.2	População e amostra .....	43
5.2.1	Critérios de Inclusão .....	43
5.2.2	Critérios de Exclusão .....	44
5.3	Considerações Éticas .....	44
5.4	Métodos .....	44
5.4.1	Dados Clínico - Epidemiológicos .....	44
5.4.2	Estudo Histomorfológico .....	45
5.4.3	Estudo de imunofenotipagem das células do infiltrado inflamatório .....	45
5.4.4	Protocolo Imuno-histoquímico .....	46

5.4.5	Detecção e tipagem do HPV .....	48
5.4.5.1	Extração de DNA genômico de tecido incluso em parafina .....	48
5.4.5.2	Análise do DNA extraído.....	49
5.4.5.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	49
5.4.5.4	Tipagem de HPV .....	50
5.4.6	Análise Estatística .....	53
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
6.1	Casuística .....	54
6.2	Dados Clínicos e Epidemiológicos .....	54
6.3	Análise Histopatológica.....	56
6.4	Análise Imunohistoquímica .....	65
6.5	Análise dos Genótipos do HPV.....	71
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>96</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>97</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>111</b>
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	112
	APÊNDICE B – Questionário .....	114
	APÊNDICE C – Protocolo de Análise Histológica de Papilomas de Laringe, Cavidades Oral e Nasal .....	116
	APÊNDICE D – Protocolo de Análise Imunohistoquímica .....	117
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>119</b>
	ANEXO A – Parecer de aprovação do comitê de ética em pesquisa CPqGM/Fiocruz .....	120

## 1 INTRODUÇÃO

Os Papilomas Vírus Humano (HPV), patógenos de alta prevalência, são determinantes de infecções persistentes em seres humanos (CHOW et al., 2010) e estão envolvidos na gênese de lesões epiteliais benignas e malignas do trato anogenital, do trato respiratório e da pele. São vírus com tropismo por células epiteliais e são constituídos de fita dupla de DNA circular revestida por capsídeo icosaédrico (ZUR HAUSEN, 1996).

Cerca de 150 diferentes genótipos já foram seqüenciados e filogeneticamente caracterizados (de VILLIERS et al., 2004). Os tipos de alto risco ou potencialmente oncogênicos a exemplo dos HPV 16 e 18 são associados ao desenvolvimento de carcinoma cervical e de cabeça e pescoço (IARC, 2007). Os HPVs 6 e 11 considerados de baixo risco, não oncogênicos, são agentes causais de lesões benignas, dentre elas o condiloma genital e a Papilomatose Laríngea Recorrente (PLR) (ZUR HAUSEN, 1996).

A PLR, a neoplasia benigna que mais comumente afeta a laringe, se caracteriza por lesões exofíticas de aspecto verrucoso que podem ser sésseis ou pediculadas, únicas ou múltiplas (MULLEN et al., 1999). A susceptibilidade particular da junção escamo-colunar à infecção viral determina a superfície laríngea da epiglote, as margens superiores e inferiores do ventrículo laríngeo e a superfície inferior das pregas vocais como os principais sítios anatômicos dessa afecção (KATSEKOS, 2011). A sua incidência na população americana é estimada em 4,3 e 1,8 casos por grupo de 100.000 pessoas, entre crianças e adultos, respectivamente (DERKAY, 1995).

Apesar de seu caráter benigno, a PLR pode ocasionar significativa morbidade e eventual mortalidade conseqüente à obstrução de vias aéreas (LARSON, 2010). As lesões têm tendência à recorrência após a ressecção cirúrgica e potencial de disseminação ao longo do trato respiratório (KATSEKOS, 2011). A presença de infecção viral latente em células da mucosa aparentemente normal e a posterior ativação da expressão gênica possibilitam esse padrão recorrente das lesões (CHOW et al., 2010). Uma infecção de alta gravidade apresenta múltiplas recorrências, acometimento da árvore traqueobrônquica e possível desenvolvimento de carcinomas de células escamosas (XIMENES, 2003), destaca-se que o risco de transformação maligna é descrito em menos de 1% dos casos (LARSON, 2010).

A realização do diagnóstico antes ou após respectivamente os 12 anos de idade categoriza a PLR de início juvenil e de início na idade adulta (LARSON, 2010). A de início

juvenil, com pico de incidência entre dois e quatro anos, tem como apresentação clínica habitual rouquidão que pode progredir para estridor, dispnéia ou dificuldade respiratória, e, eventualmente, obstrução completa das vias aéreas (DERKAY, 2008). Crianças diagnosticadas em uma idade mais jovem têm um maior risco de progressão da doença com necessidade de mais procedimentos cirúrgicos e eventualmente de traqueostomia, em comparação com crianças com diagnóstico mais tardio (BUCHINSKY, 2008). A apresentação da doença nessa última faixa etária está associada à transmissão vertical do HPV, sendo que os fatores de susceptibilidade são realização de parto vaginal, crianças de primeira gestação, idade materna jovem (YEOH et al., 2003) e presença de condiloma genital, o qual compartilha etiologia viral semelhante a da PLR (GEREIN et al., 2007)

Na idade adulta, o pico de incidência ocorre entre 20 e 40 anos, com maior prevalência do sexo masculino e as manifestações clínicas são menos graves em relação às dos pacientes pediátricos (LARSON, 2010), embora também possa ter um perfil agressivo e recidivante. Uma infecção recentemente adquirida transmitida por via sexual pelo contato oro-genital é bem estabelecida como fonte de contágio do HPV e supõe-se que a reativação de uma infecção latente também esteja envolvida no aparecimento das lesões nesses indivíduos. (KATSEKOS, 2011)

O comportamento agressivo da PLR difere de outras infecções pelo HPV nas cavidades oral e nasal. Nessas os tipos virais 6 e 11 também estão associados a essas lesões (LAWSON et al., 2008; CASTRO et al., 2006), entretanto elas apresentam baixas taxas de recorrência, são autolimitadas e têm uma evolução lenta.

Sugere-se que, entre outros fatores, variações na resposta imune justificam os diferentes comportamentos dessas lesões de etiologia semelhante. Em infecções pelo HPV, uma resposta imune celular efetiva composta por células T CD4<sup>+</sup> de perfil Th1 e células T CD8<sup>+</sup> tem um papel central na sua resolução e no seu controle (STANLEY, 2001). A resposta imune humoral, entretanto, não é proeminente em vista da disseminação intracelular do vírus e expressão tardia dos antígenos do capsídeo viral. (JAKUBICOVÁ et al., 1992; SCOTT et al., 2001)

Pacientes com PLR possivelmente apresentam distúrbios na imunidade celular os quais podem constituir o principal fator na patogênese da doença. Indica-se que tais pacientes apresentam uma resposta polarizada para o perfil de células T CD4<sup>+</sup> do tipo Th2 expressando citocinas IL-4 e IL-10 que impedem a eliminação dos queratinócitos infectados

(BONAGURA et al., 2010). Sugere-se, também, a presença de uma função citotóxica ineficaz, diante da presença de células T  $CD8^+ CD28^-$  no infiltrado inflamatório das lesões (BONAGURA et al., 1999), fato que dificulta uma resposta imune celular efetiva  $CD8^+ CD28^+$ .

O estudo da resposta imune ao HPV com a caracterização do infiltrado inflamatório, através do estudo imuno-histoquímico e tipagem viral, poderá contribuir para melhor entendimento do comportamento mais agressivo dessa doença, na laringe, quando comparado com lesões similares nas cavidades orais e nasais

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Papilomavirus Humano (HPV)

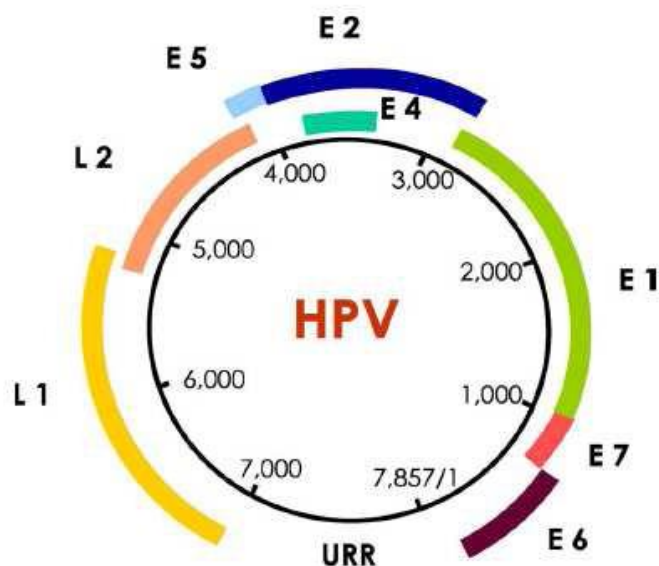
Os HPVs infectam muitas espécies de vertebrados, são altamente espécie-específicos e similares na estrutura física e organização do genoma (SASAGUAWA et al, 2001; STANLEY, 2001; de VILLIERS et al., 2004; THOMISSON et al., 2008).

Os HPVs são os vírus transmitidos sexualmente mais comuns em indivíduos jovens e sexualmente ativos de ambos os sexos (SAN JOSÉ et al, 2007). Os tipos de HPV variam quanto ao tropismo celular, associação às diferentes lesões e potencial oncogênico. De acordo com a homologia na seqüência de DNA e a associação com as lesões clínicas, os HPVs podem ser agrupados inicialmente em tipos cutâneos e mucosos (GROSS, BARRASSO, 1999). Dentre os mecanismos de transformação neoplásica, as proteínas virais, especialmente as E6 e E7 participam da inativação de inibidores do ciclo celular, resultando em hiperproliferação (PARK; ANDROPHY, 2002; FEHRMANN et al., 2003).

### 2.2 Estrutura e organização do Genoma

É um vírus não envelopado e apresenta um capsídeo de forma icosaédrica de 55nm, não revestido por envelope e uma molécula dupla de ácido desoxirribonucléico (DNA) de 8000 pares de base (pb), circular e fechada covalentemente que é o genoma do HPV (COLLIER et al., 1998; FERREIRA et al., 2002; FINEM et al., 2003). Esse DNA pode se apresentar de forma integrada (linear) ou não integrada (circular) no interior da célula hospedeira, sendo assim, toda informação genética viral está localizada em uma das fitas de DNA (CHANG et al.,1991; ZUR HAUSEN, 1996; DE VILLIERS et al., 2004). O genoma do HPV pode ser dividido em 3 regiões (Figura 1): a região reguladora não codificante conhecida como *long control region* (LCR) ou *upstream regulatory region* (URR) que representa cerca de 10% do genoma, e duas regiões codificantes, a região precoce “E” (*early*) – proteínas não estruturais, e a região tardia “L” (*later*) – proteínas estruturais, assim denominadas de acordo com o momento em que são expressas durante a infecção, com características e função peculiares (Tabela 1) (VILLA 1997, KANODIA et al, 2007; SCHEURER et al., 2005; STOLER et al, 2003; SZOSTEK et al, 2006).

Figura 1 – Ciclo de vida do HPV



Fonte: Muñoz et al., 2006

Tabela 1 - Funções dos genes do vírus do papiloma humano

Gene	Função
E1	Atividade de DNA helicase, ligação de ATP DNA dependente, atividade de ATPase.
E2	Papel na replicação e na repressão da replicação. Regulador da transcrição e replicação viral, controle da região de expressão precoce (Early), necessária para a replicação viral eficiente junto com E1.
E3	Sem função conhecida (presente apenas em uma minoria de vírus).
E4	Expresso primariamente em epitélios em diferenciação, associado ao citoesqueleto de ceratina de células epiteliais em cultura. Papel na liberação de vírus.
E5	Atividade de transformação do HPV16 <i>in vitro</i> . Possivelmente estimula o início da proliferação celular <i>in vivo</i> , e pode ter papel na iniciação da carcinogênese.
E6	Papel no processo de transformação junto com E7. Propriedades de ativação transcricional. E6 dos HPV's de alto risco inativa p53 pela degradação rápida através da via ubiquitina. Junto com E7 propicia o ambiente celular para a replicação viral.
E7	Induz síntese de DNA em células em repouso. E7 se liga à forma hipo-fosforilada da proteína do retinoblastoma (pRb), resultando em sua inativação funcional, permitindo a progressão para a fase S do ciclo celular. Proteína E7 dos tipos de baixo risco (6 e 11) liga-se menos eficientemente do que a proteína E7 dos tipos de alto risco (16 e 18).
E8	Sem função conhecida (presente apenas em uma minoria de vírus).
L1	Proteína principal do capsídeo (expressão tardia, Late).
L2	Proteína menor do capsídeo.

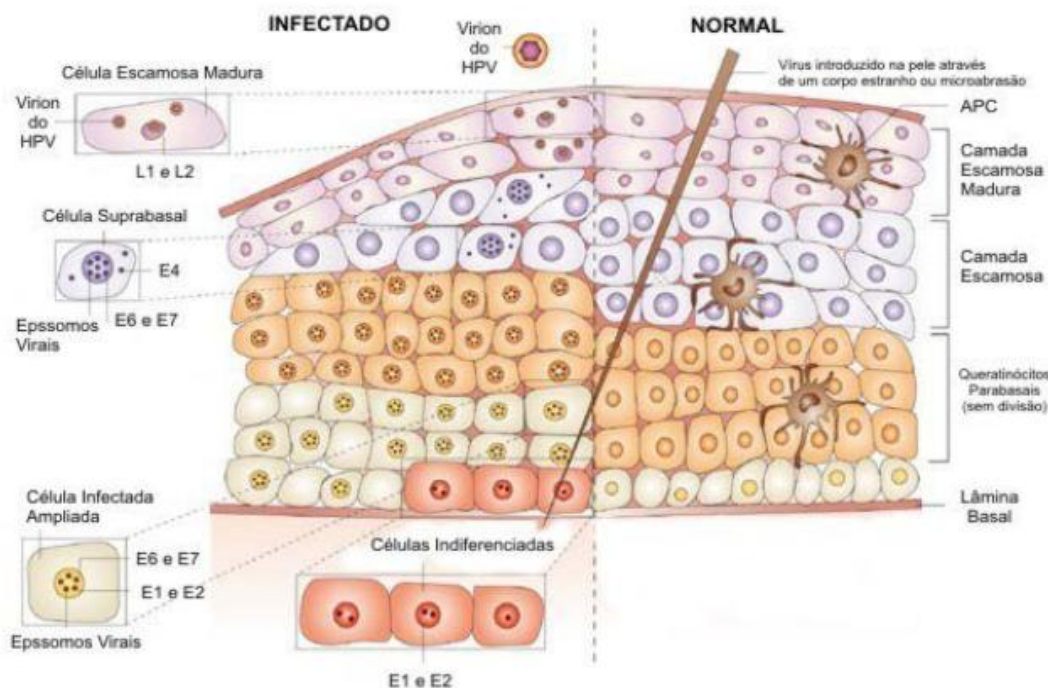
Fonte: Sanclemente; Gill, 2002

### 2.3 Replicação viral

A infecção pelo HPV é iniciada quando a partícula viral penetra nas células basais do epitélio através de micro lesões. “O receptor para entrada do vírus na célula ainda é desconhecido”, contudo, estudos sugerem que o sulfato de heparina proporciona esta fixação (LONGWORTH; LAIMINS, 2004). Nos HPVs oncogênicos, a transcrição viral é iniciada a partir de dois promotores principais: p 97 (HPV 16 e HPV 31) e p105 (HPV 18).

Uma vez no núcleo, o genoma viral é mantido na forma episossomal em número baixo, de 20 a 50 cópias por célula (CHOW; BROKER, 2010); em segundo momento, parte da progênie viral migra para as células em diferenciação da camada suprabasal, onde ocorre um aumento da replicação do genoma do vírus, expressão dos genes tardios e formação das proteínas estruturais. Nas camadas superiores do epitélio ocorre o empacotamento do vírus em capsídeos e a liberação da progênie do vírus para que o ciclo possa ser reiniciado (Figura 2) (ZUR HAUSEN, 2002; MUNOZ et al., 2006). O período de incubação do HPV varia entre 2 semanas a 8 meses e parece estar relacionado com a competência imunológica individual (LORINCZ, 1996; ARAUJO-FILHO et al., 1998).

**Figura 2 – Ciclo celular do HPV adaptado**



Fonte: adaptado Frazer, 2004



As proteínas E1 e E2 são as primeiras a serem expressas, formando um complexo que atua no recrutamento de polimerases celulares e proteínas acessórias para medir a replicação. A E1 também desempenha a atividade de helicase, permitindo a separação das fitas do DNA viral. Visto que as proteínas E1 e E2 são expressas por promotores precoces, a habilidade de E2 em ativar e reprimir a expressão contribui para o controle do número de cópias virais em células indiferenciadas (LONGWORTH; LAIMINS, 2004). A proteína E4 do HPV se associa com filamentos de queratina celular, afetando sua estabilidade mecânica, o que sugere um papel na liberação de partículas virais (DOORBAR, 2005). A proteína E5 é expressa nos estágios iniciais da infecção viral. Sua expressão modifica a transdução de sinal para o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) e bloqueia a expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe I na membrana plasmática (SANTOS 2002; LEYKAUF et al., 2004). As proteínas E6 e E7 do HPV são fundamentais no processo de replicação do vírus; elas interagem com as proteínas do ciclo celular p53 e proteína do retinoblastoma (pRb), respectivamente, degradando-as, o que promove a proliferação e eventual imortalização e transformação maligna das células (MUNGER et al., 2004).

## 2.4 Taxonomia

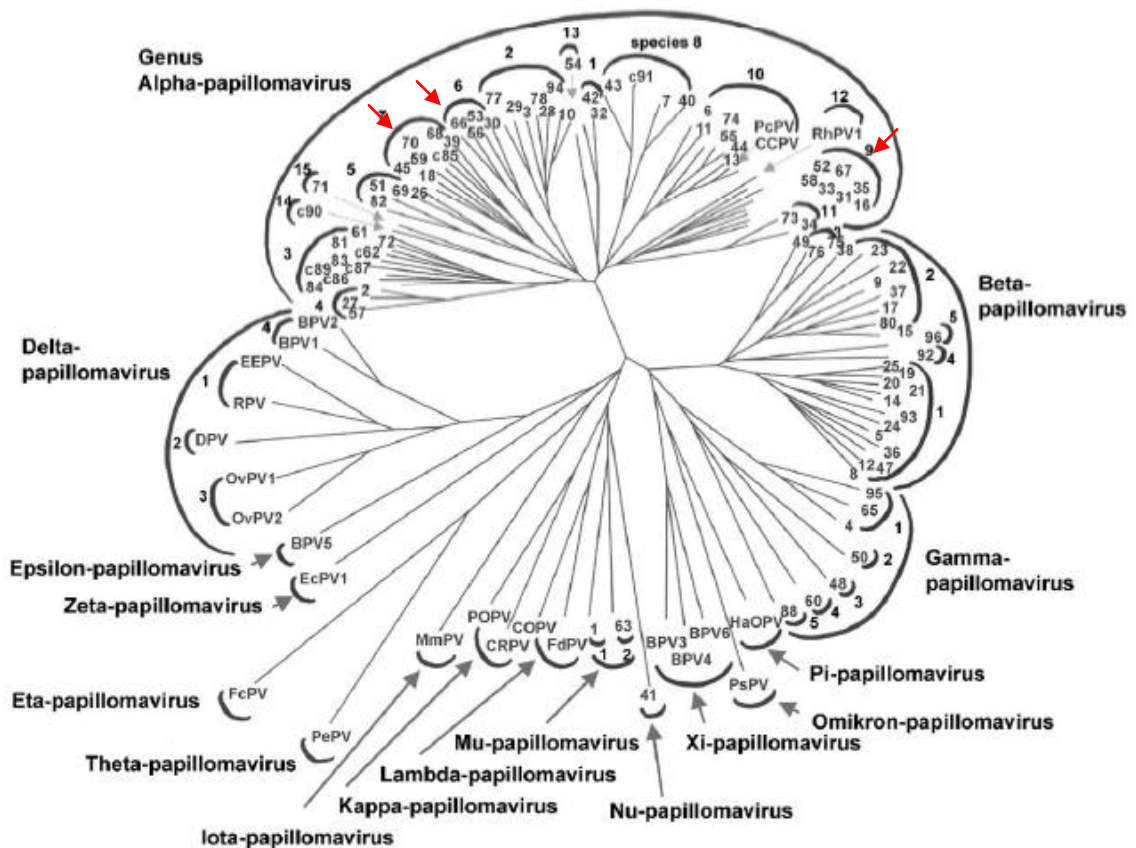
De acordo com o International Council on the Taxonomy of Viruses (ICTV), o HPV pertence à família *Papillomaviridae*, gêneros papilomavirus Alfa, Beta, Gama, Delta, Kappa, entre outros (DE VILLIERS et al., 2004; BERNARD, 2010). Clinicamente, o gênero mais importante é o Alfa-papillomavirus, por conter todos os tipos de HPV associados às lesões da mucosa genital (Figura 3).

A classificação em tipos de HPV é feita com base na homologia de suas seqüências de DNA. Atualmente, variações no genoma nos genes L1, E6 e E7 menores que 2%, são consideradas, como variantes dos tipos de HPV, variações entre 2% e 10%, como subtipos e variações maiores que 10% como novos tipos de HPV. Os papilomavirus humanos são nomeados pela abreviação HPV seguida de um número que é dado seqüencialmente, à medida que diferentes tipos são descobertos (BERNARD et al., 2005).

Atualmente, há mais de 150 tipos de HPV descritos. Entretanto, destes apenas cerca de 100 tipos de HPV foram identificados, com seus genomas isolados e completamente

seqüenciados (BERNARD, 2005). Aproximadamente, 40 tipos infectam a região genital e o ânus, sendo pelo menos 14, segundo o IARC 2007, estão associados ao carcinoma do colo útero (DE VILLIERS, et al 2004). A Figura 3 mostra a árvore filogenética com base na análise da seqüência do gene L1, onde os números nas pontas dos ramos identificam os genótipos do HPV, c-número indica candidatos a genótipos do HPV. Todas as outras abreviações se referem a genótipos de papilomavírus animais. Os semicírculos externos identificam os gêneros e os semicírculos internos às espécies. Setas vermelhas indicam as espécies contendo HPVs de alto risco (adaptado de DE VILLIERS, et al 2004).

Figura 3 – Árvore filogenética dos papilomavírus com base na análise da seqüência do gene L1



Fonte: De Villiers, 2004

## 2.5 Potencial oncogênico

A classificação dos HPVs tende a ser muito variável, pois há diversos critérios de agrupamentos baseados tanto em seu comportamento biológico quanto epidemiológico (IARC, 2005).

Os tipos de HPV podem ser divididos em dois grupos: os tipos que pertencem ao grupo de baixo risco oncogênico, que ocorrem, freqüentemente, em lesões benignas, lesões intra-epiteliais de baixo grau e, raramente, são encontradas em lesões cancerosas. Eles são os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, e CP6 08. O grupo de alto risco oncogênico, que ocorre, freqüentemente, em lesões intra-epiteliais de alto grau e, especialmente, nos carcinomas, são os tipos 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 (MUNOZ et al., 2003). Os tipos 26, 51 e 66 são provavelmente de alto risco oncogênico, e os tipos 34, 57 e 83 são de risco indeterminado (MUNOZ et al., 2003).

O HPV tem tropismo por células epiteliais de pele e mucosa, causando proliferação benigna ou maligna, na dependência do tipo viral, decorrente do modo de interação, epissomal ou integrada, entre o vírus e a célula. Portanto, esta interação determina o potencial oncogênico de determinados tipos virais em sítios anatômicos prevalentes. Alguns tipos são encontrados com maior freqüência em lesões malignas de pele (HPV 5 e 8) e os tipos 16, 18, 31, 33 e 45 nas mucosas. Outros tipos são encontrados mais comumente em lesões benignas, como o HPV 1 e 2 (pele) e 6, 11 e 42 (mucosas). A infecção de pele e mucosas pelo HPV ocorre através de micro lesões existente na camada basal do tecido (ZUR HAUSEN, 2002). A persistência da infecção poderá causar lesões clinicas dependendo do tipo HPV, do sistema imunológico do hospedeiro e de co-fatores. Os tipos de HPV de baixo risco oncogênicos são responsáveis pelos casos de verrugas no ânus e genitais em ambos os sexos. Entretanto, a infecção pelo HPV de alto risco oncogênico tem sido atribuída aos cânceres (MUÑOZ et al., 2003)

A transcrição viral inicia-se a partir de um mesmo promotor em todos os RNAm dos diferentes tipos virais, na região próxima ao gene E6 (ZUR HAUSEN, 2002). Contudo, a transcrição ocorre de maneira diferenciada em determinados tipos celulares, na dependência da interação viral com o genoma da célula hospedeira e o grau de diferenciação do epitélio infectado. Dessa forma, os genes precoces são expressos na camada basal do tecido, e continuam nas linhagens celulares subseqüentes, observados em células benignas e malignas.

Os genes tardios, L1 e L2, são expressos somente em células diferenciadas, resultando na produção de partículas virais completas e infectantes observadas nas verrugas e condilomas (ZUR HAUSEN, 2002). Há dois modos de replicação do HPV, o primeiro ocorre nas células da camada basal do epitélio, onde o genoma viral é distribuído às células filhas, principalmente quando o DNA pró viral encontra-se integrado ao genoma da célula hospedeira. A integração do genoma viral garante uma infecção persistente nas células proliferativas das camadas basais, associadas ao maior risco de malignização celular. No segundo, chamado episomal ou vegetativo, a replicação do HPV ocorre nas camadas mais diferenciadas do epitélio e não há a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira. Neste caso, são produzidas múltiplas cópias do genoma do vírus, que serão envolvidas pelo capsídeo protéico, formando assim as partículas virais maduras, também denominadas vírions (ZUR HAUSEN, 2002).

## 2.6 Papilomatose Laríngea

A etiologia viral da PLR foi inicialmente descrita por Ullman (1923). A PLR caracteriza-se pela presença de lesões epiteliais de aspecto verrucoso, sésseis ou pediculadas, únicas ou múltiplas, e geralmente recorrentes (CUMMINGS et al., 1998).

Apesar da morbidade associada a esta doença, os aspectos histomorfológicos são compatíveis com uma lesão benigna e em apenas 2% dos casos pode ocorrer malignização (CAMARGOS, 2001). Clinicamente, manifesta-se com rouquidão progressiva que pode evoluir com desconforto respiratório alto ou até mesmo insuficiência respiratória por obstrução das vias aéreas e morte (DERKAY, 2001).

Atualmente, esta enfermidade é dividida em dois grupos distintos: PLR de início juvenil e PLR de início na idade adulta (AALTONEN et al., 2002). Os papilomas laríngeos de início juvenil são associados aos HPV transmitidos por via vertical de uma mãe com infecção anogenital ativa ou latente pelo HPV (FLETCHER, 1991; KASHIMA et al., 1992; CONEJO et al., 2001). Para Kojima et al. (2002) a transmissão do HPV da mãe para o feto é diretamente proporcional à carga viral materna durante a gravidez. Quando instalada após os 20 anos está caracterizada a forma adulta da doença com contágio feito principalmente por via sexual (RABAH et al., 2001; CONEJO et al., 2001; AALTONEN et al., 2002).

A PLR juvenil acomete ambos os sexos, especialmente entre 2 e 5 anos de idades (BAUMAN et al., 1996; COHEN et al., 1980; DERKAY, 2001) e a disseminação do HPV pela árvore traqueobronqueal pode evoluir para a papilomatose pulmonar, podendo resultar em uma infecção incontrolável e fatal (OLIVEIRA et al., 2003).

### 2.6.1 Evolução da doença

A PLR apresenta como manifestação clínica na criança a presença de rouquidão ou choro fraco de caráter progressivo, que evolui com desconforto respiratório alto. À duração dos sintomas antes do diagnóstico varia, e em crianças menores, a rouquidão muitas vezes passa despercebida, não sendo incomum ocorrer um diagnóstico inicial de asma, coqueluche ou bronquite crônica (DERKAY, 2001).

O diagnóstico é facilmente realizado através da videonasofibroscopia e videolarinoscopia, e confirmado através do exame anatomo-patológico da lesão. Em crianças pequenas a realização de endoscopia rígida é praticamente impossível, mas como as lesões apresentam aspecto verrucoso vegetante característico, a nasofibroscopia é suficiente para o diagnóstico. Normalmente o primeiro diagnóstico é realizado entre os 2 e 5 anos de idade. Mas quando os papilomas laríngeos manifestam-se precocemente a doença normalmente se manifesta de forma agressiva. Como o calibre das vias aéreas das crianças é estreito, estas são muitas vezes submetidas à traqueostomia de urgência, antes mesmo do primeiro diagnóstico. Em outros casos mesmo com diagnóstico de PLR a traqueostomia é realizada pela dificuldade de manutenção das vias aéreas prévias, devido às recidivas frequentes em curtos períodos (DERKAY, 2001).

O curso da doença é variável, enquanto certos casos de papilomatose regredem espontaneamente, outros são submetidos a múltiplas cirurgias por várias décadas, pois as recidivas podem ocorrer em menos de duas semanas. As crianças normalmente apresentam recidivas mais agressivas, evoluindo com piores prognósticos. Nos adultos também ocorrem recidivas de difícil controle, com rouquidão progressiva, mas dificilmente evoluem para insuficiência respiratória aguda e traqueostomia. Doyle (1994) ao estudar pacientes com PLR recorrente grave demonstrou em sua casuística que nenhum adulto necessitou de traqueostomia, enquanto 60% das crianças tiveram que ser traqueostomizadas. Entretanto, a traqueostomia predispõe ao desenvolvimento de lesões em traquéia e brônquios, tornando a

evolução mais agressiva; assim ela deve ser evitada sempre que possível. Quando não for possível evitá-la, a decanulação deve ser realizada o mais precocemente possível. Já que uma das principais causas de morte decorrentes da doença é a progressão da doença para região distal das vias aéreas.

Os HPVs tipos 6 e 11 são responsáveis por muitos casos de PLR. HPV11 ocorre mais freqüentemente em 50% a 100% dos isolados (DUGGAN et al., 1990; POU et al., 1995; GABBOTT et al., 1997; MAJOR et al., 2005) e executa o curso clínico mais agressivo, seguido por HPV6. Os tipos de HPV 16, 18, 31 e 33 também têm sido relatados em PLR, embora raramente (DERKAY; DARROW, 2006).

Os tipos de HPV que afetam o trato das mucosas podem ser divididos em tipos de alto risco e de baixo risco com base em sua capacidade de causar a transformação maligna das células epiteliais. Tipos de alto risco do HPV16 e HPV18 são mais comumente associados com o câncer do colo do útero, bem como um subconjunto de carcinomas de orofaringe. HPV6 e HPV11 são considerados tipos de baixo risco, que não são normalmente associados com a malignidade, embora a transformação em PLR fosse descrita. A taxa de transformação maligna em PLR é inferior a 1% (HARTLEY et al., 1994) e, geralmente, tem sido relatada em adultos com outros fatores de risco, tais como o uso de tabaco ou exposição a radiação, mas também em crianças com, extensa disseminação da doença prolongada e distal (GORGOU LIS et al., 1994; DONNE et al., 2010). A causa da transformação é considerada por alguns investigadores para acompanhar a transformação molecular gradual. Num exemplo, isto envolveu a integração do DNA de HPV11 no genoma do hospedeiro em amostras de tecido maligno e mutação da p53 do proto-oncogene (GORGOU LIS et al., 1994; REIDY et al., 2004).

### 2.6.2 Transmissão

Sendo uma doença sexualmente transmissível, foi levantada a hipótese de que o HPV é transmitido verticalmente da mãe para o recém-nascido durante a passagem pelo canal do parto. No entanto, este método não tem sido demonstrado de forma conclusiva como único mecanismo de infecção pelo HPV. Tem sido demonstrado que as crianças nascidas de mães com condiloma ativo têm um risco aumentado de infecção, tanto quanto 231 vezes maior do que as mães livres da doença (SILVERBERG et al., 2003). O risco adicional de infecção

ocorre quando as mães primíparas afetadas tem partos vaginais prolongados, especialmente com o aumento da duração após a ruptura da membrana. Tal ocorrência pode aumentar ainda mais o risco porque o neonato passa uma maior quantidade de tempo de exposição ao vírus. O mesmo estudo demonstrou que o risco aumenta para quase o dobro se o trabalho de parto durar mais de 10 horas. Também tem sido sugerido que as infecções por HPV recém-adquiridas tendem a ter maior infectividade em comparação com infecções crônicas (KASHIMA et al., 1992). Estes dois fatores por si só mostram por que o baixo nível socioeconômico (um grupo que tem uma maior prevalência de HPV) e idade da mãe (aumento da probabilidade do surgimento de HPV e trabalho de parto prolongado) são fatores de risco importantes para um recém-nascido para desenvolver PLR.

A hipótese de que o HPV é transmitido para o recém-nascido durante o trânsito pelo canal do parto levantou a questão de saber se a cesariana pode fornecer algum grau de proteção contra a transmissão do HPV. Foi realizada uma recente revisão sistemática da literatura para responder a esta pergunta (WINCKWORTH; NICHOL, 2010). Os pesquisadores mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre as taxas de transmissão do HPV de mães HPV positivos, quer através de parto vaginal ou cesariana. Há estudos que não mostraram nenhuma diferença (PURANEN et al., 1997; BANDYOPADHYAY et al., 2003; SMITH et al., 2004), enquanto outros estudos mostraram uma diminuição na transmissão do HPV com o parto cesariana (WANG et al., 1998; TSENG et al., 1998; TENTI et al., 1999). Os achados do estudo de Tenti et al. (1999) correlacionaram com outros dados que mostraram que a ruptura da membrana até duas horas antes do parto (vaginal ou cesariano) aumenta o risco de transmissão do HPV.

Portanto, parece provável que outros fatores são importantes no desenvolvimento de HPV: Imunidade do paciente; tempo de exposição, comprimento e volume de exposição ao vírus, e traumas locais (entubação, refluxo extra-esofágico) (LARSON et al., 2010). Além disso, os neonatos podem ser infectados antes do nascimento, como evidenciado por um estudo recente mostrando que cerca de 12% dos recém-nascidos podem desenvolver infecções de HPV através da transmissão transplacentária (ROMBALDI et al., 2008).

Kojima et al. (2002) demonstram ainda que o risco estimado de uma criança, com a mãe infectada pelo HPV genital, de desenvolver a PLR varia de 2 a 5%. Silverberg et al. (2003) demonstram que a história de lesão genital durante a gravidez foi o principal fator de risco para PLR.

### 2.6.3 Epidemiologia

A infecção genital por HPV é uma doença sexualmente transmissível com incidência variável, de acordo com a população estudada. O aumento significativo da incidência de infecção genital pelo HPV tem sido associado a uma iniciação sexual precoce, má condição de higiene pessoal, múltiplos parceiros, o não uso de preservativos e famílias com baixo *status* econômico (WIATRAC et al., 2004).

A prevalência de HPV foi aumentando gradualmente na população feminina. Estima-se que a prevalência de HPV em mulheres com idade entre 14 e 59 anos é de 26,8%. Ao analisar as faixas etárias menores, há uma prevalência de cerca de 45,0% em mulheres entre as idades de 20 e 24 anos (DUNNE et al., 2007). Esses números também aumentam quando fatores como a educação, o índice de pobreza e estado civil são levados em consideração. A prevalência aumenta em indivíduos de nível socioeconômico mais baixo, especialmente quando eles são solteiros e não tenham concluído o ensino médio (DUNNE et al., 2007). Além disso, um estudo mostrou que a prevalência de HPV6 ou HPV11 em mulheres sexualmente ativas entre 18 e 25 anos de idade foi 2,2%, enquanto que a prevalência de HPV16 ou HPV18 no mesmo grupo foi de 7,8% (MANHART et al., 2006).

Embora, epidemiologicamente, haja uma carência de estudos que constatem a real incidência da PLR no Brasil; sabe-se que a prevalência de infecção pelo vírus do HPV tem aumentado drasticamente. A incidência é estimada na população pediátrica em 4,3 por 100.000 crianças, e 1,8 por 100.000 adultos (DERKAY, 1995). Na Suécia, Cristensen et al. (1996) relata uma incidência de 0,2 à 0,7 casos por 100.000 habitantes e Bomholt (1998) de 0,6/100.000 habitantes na Dinamarca. Derkay (2001) relata uma incidência de infecção pelo HPV em 43% das mulheres jovens de vida sexual ativa. Segundo o mesmo estudo, cerca de 1500 e 2500 casos novos de PLR recorrente ocorrem a cada ano nos EUA. Além disso, a prevalência da PLR juvenil relatada em dois centros dos EUA (Seattle e Atlanta) foi de 1,69 por 100.000 e 2,59 por 100.000, respectivamente, no ano de 2000, sem diferença significativa quando estratificada por sexo ou raça (ARMSTRONG et al., 2000).

Silverberg et al., (2003) na Dinamarca relatam incidência de 6,9 casos por 1000 nascimentos em mães com historia de lesões genitais, contra 0,0 casos por 1000 nascimentos em mães sem historia de lesões genitais. E relatam ainda um risco 231.4 vezes maior de PLR em nascidos de mães com lesões durante a gravidez em relação aquelas sem historia de lesão genital.



Um estudo piloto realizado nos EUA incluindo pacientes de instituições públicas e privadas mostrou, consistentemente, que a incidência de PLR foi maior nos pacientes de instituições privadas em relação àqueles atendidos em instituições públicas (3,21 x 1,98 por 100.000 respectivamente) (MARSICO et al., 2009).

Campisi et al. (2010) criou um banco nacional no Canadá, incluindo todas as crianças com menos de 14 anos de idade com PLR tratada por médicos pediatras otorrinolaringologistas. Esse estudo encontrou uma incidência nacional da PRRJo (Papilomatose Respiratória Recorrente Adulto Jovem) de 1994 a 2007 de 0,24 casos por 100.000 habitantes e prevalência de 1,11 por 100.000 habitantes. Estas estimativas são significativamente menores do que em vários estudos anteriores, mas similares a base populacional de pacientes com PLR em Seattle e Atlanta (ARMSTRONG et al., 2000).

#### 2.6.4 Aspectos anatomopatológicos

A laringe, principal estrutura do sistema fonatório, e um sistema músculo cartilagineo e neuromuscular com varias funções, desde a proteção das vias aéreas inferiores, respiração, deglutição até a comunicação oral (GUIMARÃES, 2007). O esqueleto cartilagineo e composto por nove cartilagens, três impares (cricóideia, tiroideia e a epiglote), um par principal (aritenóideias) e dois outros pares acessórios (corniculadas e as cuneiformes) e sustentados principalmente pelo osso hióide, situado superiormente na laringe (BEHLAU, et al., 2001). Estas estruturas estão ligadas entre si através de articulações, membranas e ligamentos (GUIMARÃES, 2007).

As patologias benignas da laringe podem ser de origem epitelial, conjuntiva ou cartilaginosa. A PLR recorrente afeta a membrana mucosa do trato respiratório, caracterizando-se por papilomas escamosos múltiplos e recorrentes. A laringe é o sítio mais comum de papilomatose, sendo as pregas vocais e a subglote os locais mais acometidos. A nasofaringe e o epitélio traqueobrônquico também podem estar envolvidos. A invasão do parênquima pulmonar por epitélio escamoso, colunar ou transicional pode ocorrer na forma agressiva da doença, que invade localmente sem metástase à distância, referida como papilomatose invasiva ou agressiva. São lesões com projeções papilares e tecido conectivo hipervascularizado, cobertas por epitélio escamoso hiperplásico.

As lesões da papilomatose ocorrem preferencialmente na transição entre epitélio ciliar e escamoso (junção escamociliar). Estas áreas são identificadas na superfície nasofaringe do palato mole, na zona intermediária da superfície laríngea da epiglote, na margem superior e inferior do ventrículo, na superfície inferior das pregas vocais, na carena, e na cicatriz de traqueostomia (epitélio ciliado que sofre metaplasia escamosa por trauma) (COLTEN; CASPER, 1996), sendo que a maioria das lesões ocorre nas pregas vocais verdadeiras (GUIMARÃES, 2007). Mais da metade dos casos de papilomatose apresentam extensão da doença além do sítio primário (GUIMARÃES, 2007).

A lesão característica do papiloma é exofítica, pediculada ou nodular (GUIMARÃES, 2007), com superfície irregular composta por inúmeras microvilosidades de vários tamanhos e formas organizadas em cordões paralelos (CASTRO, 2000). Pode ocorrer como lesões únicas ou múltiplas, de coloração rosa a avermelhada (GUIMARÃES, 2007). Trata-se de projeções de tecido conjuntivo altamente vascularizado coberto por epitélio escamoso estratificado com queratinização anormal (CASTRO, 2000; GUIMARÃES, 2007). Os papilomas exibem desregulação da diferenciação celular terminal do epitélio, causando uma hiperplasia deste, à custa da proliferação do estrato espinhoso que acaba por conferir a forma vegetante da lesão. Não existe alteração na proliferação das células basais (HARRIS, 1998) e a membrana basal encontra-se intacta. São encontrados, em meio a células epiteliais, alguns coilócitos (BEHLAU et al., 2001). Ao corte histológico as células apresentam-se muito próximas umas das outras, exceto nas camadas mais profundas que apresentam perda desta coesão. O citoplasma celular é constituído de um material finamente fibrilar e eletrondenso e não são encontradas mitoses anormais. O epitélio normal em contato com a lesão mostra aumento da atividade de crescimento e algum grau de inflamação (HARRIS, 1998).

## 2.7 Papiloma oral

Na cavidade oral, os papilomas escamosos são as lesões verrucosas mais comuns, são assintomáticos e possuem importante diagnóstico diferencial com verruga vulgar, condiloma acuminado e carcinoma verrucoso (JAJU et al., 2010; FERRARO et al., 2011). Os principais locais de ocorrência são a língua, o lábio e a mucosa palatina, porém, qualquer superfície da mucosa oral pode ser afetada (CARNEIRO et al., 2009).

Na mucosa oral, entretanto, é ainda controversa a presença do HPV como agente etiológico, com alguns estudos demonstrando a presença viral e sua correlação com a carcinogênese (MILLER et al., 1996; MCGLENNEN, 2000; SCULLY et al., 2000; MILLER et al., 2001) , enquanto outros estudos não consideram sua participação no câncer oral (MIGUEL et al. 1998; CHANG et al. 1991;). A presença na mucosa oral dos tipos anogenitais, HPV 6/11 e 16/18 poderiam significar transmissão oro genital, o que tornaria este vírus um importante cofator no desenvolvimento do câncer oral assim como é considerado no colo uterino (SYRJANEN 1987; PALEFSK et al., 1995; MILLER et al., 2001; TROTTIER E BURCHELL, 2009). A possibilidade da infecção por HPV ser a etiologia da infecção do câncer oral foi relatada por Syrjanen et al., em 1987, e continua sendo alvo de vários estudos (MILLER, 1994; MAO, 1995; MILLER, 1996; ZUR HAUSEN, 2000).

A transmissão do HPV para mucosa oral ocorre por auto-inoculação e através da prática de sexo oral (BANOCZY, 1984; LEVENSON et al.,1990). A atividade sexual, quando exercida precocemente, aliada, a um número alto de parceiros sexuais, juntamente com o fumo, paridade e outras doenças sexualmente transmissíveis podem contribuir para aumentar as chances de infecção pelo vírus (FAULKNER-JONES et al., 1990).

De mais de 150 genótipos do HPV identificados, pelo menos 30 (1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 20, 28, 31, 32, 33, 35, 38, 40, 45, 52, 54, 55, 57, 58, 59, 68, 69, 72, 73, 77, 83, 84, 85) foram detectados em amostras de tecido oral (DE VILLIERS et al., 1994, 2004; CHANG et al.,1991; STEINAU et al., 2011). Recentes estudos entre adultos infectados pelo HIV incluídos em um estudo de câncer da próstata nos EUA identificou 12 novos tipos de  $\gamma$ -HPV na cavidade oral (119, 121, 123, 134, 135, 136, 137, 140, 141, 144, FA27, e FA150) assim como 8 novos tipos de  $\beta$ -HPV (120, 122, 124, 143, 145, FA14, FA22 e FAIMvs6.2) (BOTTALICO et al., 2011).

## 2.8 Papiloma Nasal

Na cavidade nasal, o vírus está envolvido na gênese dos papilomas sinonasais, denominados Schneiderianos, particularmente, os grupos morfológicos exofítico e invertido; o terceiro grupo morfológico, o oncocítico, não possui etiologia viral estabelecida (SYRJANEN 2003; BARNES 2005). As lesões representativas de 0,4 – 4,7% dos tumores sinonasais (BARNES 2002; BARNES 2005) são observadas em pacientes, de forma

generalizada, com idade entre 30 e 60 anos e acometem os homens de forma mais freqüente, numa proporção de 3:1 (SYRJANEN 2003). O quadro clínico inclui obstrução nasal unilateral, epistaxe e dor facial (GNEPP 2009).

## 2.9 Perfil da Resposta Imunológica

Muito do que se sabe sobre a resposta imune associada à infecção pelo HPV tem sido observado em diversos estudos com lesões cervicais e, pouco se sabe sobre a resposta imunológica associada ao HPV em lesões de mucosa laríngea, nasal e oral.

O HPV não causa lise celular, geralmente produz lesões verrucosas ou alterações celulares no epitélio escamoso sem induzir inflamação local. A replicação viral ocorre dentro das células epiteliais; logo após os vírus maduros são liberados e infectam novas células que estão descamando. Desta forma há pouca apresentação de antígeno viral ao sistema imune local e sistêmico, uma vez que as células da resposta imune situam-se no tecido conjuntivo abaixo do epitélio (GUZMÁN-ROJAS et al., 1998).

Acredita-se que a vigilância de células infectadas, realizada por células T e Natural Killer (NK), é importante na infecção e na resolução da doença. As células NK são conhecidas como grandes linfócitos granulosos, que representam 5 a 20% das células mononucleares no sangue e no baço, pouco freqüentes em outros órgãos linfóides e são derivadas de precursores da medula óssea. Elas fazem parte da imunidade natural celular e compõem a resposta inicial aos microrganismos, pois impedem, controlam ou eliminam a infecção do hospedeiro imediatamente após a entrada dos microrganismos. As suas principais funções são a lise de células infectadas ou danificadas e ativação dos macrófagos através da citocina interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (ABBAS et al., 2008).

As diferenças individuais nas respostas imunológicas ao HPV têm um papel crítico na determinação, progressão e recorrência da infecção. A presença de DNA viral é demonstrada em sítios assintomáticos da epiderme, da mucosa cervical, da laringe e na pele. O modo da manutenção dessa persistência do DNA não está totalmente esclarecido (ZUR HAUSEN, 1996). Em geral, devido a sua baixa imunogenicidade, poucos anticorpos são sintetizados contra este vírus e, dessa forma, a imunidade celular parece ser o principal fator de resistência

ao HPV (FERREIRA; SOUSA, 2002) e determinante para o surgimento de lesões (STEINBERG et al., 1988).

A maior importância da imunidade celular em relação à resposta humoral fica evidente devido aos altos índices de infecções pelo HPV e evolução para malignidade em pacientes imunodreprimidos como os portadores de doença de Hodgkin, leucemia linfocítica crônica, HIV positivos, transplantados e os pacientes em uso de drogas imunossupressoras (MCFADDEN et al., 1994).

Nas infecções persistentes pelo HPV, observa-se uma depleção da função célula T, comprovada pela redução da ativação dos linfócitos T frente à fitohemaglutinina, uma diminuição da contagem de células T e pelo teste de inibição de migração dos leucócitos e da atividade das células *natural killer* (NK) (MCFADDEN; KANE, 1994), redução na relação  $CD4^+/CD8^+$  no infiltrado celular geralmente para menos de um (TAY, et al., 1987). Durante a regressão da lesão, observa-se aumento gradativo de atividade celular e associação com eliminação do vírus/tumor. A regressão e/ou progressão das lesões são determinadas pela estrutura genética do vírus (MCFADDEN; KANE, 1994). Os linfócitos citotóxicos são considerados as principais células envolvidas na remoção das células infectadas por HPV ou das que estão em processo de transformação maligna. Uma deficiência na indução dos mecanismos de citotoxicidade celular parece estar relacionada à persistência do HPV e a carcinogênese (RIETHMULLER et al., 2000).

Banks et al. (1991) demonstraram que o macrófago pode ser induzido ao reconhecimento seletivo e destruição das células infectadas por HPV e neoplásicas quando ocorre a expressão da oncoproteína E7 do HPV. Os mecanismos de reconhecimento e lise celular exercido pelo macrófago ainda não estão completamente esclarecidos, porém há comprovações de que os interferons sejam agentes eficazes na regressão de papilomas genitais (COLEMAN et al., 1994). Essa família de citocinas, e em particular o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), é o mais potente ativador de macrófagos conhecido, e, possivelmente, sua função seja ajustar a resposta imune contra as lesões associadas ao HPV (BANKS et al. 1991).

Diversos autores têm sugerido que distúrbios na imunidade celular destes pacientes podem ser o principal fator envolvido na patogênese da PLR (GISSMAN et al., 1983; ABRAMSON et al., 1987; BONAGURA et al., 1999), especialmente por que a resposta imune humoral natural não parece contribuir para a defesa contra o HPV, já que este vírus apresenta uma baixa virulência e, ao mesmo tempo, é um parasita intracelular obrigatório,

especialmente de células epiteliais, o que facilita a evasão do vírus à resposta imune (PARELLADA et al., 2005).

O estudo da resposta imune ao HPV em pacientes com PLR pode contribuir para compreender o comportamento da doença. Bonagura, et al. (1999) observaram uma associação entre a gravidade da doença e o percentual de células T  $CD8^+ CD28^-$  em pacientes com PLR. Isso sugere que a alteração na resposta imune celular ao HPV deve influenciar o desenvolvimento e ou recorrência dessa doença. Apesar das funções das células T  $CD8^+ CD28^-$  serem controversas e seu papel na PLR ainda ser desconhecido, sugerem-se que essas células possam bloquear o desenvolvimento de células Th1 HPV específicas, pela produção de citocinas imunossupressoras, como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ . Além disso, essa subpopulação de células T pode interferir com a maturação de células T citotóxicas  $CD8^+CD28^+$  competindo localmente pela IL-2 no microambiente tecidual.

Em certas doenças infecciosas microbianas, a suscetibilidade a infecção esta associada com uma produção predominante de citocinas padrão Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) enquanto a resistência ou liberação desses patógenos está altamente associada com o perfil das citocinas Th1 (IL2, TNF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ ). Estudos em verrugas genitais não recorrentes mostram um perfil de citocina predominante Th1 ou Th1/Th2 misto. Contrariamente, as lesões persistentes ou recorrentes são associadas com um padrão Th2 (GRASSEGGGER et al., 1997).

## 2.10 Células de Langerhans

As Células Dendríticas (CD) hoje são reconhecidas como reguladoras essenciais, tanto do sistema imune inato, quanto do adquirido (BANCHEREAU et al., 1998). As CD, além da sua morfologia distinta, têm características fenotípicas que as tornam Células Apresentadoras de Antígenos (APC). As CD são responsáveis, sozinhas pela estimulação das células T- virgens, propriedade esta que as distinguem de todas outras APC. As CD são também células acessórias essenciais na geração de resposta a anticorpos primários.

As células de Langerhans fazem parte da família das células dendríticas, originadas na medula óssea, estando presentes em maior quantidade na epiderme e mucosa. Estas células são apresentadoras de antígeno profissionais na epiderme e constituem em torno de 3% de todas as células epidérmicas (BABI, 1998). Estão presentes em epitélio estratificado

escamoso, onde se encontram largamente distribuídas na camada basal e supra basal desse epitélio, incluindo tecidos de boca, orofaringe e esôfago (CUTLER et al., 2006). Já os linfócitos T e B são os mediadores da imunidade, mas a sua função está sob controle das CLs (células de Langerhans). As CLs capturam e processam os antígenos na periferia, expressam as moléculas linfocíticas co-estimuladoras, migram para os órgãos linfóides e secretam citocinas, as quais iniciam a resposta imune. Há muito se enfocava a imunidade baseando-se apenas em antígenos e linfócitos. (BANCHEREAU et al., 1998)

O impacto das células dendríticas sobre o sistema imune não está limitado apenas à apresentação de antígenos aos linfócitos T. Tem sido relatada sua atuação na promoção da diferenciação de plasmócitos a partir de linfócitos B. Além disso, as células dendríticas funcionam como instrumento direcionador de linfócitos T “helper” na definição da resposta imune celular (Th1) e humoral (Th2) (MCLELLAN et al., 2000; KELLER, 2001). Essa diferenciação também dependerá das citocinas a que essas células apresentadoras estarão expostas quando da ligação com antígenos ou haptenos e sobre o processo de maturação (HOLIKOVÁ et al., 2001).

Viac et al., (1990) estudando as modificações das células de Langerhans em lesões intraepiteliais cervicais e sua correlação com o HPV, observaram uma redução do número das CLs nessas lesões em comparação com o epitélio cervical normal, sugerindo que uma diminuição da vigilância imunológica pode contribuir para gravidade das lesões associadas ao HPV.

Connor et al., (1999) analisando casos de neoplasias intracervicais uterinas, evidenciaram um menor número de CLs nos casos de displasias do que em relação a mucosa normal. Além disso, a quantidade de células de Langerhans encontrava-se significativamente diminuída nas lesões com HPV positivas quando comparadas com os casos negativos. Com isso, os autores sugerem que as CLs são uma parte importante no desenvolvimento da imunidade contra o papilomavirus humano.

Kovalenko et al., (2009) fizeram uma análise da densidade de CD1a+ e CD83+ por mm<sup>2</sup> em pacientes com PLR e portadores de HPV dos tipos 6 e 11, na qual eles mostraram, que houve um aumento de células dendríticas CD1a+ nos pacientes com papiloma laríngeo quando comparados com pacientes que apresentaram laringite crônica. Alguns autores relataram diminuição de células dendríticas no epitélio cervical de pacientes com HPV (LEHTINEN et al., 1993; CONNOR et al., 1999; JIMENEZ-FLORES et al., 2005). De

acordo com esses autores a possível explicação para diminuição de densidade de células dendríticas são alterações na expressão de molécula de adesão (com as E caderinas), resultando em uma dificuldade de interação das células dendríticas com células epiteliais (MATTHEWS et al., 2003; OFFRINGA et al., 2003). Essas alterações podem está associada com propriedades peculiares da proteína E6 de HPVs de alto risco oncogenico.

### 2.11 Proteína Ki- 67

A proteína Ki-67, definida como um complexo de proteínas de 345-395 kDa, aparece expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G<sub>0</sub>, onde as células apresenta-se em repouso (GERDES et al., 1983; TUMULURI et al., 2002). Sua expressão aumenta com a progressão do ciclo celular, atingindo seu maior pico nas fases G<sub>2</sub> e mitótica, sendo rapidamente degradada após a mitose. A meia-vida para detecção do antígeno dura 1 hora ou menos (LIU et al., 2000; VICENT et al., 2002). No entanto, sua função permanece desconhecida (ENDL; GERDES, 2000). A imunopositividade para o Ki-67 aparece localizada no núcleo ou em regiões perinucleares e está associada com o índice de proliferação celular do órgão ou lesão (BACCHI et al., 1993).

Sittel et al., em 1999, estudaram o valor prognostico da proteína Ki-67 em dois grupos de 28 pacientes com carcinoma bucal e de orofaringe, sendo que um grupo apresentava recorrência da doença e o outro não. Esses pacientes receberam tratamento cirúrgico e radiação pós-operatória. O índice de expressão da proteína foi significativamente maior naqueles tumores onde o tratamento não trouxe a cura para o paciente mostrando que o alto índice do Ki-67 pode ser um indicador de falhas no tratamento, sendo considerado como um fator prognóstico desfavorável para esses tumores.

Tulumuri et al., em 2002, ao pesquisar a proliferação celular em cortes histológicos obtidos de 47 blocos de parafina contendo fragmentos de carcinomas de células escamosas bucais, através da imunomarcção da proteína Ki-67, observaram que o índice de positividade era cinco vezes maior nas áreas de invasividade dos tumores do que nas áreas de limite cirúrgico da lesão. E que quanto mais pobre a diferenciação do tumor, maior era a quantidade de imunopositividade para a proteína Ki-67 nas áreas de invasão tumoral.



Em PLR, papiloma nasal e oral, trabalhos avaliando o índice de proliferação são escassos, como também em carcinomas de laringe. Alguns autores indicam que a proliferação celular influencia o prognóstico (WELKOBORSKY et al., 1995; LERA et al., 1998), mas essa conclusão não é consenso na literatura (SPAFFORD et al., 1996). Embora Krecicki et al. (1998) tenham observado maior sobrevida entre pacientes cujas lesões exibiam baixa positividade para Ki-67, os autores ressaltam que esse resultado não apresentou significado estatístico. Não houve correlação entre marcação de Ki-67 e recorrência da neoplasia.

### **3 HIPÓTESE**

#### 3.1 Hipótese alternativa

A resposta imune celular tecidual e os tipos moleculares de HPV encontrados em pacientes com PLR são similares aos encontrados em pacientes com papilomas orais e nasais.

#### 3.2 Hipótese Nula

A resposta imune celular tecidual e os tipos moleculares de HPV encontrados em pacientes com PLR são diferentes aos encontrados em pacientes com papilomas orais e nasais

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Identificar os tipos de HPV e descrever a resposta imune celular tecidual dos pacientes com PLR e não recorrente dos pacientes com papilomas de cavidade nasal e oral.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Descrever os aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes com Papilomatose laríngea recorrente, papiloma nasal e oral referenciados ao Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Santa Izabel (Salvador, Bahia);
- Realizar a caracterização morfológica das lesões teciduais nos grupos de estudo;
- Determinar a frequência de HPV, pela reação de polimerização em cadeia de PCR, identificando os tipos de HPV mais frequentes.
- Realizar a imunofenotipagem das células do infiltrado inflamatório e comparar os resultados de PLR com os de papilomas nasal e oral, correlacionando com os aspectos clínicos, epidemiológicos, morfológicos e tipos de HPV;
- Avaliar a expressão de Ki-67 nas lesões de PLR como também as de cavidade nasal e oral através da imuno-histoquímica.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Caracterização do Estudo

O presente trabalho trata-se de um estudo transversal, com uma análise comparativa por intermédio de estudo epidemiológico, morfológico e molecular por genotipagem do HPV e imuno-histoquímica em paciente com PLR e com papilomas de cavidade nasal e oral.

### 5.2 População e Amostra

Foram incluídos neste estudo pacientes com lesões de PLR e com papilomas na cavidade oral e na cavidade nasal, referenciados ao Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Santa Izabel – HSI (Salvador, Bahia). O HSI é do tipo terciário e pertence à Santa Casa de Misericórdia da Bahia, integrando o Sistema Único de Saúde – SUS.

Foram estudados todos os fragmentos de tecido preservados em parafina dos pacientes com PLR e papilomas de cavidade nasal e oral atendidos no período de 2004 a 2008 (n=81/estudo retrospectivo) pertencentes aos arquivos anatomopatológicos do Instituto de Patologia da Bahia de pacientes atendidos no HSI e amostras teciduais das lesões dos pacientes atendidos entre 2009 e 2012 (n=44/estudo prospectivo) atendidos no ambulatório do mesmo Hospital

A amostra foi composta por 125 pacientes atendidos no HSI no período de 2004 a 2012.

#### 5.2.1 Critérios de Inclusão

- Todos os casos clínicos de pacientes com PLR, papiloma de cavidade oral e nasal exofíticos que apresentaram quadro clínico e anatomopatológico compatíveis com papilomatose e papiloma.

- Os pacientes que concordaram em participar do estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, depois de esclarecidas todas as dúvidas (APÊNDICE A).

### 5.2.2 Critérios de Exclusão

- Casos clínicos do período de 2004 a 2008 em que não foi possível obter os blocos parafinizados do arquivo anatomopatológico.
- Pacientes de 2009 a 2012 que apresentaram diagnóstico de papiloma invertido, pólipos e hiperplasia epitelial.

### 5.3 Considerações Éticas

O protocolo desta pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ/BAHIA), o qual aprovou o projeto através do parecer N°196/2009 (ANEXO A).

### 5.4 Métodos

#### 5.4.1 Dados Clínico-Epidemiológicos

Os dados epidemiológicos de sexo e idade, assim como dados clínicos referentes à localização anatômica da lesão e à sintomatologia (rouquidão, tosse, dispnéia, disfonia, etc.) foram coletados dos prontuários dos pacientes, cujo acesso foi disponibilizado no ambulatório do serviço de referência citado, acompanhado pelo médico responsável.

Foram realizadas entrevistas com os pacientes portadores de PLR e com papilomas nasais e orais, atendidos no ambulatório no período de 2009 a 2012, tendo em vista a melhor definição do perfil clínico-epidemiológico da população do estudo. Foram investigadas as procedências, idade, sexo, escolaridade, idade ao diagnóstico da afecção, evolução do quadro, número de cirurgias realizadas para o tratamento, o nível de conhecimento sobre o que é HPV

(APÊNDICE B). Esse material constituiu o banco de dados empregado para a execução da pesquisa.

#### 5.4.2 Estudo Histomorfológico

Para a revisão e análise morfológica dos casos de PLR e de cavidades oral e nasal, cortes de quatro micrômetros de espessura foram obtidos dos espécimes fixados em formol a 10% e emblocados em parafina, provenientes do arquivo anátomo-patológico do Hospital Santa Izabel, sendo os mesmos submetidos às colorações por Hematoxilina/Eosina (HE) e por Sirius Red para a análise de fibrose. O processamento histológico e as colorações (HE e Sirius Red) foram realizados na Plataforma de Histotecnologia da Fiocruz/BA.

Foram realizados exames histopatológicos para confirmação diagnóstica e reconhecimento das lesões pré-malignas. Foi feita, também, análise morfológica das lesões teciduais com ênfase nos seus aspectos histológicos, análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos e matriz conjuntiva extracelular, especialmente fibrose. A semi-quantificação dos aspectos morfológicos foi feita seguindo os critérios: 0 - Negativo, 1 - Discreto, 2 – Moderado e 3 – Intenso (APÊNDICE C).

#### 5.4.3 Estudo de imunofenotipagem das células do infiltrado inflamatório

Foi realizado considerando os anticorpos monoclonais, descritos no Quadro 1, onde também consta a justificativa para a escolha dos mesmos (reatividade). Também foi avaliado o índice de proliferação celular da PLR, papiloma nasal e oral, através da identificação da proteína Ki-67 (Clone KiS5) e a Vimentina (Clone V9) para confirmar a boa preservação tecidual e antigênica. A reação imuno-histoquímica foi executada utilizando o Sistema EnVision™ e o procedimento foi feito no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular – LPBM/FIOCRUZ/BA.

Um Patologista (o próprio orientador, professor de patologia da FMB-UFBA e pesquisador do CPqGM-FIOCRUZ/BA, realizou a análise imuno-histoquímica do infiltrado inflamatório, a partir de um microscópio de luz, com diversos aumentos, sob um foco fixo e clareza de campo, acoplado a um sistema de câmara digital (AXIOCAM HRP, ZEISS,

Germany, 2004) e com auxílio do sistema operacional Axio-Zeiss versão 4.04 (ZEISS, Germany, 2004).

O estudo qualitativo do infiltrado inflamatório e semi-quantificação do tipo celular previstos considerou os parâmetros: Negativo (0 a 5% de células positivas); +1 Discreto (6 a 25% de células positivas); +2 Moderado (26 a 50% de células positivas) e +3 Intenso (> 50% de células positivas).

Foram incluídos na análise, os casos que apresentaram no estudo histopatológico, infiltrado inflamatório moderado e intenso (APÊNDICE D).

Embora fosse objetivo da presente pesquisa fazer o estudo imuno-histoquímico de todos os casos que compõem a nossa amostra de estudo (N=125), só foi possível fazer a análise de 36 casos. O critério para a seleção desses 36 casos examinados através da imuno-histoquímica foi a intensidade do infiltrado inflamatório. Nesse primeiro momento preferimos estudar todos os casos que apresentasse infiltrado inflamatório em grau moderado e intenso, os casos que apresentavam o infiltrado em grau discreto serão computados para publicação do trabalho. Entedemos que embora seja difícil a imunofenotipagem dos componentes de um infiltrado inflamatório em grau discreto, o estudo desse material poderá trazer resultados interessante.

#### 5.4.4 Protocolo Imuno-histoquímico

Todo o protocolo imuno-histoquímico foi realizado utilizando o Sistema EnVision™ e anticorpos monoclonais, conforme descrito no Quadro 1 e rotina imuno-histoquímica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, LPBM.

Foram obtidos cortes histológicos de 4µm do material embocado em parafina e colocados sobre lâminas previamente tratadas e silanizadas. A desparafinização dos cortes foi realizada com dois banhos de xilol com duração de 10 minutos cada e a hidratação do material com álcool etílico absoluto e em concentrações decrescentes, em dois tempos de 5 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e, subsequentemente, seguiram para a recuperação antigênica, utilizando os tampões descritos no Quadro 1 específicos para cada anticorpo, durante 30 minutos, em calor úmido a 95°C (banho-Maria). Os cortes foram submetidos à solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água para bloqueio da peroxidase endógena, protegidos da luz, por 15 minutos em temperatura ambiente.

**Quadro 1 - Marcadores Imuno-histoquímicos**

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição	Recuperador Antigênico	Reatividade
<b>CD1a</b>	Dako	010	1:30	EDTA 10mmol/L pH 9.0	Timócitos corticais imaturo, células de Langerhans e células dendríticas.
<b>CD3</b>	Dako	F7.2.38	1:25	Citrato 10mmol/L pH 6.0	Células T (pan T)
<b>CD4</b>	Novocastra	4B12	1:100	EDTA 10mmol/L pH 9.0	Células T CD4 (helper/inducer),
<b>CD8</b>	Biogen	C8/144B	1:200	EDTA 10mmol/L pH 9.0	Células T CD8 (supressora/citotóxica).
<b>CD15</b>	Biogen	C3D-1	1:50	Citrato 10mmol/L pH 6.0	Neutrófilos.
<b>CD20</b>	Dako	L26	1:50	Citrato 10mmol/L pH 6.0	Células B (pan B)
<b>CD68</b>	Dako	PG M1	1:200	Citrato 10mmol/L pH 6.0	Macrófagos.
<b>CD117</b>	Dako		1:500	Citrato 10mmol/L pH 6.0	Mastócitos.
<b>VS38</b>	DakoCytomation	VS38c	1:100	Citrato 10mmol/L pH 6.0	Plasmócitos.
<b>Antígeno-Ki- 67</b>	Dako	MIB I	1:100	Citrato 10mmol/L pH 6.0	Expressão da proliferação celular
<b>Vimentina</b>	Dako	V9	1:400	Citrato 10mmol/L pH 6.0	Células mesenquimais

Para determinações das diluições dos anticorpos monoclonais foram realizados estudos pilotos, levando em consideração as diluições sugeridas pelo fabricante e as utilizadas na rotina do laboratório. Foi utilizado o diluente de anticorpos do kit EnVision™ e foi realizada a incubação dos anticorpos em câmara úmida, por 60 minutos, em temperatura ambiente.

As reações imuno-histoquímicas foram reveladas com o cromógeno DAB (3,3 Diaminobenzidina), na diluição de 20µl/mL do tampão de cromógeno, durante 5 minutos, seguidas por lavagens com água destilada, para interromper a reação. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris e montadas com lamínulas e Bálsamo do Canadá.

Para o controle negativo das reações, o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 0,15M pH7,2 (*Phosphated Buffered Solution – Bovine Serum Albumin*). Os controles positivos dos antígenos pesquisados corresponderam a casos selecionados e previamente diagnosticados de linfonodo reacional, amígdala reacional, pele com mastocitose e pele de mama normal. Secções histológicas desses órgãos foram usadas como controle positivo e negativo.



#### 5.4.5 Detecção e tipagem do HPV

##### 5.4.5.1 Extração de DNA genômico de tecido incluído em parafina

Para a extração do DNA foram utilizados dois cortes histológicos com espessura de 8µm cada um, coletados em microtubos de polipropileno estéreis. A parafina foi removida pela adição 750µl de xileno p.a. e homogeneização vigorosa por 60 segundos, seguida por centrifugação a 13.400 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tecido foi recuperado no “*pellet*” progressivamente re-hidratado pela adição de 500µl de etanol 100%, seguido por etanol 50% através de homogeneização por 30 segundos e centrifugação a 13.400 x g por 15 min. Em cada etapa e em seguida deixado sobre a bancada até a secagem completa do tecido.

A digestão foi realizada pela adição de 300µl de Proteinase-K (5 ml de PK1% - SDS 10% e 45 ml TE pH9) (Shi SR et al., 2002) e incubado em banho Maria a 55°C por 24h. Após este período foram adicionados 5µl de PK 2,0% (100mg Proteinase K em 5ml de TE pH9) nas amostras ainda não digeridas e mantidas por mais 24h 55°C até a total digestão dos tecidos.

Os DNA foram purificados através de extração com solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado pela adição de 100µl de acetato de amônio 7,5M e 800µl de etanol absoluto gelado e mantidos por 2 horas em freezer -80°. Os DNA foram recuperados através de centrifugação a 4°C por 12.074 x g por 15minuto e lavados por duas vezes com etanol 70% diluído em água nas mesmas condições, sendo que após a última lavagem, os tubos contendo o DNA foram mantidos invertidos sobre um papel absorvente até a secagem por completo e reconstituídos com 50µl de água deionizada e quantificados a 260/280 no espectrofotômetro (NanoDrop 1000 – Thermo Scientific USA). As concentrações das amostras variaram em torno de 10ng/ul até 800ng/ul e foram todas normalizadas a 50ng/µl para a realização dos testes.

##### 5.4.5.2 Análise do DNA extraído

Os DNA foram qualitativamente analisados através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando-se os iniciadores PCO3/PCO4 para a  $\beta$ -globina humana (SAIKI et al., 1988) que gera um amplicon de 110bp. Das amostras negativas para beta globina foram consideradas inadequadas e novos cortes de parafina foram utilizados para nova extração de DNA.

A tabela 2 mostra a seqüência dos *primers* (iniciadores) utilizados.

**Tabela 2 - Conjunto de iniciadores utilizados para detecção do gene da globina**

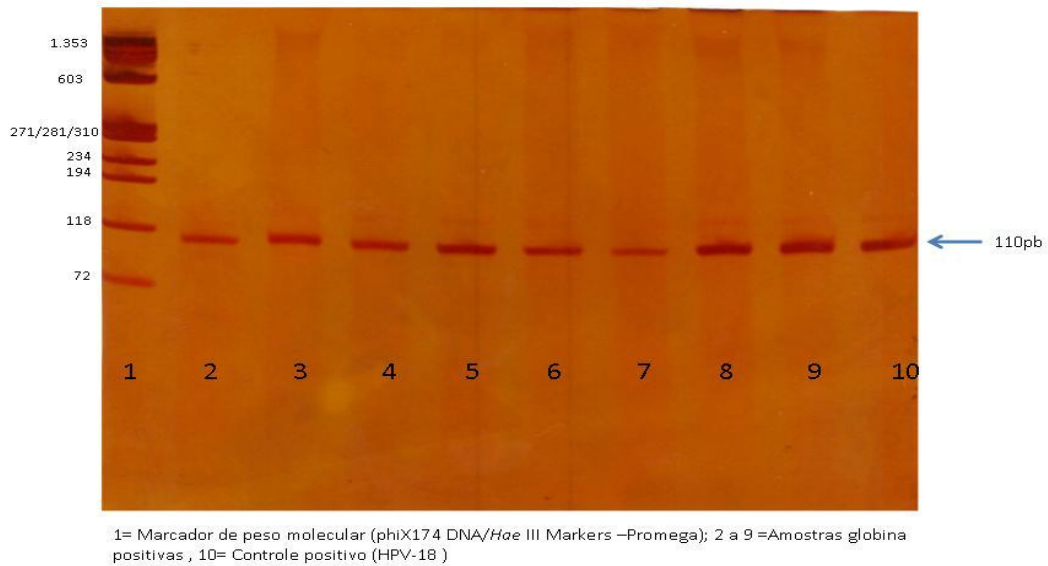
Sistema	Seqüências Nucleotídeos	Fragmento amplificado
PCO3 Forward	5'ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3'	
PCO4 Reverse	5'CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'	110pb

A PCR de  $\beta$ -globina humana foi processada em volume final de 25 $\mu$ l utilizando-se 100 ng de todos os DNA e 0,2mM de dNTP, 2mM de magnésio, 80nM de cada iniciador e 0,5U de Taq polimerase recombinante (Invitrogen) nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95° por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 95 ° por 5 minutos, 55° por 1 minuto e 72° por 1 minuto. O termociclador utilizado foi Eppendorf modelo Mastercycle gradient. Como controle positivo utilizou-se DNA de células HeLa (linhagem de câncer cervical) que contem o genoma do HPV 18 .

#### 5.4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrílamida

A eletroforese foi realizada com 5 $\mu$ l do produto amplificado de  $\beta$ -globina humana e análise foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrílamida a 8% e corado com nitrato de prata (SANGUINETTI et al., 1994). Observa-se a presença do fragmento 110pb correspondente da região do gene da  $\beta$ -globina humana (Figura 4).

**Figura 4 – Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata utilizando os *primers* PCO3/PCO4 para amplificação da região do gene (110pb)**



#### 5.4.5.4 Tipagem de HPV

A tipagem do HPV foi realizada através de hibridização reversa utilizando o Kit INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics, Ghent, Belgium) por ser mais sensível e apropriado para amostras fixadas e emblocadas em parafina.

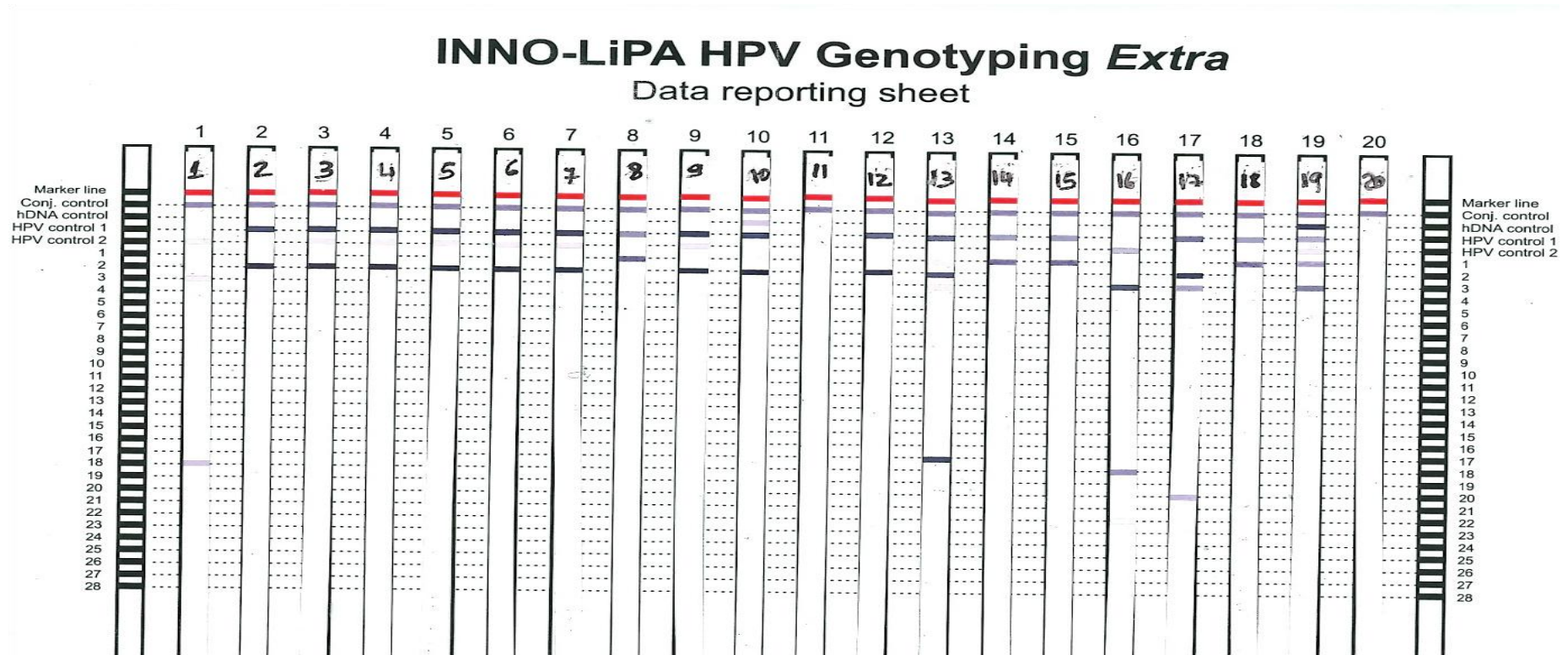
O teste INNO-LiPA é direcionado para amplificação de 65pb da região L1 do genoma do HPV que permite a identificação de 28 tipos de HPV de alto e baixo risco utilizando *primers* SPF biotinizados

A tipagem de HPV foi realizada conforme protocolo descrito pelo fabricante em parceria com o Instituto do Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer / ILPC, Brasil, e o Instituto Nacional Ciência e Tecnologia das doenças do HPV - INCT – HPV.

A Figura 5 ilustra a hibridização em linhas, em diferentes posições podendo representar a presença de um ou mais tipos de HPV. A identificação é feita através da análise comparativa com o diagrama que acompanha o Kit.

Os tipos de HPV são identificados através de um diagrama fornecido pelo fabricante (Figura 6).

Figura 5 – Hibridização em linhas



1 a 18 ( amostras testadas); 19 (controle positivo – HPV 6 e 16); 20 (controle negativo –No DNA)

Figura 6 – Diagrama de interpretação – genótipos de HPV

81063 INNO-LiPA HPV Genotyping Extra / 27275 v7 / KEY-CODE: INX44948

p 16/16

Interpretation Chart

Probe #	HPV genotypes																																			
	6 LR	11 LR	16 HR	18 HR	18 HR	26* pHR	31 HR	33 HR	35 HR	39 HR	40 LR	43 LR	44 LR	45 HR	45 HR	51 HR	52 HR	53* pHR	53* pHR	54 LR	56 HR	58 HR	58 HR	58 HR	58 HR	59 HR	66* pHR	68 HR	69/71**	70 LR	70 LR	73 HR	74**	82 HR		
1	X																																			
2		X																																		
3			X																																	
4				X																																
5					X																															
6						X																														
7																														X						
8							X				X									X				X	X											
9							X	X											X																	
10							(X)***	X																												
11									X																											
12				X	X					X																		X						X		
13											X																									
14												X																								
15													X																							
16														X	X																					
17																X																				
18							X	X			X						X						X	X	X	X										
19																		X	X																	
20																							X													X
21																						X			X											
22																							X	X	X	X										
23																											X									
24																												X								
25															X													X					X	X		
26																														X	X					
27																																		X		
28																																				X

\*: 26, 53 and 66 are considered probable high-risk (pHR) genotypes according to Munoz et al. N Engl J Med 2003;348:518-27.  
 \*\*: 69, 71 and 74 are not classified as high-risk, probable high-risk or low risk genotypes according to Munoz et al. N Engl J Med 2003;348:518-27.  
 \*\*\*: probeline 10 may show weak reactivity when probelines 8 and 9 are positive; in this case the sample should be interpreted as genotype 31

#### 5.4.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram compilados em um banco de dados do programa operacional *Microsoft Excel*. A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico STATA, versão 10.

Os dados foram apresentados por gráficos e tabelas de frequência. Para avaliação de associação entre as variáveis, foi utilizado o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e o teste exato de Fisher quando o número extraído de uma célula foi menor que 5. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Casuística

Foram incluídos nesse estudo 125 casos clínicos atendidos no serviço de referência em Otorrinolaringologia do HSI de Salvador (BA), durante o período de 2004 a 2012. Segundo a localização anatômica das lesões, foram encontrados 23 casos (18,4%) em cavidade nasal, 34 (27,2%) em cavidade oral e 68 (54,4%) em laringe (Tabela 3).

### 6.2 Dados Clínicos e Epidemiológicos

Dos 125 pacientes analisados, 52,8% eram do sexo masculino e 47,2% do feminino. Estes tinham idade de 1 a 75 anos com média de 32,8 anos e DP=18,5. A grande maioria foi de adultos com mais de 18 anos de idade (74,4%), conforme Tabela 3.

**Tabela 3 – Perfil dos pacientes atendidos no HSI de Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (N=125)**

Variáveis	N	%
<u>Sexo</u>		
Masculino	66	52,8
Feminino	59	47,2
<u>Idade (anos)</u>		
0 a ≤18	32	25,6
>18	93	74,4
<u>Localização da lesão</u>		
Nasal	23	18,4
Oral	34	27,2
Laringe	68	54,4

Entre os 23 casos na cavidade nasal, 19 (82,6%) foram diagnosticados, segundo critérios clínicos e histológicos, como papiloma e 4 (17,4%) como papilomatose, caracterizada por múltiplas lesões. O sexo masculino foi representado por 12 (52,2%) dos casos analisados e o sexo feminino por 11 (47,8%).

Na cavidade oral (34), o diagnóstico de papiloma foi definido em 31 (91,2%) dos casos e o de papilomatose em 3 (8,8%), sendo que 14 (41,17%) dessas lesões acometeram homens e 20 (58,9%) mulheres. Os pacientes não apresentaram recorrências no momento do estudo.

Nas lesões em laringe (68), 52 (76,5%) tiveram como diagnóstico a papilomatose e 15 (22,0%) o papiloma e 1 foi considerado inadequado para análise. Quarenta pacientes (58,8%) foram do sexo masculino e 28 (41,2%) do sexo feminino.

A Tabela 4 mostra os principais sintomas por localização da lesão. Os mais frequentes foram rouquidão e obstrução nasal.

**Tabela 4 – Associação entre os sintomas e a localização da lesão nos pacientes do HSI, Salvador, Bahia. 2004 a 2011. (N=125)**

Sintomas	Localização da lesão						p
	Nasal		Oral		Laringe		
	n=23	%	n=34	%	n=68	%	
<u>Rouquidão</u>							0,594
1 - Sim	18	78,3	26	76,5	47	69,1	
2 – Não	5	21,7	8	23,5	21	30,9	
<u>Obstrução nasal</u>							0,959
1 - Sim	18	78,3	27	79,4	55	80,9	
2 – Não	5	21,7	7	20,6	13	19,1	
<u>Dispneia</u>							0,214
1 - Sim	11	47,8	11	32,4	19	27,9	
2 – Não	12	52,2	23	67,6	49	72,1	
<u>Disfonia</u>							0,587
1 - Sim	9	39,1	16	47,1	35	51,5	
2 – Não	14	60,9	18	52,9	33	48,5	
<u>Tosse</u>							0,404
1 - Sim	5	21,7	5	14,7	18	26,5	
2 – Não	18	78,3	29	85,3	50	73,5	

\*p <0,05 (Teste  $\chi^2$ )

Durante o período do estudo, 19 (15,2%) pacientes cursaram com 1 recorrência; 5 (4,0%) 2 recorrências; 2 (1,6%) 3 recorrências e 1 (0,8%) 4 recorrências. Os sintomas mais frequentes foram rouquidão (78,9%) e obstrução nasal (84,2%), como mostra a Tabela 5. Destaca-se que 2 desses pacientes incluídos no estudo apresentaram recorrência com lesão em



locais diferentes. Um do sexo feminino com idade de 29 anos apresentou papiloma em cavidade nasal e em seqüência cursou com lesão clinicamente semelhante em cavidade oral. O segundo, do sexo masculino com 15 anos, apresentou na cavidade nasal e, posteriormente, na laringe.

**Tabela 5 – Sintomas apresentados pelos pacientes com recorrência do HSI. Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=19)**

Variáveis	Sim		Não	
	N	%	n	%
Dispneia	5	26,3	14	73,7
Tosse	6	31,6	13	68,4
Disfonia	11	57,9	8	42,1
Rouquidão	15	78,9	4	21,1
Obstrução nasal	16	84,2	3	15,8

### 6.3 Análise Histopatológica

Os papilomas em cavidade nasal (23) ocorreram sob a forma exofítica e se caracterizaram por apresentar epitélio de revestimento do tipo pavimentoso estratificado com evidências de acantose e de papilomatose. A coilocitose esteve presente em 52,2% (12) dos casos. A hiperkeratose e a diskeratose foram achados ocasionais e a parakeratose esteve presente em 82,6%. Infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear foram evidentes com 78,2% (18) e 56,5% (13), respectivamente, fibrose em 78,2% (18) e edema em 56,5% (13). Displasia epitelial discreta foi encontrada em 13,0% (3) dos casos (Tabela 6), não sendo observados os demais tipos.

As lesões em cavidade oral (34) evidenciaram epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado com acantose e papilomatose frequentes. Em 41,2% (14) dos casos a coilocitose esteve presente. Alterações como hiperkeratose, diskeratose e exocitose foram observadas em 29,4% (10), 11,7% (4) e 29,4% (10), respectivamente. Edema foi presente em 41,2% (14) e fibrose em 70,6% (24) dos casos. O infiltrado inflamatório predominante foi o mononuclear em 58,8% (20) das lesões. Displasias não foram evidenciadas (Tabela 6).

Os papilomas na laringe (68), de forma semelhante aos outros sítios anatômicos, apresentaram epitélio pavimentoso estratificado com acantose e papilomatose importantes. A coilocitose foi observada em 73,5% (50) dos casos, sendo que os aspectos morfológicos de

paraceratose, disceratose e exocitose, também, foram freqüentes. Na avaliação da lâmina própria, foi evidenciada fibrose em 76,5% (52) das lesões, edema em 51,5% (35) e o infiltrado inflamatório mononuclear foi predominante em 80,9% (55). Displasias epiteliais foram encontradas em 13,2% (9) dos casos, classificadas em discreta em 10,2% (7), moderada em 1,5% (1) e intensa com acometimento de todo o epitélio (terços inferior, médio e superior) em 1,5% (1), como observado na Tabela 6.

Foram observadas associações estatisticamente significantes entre os aspectos morfológicos de coilocitose, acantose, papilomatose, exocitose, disceratose, fibrose e infiltrado inflamatório polimorfonuclear detectados nos pacientes com PLR, papiloma de cavidade nasal e oral ( $p < 0,05$ ), observadas na Tabela 6.

A presença de coilocitose nos casos examinados foi de 60,8% (76). Por outro lado a presença desse mesmo aspecto morfológico em pacientes HPV positivo, verificado através de PCR foi 63,2% (67). Não foi observada uma associação estatística entre coilocitose e a infecção pelo HPV. O que não quer dizer que não exista relação entre esses aspectos.

**Tabela 6 – Associação entre a localização da lesão e os aspectos morfológicos apresentados pelos pacientes do HSL. Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (N=125) (continua)**

Aspectos morfológicos	Localização da lesão						p
	Nasal		Oral		Laringe		
	n=23	%	n=34	%	n=68	%	
<u>Coilocitose</u>							<b>0,001</b>
Negativo	11	47,8	20	58,8	18	26,5	
Discreto	10	43,5	10	29,4	17	25,0	
Moderado	2	8,7	3	8,8	23	33,8	
Intenso	0	0,0	1	2,9	10	14,7	
<u>Acantose</u>							<b>0,006</b>
Negativo	1	4,3	2	5,9	3	4,4	
Discreto	0	0,0	0	0,0	1	1,5	
Moderado	7	30,4	20	58,8	15	22,1	
Intenso	15	65,2	12	35,3	49	72,1	
<u>Papilomatose</u>							<b>0,000</b>
Negativo	1	4,3	7	20,6	4	5,9	
Discreto	9	39,1	11	32,4	7	10,3	
Moderado	7	30,4	8	23,5	13	19,1	
Intenso	6	26,1	8	23,5	44	64,7	
<u>Hiperkeratose</u>							0,155
Negativo	20	87,0	24	70,6	58	85,3	
Discreto	2	8,7	6	17,6	9	13,2	
Moderado	1	4,3	3	8,8	0	0,0	
Intenso	0	0,0	1	2,9	1	1,5	
<u>Parakeratose</u>							0,482
Negativo	4	17,4	6	17,6	6	8,8	
Discreto	2	8,7	8	23,5	13	19,1	
Moderado	13	56,5	12	35,3	33	48,5	
Intenso	4	17,4	8	23,5	16	23,5	
<u>Excitose</u>							<b>0,000</b>
Negativo	6	26,1	24	70,6	25	36,8	
Discreto	5	21,7	6	17,6	31	45,6	
Moderado	7	30,4	2	5,9	12	17,6	
Intenso	5	21,7	2	5,9	0	0,0	
<u>Disqueratose</u>							<b>0,000</b>
Negativo	18	78,3	30	88,2	18	26,5	
Discreto	4	17,4	4	11,8	29	42,6	
Moderado	1	4,3	0	0,0	18	26,5	
Intenso	0	0,0	0	0,0	3	4,4	

**Tabela 6 – Associação entre a localização da lesão e os aspectos morfológicos apresentados pelos pacientes do HSI. Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (N=125) (conclusão)**

Aspectos morfológicos	Localização da lesão						p
	Nasal		Oral		Laringe		
	n	%	n	%	n	%	
<u>Displasia</u>							0,214
Negativo	20	87,0	34	100,0	59	86,8	
Discreto	3	13,0	0	0,0	7	10,3	
Moderado	0	0,0	0	0,0	1	1,5	
Intenso	0	0,0	0	0,0	1	1,5	
<u>Edema</u>							0,159
Negativo	10	43,5	20	58,8	33	48,5	
Discreto	7	30,4	10	29,4	28	41,2	
Moderado	2	8,7	2	5,9	6	8,8	
Intenso	4	17,4	2	5,9	1	1,5	
<u>Fibrose</u>							<b>0,000</b>
Negativo	5	21,7	10	29,4	16	23,5	
Discreto	3	13,0	7	20,6	19	27,9	
Moderado	7	30,4	3	8,8	28	41,2	
Intenso	8	34,8	14	41,2	5	7,4	
<u>Infiltrado PN</u>							<b>0,004</b>
Negativo	10	43,5	28	82,4	45	66,2	
Discreto	11	47,8	3	8,8	21	30,9	
Moderado	2	8,7	2	5,9	2	2,9	
Intenso	0	0,0	1	2,9	0	0,0	
<u>Infiltrado MN</u>							0,073
Negativo	5	21,7	14	41,2	13	19,1	
Discreto	8	34,8	15	44,1	35	51,5	
Moderado	8	34,8	3	8,8	17	25,0	
Intenso	2	8,7	2	5,9	3	4,4	
<u>Proliferação vasos</u>							0,079
Negativo	16	69,6	23	67,6	57	83,8	
Discreto	4	17,4	7	20,6	10	14,7	
Moderado	3	13,0	4	11,8	1	1,5	
Intenso	0	0,0	0	0,0	0	0,0	

PN (Polimorfonuclear); MN (Mononuclear); p <0,05 (Teste exato de Fisher)

Entre os pacientes com lesão na laringe que apresentaram recorrência (17) pela primeira vez, cuja caracterização morfológica pode ser observada na Tabela 7, a coilocitose esteve presente em 88,2% (15) dos casos. A displasia foi observada em 11,7% (2), sendo notável a ocorrência de displasia intensa apenas na lesão inicial no paciente com maior número de recorrências. Em relação ao infiltrado inflamatório mononuclear, a semi-quantificação discreta foi observada em 70,5% (12), como mostra a Tabela 7. Também foi observada a presença de fibrose em 94,1% (16) e edema em 52,9% (9) dos pacientes com uma recorrência.

**Tabela 7 – Aspectos morfológicos das lesões dos pacientes com PLR recorrente do HSI. Salvador, Bahia, 2004 a 2012. (n=17)**  
(continua)

Paciente (Idade – LI)	Aspectos Morfológicos	LI	1R	2R	3R	4R
1 (11a)	Coilocitose	3	4	-	-	-
	Displasia	1	2	-	-	-
	Infiltrado MN	2	2	-	-	-
	Infiltrado PN	1	2	-	-	-
2 (40a)	Coilocitose	3	2	-	-	-
	Displasia	2	1	-	-	-
	Infiltrado MN	2	1	-	-	-
	Infiltrado PN	1	3	-	-	-
3 (47a)	Coilocitose	3	4	-	-	-
	Displasia	1	1	-	-	-
	Infiltrado MN	3	2	-	-	-
	Infiltrado PN	1	1	-	-	-
4 (8a)	Coilocitose	2	3	2	-	-
	Displasia	1	1	1	-	-
	Infiltrado MN	1	2	1	-	-
	Infiltrado PN	1	2	2	-	-
5 (48a)	Coilocitose	3	2	-	-	-
	Displasia	1	1	-	-	-
	Infiltrado MN	2	2	-	-	-
	Infiltrado PN	2	2	-	-	-
6 (2a)	Coilocitose	4	3	-	-	-
	Displasia	1	1	-	-	-
	Infiltrado MN	2	2	-	-	-
	Infiltrado PN	2	1	-	-	-
7 (1a)	Coilocitose	2	4	3	2	1
	Displasia	4	1	1	1	1
	Infiltrado MN	2	2	2	1	2
	Infiltrado PN	1	1	1	2	2

**Tabela 7 – Aspectos morfológicos das lesões dos pacientes com PLR recorrente do HSI. Salvador, Bahia, 2004 a 2012. (n=17)**

Paciente (Idade – LI)	Aspectos Morfológicos	LI	1R	2R	3R	4R
8 (10a)	Coilocitose	4	2	-	-	-
	Displasia	1	1	-	-	-
	Infiltrado MN	2	4	-	-	-
	Infiltrado PN	2	2	-	-	-
9 (4a)	Coilocitose	2	1	-	-	-
	Displasia	1	1	-	-	-
	Infiltrado MN	2	2	-	-	-
	Infiltrado PN	1	1	-	-	-
10 (9a)	Coilocitose	2	3	-	-	-
	Displasia	1	1	-	-	-
	Infiltrado MN	2	3	-	-	-
	Infiltrado PN	2	3	-	-	-
11 (44a)	Coilocitose	1	1	-	-	-
	Displasia	1	1	-	-	-
	Infiltrado MN	1	1	-	-	-
	Infiltrado PN	1	1	-	-	-
12 (10a)	Coilocitose	1	3	-	-	-
	Displasia	1	1	-	-	-
	Infiltrado MN	1	2	-	-	-
	Infiltrado PN	1	1	-	-	-
13 (26a)	Coilocitose	3	3	3	-	-
	Displasia	1	1	1	-	-
	Infiltrado MN	3	2	2	-	-
	Infiltrado PN	2	2	1	-	-
14 (2a)	Coilocitose	3	2	-	-	-
	Displasia	1	1	-	-	-
	Infiltrado MN	3	1	-	-	-
	Infiltrado PN	1	1	-	-	-
15 (47a)	Coilocitose	3	4	-	-	-
	Displasia	1	1	-	-	-
	Infiltrado MN	2	2	-	-	-
	Infiltrado PN	2	3	-	-	-
16 (5a)	Coilocitose	3	3	3	-	-
	Displasia	1	1	1	-	-
	Infiltrado MN	1	2	3	-	-
	Infiltrado PN	1	2	2	-	-
17 (8a)	Coilocitose	4	3	3	3	-
	Displasia	1	2	1	1	-
	Infiltrado MN	2	2	2	2	-
	Infiltrado PN	2	2	2	3	-

LI (Lesão inicial); 1R (1ª. Recorrência); 2R (2ª. Recorrência); 3R (3ª. Recorrência); 4R (4ª. Recorrência); MN (Mononuclear); PN (Polimorfonuclear); 1 (negativo); 2 (discreto); 3 (moderado); 4 (intenso).

A Tabela 8 se refere aos dois pacientes que apresentaram recorrência em sítios diferentes. O primeiro paciente (15 anos) apresentou a primeira lesão na cavidade nasal e depois, na laringe. Já o segundo (29 anos), mostrou primeira lesão na cavidade nasal e a segunda na oral. Em relação aos aspectos morfológicos coilocitose, displasia, infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, a semi-quantificação variou de ausente a moderada na cavidade nasal, ausente a discreta na laringe e de ausente a intensa na oral (Tabela 8). Sobre o aspecto de fibrose a intensidade variou de discreto a moderado e o edema se apresentou intenso nos dois casos.

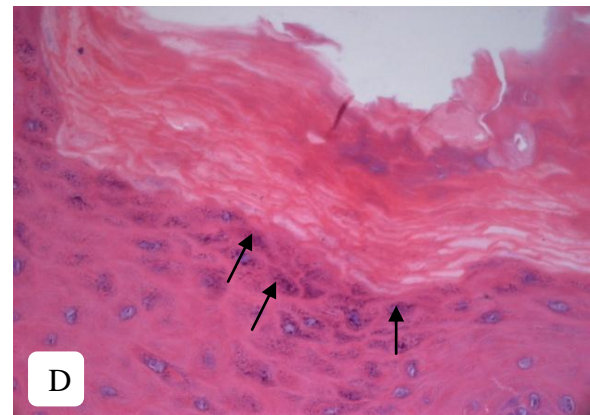
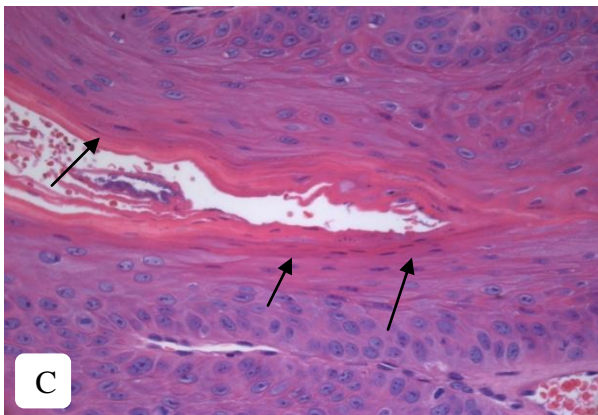
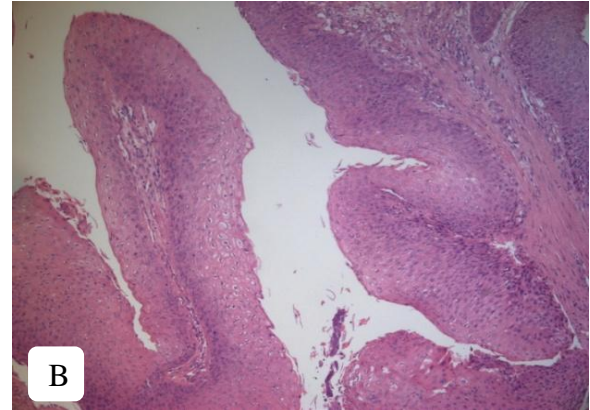
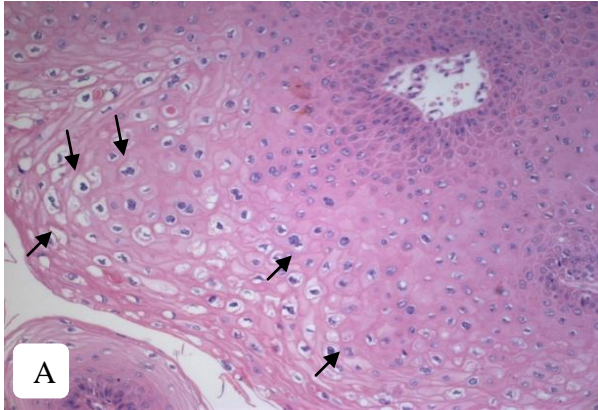
**Tabela 8 – Aspectos morfológicos das lesões dos pacientes com recorrência nasal do HSI. Salvador, Bahia, 2004 a 2012. (n=2)**

Paciente (Idade – LI)	Local	Coilocitose	Displasia	IMN	IPN
1 (15a)	1ª. lesão <u>Nasal</u>	1	1	3	2
	2ª. lesão <u>Laringe</u>	1	1	2	1
2 (29a)	1ª. lesão <u>Nasal</u>	1	1	1	1
	2ª. lesão <u>Oral</u>	4	1	2	1

LI (Lesão inicial); IMN (Mononuclear); IPN (Polimorfonuclear); 1 (negativo); 2 (discreto); 3 (moderado); 4 (intenso).

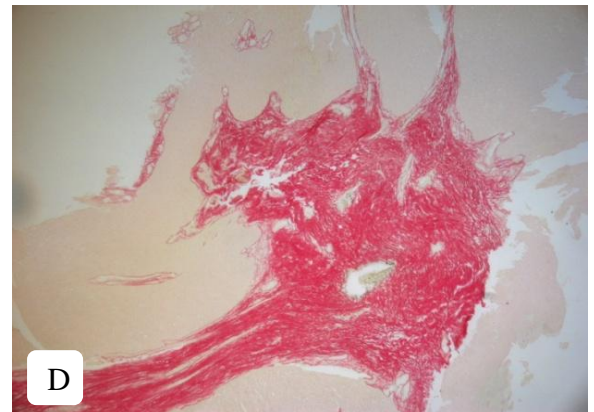
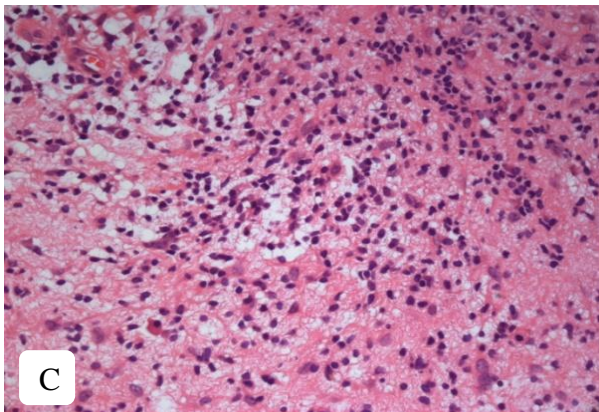
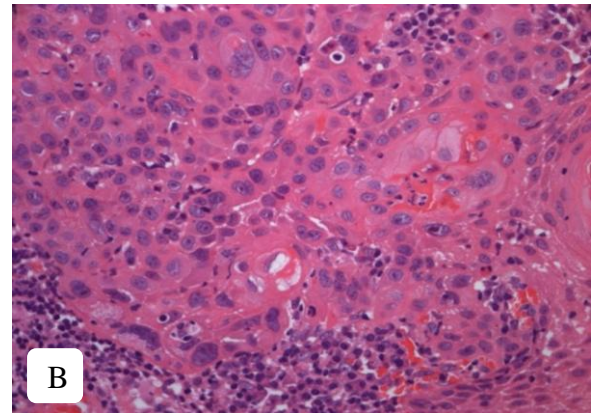
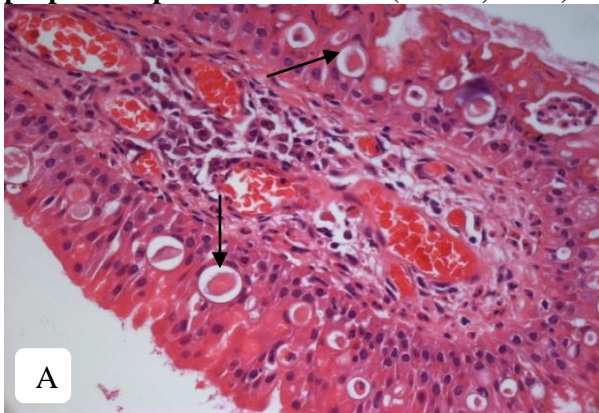
A caracterização dos aspectos morfológicos das lesões em estudo está ilustrada nas Figuras 7 e 8.

**Figura 7. Aspectos morfológicos das lesões em estudo. (A) Papilomatose laríngea com evidências de epitélio acantótico e coilocitose (setas) intensa (HE, 200X). (B) Papiloma de cavidade nasal com eixos conjuntivo fibroso revestido por epitélio acantótico (papilomatose) (HE, 100X). (C) Paraceratose intensa na superfície epitelial de papiloma de cavidade oral (HE, 400X). (D) Hiperkeratose intensa e grânulos de cerato-hialina, eixo abundante de papiloma de cavidade oral (HE, 400X).**





**Figura 8. Aspectos morfológicos das lesões em estudo. (A) Epitélio acantótico com disceratose (setas) intensa e infiltrado inflamatório mononuclear na lâmina própria (HE, 400X). (B) Caso com displasia moderada em PLR (HE, 400X). (C) Caso de PLR mostrando o infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (HE, 400X). (D) Fibrose intensa na lâmina própria em paciente com PLR (PIFIG, 100X).**



#### 6.4 Análise Imuno-histoquímica

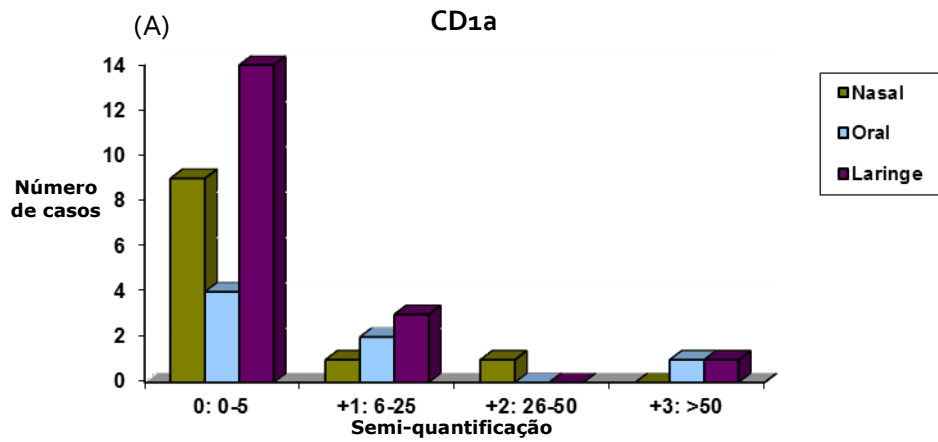
A imunomarcação foi feita com 36 casos que revelou a presença de reação inflamatória, constituída por células inflamatórias mononucleares e ou polimorfonucleares do tipo em grau moderado e intenso, sendo 11 (30,6%) na cavidade nasal, 7 (19,4%) na cavidade oral e 18 (50,0%) na laringe.

Nas lesões de cavidade nasal (11) casos, a imunomarcação para o CD3 específico para linfócitos T, o CD8 para linfócitos citotóxicos, o CD117 para mastócitos e o VS38 para plasmócitos, foi semi-quantificada como moderada na maior parte dos casos: 7 (63,3%), 5 (45,4%), 6 (54,5%) e 6 (54,5%), respectivamente. A positividade para o CD68 marcador de macrófagos, evidenciou os mesmos escores em 3 (27,3%) dos casos, em grau discreto, moderado e intenso. O CD1a, específico para as células dendríticas de Langerhans, esteve negativo em 9 (81,8%) casos, os linfócitos T auxiliares, marcados pelo anticorpo CD4, foram negativo em 10 (90,9%) casos. A imunomarcação discreta foi predominante para o CD15, utilizado para identificar neutrófilos e CD20, específico para linfócitos B, em 4 (36,4%) dos casos (Figura 9) e com o escore de 100,0%, o Ki-67 se mostrou negativo.

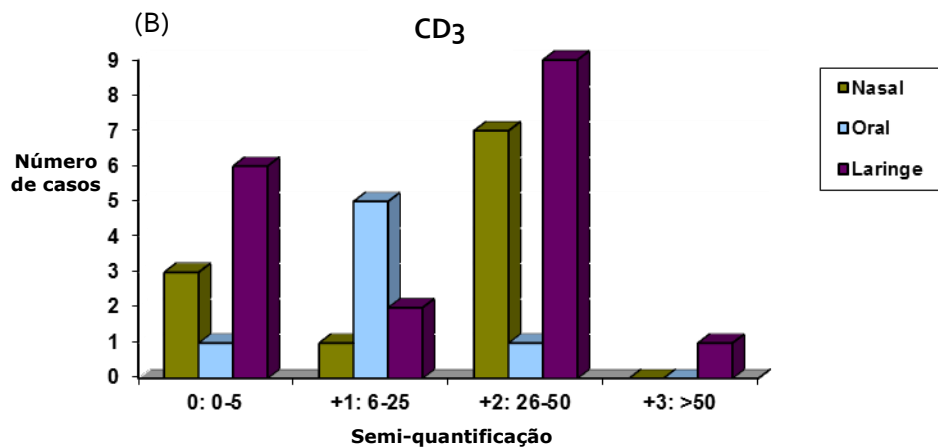
Na cavidade oral (7), o CD3 foi positivo em 5 (71,4%) casos e o CD8 em 4 (57,1%). O CD117 em 3 casos (42,8%) foi semi-quantificado como discreto. O VS38 e o CD15 em 3 casos (42,8%) foi semi-quantificado como negativo, mas a imunomarcação foi intensa para o VS38 e discreta para o CD15 em 2 (28,5%) casos. Na maior parte das lesões a imunomarcação foi negativa para CD1a e CD20 em 4 (57,1%) e para CD4 e Ki-67 em 100,0% das lesões. A imunomarcação para o CD68 foi moderada em 3 (42,8%) lesões (Figura 9).

Na laringe (18), o CD1a (14/77,8%), CD4 (15/83,3%), CD20 (10/55,5%), CD68 e o CD117 (11/61,1%) foram negativo na maior parte dos casos. O marcador para linfócitos T, CD3, foi semi-quantificado como moderado em 9 (50,0%) das lesões, o CD8 e o VS38 como discreto em 8 (44,4%) e 7 (38,9%), respectivamente. O CD15 foi semi-quantificado em igual proporção como negativo e moderado em 6 (33,3%) lesões (Figura 9). Nesta lesão o Ki-67 revelou imunomarcação negativo em 100% dos casos.

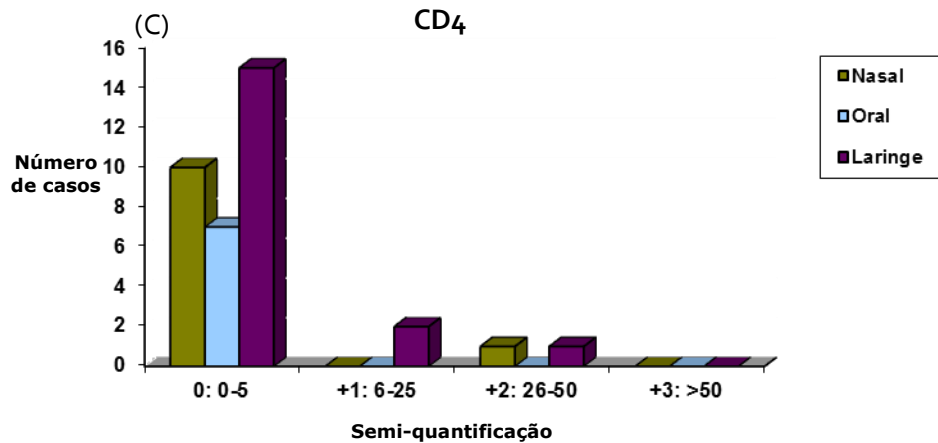
**Figura 9 - Distribuição proporcional da positividade para os marcadores imuno-histoquímicos nas lesões das cavidades nasal, oral e laringe. Salvador, Bahia, 2004 a 2012. (A) CD1a (B) CD3 (C) CD4 (D) CD8 (E) CD15 (F) CD20 (G) CD68 (H) CD117 (I) VS38.**



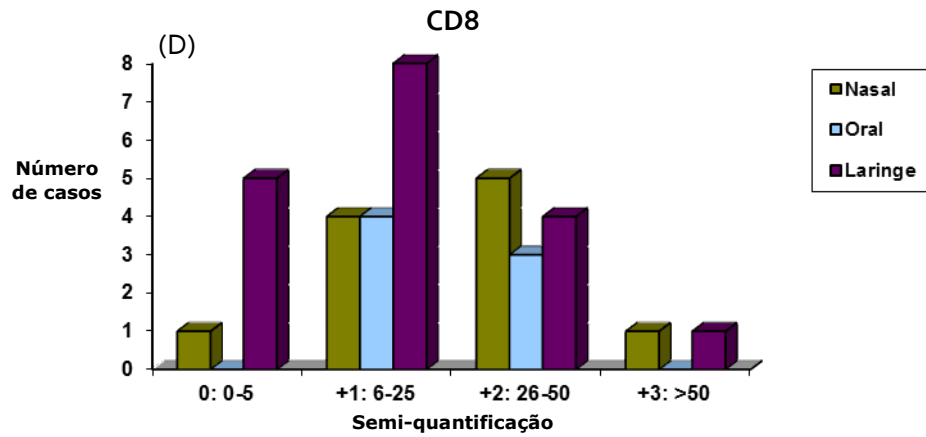
\* 0: Negativo; +1: Discreto; +2: Moderado; +3: Intenso



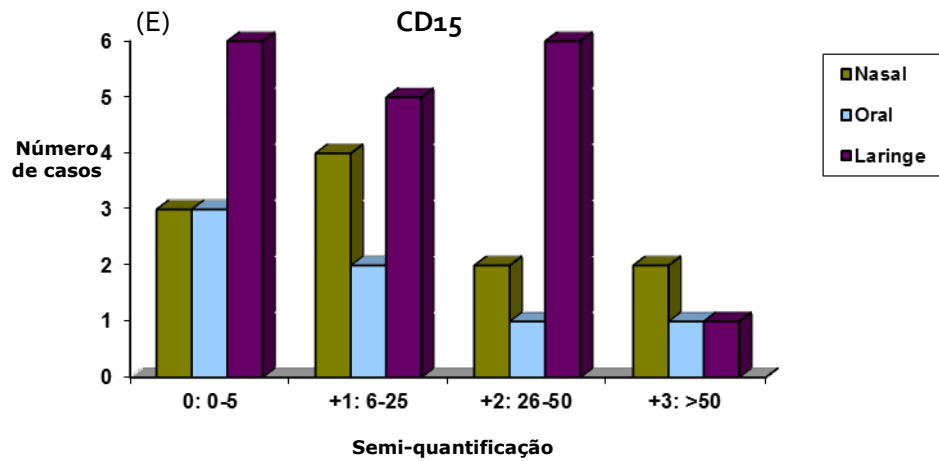
\* 0: Negativo; +1: Discreto; +2: Moderado; +3: Intenso



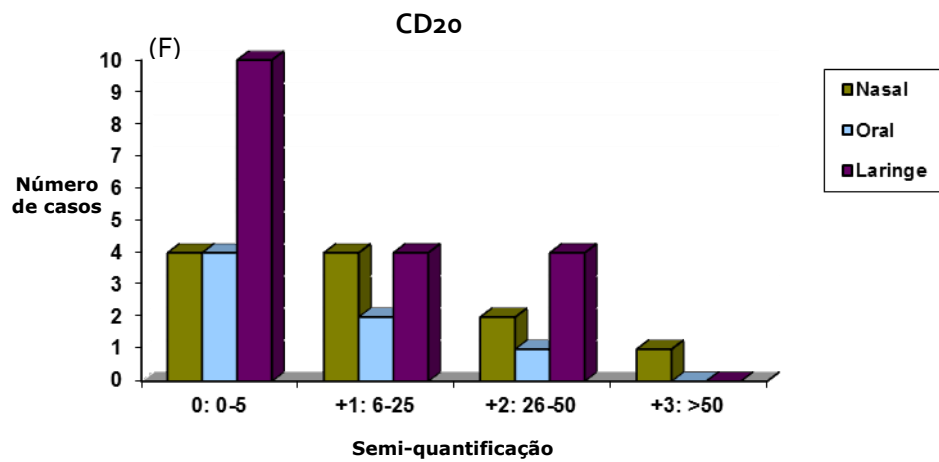
\* 0: Negativo; +1: Discreto; +2: Moderado; +3: Intenso



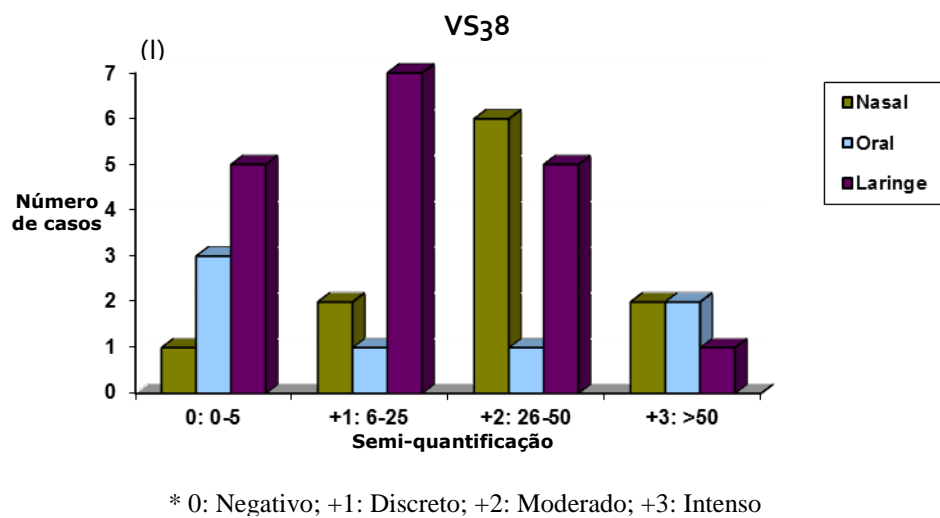
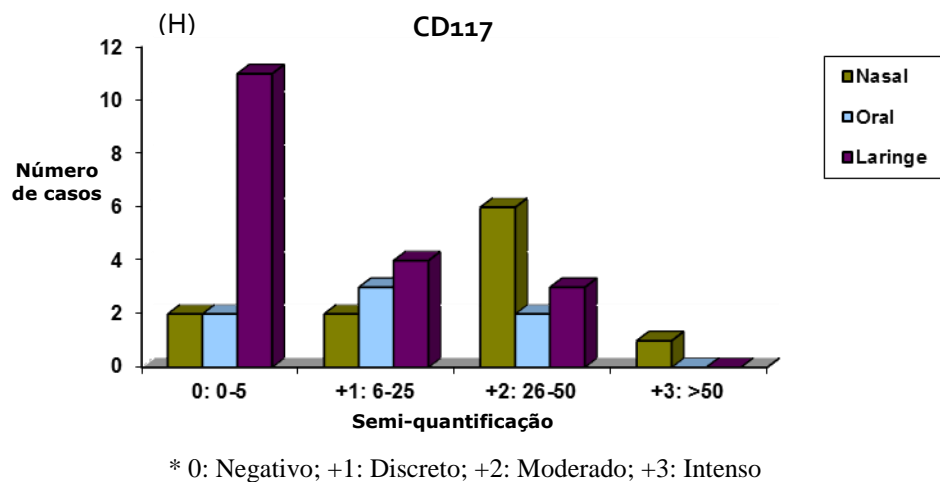
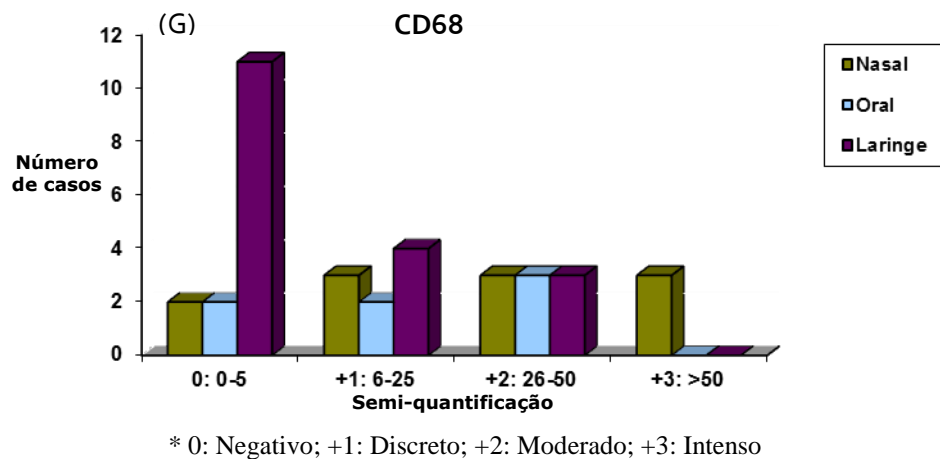
\* 0: Negativo; +1: Discreto; +2: Moderado; +3: Intenso



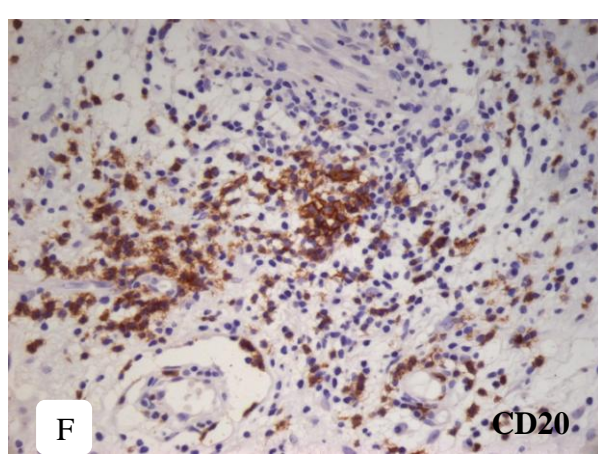
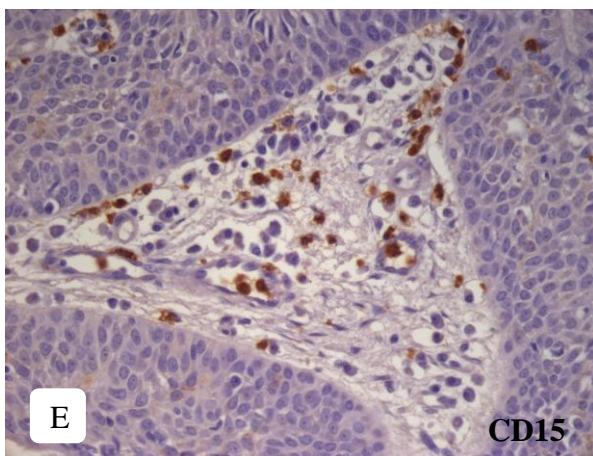
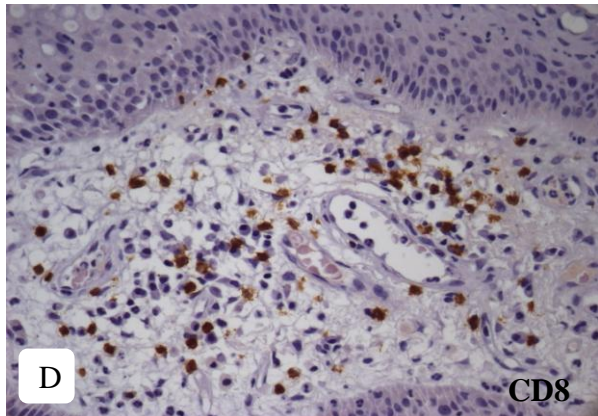
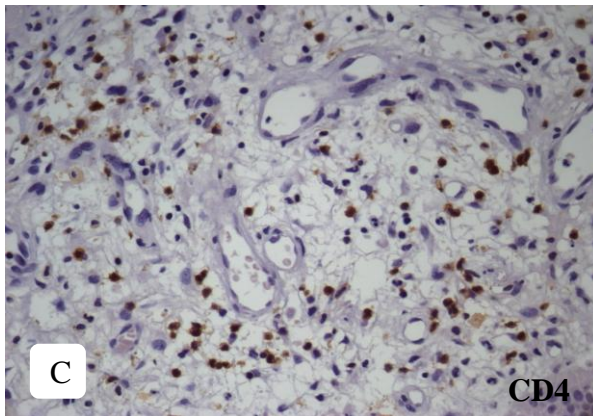
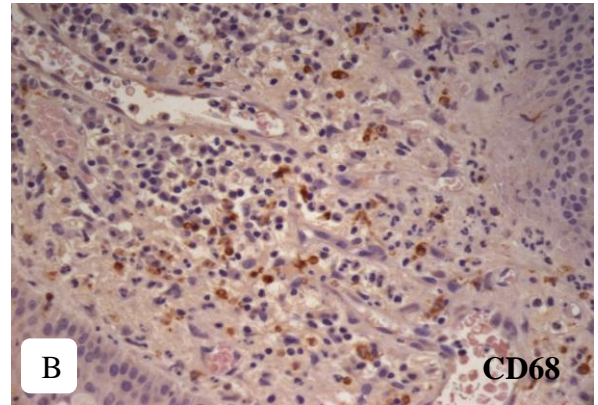
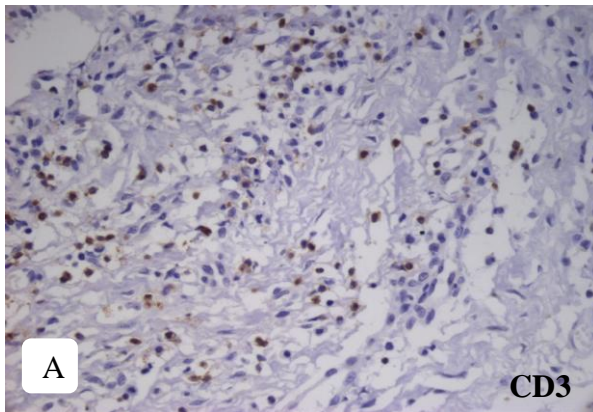
\* 0: Negativo; +1: Discreto; +2: Moderado; +3: Intenso

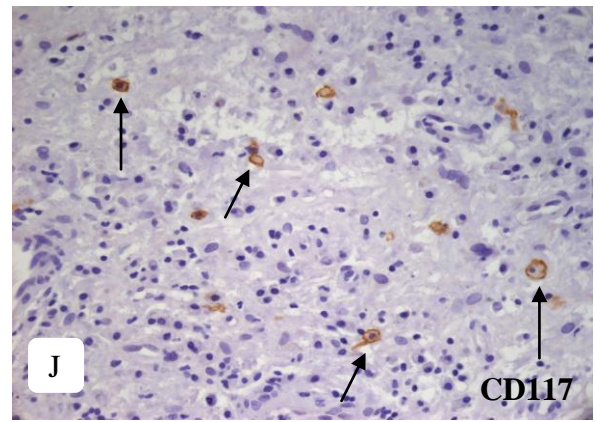
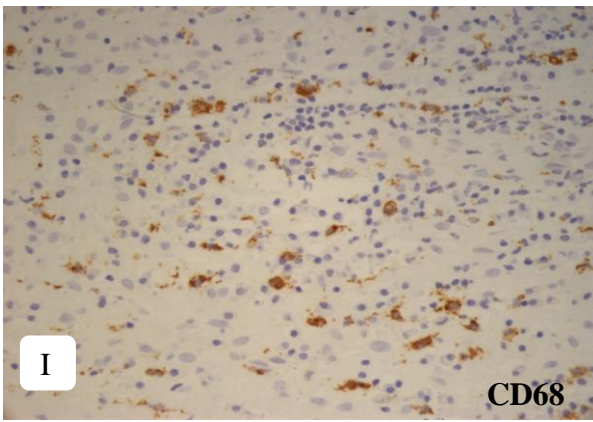
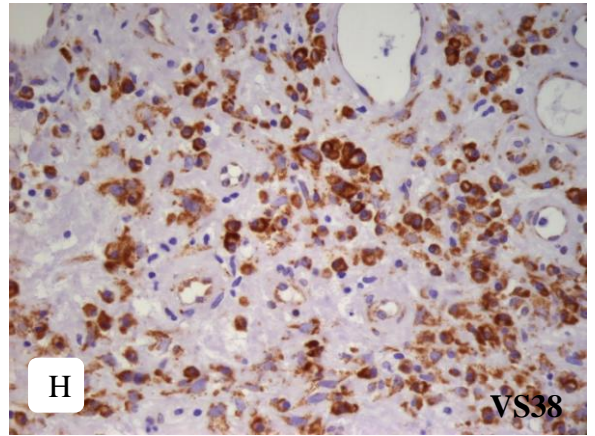
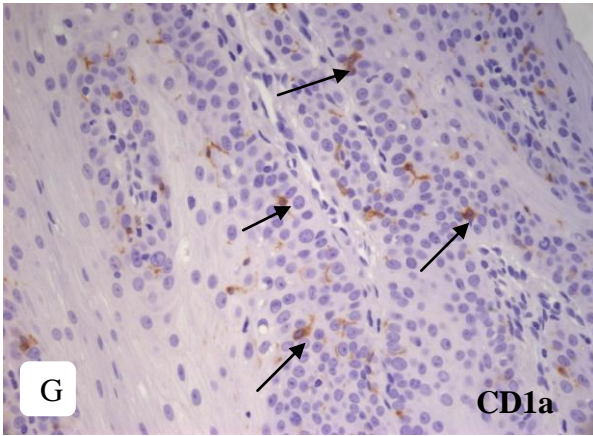


\* 0: Negativo; +1: Discreto; +2: Moderado; +3: Intenso



**Figura 10 – Reação de imuno-histoquímica usando o kit do Sistema EnVision™ para CD3, CD68,CD4,CD8,CD15,CD20,CD1a,VS38 ,DC117 no infiltrado inflamatório de lesões de laringe, cavidade nasal e oral infectadas por HPV com marcação castanha nas células inflamatórias. A) Marcação de CD3 em PLR em grau intenso (400X) B) Marcação de CD68 em papiloma nasal em grau intenso (400X) C) Marcação de CD4 em papiloma nasal em grau moderado (400X) D) Marcação de CD8 em papiloma nasal em grau intenso (400X) E) Marcação de CD15 em PLR em grau intenso (400X) F) Marcação de CD20 em papiloma nasal em grau intenso (400X) G) Marcação de CD1a em papiloma oral em grau intenso (400X) H) Marcação de VS38 em papiloma nasal em grau intenso (400X) I) Marcação de CD68 em papiloma nasal em grau intenso (400X) J) Marcação de CD117 em papiloma nasal em grau intenso (400X).**





## 6.5 Análises dos Genótipos do HPV

Sabendo-se da importância da utilização de métodos de alta sensibilidade e acuracidade, para a genotipagem para HPV em amostras histológicas, optou-se pelo Kit INNO-LiPA Genotyping Extra (Innogenetic, Ghent, Belgium) direcionado para amplificação de 65pb da região L1 do genoma do HPV que permite indentificação de 28 tipos de alto e baixo risco utilizando *primers* SPF10 biotinilados.

Dos 125 casos analisados pela técnica INNO-LiPA, o HPV foi detectado em 106 pacientes (84,8%), 9 (7,2%) amostras foram consideradas invalidas devido à ausência da amplificação do gene da  $\beta$ -globina humana e em 10 (8,8%) o HPV não foi detectado devido a falta de material. Dos pacientes positivos para HPV, 17 (16,0%) foram da cavidade nasal, 29 (27,4%) da oral e 60 (56,6%) da laríngea (Tabela 9).

**Tabela 9 – Associação entre localização da lesão e presença de HPV nos pacientes do HSI de Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (N=125)**

HPV	Localização da lesão							
	Nasal		Oral		Laringe		Total	
	n=23	%	n=34	%	n=68	%	n	%
Positivo	17	73,9	29	85,3	60	88,2	106	84,8
Negativo	4	17,4	3	8,8	3	4,4	10	8,8
Inadequado	2	8,7	2	5,9	5	7,4	9	7,2

Nos pacientes positivos para HPV, o HPV 16 foi o mais prevalente, sendo encontrado em 50,0% dos casos, seguido pelo 11 (43,4%), 52 (36,8%), 6 (34,9%) e 58 (30,2%), expostos na Tabela 10.



**Tabela 10 – Tipos de HPV presentes nos pacientes HPV positivos do HSI de Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=106)**

HPV	Sim	
	n	%
6	37	34,9
11	46	43,4
16	53	50,0
39	2	1,9
44	1	0,9
51	7	6,6
52	39	36,8
53	4	3,8
54	1	0,9
58	32	30,2
66	8	7,5
73	2	1,9
74	12	11,3

Apresentaram infecção múltipla 63 (50,4%) pacientes e 43 (34,4%) apresentaram infecção única, 19 (15,2%) foram consideradas inadequadas. A Tabela 11 mostra os tipos de HPV encontrados nos pacientes infectados por grau de risco e tipo de infecção. Os genótipos de HPV de alto risco mais prevalentes foram o 16 (42,4%), o 52 (31,2%) e o 58 (25,6%). Os considerados de baixo risco mais encontrados foram o 6 (29,6%) e o 11 (36,8%). O HPV 74, de risco indeterminado, foi observado em 9,6% desses pacientes. Considerando o tipo de infecção, os genótipos de HPV 16, 58, 66 (alto risco), 6, 11 (baixo risco) e 71 (risco indeterminado) foram os únicos que foram observados nos pacientes que apresentaram infecção única.

**Tabela 11 – Genótipos de HPV e tipo de infecção em pacientes do HSI de Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (N=125)**

Genótipos de HPV	Prevalência total		Infecção única		Infecção múltipla	
	n	%	n	%	n	%
<u>Alto risco</u>						
16	53	42,8	4	7,5	49	92,5
39	2	1,6	-	-	2	100,0
51	7	5,6	-	-	7	100,0
52	39	31,2	-	-	39	100,0
53	4	3,2	-	-	4	100,0
58	32	25,6	2	6,2	30	93,8
66	8	6,4	1	12,5	7	87,5
73	2	1,6	-	-	2	100,0
<u>Baixo risco</u>						
6	37	29,6	19	51,3	18	48,7
11	46	36,8	17	37,0	29	63,0
44	1	0,8	-	-	1	100,0
54	1	0,8	-	-	1	100,0
<u>Risco indeterminado</u>						
71	1	0,8	1	100,0	-	-
74	12	9,6	-	-	12	100,0

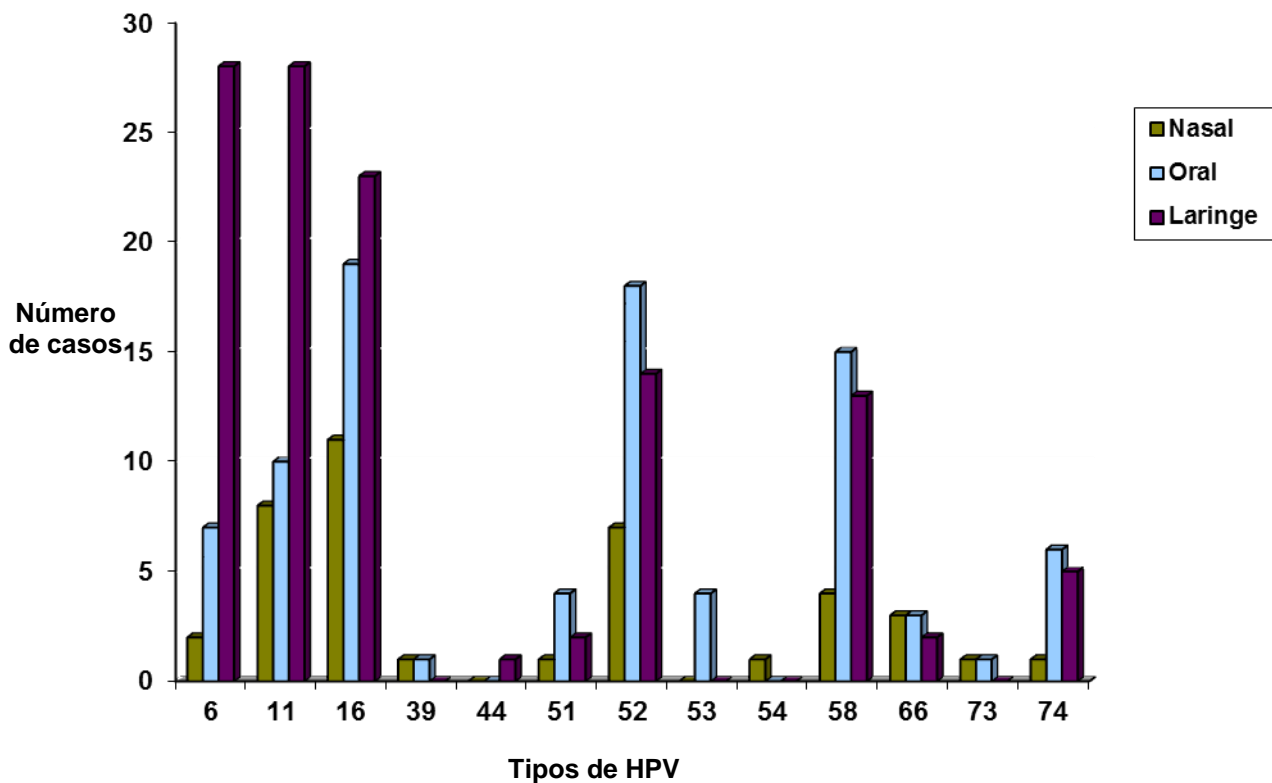
Os tipos virais 39, 53, 73, 44 e 54 foram achados apenas em pacientes maiores de 18 anos de idade, como mostra a Tabela 12.

**Tabela 12 – Genótipos de HPV segundo idade em pacientes do HSI de Salvador, Bahia. 2004 a 2012.**

Genótipos de HPV	Prevalência total		Idade			
			≤18a		>18a	
	n	%	n	%	n	%
<u>Alto risco</u>						
16	53	42,8	10	18,9	43	81,1
39	2	1,6	-	-	2	100,0
51	7	5,6	1	14,3	6	85,7
52	39	31,2	7	17,9	32	82,1
53	4	3,2	-	-	4	100,0
58	32	25,6	8	25,0	24	75,0
66	8	6,4	1	12,5	7	87,5
73	2	1,6	-	-	2	100,0
<u>Baixo risco</u>						
6	37	29,6	13	35,1	24	64,9
11	46	36,8	14	30,4	32	69,6
44	1	0,8	-	-	1	100,0
54	1	0,8	-	-	1	100,0
<u>Risco indeterminado</u>						
74	12	9,6	3	25,0	9	75,0

Na Figura 11 pode ser observada a composição dos genótipos do HPV por local de lesão, determinada pelo método INNO-LiPA, onde os tipos 6, 11 e 16 foram mais encontrados na lesão de laringe. Os tipos 52 e 58, na cavidade oral. Na cavidade nasal foram 11,16 e 52.

**Figura 11 – Distribuição dos tipos de HPV por local da lesão.**



O HPV 6 esteve presente em 8,7% dos casos de lesão nasal, em 20,6% de lesão oral e em 41,2% de lesão laríngea. O HPV 11 apareceu em 34,8% dos casos de lesão nasal, 29,4% de lesão oral e predominou com 41,2% dos casos de lesão na laringe. Já o HPV 16 foi observado em 47,8% das lesões nasais, 55,9% das orais e 33,8% da laringe. O HPV 52 esteve presente em 30,4% dos pacientes de lesão nasal, 52,9% de lesão oral e 20,6% de lesão laríngea. Quanto ao HPV 58, 17,4% dos pacientes de lesão nasal, 44,1% de oral e 19,1% de laríngea (Tabela 13).

Em relação aos tipos de HPV oncogênicos, pôde ser observado que o HPV 16 prevaleceu na laringe com 33,8% dos casos; os HPVs 39 e 73 apareceram na mesma proporção nas cavidades nasal e oral (4,3 e 2,9 cada); os tipos 51, 52, 53 e 58 prevaleceram na cavidade oral com 11,8%; 52,9%; 11,8% e 44,1%, respectivamente. Já o HPV 66 apareceu na proporção de 13,0 e 8,8% nas cavidades oral e nasal. Menos freqüentemente, outros tipos de HPV (44 e 74) também foram observados e mostrados na Tabela 13. Foram observadas associações estatisticamente significantes com os tipos de HPV 6, 52, 53 e 58 e os locais das lesões (laringe, cavidade nasal e oral)  $p < 0,005$ .

**Tabela 13 – Associação entre a localização da lesão e o tipo de HPV nos pacientes HPV positivos do HSI de Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=106)**

HPV	Localização da lesão						p
	Nasal		Oral		Laringe		
	n=23	%	n=34	%	n=68	%	
<u>HPV 6</u>							<b>0,004**</b>
Sim	2	8,7	7	20,6	28	41,2	
Não	21	91,3	27	79,4	40	58,8	
<u>HPV 11</u>							0,523**
Sim	8	34,8	10	29,4	28	41,2	
Não	15	65,2	24	70,6	40	58,8	
<u>HPV 16</u>							0,097**
Sim	11	47,8	19	55,9	23	33,8	
Não	12	52,2	15	44,1	45	66,2	
<u>HPV 39</u>							0,206*
Sim	1	4,3	1	2,9	0	0,0	
Não	22	95,7	33	97,1	68	100,0	
<u>HPV 44</u>							1,000*
Sim	0	0,0	0	0,0	1	1,5	
Não	23	100,0	34	100,0	67	98,5	
<u>HPV 51</u>							0,176*
Sim	1	4,3	4	11,8	2	2,9	
Não	22	95,7	30	88,2	66	97,1	
<u>HPV 52</u>							<b>0,004**</b>
Sim	7	30,4	18	52,9	14	20,6	
Não	16	69,6	16	47,1	54	79,4	
<u>HPV 53</u>							<b>0,006*</b>
Sim	0	0,0	4	11,8	0	0,0	
Não	23	100,0	30	88,2	68	100,0	
<u>HPV 54</u>							0,184*
Sim	1	4,3	0	0,0	0	0,0	
Não	22	95,7	34	100,0	68	100,0	
<u>HPV 58</u>							<b>0,013**</b>
Sim	4	17,4	15	44,1	13	19,1	
Não	19	82,6	19	55,9	55	80,9	
<u>HPV 66</u>							0,137*
Sim	3	13,0	3	8,8	2	2,9	
Não	20	87,0	31	91,2	66	97,1	
<u>HPV 73</u>							0,206*
Sim	1	4,3	1	2,9	0	0,0	
Não	22	95,7	33	97,1	68	100,0	
<u>HPV 74</u>							0,208*
Sim	1	4,3	6	17,6	5	7,4	
Não	22	95,7	28	82,4	63	92,6	

\*Teste exato de Fisher; \*\*Teste  $\chi^2$

Analisou-se associação entre as varias células da resposta imune e Ki-67 em relação à presença de infecção pelo HPV e não foi observada associação estatisticamente significativa.

(Tabela 14). Quando feita a relação entre a quantidade de células de Langerhans marcadas pelo anticorpo CD1a e a infecção pelo HPV investigada pela análise de PCR foi verificada que elas se mostraram negativas em 75,0% dos pacientes positivos para HPV e presentes em apenas 25,0% destes. Por local de lesão, o CD1a foi positivo para células de Langerhans em 4 (11,1%) dos pacientes com PLR, 3 (8,3%) daqueles com lesão oral e 2 (5,6%) dos com lesão nasal. Foi verificada a expressão de linfócitos T CD4 e CD8 dos pacientes com infiltrado do tipo moderado e intenso nos pacientes HPV positivos. O CD4 foi negativo em 89% nos três tipos de lesões. A expressão de CD8 foi discreta em 44,4% dessas lesões (Tabela 14).

**Tabela 14 – Associação entre contagem de células de Langerhans, linfócitos TCD4, CD3, CD8, CD15, CD20, CD68, CD 117, VS 38, Ki67 e pacientes com HPV positivo do HSI, Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=36) (continua)**

Marcadores	Local								p*
	Nasal		Oral		Laringe		Total		
	n	%	N	%	n	%	n	%	
<b><u>CD1a</u></b>									0,526
Negativo	9	81,8	4	57,1	14	77,8	27	75,0	
Discreto	1	9,1	2	28,6	3	16,7	6	16,7	
Moderado	1	9,1	0	0,0	0	0,0	1	2,8	
Intenso	0	0,0	1	14,3	1	5,6	2	5,6	
<b><u>CD3</u></b>									0,051
Negativo	3	27,3	1	14,3	6	33,3	10	27,8	
Discreto	1	9,1	5	71,4	2	11,1	8	22,2	
Moderado	7	63,6	1	14,3	9	50,0	17	47,2	
Intenso	0	0,0	0	0,0	1	5,6	1	2,8	
<b><u>CD4</u></b>									0,905
Negativo	10	90,9	7	100,0	15	83,3	32	88,9	
Discreto	0	0,0	0	0,0	2	11,1	2	5,6	
Moderado	1	9,1	0	0,0	1	5,6	2	5,6	
Intenso	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
<b><u>CD8</u></b>									0,561
Negativo	1	9,1	0	0,0	5	27,8	6	16,7	
Discreto	4	36,4	4	57,1	8	44,4	16	44,4	
Moderado	5	45,5	3	42,9	4	22,2	12	33,3	
Intenso	1	9,1	0	0,0	1	5,6	2	5,6	

**Tabela 14 – Associação entre contagem de células de Langerhans, linfócitos TCD4, CD8, CD3, CD15, CD20, CD68, CD 117, VS 38, Ki67 e pacientes com HPV positivo do HSI, Salvador, BA. 2004 a 2012. (n=36) (conclusão)**

Marcadores	Local								p*
	Nasal		Oral		Laringe		Total		
	n	%	N	%	n	%	n	%	
<b><u>CD15</u></b>									0,884
Negativo	3	27,3	3	42,9	6	33,3	12	33,3	
Discreto	4	36,4	2	28,6	5	27,8	11	30,6	
Moderado	2	16,2	1	14,3	6	33,3	9	25,0	
Intenso	2	18,2	1	14,3	1	5,6	4	11,1	
<b><u>CD20</u></b>									0,809
Negativo	4	36,4	4	57,1	10	55,6	18	50,0	
Discreto	4	36,4	2	28,6	4	22,2	10	27,8	
Moderado	2	18,2	1	14,3	4	22,2	7	19,4	
Intenso	1	9,1	0	0,0	0	0,0	1	2,8	
<b><u>CD68</u></b>									0,095
Negativo	2	18,2	2	28,6	11	61,1	15	41,7	
Discreto	3	27,3	2	28,6	4	22,2	9	25,0	
Moderado	3	27,3	3	42,9	3	16,7	9	25,0	
Intenso	3	27,3	0	0,0	0	0,0	3	8,3	
<b><u>CD117</u></b>									0,103
Negativo	2	18,2	2	28,6	11	61,1	15	41,7	
Discreto	2	18,2	3	42,9	4	22,2	9	25,0	
Moderado	6	54,5	2	28,6	3	16,7	11	30,6	
Intenso	1	9,1	0	0,0	0	0,0	1	2,8	
<b><u>VS38</u></b>									0,224
Negativo	1	9,1	3	42,9	5	27,8	9	25,0	
Discreto	2	18,2	1	14,3	7	38,9	10	27,8	
Moderado	6	54,5	1	14,3	5	27,8	12	33,3	
Intenso	2	18,2	2	28,6	1	5,6	5	13,9	
<b><u>Ki67</u></b>									**
Negativo	11	100,0	7	100,0	18	100,0	36	100,0	

\*Teste exato de Fisher; \*\* Todos os casos foram negativos;

A Tabela 15 mostra os tipos de HPV nos pacientes que apresentaram processos inflamatórios em graduado como moderado ou intenso fosse ele mononuclear ou polimorfonuclear. A frequência de HPV nestes pacientes foi de 77,8% (28).

**Tabela 15 – Tipos de HPV presentes nos pacientes com processo inflamatório grau moderado ou intenso do HSI, Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=36)**

Pacientes	local da lesão inicial		
	Laringe	Nasal	Oral
1	-	-	NEGATIVO
2	-	NEGATIVO	-
3	-	11, 39, 73	-
4	16	-	-
5	-	-	NEGATIVO
6	11, 16	-	-
7	-	NEGATIVO	-
8	-	-	16, 58
9	6	-	-
10	-	11, 16, 52, 58	-
11	6	-	-
12	6, 16, 52	-	-
13	-	16, 52	-
14	-	-	11, 16, 52, 58
15	6, 52, 74	-	-
16	-	16, 52, 58	-
17	-	11, 16, 52	-
18	-	-	16, 52, 58
19	-	16, 52	-
20	-	INADEQUADO	-
21	11	-	-
22	-	-	16
23	11, 16	-	-
24	16	-	-
25	-	INADEQUADO	-
26	-	16,52	-
27	6	-	-
28	11	-	-
29	6, 11	-	-
30	-	NEGATIVO	-
31	11	-	-
32	6	-	-
33	6	-	-
34	6	-	-
35	-	NEGATIVO	-
36	11	-	-
	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>06</b>



A tabela 16 mostra os tipos de HPV encontrados nos pacientes HPV positivos que apresentaram recorrência. Os dois pacientes com HPV na cavidade nasal, e que fizeram recorrência em sítios diferentes (laringe e oral), tiveram HPV tipos 16 e 11 respectivamente.

**Tabela 16 – Tipos de HPV presentes nos pacientes com recorrência do HSI, Salvador, Bahia. 2004 a 2012. (n=19)**

Pacientes	local da lesão inicial		local da recidiva	
	Laringe	Nasal	Oral	Laringe
1	6	-	-	NEGATIVO
2	11	-	-	11
3	6	-	-	6
4	6	-	-	6
5	6, 16, 52, 58, 66	-	-	6
6	-	11, 16, 52	-	16
7	11	-	-	11
8	11	-	-	11
9	6	-	-	6
10	11	-	-	6
11	11	-	-	11
12	16, 52	-	-	NEGATIVO
13	6	-	-	6, 51
14	11, 16	-	-	16
15	11	-	-	11
16	11, 16, 52, 58	-	-	11
17	6, 11, 51, 74	-	-	6, 11, 16, 52
18	-	11, 16, 74	11	-
19	INADEQUADO	-	-	INADEQUADO

A leitura de marcadores para CD1a, CD3, CD4, CD8, CD15, CD20, CD68, CD117 e VS38 foi feita em 3 pacientes com HPV em lesões de laringe que apresentaram recorrência. A Tabela 17 mostra como esses marcadores se comportaram.

**Tabela 17 – Frequência dos marcadores CD1a, CD3, CD4, CD8, CD15, CD20, CD68, CD117, VS38 e Ki-67 e pacientes HPV positivo da laringe com recorrência do HSI, Salvador, Bahia. 2004 a 2012.**

Marcadores	Grau do infiltrado		
	P1	P2	P3
CD1a	Negativo	Negativo	Negativo
CD3	Discreto	Discreto	Negativo
CD4	Negativo	Negativo	Negativo
CD8	Discreto	Discreto	Discreto
CD15	Discreto	Moderado	Moderado
CD20	Moderado	Negativo	Negativo
CD68	Negativo	Negativo	Negativo
CD117	Negativo	Moderado	Discreto
VS38	Negativo	Discreto	Discreto
Ki67	Negativo	Negativo	Negativo

\*P=paciente

## 7 DISCUSSÃO

Os HPVs são reconhecidos como agentes causais de grande variedade de lesões epiteliais proliferativas benignas e malignas, assim como, pelo seu envolvimento na etiologia dos cânceres de colo de útero, anogenitais e de cabeça e pescoço (ZUR HAUSEN, 1996). A prevalência da infecção pelo HPV, no Brasil, em mulheres com citologia vaginal normal, é de 14,1% (WHO-ICO,2010; FEDRIZZI, 2011), com maiores frequências entre as mulheres mais jovens, logo após o início da vida sexual, evidências de persistência da infecção viral e de co-infecção por tipos virais de alto risco (BARNES, 2005; TROTTIER, 2010; RAMA, 2008). Segundo a OMS, mais de 630 milhões de homens e mulheres estão infectados pelo HPV no mundo (FEDRIZZI, 2011).

No presente estudo, na cavidade nasal, toda a amostra foi composta por papilomas Schneiderianos do tipo exofítico, os quais apresentam frequência descrita na literatura de apenas 32,0%, com variação de 6 a 50% (BARNES 2002). Essas lesões são duas a dez vezes mais comuns em homens e ocorrem primariamente em indivíduos com idade entre 20 e 50 anos (BARNES, 2005; BARNES, 2002). Tais dados epidemiológicos foram também ratificados nesse estudo, considerando a maior prevalência do sexo masculino e a idade média de 40,3 anos.

As recorrências locais dos papilomas nasais exofíticos foram observadas neste estudo somente em dois pacientes (10,5%) e segundo dados da literatura ocorrem em 22 a 50% dos casos, sendo mais associadas à excisão cirúrgica inadequada do que à multiplicidade das lesões (SYRJANEN, 2003; BARNES, 2005). O quadro clínico abrange, comumente, hemorragia nasal, obstrução nasal unilateral ou a presença de uma massa assintomática (SYRJANEN, 2003; BARNES, 2005).

Na cavidade oral, foi observada uma maior prevalência do sexo feminino (58,9%), sendo que na literatura não há consenso quanto ao sexo mais acometido pelos papilomas orais, com alguns autores relatando uma maior frequência entre as mulheres (SOARES et al., 2005; CARNEIRO et al., 2009; MARTINS FILHO et al., 2009), entre os homens (BAO et al., 2012; TINOCO et al., 2004) ou sem diferença entre eles (FERRARO et al., 2011). A quarta década de vida foi a mais acometida no estudo atual, em concordância com dados anteriores, que indicam como faixas etárias mais frequentes a terceira, quarta e quinta décadas de vida (BARNES 2002; MARTINS FILHO et al., 2009; BAO et al., 2012). Recorrências são raramente relatadas na literatura, aspecto corroborado pelo presente trabalho, no qual os

pacientes não apresentaram recidivas das lesões (GONZÁLEZ-MOLES et al.,1994; CARNEIRO et al.,2009;).

A PLR pode ser observada desde o período pós-natal imediata até os 84 anos de idade segundo Larson e Derkay (2010), o que corrobora com a variação de idade dos pacientes desse estudo. Entre eles, o sexo masculino foi o mais freqüente e a idade durante os episódios clínicos acometeu, principalmente, a terceira década de vida. Na papilomatose juvenil não há diferenças entre os sexos e o pico de incidência é entre dois e quatros anos, enquanto, a de início na idade adulta, ocorre uma predileção pelo sexo masculino e maior incidência entre 20 e 40 anos (LARSON et al., 2010; XIMENES et al., 2003; BAIDOO et al., 2012; LONG et al., 2003).

Durante o período do estudo, foi observada uma primeira recorrência em 19 pacientes (15,2%), uma segunda recorrência em 5 (26,3%), uma terceira recorrência em 2 (10,5%) e uma quarta recorrência em 1 (5,3%) paciente com PLR, percentuais inferiores quando comparados aos da literatura, os quais demonstram variação de 40 a 60% (XIMENES et al., 2003; BAIDOO et al., 2012). É bem estabelecido que os pacientes diagnosticados em idades mais precoces, que necessitaram da realização de traqueostomia e que apresentaram disseminação das lesões ao longo da árvore traqueobrônquica, cursam com mais recorrências, e, portanto, necessidade de múltiplos procedimentos cirúrgicos (DERKAY 1995; BUCHINSKY et al., 2008; DERKAY et al., 2001). Na presente pesquisa, tais fatores puderam ser observados, em alguns pacientes. Em relação ao quadro clínico, a rouquidão e a obstrução nasal foi o sinal/sintoma mais referido pelos pacientes, seguido pela disfonia, dispnéia e pela tosse o que é condizente com a literatura (XIMENES et al., 2003; LONG et al., 2003) e evidencia um quadro clínico de menor gravidade.

No presente estudo houve maior prevalência de recorrência em jovens com <18 anos de idade em 63,2% (12) e nos adultos foi de 36,8% (7).

As lesões associadas ao HPV evidenciam aspectos morfológicos sugestivos da infecção pelo vírus, que foram incluídos na análise histopatológica das amostras em estudo. A coilocitose, descrita por Koss et al., em 1956, é caracterizada pela presença de células exibindo núcleos hipercromáticos e irregulares contornados por extensos vacúolos citoplasmáticos claros (“núcleo em ameixa”) com volume geralmente superior ao citoplasmático (KOSS et al., 1956; SYRJANEN et al., 1983). Em 1976, Meisels et al. correlacionaram a coilocitose com a presença do HPV, o que foi adotado em seguida como

sinal muito sugestivo da infecção pelo vírus. Determinou-se que a coilocitose, assim como a disqueratose, queratinização prematura e anormal das células abaixo do estrato granuloso, constituem manifestações celulares clássicas da infecção pelo HPV (MEISELS et al., 1976; ROBBINS, 2010).

A papilomatose, definida como projeções epiteliais acantóticas revestindo eixos conjuntivos vascularizados que se estendem acima da mucosa de superfície (SYRJANEN et al., 1983), é um achado histopatológico comum em lesões do epitélio de revestimento oral, onde o HPV é detectado (SOARES et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2003). Outros aspectos histológicos usualmente observados nessas lesões são a hiperqueratose, espessamento do estrato córneo muitas vezes associado à anormalidade qualitativa da queratina (ROBBINS 2010), e a acantose, hiperplasia das células espinhosa do epitélio de revestimento OLIVEIRA et al., 2003).

No presente estudo, os papilomas exofíticos da cavidade nasal, a coilocitose foi observada em importante proporção do total de 12 casos (52,2%). Quando comparamos esse percentual de coilocitose com a positividade para HPV pelo método de PCR, essa última foi 47,8% (11), confirmando com a pesquisa de Lawson et al., (2008) em revisão de quinze estudos, relatam que o HPV, nos papilomas exofíticos, apresentam variação dos níveis de detecção, por métodos de hibridização *in situ* e PCR, de 0 a 100%, com prevalência ponderada de 65,3%. A presença de queratinização superficial nessas lesões, usualmente, é escassa ou ausente (BARNES, 2002), característica confirmada no estudo pelas baixas frequências de hiperqueratose e parakeratose. As lesões, nas quais esses aspectos estiveram presentes podem estar associadas com a irritação local provocada pelo próprio paciente (BARNES, 2002), ou a localização próxima ao vestíbulo nasal (SYRJANEN, 2003).

Na presente análise os papilomas nasais exofíticos apresentaram lâmina própria com poucas células inflamatórias, com exceção quando estão infectados ou irritados mecanicamente (BARNES, 2002). Um infiltrado inflamatório do tipo misto, com células polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos), foi observado na maior parte das lesões. A presença de displasia epitelial foi considerável, 13,0%, condizente com a frequência relatada por Syrjänen (2003), aproximadamente, 10 a 15%.

A caracterização histopatológica dos papilomas na cavidade oral, com papilomatose, acantose e parakeratose frequentes, corrobora com àquela descrita na literatura (SYRJANEN,

2003; OLIVEIRA et al., 2003; SOARES et al., 2005; TANCREDI 2007; CARNEIRO et al., 2009; BAO et al., 2012). A coilocitose presente em um percentual significativo das lesões representa o efeito citopático mais comum do HPV nas lesões benignas e malignas da mucosa oral, o que foi observado em 14 (41,2%) dos pacientes com papiloma na cavidade oral analisadas. Para esse aspecto histopatológico, outros autores, entretanto, relatam a evidência de coilocitose em 100% das lesões (CARNEIRO et al., 2009; MARTINS FILHO et al., 2009). Nos nossos casos de papiloma oral de acordo com a PCR, a positividade para HPV foi de 32,3% (11) em 17 casos positivos.

Nas lesões da cavidade oral estudada não foram observadas displasias. A presença de células atípicas e mitoses são incomuns nos papilomas orais (CARNEIRO et al., 2009), em concordância com a detecção de tipos de HPV de baixo risco oncogênico (HPV 6 e 11) (CASTRO et al., 2006). O risco de transformação maligna dos papilomas orais foi avaliado por Z. Bao et al., (2012), que encontraram como fatores predisponentes a idade acima de 60 anos e a localização das lesões na gengiva, parâmetros não avaliados no presente estudo. Destaca-se que o carcinoma oral de células escamosas tem sido associado ao HPV, particularmente, os tipos virais de alto risco oncogênico, determinando uma apresentação clínica e prognóstico diferente daqueles cujos principais fatores de risco são o fumo e o álcool (LAJER et al., 2010; XAVIER et al., 2005). O presente trabalho foi constituído de casos onde a positividade ou negatividade para o HPV foi confirmada através de PCR. Dos casos que compuseram a amostra desse estudo (125), 29 (85,3%) destes eram HPV positivos em papiloma oral. É válido salientar que o HPV 16 prevaleceu nos casos positivos (55,9%), percentual menor aos encontrados por Bouda et al. (2000), Gillison et al. (2000) e Ibieta et al. (2005) que detectaram o HPV 16 em 71%, 90%, 35% e 66% dos casos respectivamente, sendo este o tipo de HPV mais prevalente encontrado pelos referidos autores. Os tipos de HPV de alto risco são agora reconhecidos como um potencial fator de risco carcinogênico oral (HA; CALIFANO, 2004), já que vários estudos evidenciaram o HPV 16 como o tipo mais prevalente no câncer oral, assim como no câncer anogenital (CHANG et al., 1991; SYRJANEN, 1999; IARC, 1995).

Herrero, et al. (2003) estudaram a prevalência do HPV no câncer oral e observaram uma frequência maior de HPV 16 na cavidade oral e na orofaringe entre os pacientes com mais de um parceiro sexual ou entre aqueles que praticavam sexo oral, enquanto a menor frequência foi entre os pacientes tabagistas.

No estudo de Lawton et al. (1992) onde foi avaliada a prevalência de seis genótipos de HPV genital na mucosa oral clinicamente normal de uma população adulta branca, mais de 60% dos voluntários apresentaram alguma forma de HPV, sendo que 43% dos casos se relacionaram com os tipos 16 e 18, embora a taxa de detecção variasse de acordo com a técnica utilizada para a coleta (se por esfregaço, biópsia ou por lavado de cavidade oral. Uma prevalência semelhante (43%) para o HPV 16 foi observada no estudo feito por Jalal et al. (1992), que investigou esfregaços bucais de 48 indivíduos saudáveis.

A apresentação de papilomas exofíticos não concomitantes e em sítios diferentes, como em cavidade nasal e oral em um paciente; e cavidade nasal e laringe observada em outro paciente do estudo não apresentam relatos semelhantes na literatura pesquisada. No primeiro paciente os tipos de HPV presentes foram 11, 16 e 74 na lesão nasal e na oral HPV tipo 11; no segundo paciente foram os HPV 11, 16 e 52 na lesão nasal e na laringe HPV 16. Piva et al., (2011) relataram uma apresentação incomum do papiloma invertido, em homem de 61 anos com acometimento das cavidades oral e nasal e comprovação da infecção pelo HPV, entretanto, relatos semelhantes quanto ao papilomas do tipo exofítico não foram encontrados. Sugere-se, também, que uma solução de continuidade entre as mucosas orais e nasais, a presença de infecção latente pelos HPVs e uma condição imunossupressora seriam possíveis fatores predisponentes para um quadro clínico como o dos pacientes, com múltiplos papilomas em diferentes localizações.

Lesões proliferativas exofíticas revestidas por epitélio hiperplásico com acantose, papilomatose e paraceratose, também, foram observadas na laringe, em concordância com dados anteriores (GNEPP, 2009; MARTINS FILHO et al., 2009). Nessa localização anatômica, as lesões evidenciaram maiores frequências de coilocitose e disqueratose, em comparação com as da cavidade nasal e oral. Nos papilomas, diversas técnicas de identificação do DNA viral também têm sido aplicadas e os resultados variam entre 12,5% e 85% de positividade (CHANG et al., 1991; SYRJANEN, 1999).

No presente estudo, com relação à PLR, foi encontrado um percentual geral de 88,2% positivos para HPV, e os tipos de HPV 6 (41,2%) e 11 (41,2%) foram os mais prevalentes, corroborando com os resultados relatados por outros autores (RABAH et al., 2001; PEÑALOZA-PLASCENCA et al. 2000; VELYVYTE et al., 2002) que descrevem prevalências encontradas em pacientes com PLR na ordem de 32,0 a 88,9% para o tipo 6 e de 19,4 a 38,0% para o tipo 11.

A atual pesquisa mostra que o HPV 16 foi o tipo viral oncogênico mais freqüente encontrado nas lesões de PLR (33,8%) seguido pelo o tipo HPV 52 (20,6%) e 58 (19,1%). Vélyvytė et al. (2002) detectou prevalência de HPV de alto risco de 52,7% no trato respiratório, onde o tipo HPV 16 foi predominante com 50,0%. Outros estudos têm relatado de 26,0% até 51,7% de prevalência de HPV 16 no sistema respiratório superior (KAYE et al.1994; MUND et al., 1997; RICE et al., 2000). Já Peñaloza-Plascenca et al. (2000) encontraram prevalência superior às relatadas anteriormente de 83,0% para o HPV 16. No material analisado, dentre os casos HPV positivos encontrados, os tipos 52 e 58, surpreendem pela elevada freqüência na PLR. Não foram encontrados relatos semelhantes na literatura, de modo que essa informação deve ser interpretada com cautela. De forma geral, estes achados têm mostrado grande variabilidade dos tipos de HPVs nessa localização, o que em parte pode ser devido ao fato de que quando se utilizam métodos de genotipagem distintos podem-se produzir resultados diferentes, de acordo com a sensibilidade e a especificidade dos métodos empregados (CAPRA et al., 2008; LEVI et al., 2004).

Nessa localização anatômica (laringe), as lesões evidenciaram maior freqüência de coilocitose (73,5%), em comparação com as da cavidade nasal (52,2%) e oral (41,2%). Quando comparado a coilocitose com HPV positivo, este aspecto morfológico continuou prevalecendo com 56,6% na laringe, seguido pela oral com 27,4% e nasal 16,0%. Esses achados sugerem uma maior associação do HPV com as lesões de PLR, descrita por diferentes autores em 100% dos casos, com identificação, principalmente, dos tipos virais 6 e 11 (MAJOR et al., 2005; DONNE et al., 2010).

Nos casos de infecção por múltiplos tipos virais, observou-se, neste estudo, a predominância dos tipos virais de alto risco, enquanto nas infecções únicas houve predominância dos de baixo risco, achados esses não comparados por falta de dados na literatura consultada. As infecções múltiplas são um fenômeno comum em pacientes infectados pelo HIV, o que pode ser explicado pela maior exposição deles as relações sexuais desprotegidas e a falha no sistema imunológico, de forma a permitir a replicação de mais tipos de HPV (PALEFSKY et al., 1995). Neste estudo, o tipo viral mais freqüente na infecção única foi o HPV 6 com 51,3% (19) e na infecção múltipla foi o HPV 16 com 92,5% (49), como observado na Tabela 11.

A ocorrência de displasias nessa afecção apresenta um perfil controverso segundo dados da literatura, associada com a idade durante o diagnóstico da doença. A prevalência da



displasia na população pediátrica é um evento raro, descrito por Sajan et al., (2010) em 5% do total de pacientes. Entre os pacientes com papilomatose de início na vida adulta, segundo Hall et al., (2011), em estudo de série de casos, 50,0% apresentaram displasias definindo-o como um acontecimento comum. No presente estudo, de um modo geral, houve um maior número de pacientes adultos 74,4% (93), mas uma pequena proporção desses pacientes apresentou lesões displásicas em 9,6% (12), estando mais próximo do perfil de ocorrência de displasia da papilomatose juvenil. Desses pacientes com displasia, 9 (75,0%) eram adultos e 3 jovens e apresentaram HPV positivo 9 (75,0%).

As lesões dos pacientes que cursaram com recorrências não revelaram um padrão diferente daquele observado nas lesões de laringe como um todo, quanto aos aspectos morfológicos analisados. Foi notável, que o paciente do estudo que cursou com o maior número de recorrências possuía idade de um ano quando teve a lesão inicial e, apresentou displasia intensa em uma das lesões, evidenciando uma apresentação de maior gravidade da doença. O curso clínico desse paciente é representativo da descrição na literatura de que os indivíduos diagnosticados em idades mais jovens apresentam pior prognóstico (BUCHINSKY et al., 2008). Nesse pacientes nas três primeiras recorrências houve infecção única com HPV 11 e na quarta recorrência o HPV foi do tipo 71. Sugere-se a possibilidade de que a infecção pelo HPV 11 esteja associada com doenças mais graves, ou até mesmo a infecção por múltiplos tipos virais, inclusive, o HPV 16 que é de alto potencial oncogênico (PEÑALOZA-PLASCENCIA et al., 2000; BUCHINSKY et al., 2008; DONNE et al., 2010).

A caracterização imuno-histoquímica do infiltrado inflamatório das lesões em estudo possibilitou a identificação de um amplo espectro de células do sistema imune. A inflamação resultante da infecção e das lesões causadas pelo HPV possui um importante papel no desenvolvimento e na progressão de neoplasias (BOCCARDO et al., 2010). A infecção pelo vírus é altamente localizada em sítios com epitélio estratificado, sem repercussões sistêmicas significativas (SCOTT et al., 2001) e uma resposta imune local efetiva do tipo celular está associada com a regressão de uma proporção significativa das lesões neoplásicas (BOCCARDO et al., 2010).

O sistema imune do hospedeiro desempenha um papel fundamental no resultado clínico de lesões relacionadas ao HPV. Cerca de 70% a 90% dos indivíduos infectados eliminam o vírus entre 12 a 24 meses após a detecção da infecção inicial. A persistência viral nos 10% a 30% restantes está geralmente relacionada ao tipo viral infectante (oncogênico) e

com o quadro imunológico do paciente. Estudos demonstraram que, em pacientes imunossuprimidos, há um aumento da persistência viral e maior progressão de lesões neoplásicas (OZSARAN, 1999; HARWOOD, 2000; HEARD, 2000). Já em alguns indivíduos imunocompetentes, a infecção viral poderia induzir a deficiência ou ausência da resposta imunológica, permitindo assim que o vírus utilize estratégias para evadir-se da imunovigilância do hospedeiro.

A persistência da infecção pelo HPV parece ocorrer em 10 a 30% das pessoas infectadas, principalmente associada à infecção pelos tipos de HPV de alto risco, associada à menor resposta imune e à progressão tumoral em pacientes imunossuprimidos (HARWOOD et al., 2000; HEARD et al., 2000). Por outro lado, em indivíduos normais, a ausência ou deficiência de resposta imunológica poderia ser uma estratégia do HPV para se evadir da imunovigilância do hospedeiro (O'BRIEN; SAVERIA, 2002).

A complexidade da resposta imune aos tumores é muito bem exemplificada nas neoplasias do colo uterino, que geralmente estão associadas ao HPV, existindo evidências de que o vírus cause uma imunodepressão local. A partir dessas observações resolvemos investigar o fenótipo das células inflamatórias nas lesões de PLR e papiloma nasal e oral.

Quanto à presença do infiltrado inflamatório no câncer, sabe-se que existe uma maior frequência de tumores malignos em pacientes transplantados, fato esse que apóia a existência de uma vigilância imunológica aos tumores nos seres humanos e que está comprometida nos pacientes transplantados. Entretanto, não encontramos estudos prévios correlacionando o fenótipo das células inflamatórias com PLR e papiloma nasal e oral, nem em relação à presença do HPV nestas lesões.

A presença de células marcadas pelo anticorpo anti CD3 é indicado para avaliar a presença geral de células T, relacionada a células imunológicas no local do infiltrado inflamatório. Nos papilomas nasais, os linfócitos T CD3 estiveram presentes no infiltrado inflamatório das lesões de forma significativa em 63,6% (7) dos casos, em grau moderado. Nas lesões da laringe, também, foi evidenciada uma mobilização para resposta imune celular T CD3 dependente em 50,0% (9) em grau moderado. Nos papilomas orais o CD3 apresentou 71,4% (5) em grau discreto. O infiltrado de linfócitos nessas lesões pode determinar o prognóstico da infecção (persistência, regressão, progressão).

As moléculas CD4 e CD8 são proteínas das células T que se ligam às regiões não polimórficas das moléculas de MHC e traduzem sinais que, juntamente com sinais liberados pelo complexo TCR, iniciam a ativação das células T. Uma vez que as moléculas CD4 e CD8 atuam simultaneamente com o TCR no reconhecimento do Ag, essas moléculas passam a ser conhecidas como co-receptores, pois passam a ser efetoras. A segregação de resposta da célula T CD4 e do CD8 a esses diferentes grupos de antígenos é derivada das especificidades do CD4 e CD8 para diferentes classes de moléculas do MHC. O CD4 se liga a moléculas de MHC de classe II e é expresso nas células T cujos TCRs reconhecem os complexos de peptídeos e moléculas de MHC de classe II. A maioria das células T CD4 é restrita à classe II, e produz citocinas e, assim, funciona para a defesa contra microrganismos extracelulares. Já a célula T CD8 é restrita à classe I, células citotóxicas (CTLs), que servem para erradicar infecções por microrganismos intracelulares (ABBAS, 2005).

Os linfócitos T CD4 podem ser subdivididos em duas subpopulações celulares de acordo com o perfil de citocinas produzidas. As células T helper 1 (Th1), responsáveis pelo predomínio da imunidade mediada por células, e as T helper 2 (Th2) que determinam o predomínio de imunidade mediada por anticorpos ou imunidade humoral (ROMAGNANI, 1992; SEDER; PAUL, 1994). Nas infecções virais e na resposta anti-tumoral, as células Th1 ativadas estimulam a liberação de IFN- $\gamma$ , que por sua vez, estimula os macrófagos a iniciarem a fagocitose e a liberação de outras citocinas, ativando tanto a replicação das células Th1 e a ação de células T CD8, quanto potencializando a atividade das células NK (GUZMÁN-ROJAS et al., 1998).

A análise por imuno-histoquímica em lesões de PLR, papiloma nasal e oral permitiu avaliar o perfil local da resposta imune-celular tecidual, relacionando-o às alterações celulares detectadas pelo diagnóstico histopatológico. Com relação à presença das células CD4, verificou-se que uma maior proporção foi de linfócitos T CD4 negativo, 89,0% (32) dos casos nas lesões estudadas, não havendo significância estatística ( $p=0,905$ ) (Tabela 14).

Avaliando outros trabalhos que detectaram células CD4, foi observado o predomínio destas células em lesões de baixo grau e associadas às lesões verrucosas (COLEMAN et al., 1994; HONG et al., 1997; MONNIER-BRENOIT et al., 2006). Estudos anteriores, em pacientes com deficiência de linfócitos T CD4, mostraram maior prevalência de HPV associado às lesões pré-invasivas e com maior progressão, demonstrando que a presença

destas células seria importante para o controle da replicação viral e a supressão da transformação maligna (PETRY et al., 1994; PALEFSKY, 1998).

Ao avaliar a presença de células CD8 deve-se considerar que, para estas células estarem presentes já ocorreu o reconhecimento antigênico e ativação pelas células CD4. Este fato permite a produção de citocinas para o recrutamento das células CD8. Neste estudo a presença de células T CD8 apresentou uma maior proporção classificada como discreto em 44,4% (16) e moderado em 33,3% (12), sem significância estatística ( $p=0,561$ ) (Tabela 14).

Nos pacientes recorrentes, o CD4 foi negativo em 100,0% e o CD8 foi positivo, mas em grau discreto em 100,0% dos casos. Os pacientes com PLR apresentam distúrbios na imunidade celular, com uma resposta imune local permissiva à infecção crônica pelos tipos virais 6 e 11 (BONAGURA et al.; 1999). Bonagura et al. (2010) sugerem uma polarização para o perfil de células TCD4 do tipo Th2 inibindo a função protetora da resposta Th1, específica para o HPV. E os mesmos autores ao identificarem células T CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> no microambiente dos papilomas aventaram a possível função citolítica ineficaz dessas células pela ausência da molécula co-estimulatória CD28.

Salienta-se que uma resposta imune protetora para o HPV abrange as atividades efetoras dos linfócitos T CD8 e da sub-população Th1 dos linfócitos T CD4 para a eliminação das células infectadas (STANLEY 2001; SCOTT et al., 2001). Embora a resposta imunológica ao HPV seja ainda pouco compreendida, tem sido postulado que a resposta imune, principalmente, celular (Th1), em oposição à resposta humoral (Th2), seja fundamental para a eliminação do vírus (GONÇALVES; DONADI, 2004).

Em lesões papilomatosas que regrediram, tem sido descrita a presença de infiltrados inflamatórios sugerindo a remoção das células infectadas por células citotóxicas. Similarmente, a resposta imune local parece exercer papel fundamental para o desenvolvimento e progressão do câncer cervical, principalmente em um estágio inicial (VILLA, 1998). Entretanto, os mecanismos exatos, que disparam uma resposta imune eficiente contra lesões relacionadas ao HPV, ainda não são bem compreendidos e podem estar relacionados à ativação do sistema imune ou à composição genética do hospedeiro (PINTO; TULIO; CRUZ, 2002).

Os linfócitos B marcados pelo CD20 e os plasmócitos pelo VS38, presentes na lâmina própria dos papilomas nasais foram, observados respectivamente, em grau discreto em 36,4%

(4) para CD20 e em grau moderado em 54,5% (6) para VS38, evidenciam a participação de uma resposta imune humoral, possivelmente ineficaz para a erradicação do HPV. Esses mesmos marcadores se mostraram em proporções semelhantes na laringe e na cavidade oral, conforme Tabela 14. Considerando a disseminação intracelular do vírus e expressão tardia dos antígenos do capsídeo viral, essa resposta imune humoral não apresenta papel significativo na resolução da infecção (JAKUBIKOVA et al., 1992; SCOTT et al., 2001). Dados da literatura relatam que distúrbios da imunidade humoral não resultam em susceptibilidade aumentada ao HPV (STERN et al., 2000; STANLEY, 2001).

Os macrófagos, identificados pela imunomarcção da molécula CD68, apresentaram-se predominante em grau discreto em 4 (22,2%) na laringe. Na cavidade oral, os mesmos apresentaram em grau moderado em 3 (42,8%). A cavidade nasal mostrou as mesmas proporções de discreto, moderado e intenso em 3 (27,3%). Os macrófagos são células importantes no processamento e apresentação antigênicos (BANKS et al., 1991). No entanto, Grassergger et al. (1997) demonstraram que nas verrugas genitais persistentes o padrão de citocinas é Th 2, ou seja, com produção de IL-5 e principalmente IL-10, que inibe o recrutamento dessas células macrófagicas. Infiltração de macrófagos e linfócitos T CD4 é componentes importantes do infiltrado inflamatório de verrugas genitais em regressão (BISHOP et al., 1990; BOCCARDO et al., 2010). Por outro lado, a infecção por HPV pode interferir nos mecanismos de vigilância imune local na fase indutora na qual ocorre a apresentação do antígeno e na efetora que gera células T citotóxicas e células B ativadas (TINDLE, 2002; GONÇALVES; DONADI, 2004).

Conforme destacado por Pinto Junior et al., (1994) uma das possibilidades de verificação do sistema imunológico do paciente, é a avaliação das células de Langerhans junto ao componente epitelial. As células de Langerhans são células processadoras e apresentadoras de antígenos, presente no epitélio da pele e mucosas (BARRETT et al., 1996; ABBAS et al., 2008). Esta população celular é a principal responsável pela captura de antígenos na intimidade do epitélio de revestimento, apresentando-os às células T auxiliares (linfócitos T CD 4), dando início, a uma resposta imune específica (MCLENLLAN et al., 2000). Tem sido sugerido que a infecção pelo HPV provoca um efeito imunossupressivo, reduzindo o número das CLs no epitélio das lesões infectadas por esse vírus (MOTA et al., 1999; HUBERT et al., 2005). Tal premissa estimulou a investigação imuno-histoquímica das LCs em PLR e papiloma de cavidade nasal e oral. As células dendríticas de Langerhans estiveram predominantemente negativas nos papilomas nasais (81,8%/9), oral (57,1%/4) e

laringe (77,8%/14) quando realizado a imuno-histoquímica. Um reduzido número de células de Langerhans como observado nas lesões do presente estudo tem sido documentado em lesões causadas pelo HPV, particularmente, no câncer e lesões pré-malignas do colo uterino (JIMENEZ-FLORES et al., 2005; KARUZA 2006).

Kovalenko et al., (2009), fizeram uma análise da densidade de células CD1a<sup>+</sup> e CD83<sup>+</sup> por mm<sup>2</sup> em pacientes com PLR recorrente e portadores de HPV dos tipos 6 e 11. Embora usando uma metodologia diferente da aplicado no presente estudo, eles mostraram, contrariamente aos nossos dados, que houve um aumento de células dendríticas CD1a<sup>+</sup> nos pacientes com papiloma laríngeo quando comparados com pacientes que apresentaram laringite crônica. Esses dados correlacionam bem com os apresentados por Ferluga et al. (1997) que avaliaram a frequência e distribuição de células de Langerhans em papilomas de laringe associados a infecção com HPV 6 e 11, usando anticorpos CD1a e S100. Por outro lado alguns autores relataram diminuição de células dendríticas no epitélio cervical de pacientes com HPV (CONNOR et al., 1999; JIMENEZ-FLORES et al., 2005), corroborando indiretamente com os achados do presente estudo. De acordo com esses autores a possível explicação para diminuição de densidade de células dendríticas seriam alterações na expressão de molécula de adesão (com as E caderinas), resultando em uma dificuldade de interação das células dendríticas com células epiteliais (MATTHEWS et al., 2003; OFFRINGA et al., 2003). Essas alterações podem está associada com propriedades peculiares da proteína E6 de HPVs de alto risco oncogenico.

O marcador CD117, utilizado para identificar os mastócitos, apresentou positividade importante respectivamente na cavidade nasal em 81,8% (9), na cavidade oral em 71,4% (5), e laringe em 38,9% (7). Os mastócitos são as principais células efetoras das reações de hipersensibilidade imediata, desempenham importante papel na resposta imune inata a infecções bacterianas (ABBAS et al., 2008) não existindo dados disponíveis na literatura consultada sobre a sua participação na resposta imune ao HPV. Tem-se como hipótese que a liberação de IL-4 por essas células pode contribuir para uma polarização para a resposta T CD4 do tipo Th2, não protetora ao HPV (RODINI et al., 2004). Destaca-se que a presença dessas células nos papilomas nasais pode ser justificada pela ocorrência de um processo alérgico ou infeccioso associado.

Os neutrófilos, componentes da resposta imune inata, são as principais células presentes na resposta inflamatória aguda a infecções bacterianas (ABBAS et al., 2008). Foram

semi-quantificados na maior parte das lesões da cavidade nasal em grau discreto 4 (36,4%), na cavidade oral também foram discretos 2 (28,6%), na laringe apresentou moderado 6 (33,3%), o que pode estar associado com a presença de possíveis infecções concomitantes como já foi citado anteriormente ou com a ocorrência de erosão e ulceração nas lesões em estudo, embora, não tenho sido encontrada significância estatística entre o aspecto morfológico erosão e a imunomarcação para CD15.

Na PLR, papiloma nasal e oral, trabalhos avaliando proliferação celular são escassos. Considerando-se a capacidade que o HPV apresenta de induzir a proliferação celular, já evidenciada nas lesões benignas e malignas, um dos objetivos desta pesquisa foi analisar o índice proliferação celular nos casos de PLR, papiloma nasal e oral, com o auxílio do marcador imuno-histoquímico de proliferação celular Ki-67.

Entretanto, não foram observadas associações entre infecção por HPV e o índice de proliferação celular pelo Ki-67, pois o mesmo foi negativo em 100% das lesões analisadas, nas três localizações. Esses resultados devem ser vistos com cautela, uma vez que a ausência de expressão da proteína Ki-67, não necessariamente exclui a existência de proliferação celular.

Ao estudarmos alguns componentes da imunidade local, os nossos resultados mostraram que a infecção pelo HPV está associada com a redução do número de células de Langerhans na PLR, tanto na área da neoplasia quanto ao longo do epitélio de revestimento não neoplásico, nos papilomas e papilomatoses das vias aéreas superiores, o mesmo acontecendo com células CD4, CD8 e macrófagos CD68 em graus variados, mas sem significado estatístico. Assim, considerando-se a complexidade da resposta imunológica tecidual nos pacientes, a obtenção da frequência de HPV em pacientes com PLR, papiloma nasal e oral, a identificação dos tipos de vírus nas lesões e a busca de possíveis fatores de risco de persistência do papilomavírus nas vias aéreas superior poderá contribuir para a melhor compreensão do padrão de infecção pelo HPV. Por isso, estudos avaliando outros componentes da resposta imunológica local, fatores inerentes ao próprio HPV e a pesquisa da produção de várias citocinas e fatores de crescimento *“in situ”*, entre outros, poderão fornecer dados para melhor entendimento da relação patógeno-hospedeiro em relação ao HPV e os papilomas e papilomatose de vias aéreas superiores.

A presente pesquisa representa uma tentativa de melhor entender à resposta imune tecidual em papilomatose e papilomas de laringe, cavidade nasal e oral,

correlacionando com a infecção pelo HPV e seus vários tipos moleculares. Também fazendo associação com alguns aspectos clínicos descritos e características como recorrência e prognóstico. Essa abordagem multidisciplinar talvez esteja sendo feita pela primeira vez na literatura.



## 8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

- Na PLR e nos papilomas de cavidade nasal e oral ocorre uma redução da mobilização para a resposta imune celular CD3 dependente, importante para a contenção viral, apesar de existir também a participação de células da resposta imune humoral, possivelmente ineficaz para a erradicação do vírus.

- Verificou-se uma baixa expressão de células T CD4<sup>+</sup>, indicando que, aparentemente, uma possível deficiência da resposta imune celular mediada por células T facilitaria a persistência da infecção pelo HPV.

- A menor frequência de células CD68, importante no processamento e apresentação antigênica nas lesões em laringe, pode ter contribuído para uma resposta imune celular menos eficaz nas lesões estudadas.

- A frequência dos vários tipos de HPV nas três topografias comparada à presença ou ausência de CLs verificamos que nos casos positivos para HPV, havia também diminuição importante das células CD1a positivos.

- As frequências de infecção pelo HPV através da PCR nas PLR, papilomas de cavidade oral e nasal foi respectivamente 88,2%, 85,3% e 73,9%.

- Não houve diferenças entre alguns aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes do nosso estudo em relação com aqueles relatados em outros trabalhos da literatura.

- Não foi observada nenhuma característica morfológica peculiar das lesões papilomatosas nas três localizações estudadas.

## REFERÊNCIAS

- AALTONEN, L. M.;RIHKANEN,H.;VAHERI,A. Human papillomavirus in larynx. **Laryngoscope**. 2002; 112: 700-707.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ABRAMSON, A. L.; STEINBERG, B. M.; WINKLER, B. Laryngeal papillomatosis: clinical histopathologic and molecular studies. **Laryngoscope**. 1987; 97: 678 – 685.
- ARMSTRONG L, R.;PRESTON, E.I.D.; REICHERT, M. et al. Incidence and prevalence of recurrent respiratory papillomatosis among children in Atlanta and Seattle. **Clin Infect Dis**. 2000; 31: 107 – 109.
- ARAÚJO-FILHO ,V. J. et al. Incidence of oral Câncer profile at a general hospital in São Paulo. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo** 53:110-113, 1998.
- BABI, L. F. S. L. Células de Langerhans en Lâ inmunidad Câncer. Con especial referencia a La dermatitis atópica. **Acta Dermatol**.1998: 173 – 181.
- BACCHI, C. E.; GOWN, A. M. Detection of cell proliferation in tissue sections. **Braz J Med Biol Res**. 1993; 26: 677-687.
- BANKS, L.; MOREAU, F.;VOUSDEN, K. et al. Expression of the human pappillomavirus E7 oncogene during cell transformation is sufficient to induce susceptibility to lysis by activated macrophages. **J Immunol**. 1991; 146 (6): 2037-2042.
- BANDYOPADHYAY S.; SEN, S.; MAJUMDAR, L.et al. Human papillomavirus infection among Indian mothers and their infants. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2003; 4(3):179–84.
- BARNES L. Schneiderian Papillomas and Nonsalivary Glandular Neoplasms of the Head and Neck. **Mod Pathol**. 2002;15(3):279–297.
- BARNES L. Scheneiderian papillomas. In: Barnes L, Eveson JV, Reichart P, et al., editors. World Health Organization classification of tumors. Lyon: **Pathol Head and Neck Tumors**. Lyon: IARC Press; 2005. pp. 28-32.
- BAO, Z.; YANG, X.; SHI,L. et al. Clinicopathologic features of oral squamous papilloma and papillary squamous cell carcinoma: a study of 197 patients from eastern China. **Ann Diagn Pathol**. 2012: 1-4.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**. 1998; 392, 245-252.
- BANOCZY, J. Clinical and histopathological aspects of premalignant lesions. In: Van der Waal I, Snow GB (eds) **Oral Oncology**, 1<sup>st</sup> edition. The Hague: Martinus Nijhoff. P.13-18, 1984.

- BARRETT, A. W; CRUCHLEY, A. T; WILLIAMS, D. M. Oral mucosal langerhans' cells. **Crit Rev Oral Biol Med.** 1996; 7(1): 36-58.
- BAUMAN, N. M. ; SMITH, R.J. Recurrent respiratory Papillomatosis. **Pediatr Clin North Am.** 1996; 43: 1385-1401.
- BERNARD, H.U. The clinical importance of the nomenclatura, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **J Clin Virol.** 2005; 32 (suppl) 1: S1- 6.
- BISHOP, P. E.; MCMILLAN, A.; FLETCHER, S. An immunohistological study of spontaneous regression of condylomata acuminata. **Genitourin Med.** 1990; 66: 79-81.
- BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis** 2010;31(11) pp.1905–1912.
- BOMHOLT, A. Juvenile laryngeal papillomatosis. **Acta Otolaryngol.** 1988; 105: 367– 371.
- BONAGURA V. R.; HATAM,L.; DE VOTI, J. et al. Recurrent respiratory papillomatosis: altered CD8<sup>+</sup> t-cell subsets and T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 cytokine imbalance. **Clin Immunol.** 1999: 93 (3): 302-311.
- BONAGURA,V.R.;HATAM,L.J.;ROSENTHA,D.W. et al. Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and -11. **APMIS** 2010; 118: 455-470.
- BOTTALICO, D.; CHEN,Z.; DUNNE,A. et al. The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. **J Infect Dis.** 2011; 204: 787–792.
- BOUDA, M.; GORGOULIS,V.G.; KASTRINAKIS,N.G. et al. High risk HPV types are frequently detected in potentially malignant and oral lesions, but not in normal oral mucosa. **Mod. Pathol.** 2000;13(6):644-653.
- BUCHINSKY, F. J. ;DONFACK, J. ;DERKAY, C.S. et al. Age of child, more than HPV type, is associated with clinical course in recurrent respiratory papillomatosis. **PloS ONE.** 2008; 3(5): 1-8.
- CAMARGOS, A. F; MELO, H. V. **Ginecologia ambulatorial.** Belo Horizonte: Coopamed. 2001: 397-400.
- CAMPISI, P.; HAWKES, M.; SIMPSON, K. The epidemiology of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis derived from a population level national database. **Laryngoscope.** 2010: 120:1233-1245.
- CAPRA, G.; GIOVANNELLI, L.; BELLAVIA, C. et al. HPV genotype prevalence in cytologically abnormal cervical samples from women living in south Italy. **Virus Research.** 2008; 133(2): 195-200.
- CARNEIRO, T. E. et al. Oral squamous papilloma: clinical, histologic and immunohistochemical analyses. **J Oral Sci.** 2009; 51(3):367-72,

- CASTRO, T. P. G. C. et al. Detecção de HPV na mucosa oral e genital pela técnica de PCR em mulheres com diagnóstico histopatológico para HPV genital. **Rev Bras Otorrinolaringol**, 2009; 75(2): 167 -71
- CASTRO, T. P. G. C.; BUSSOLOTI FILHO, I. Prevalência do Papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe. **Rev. Bras. Otorrinolaringol**. 2006; 72 (2): Mar./Apr.
- CHAN, S. Y. ; DELIUS,H. ; HALPERN,A.L. ; BERNARD,H.V. Analysis of genomic sequences of 95 papilomavirus types: uniting typing phylogeny and taxonomy. **J Virol**. 1995; 69 (5): 3074 – 3083.
- CHANG, F. ;SYRJANEN,S.; KELLOKOSKI, J.; SYRIANEN, K. Human papillomavirus (HPV) infection and their association with oral disease. **J Oral Pathol Med**, 20:305-417, 1991.
- CHEN, R.; SEHR,P.;WATERBOER,T. et al. Presence of DNA of human papillomavirus 16 but no other types in tumor-free tonsillar tissue. **J. Clin Microbiol**. 2005; 43: 1408 – 1410.
- CHEETHAM, D.; SMITH,J.;WILSON,C. et al. **Br J Vener Dis**. 1984; 60: 182-5.
- CHOW, L. T; BROKER, T. R; STEINBERG, B. M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **APMIS** 2010; 118: 422-449.
- CHOW, V. T. ; LOH, E. ; YEO,W.N. et al. Identification of multiple genital HPV types and sequences variants by consensus and nested type-specific PCR coupled with cycle sequencing. **Pathol**. 2000; 32; 204 -208.
- CHOW, L. T.; BROKER, T. R.; STEINBERG B.M. In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences. **Clin Dermatol**. 1997;15(2): 217-227.
- COHEN, S. R. ;GELLER, K.A. ;SELTZER, S. Et al. Papilloma of the larynx and traqueobronchial tree in children. **Ann Otol**. 1980; 89: 497.
- COLEMAN, N.; BIRLEY,H.D.; RENTON,A.M., et al. Immunological events in regressing genital warts. **Am J Clin Pathol**.1994;102( 6): 768-774.
- COLLIER, B. ; GOOBAR-LARSSON, L.; SOKOLOWSKI, M.; SCHWARTZ, S. Translational inhibition in vitro of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogeneous ribonucleoprotein k and Poly(rc)-binding Proteins 1 and 2. **J. Bio Chem**. 1998; 273: 22648-22656.
- CONEJO, P. R. ; MARTIN P.M.; MENDOZA,S.A. et al. Papilomatosis respiratória recorrente: uma causa de dificuldade respiratória progressiva. **An Esp Pediatr**. 2001; 55 (6): 558-560.
- CONNOR, J. P. ; FERRER,K. ; KANE, J.P. et al. Evaluation of Langerhans' cells in the cervical epithelium of women with cervical intraepithelial neoplasia, **Gynecol Oncol**. 1999; 75 (1): 130-135.

- CRISTENSEN, P. H; JORGENSEN, K. et al. Juvenile papillomatosis of the larynx a 45-year follow-up from the country of Funem, Denmark. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 1996; 122: 942 -944.
- CUMMINGS, C. H. et al. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** Mosby, 3<sup>a</sup>ed, 1998.
- CUTLER, C. W.; JOTWANI, R. Oral mucosal expression of HIV – 1 receptors, co-receptors and  $\alpha$ -defensis. **Adv Dent Res.** 2006; 19: 49 -51.
- DERKAY, C. S. Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 1995; 121(12):1386-91.
- DERKAY, C. S. Recurrente respiratory papillomatosis. **Laryngoscope.** 2001; 111: 57-69.
- DERKAY, C. S.; JOHNSON, K. E. Recurrent respiratory papillomatosis. Touch Briefings, European Paediatrics [periódicos na Internet]. 2008; 35-38. Disponível em: [www.touchbriefings.com/pdf/3211/johnson.pdf](http://www.touchbriefings.com/pdf/3211/johnson.pdf). Acessado em: 30/10/2012.
- DERKAY C.S.; DARROW D.H. Recurrent respiratory papillomatosis. **Ann Otol Rhinol Laryngol.** 2006; 115(1):1–11.
- DE VILLIERS, E. M. et al. Human pathogenic papillomavirus types : an update. **Curr Top Microbiol Immunol.** 1994 ; 186 : 01-12
- DE VILLIERS, E. M. ; FAUQUET,C. ; BROKER,T.R. et al. Classification of papillomaviruses. **Viol.** 2004: 324: 17 – 27.
- DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **J. Clin. Virol.** 2005; 32 Suppl 1: S7-15.
- DOYLE, D. J. ;HENDERSON,L.A. ; LEJEUNE, F.E.Jr. et al. Changes in human papillomavirus typing of recurrent respiratory papillomatosis progressing to malignant neoplasm. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 1994; 120: 1273–1276.
- DONNE, A. J. ; HAMPSON, L. ;HOMER, J.J. et al. The role of HPV type in recurrent respiratory papillomatosis. **J Pediatr Otorhinolaryngol.** 2010; 74(1):7-14.
- DUGGAN, M.A.; LIM, M.; GILL, M.J. et al. HPV DNA typing of adult-onset respiratory papillomatosis. **Laryngoscope.** 1990; 100(6):639–42.
- DUNNE E.F.;UNGER,E.R.; STERNBERG,M.; MCQUILLAN,G. et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. **JAMA.** 2007; 297(8):813–9.
- ENDL, E.; GERDEA, J. The Ki-67 protein: fascinating forma and unknown function. **Exp. Cell Res.** 2000; 257: 231-237.
- FAULKNER-JONES, B. E.; BELLOMARINO,V.M.; BORG, A.J. et al. Detection and typing of human papillomavirus using Viral Type in situ hybridization kit: comparision with a conventional dot blot technique. **J Clin Pathology.** 1990; 43: 913-917.
- FEDRIZZI, E. M. Epidemiologia da infecção genital pelo HPV. **Rev Bras Pat Trato Gen Inf.** 2011;1(1):3-8.

FEHRMANN, F.; KLUMPP, D. J.; LAIMINS, L. A. Human Papillomavirus type 31 e 5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. **J Virol.** 2003; 77: 2819-2831

FERRARO, C. T. L. ;CANEDO, N.H.S ; OLIVEIRA,S.P. et al. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **J Bras Patol Med Lab.** 2011; 47(4): 451-459.

FERLUGA, D. ; LUZAR, B;VODOVNIK, A. et al. Langerhans cells in human papillomaviruses types 6/11 associated laryngeal papillomas, **Acta Otolaryngol. Suppl.** 1997;527 :87—91.

FERREIRA, W.; SOUSA, J. **Microbiologia.** Lisboa: LIDEL. 2002

FLETCHER J.L.Jr. Perinatal transmission of human papillomavirus. **AFP.** 1991; 43: 143-148.

FINNEN, R. L.; ERICKSON, K.D.; CHEN, X. S. et al. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. **J Virol.** 2003; 77: 1410-4826.

FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nat Rev Immunol.** 2004; 4(1): 46 -54

GABBOTT, M. COSSART Y.E.; KAN, A. et al. Human papillomavirus and host variables as predictors of clinical course in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. **J Clin Microbiol.** 1997; 35(12):3098–103.

GEREIN, V. SCHMANDT,S.;BABKINA, N. et al. Human papilloma virus (HPV)-associated gynecological alteration in mothers of children with recurrent respiratory papillomatosis during long-term observation. **Cancer Detection and Prevention.** 2007; 31: 276-281.

GERDES, J.; SCHMANDT, S.;BABKINA, N. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer.** 1983; 31: 13-20.

GILLISON, L.WOLNIK,L.IKENBERG, H. et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and subset of head and neck cancers. **J Natl Cancer Inst.** 2000; 92:709-720.

GISSMANN, L.; WOLNIK,L.; IKENBERG,H. et al. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1983; 80 (2): 560-563.

GONÇALVES, M. A. G.; DONADI, E. A. Immune cellular response to HPV: current concepts. **Braz J Infect Dis.** 2004; 8(1): 1-9.

GONZÁLEZ-MOLES, M. A.; RUIZ-AVILA, I.; GONZÁLEZ-MOLES, S. et al. Detection of HPV DNA by in situ hybridization in benign, premalignant and malignant lesions of oral mucosa. **Int Rech Sci Stomatol Odontol.** 1994; 37(3-4): 79-85.

GORGOLIS, V.; RASSIDAKIS, G.; KARAMERIS, A. et al. Expression of p53 protein in laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia: possible correlation with human

- papillomavirus infection and clinicopathological findings. **Virchows Arch.** 1994; 425(5):481–9.
- GNEPP, D. R. Diagnostic surgical pathology of the head and neck. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009.
- GRASSERGGGER, A. et al. Spontaneous or interferon- $\gamma$ -induced Tcell infiltration, HLA-DR and ICAM- 1 expression in genitoanal warts are associated with TH1/TH2 cytokin mRNA expression profiles. **Arch Dermat Res.** 1997; 289: 243-250.
- GROSS, G. E.; BARRASSO, R. Infecção por papillomavirus humano: **Atlas Clínico de HPV.** Artmed, 1999; 432p.
- GUZMÁN-ROJAS, L.; ALCOCER-GONZÁLEZ, I.M.;MADRID-MARINA, V. et al.Perspectiva para El desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra câncer cervicouterino. **Salud Publica de Mexico**, Morelos.1998; 40 (1):38-46.
- HA, P. K.; CALIFANO, J. A. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med.** 2004; 15(4): 188-196.
- HALL, J. E.;CHEN, K.; YOO, M.J. et al. Natural progression of dysplasia in adult recurrent respiratory papillomatosis. **Otolaryngol Head Neck Surg.** 2011; 144(2): 252-6, PubMed; 21493426.
- HARWOOD, C. A.; SURENTERANT, T.; MCGREGOR, J.M. et al. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. **J Med Virol.** 2000; 61(3): 289-297.
- HEARD, I .;TASSIE, J.M.; SCHMITZ, V. et al. Increased risk of cervical disease among human immunodeficiency virus-infected women with severe immunosuppression and high human papillomavirus load. **Obstet Gynecol.** 2000; 96(3): 403-409.
- HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; PAWLITA, M. et al. IARC Multicenter oral câncer study group. Human papillomavirus and oral 46. cancer: the international agency for research on câncer multicenter study. **J Natl Cancer Inst.** 2003; 95(23): 1772-1783.
- HOLIKOVÁ, Z.; HERCOGOVÁ,J.; PIZÁK, J.; SMETANA, K. Jr. et al. Dendritic cells and their role in skin- induced immune responses. **J Eur Acad Dermat Venereol.** 2001; 15 (2): 116 -120.
- HONG, K.; GREER, C.E.; KETTER, N. et al. Isolation and characterization of human papillomavirus type 6-specific T cells infiltrating genital warts. **J Virol.** 1997; 71 ( 9): 6427-6432.
- HUBERT, P.; CABERG, J.H., GILLES,C. et al. E-cadherin-dependent adhesion of dendritic and Langerhans cells to keratinocytes is defective in cervical human papillomavirus associated (pre) neoplastic lesions. **J. Pathol.** 2005; 206 (3): 346-355.
- I.A.R.C. International Agency for Rsearch on Cancer, World Health Organization. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.**Human papillomaviruses. Lyon. 2007. vol 90.

I.A.R.C. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization.  
**Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.** Human papillomaviruses.  
 Lyon. 2005. vol 64.

IBIETA, B. R.; LIZANO, M.; FRAS-MENDIVIL, M. et al. Human papiloma virus in oral squamous cells carcinoma in a Mexican population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontics.** 2005; 99: 311-315.

JALAL, H.; SANDERS, C.M.; PRIME, S.S. et al. Detection of human papillomavirus types 16 DNA in oralsquames from young adults. **J Oral Pathol Med.** 1992; 21:465-470

JAKUBICOVÁ, J.; ORAVEC, C.; KLACANSKY . Modulation of humoral and cellular resistance in children with laryngeal papillomatosis. **Int J Pediat Otorinolayngol.** 1992; 23: 229-236.

JAJU, P. P.; SUVARNAN, P. V.; DESAI, R. S. Squamous Papilloma: Case report and review of literature. **Int J Oral Sci.** 2010; 2(4):222-225.

JIMENEZ-FLORES, R. ; MENDES-CRUZ, R. ; OJEDA-ORTIZ, J. et al. High-risk human papilloma infection decreases the frequency of dendritic Langerhans cells in the human female genital tract. **Immunol.** 2005; 117: 220-228.

LAJER, C. B.; BUCHWALD, C. V. The role of human papillomavirus in head and neck cancer. **APMIS.** 2010; 118: 510-519.

LARSON, D. A.; DERKAY, C. S. Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. **APMIS.** 2010; 118: 450-454.

LAWSON, W.; SCHLECHT, N. F.; BRADWEIN-GENSLER, M. The role of the human papillomavirus in the pathogenesis of Schneiderian inverted papillomas: an analytic overview of the evidence. **Head Neck Pathol.** 2008; 2: 49-59.

LAWTON, G. ; THOMAS, S. ; SCHONROCK, J. ; et al. Human papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection. **J Oral Pathol Med.** 1992; 21(6):265-269.

LEHTINEN, M. ; RANTALA, I.; TOIYONEN, A. et al. Depletion of Langerhans cells in cervical HPV infection is associated with replication of the virus, **APMIS** 1993 ;101 (11):833—837.

LERA , J.; LARA, P.C.; PEREZ, S. et al. Tumor proliferation, p53 expression and apoptosis in laryngeal carcinoma – relation to the results of radiotherapy. **Cancer.** 1998;83: 2493 – 2500.

LEVI, J. E.; FERNANDES, S.; TATENO, A.F. et al. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV- infected women. **Gynecol Oncol.** 2004; 1: 225-231.

LONG, Y. T.; SANI, A. Recurrent Respiratory Papillomatosis. **Asian J Surg** 2003; 26(2): 112-116.



- LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2004; 68 (2): 362-372.
- LORINCZ, A. T. Hybrid capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. **J Obstet Gynecol Res.** 1996a; 22(6): 629-636.
- LIU, S. C.; KLEIN-SZANTO, A. J. Markers of proliferation in normal and leucoplakic oral epithelia. **Oral Oncology.** 2000; 36:145-151.
- KAYE, N. J. ;CASON, J. ;PAKARIAN,F.B., et al. Viral load as a determinant for transmission of human papillomavirus type 16 from mother to child. **J Med Virol.** 1994; 44: 415-421.
- KANODIA, S.; FAHEY,L.M.; KAST,W.M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Current Cancer Drug Targets.** 2007; 7: 79-89.
- KARUZA, M. A. P. **Papilomavírus humano (HPV) e células de Langerhans em carcinoma epidermóide oral.** [Tese de Doutorado]. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN. 2006.
- KASHIMA, H.K.; SHAH, F.; LYLES, A. et al. Factors in juvenile-onset and adult onset recurrent respiratory papillomas. **Laryngoscope.** 1992;102: 9 – 13.
- KATSELOS, S.; BECKER, H. D. Recurrent respiratory papillomatosis: a rare chronic disease, difficult to treat, with potential to lung cancer transformation: apropos of two cases and a brief literature review. **Case Rep Oncol** 2011; 4: 162-171.
- KELLER, R. Dendritic cells: their significance in health and disease. **Immunol Letters.** 2001;78: 113-122.
- KOJIMA, A.; MAEDA, H.; SUGITA, Y. et al. Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous cell carcinomas oral. **Oncology.** 2002; 38: 591 – 596.
- KOSS L, G.; DURFEE, G. R. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytic atypia. **Ann N Y Acad Sci.** 1956; 63: 1245-61.
- KOVALENKO, S. ;LUKASHENHO,P.; ROMANOVSKAYA A. et al. Distribution and Density of CD1a+ and CD83+ dendritic cells in HPV-associated laryngeal papillomas. **Int J Ped Otorinol.**2009; 73: 249-256.
- KREIMER, A. R. ; VILLA, A. ; NYITRAY,A.G. et al. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2011; 20(1): 172–182.
- KRECICKIT, T.; JELÉN, M.;ZALESSKA-KRECICKA, M. et al., Ki-67 immunostainnig and prognosis in laryngeal cancer clin.**Otolaryngol.** 1998;23; p539- 542.
- MAJOR, T. ;SZARKA,K.; SZIKLAI, I. et al. The characteristics of human papillomavirus DNA in head and neck cancers and papillomas. **J Clin Pathol** 2005; 58: 51–55.

- MAO, E. J. Prevalence of human papillomavirus 16 and nucleolar organizer region counts in oral exfoliated cells from normal and malignant epithelia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod.** 1995; 80:320-329.
- MANHART, L.E. ;HOLMES K.K.; KOUTSKY L. A; et al. Human papillomavirus infection among sexually active young women in the United States: implications for developing a vaccination strategy. **Sex Transm Dis.** 2006; 33(8):502–8.
- MARTINS FILHO, P. R. S. ; PIVA, R. M.; SANTOS, S. T. et al. Papiloma de células escamosas da cavidade oral. **Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-fac.** 2009; 9 (3): 69-78.
- MARSICO, M. et al. **Estimating the disease burden of juvenile onset RRP in the US using large administrative databases** – preliminary pilot results. Presented May 2009 at the International Papillomavirus Conference. Disponível em: <http://www.hpv2009.org>. Acessado em :21/05/2013.
- MATTHEWS, K.; LEONG, C.M.; BAXTER, L. et al. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6- mediated down regulation of E- cadherin, **J. Virol.** 2003; 77(15):8378- 85.
- MCLELLAN, A. D.; KAMPGEN, E. Functions of myeloid and lymphoid dendritic cells. **Immunol Lett.** 2000; 72: 101-105.
- MEISELS, A.; FORTIN, R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. **Acta Cytol.** 1976 ; 20(6):505-9.
- MIGUEL, R. E. ; VILLA, L.L. ; CORDEIRO,A.C. et al. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. **Am J Surg.** 176:428-429, 1998.
- MILLER, C. S.; JOHNSTONE, B. M. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997.**Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 91:622-635, 2001.
- MILLER, C. S.; WHITE, D. K. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 82:57-68, 1996.
- MONNIER-BENOIT, S.; MAUNY, F.;RIETHMULLER, D. et al. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated premalignant and malignant lesions of uterine cervix. **Gynaecol Oncology.**2006; 102 (1),:22-31.
- MOTA, F. RAYMENT, N., CHONG, S. et al. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus-(HPV) – related premalignant cervical epithelium. **Clin Exp Immunol.** 1999; 116: 33-40.
- MÜLLEN, C. et al. Papilomatose de laringe. **Revista HCPA** 1999; 19(2): 260.
- MUND, K, HAN C.; DAUN, R. et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA and of antibodies to human papillomavirus type 16 proteins in children. **Intervirol.** 1997;40:232-237.

MUÑOZ, N., CASTELLSAQUE, X. ; GONZALEZ, A.B.;GISSMANN, L. HPV in the etiology of human Câncer. **Vaccine**. 2006; 3: 3-10.

MUÑOZ , N.; BOSCH,F.X.; DE SANTOS, S. et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical study group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**. 2003; 348(6): 518-527.

MUNGER, K. A;BALDWIN, A.; EDWARDS, K.M. et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. **J Virol**. 2004; 78(21): 11451 -11460.

O'BRIEN, P. M.; SAVERIA, C. M. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. **Virus Res**. 2002; 88 (1-2):103-117.

OLIVEIRA, M. C.;SOARES, R.C.; PINTO, L.P. et al. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. **Rev Brás Otorrinolaringol**. 2003; 69 (4): 553-559.

OLIVEIRA, L. H.; ROSA, M. L.;CAVALCANTI, S. M. Patterns of genotypes Câncer gen in multiple human papillomavirus infections. **Clin Microb Infect**. 2008; 14: 60 – 65.

OFFRINGA, R.; DE JONG, A.; TOES, R.E. et al. Interplay between human papillomaviruses and dendritic cells, **Curr. Top. Microbiol. Immunol**. 2003; 276: 215—240.

OZSARAN, A. A. et al. (2): Evaluation of the risk of cervical intraepithelial neoplasia and human papilloma virus infection in renal transplant patients receiving immunosuppressive therapy. **Eur J Gynaecol Oncol**. 1999; 20(2) 127-130.

PALEFSK, J. M. ; SILVERMAN, S.Jr. ; ABDEL-SALAAM, M. et al. Association between proliferative verrucous leukoplakia and infection with human papilomavirus type 16. **Oral Pathol Med** 24:193-197, 1995.

PALEFSKY, J. M. Human papillomavirus infection and anogenital neoplasia in human immunodeficiency virus-positive men and women. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**.1998 ; 23; 15-20.

PARK, R. B.; ANDROPHY, E. J. Genetic analysis of human- risk E6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. **J Virol**. 2002; 76: 11359-11364.

PARELLADA, C. I.; PEREYRA, E. A. G. Papilomavirose humanas. In Focaccio, R Veronesi. **Tratado de Infectologia**. 3<sup>a</sup> Ed. ATHENEU. 2005, cap. 27: 607 – 625.

PEÑALOZA-PLASCENCIA, M. MONTOYA-FUENTES, H; FLORES-MARTINEZ S. C.;et al. Molecular identification of 7 human papillomavirus types in recurrent respiratory papillomatosis. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. 2000 Sep;126 (9):1119-23, PubMed; 10979126.

PETRY, K. U.; SCHEFFEEL, D.; BODE, U. et al. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesion. **Int J Cancer**. 1994;57 (6 ) 836-840.

- PIVA, M. R. ; MARTINS FILHO, P.R.S ; SANTOS, T. S. et al. Papiloma invertido (Papiloma Schneideriano) com envolvimento da cavidade oral: relato de caso incomum. **Ann Bras Dermatol.** 2011; 86(4): 779-8.
- PINTO JÚNIOR, D. dos S. et al. A célula de Langerhans e o prognóstico dos carcinomas epidermóides. **RPG.** 1994; 1(2): 10-13.
- PINTO, A. P.; TULIO, S; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. **Revista da Associação Médica Brasileira.** 2002; 48 (1): 73-78.
- POU, A. M.; RIMELL, F.L.; JORDAN, J.A. et al. Adult respiratory papillomatosis: human papillomavirus type and viral coinfections as predictors of prognosis: **Ann. Otol. Laryngol.** 1995; 104:758-762.
- PREMOLI-DE-PERCOCO, G.; CHRISTENSEN, R. Human papillomavirus in oral verrucal-papillary lesions. **Pathologica.** 1992; 84:383-392.
- PURANEN, M.H.; YLISKOSKI, M.H.; SAARIKOSKI, S.V. et al. Exposure of an infant to cervical human papillomavirus infection of the mother is common. **Am J Obstet Gynecol.** 1997; 176(5):1039-45.
- RABAH, R.; LANCASTER, W.D.; THOMAS, R. et al. Human papillomavirus -11-associated recurrent respiratory papillomatosis is more Câncer gen than human papillomavirus-6- associated disease. **Pediatr Dev Pathol.** 2001; 4(1): 68-72.
- RAMA, C. H. et al. Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical cancer. **Rev Saúde Pública.** 2008; 42(1): 1-7.
- RAUTAVA, J.; WILLBERG, J.; LOUVANTO, K. et al. Prevalence, Genotype Distribution and Persistence of Human Papillomavirus in Oral Mucosa of Women: A Six-Year Follow-Up Study. **Plos One.** 2012; 7(8) 42171: 1-9.
- REIDY, P.M.; DEDO, H.H. RABAH, R. et al. Integration of human papillomavirus type 11 in recurrent respiratory papilloma-associated cancer. **Laryngoscope.** 2004; 114(11):1906-9.
- RICE, P.S. ; MANT, C. ; CASON, I. et al. High prevalence of human papillomavirus type 16 infection among children. **J Med Virol.** 2000; 61:70-75.
- RIETHMULLER, D ; SEILLES, E. Immunity of the female genital tract mucosa and mechanisms of papillomavirus evasion. **J Gynecol Obstet Biol Reprod.** 2000; 29(8): 729-740.
- ROBBINS, C. Bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- RONCO, L. V. ; KARPOVA, A.Y. ; VIDAL, M. et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes Dev.** 1998; 1(12-13): 2061-2072.
- RODINI, C.O; BATISTA, A.C.; LARA, V.S. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and perapical cysts: Possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. **Oral Surg Oral Medic Oral Pathol.** 2004; 97 (1).

ROMAGNANI, S. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. **Int Allergy and Immunol.**1992; 98 (4): 279-285.

ROMBALDI, R.L.;SERAFINI, E.P.;MANDELLI, J. et al. Transplacental transmission of human papillomavirus. **Viol J.** 2008; 5:106.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOHEL, S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science.**1988; 239; 487-491

SANCLEMENTE, G.; GILL, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** 2002; 16: 231 – 240.

SANJOSÉ, S. ;DIAZ, M.; CASTELLSAGUÉ, X. et al. Worldwide prevalence and genotypes distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **Lancet Inf Dis.** 2007; 7: 453-459.

SAJAN, J. A.; KERSCHNER,J.E.; MERATI, A.L. et al. Prevalence of dysplasia in juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 2010; 136(1): 7-11.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. Rapid silver cãncer and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. **Biotechniques,** 1994; 17: 915 - 919.

SASAGUAWA, T. et al. High – risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. **Cancer Epidemiol Biomarker Prevention.** 2001; 10: 45 – 52.

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology and prevention. **Int J Gynecol Cancer.** 2005; 15: 727 – 746.

SCOTT, M.; MAYUMI, N.; MOSCICKI, A. B. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. **Clin Diagn Lab Immunol.** 2001 Mar; 8(2): 209-220.

SCULLY C.; FIELD, J.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral orhead and neck squamous cell carcinoma(SCCHN):1. Carcinogenmetabolism, DNA repair and cell cicle control. **Oral Oncology** 36:256-263, 2000.

SHI, S.R.; COTE, R. J., WU, L. et al. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of ph. **J Histochem Cytochem.** 2002; 50(8) 1005 – 1011.

SILVA-FILHO, et al. Associação entre a expressão das proteínas p53 e Ki-67 e os achados clínicos-patológicos em pacientes com carcinoma invasor de colo uterino. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia.** 2005; 27 (5): 243-247.

SILVERBERG, M. J.; THORSEN, P.; LINDEBERG, H. et al. Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. **Obstet Gynecol.** 2003; 101 (4): 645-652.

- SITTEL, C.;RUIZ, S.;VOLLING,P. et al. Prognostic significance of Ki-67 (MIB), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. **Oral Oncol.** 1999; 35(6): 583-589.
- SOARES, R. C. et al. Papiloma, verruga vulgar e carcinoma verrucoso oral: estudo epidemiológico de 77 casos e avaliação histológica. **RGO.** 2005; 53(3): 201-205.
- SMITH, E.M. ;RITCHIE,J.M.; YANKOWITZ, J. et al. Human papillomavirus prevalence and types in newborns and parents: concordance and modes of transmission. **Sex Transm Dis.** 2004; 31(1):57–62.
- SPAFFORD, M.F.; KOEPPE, J.; PAN, Z. et al. Correlation of tumor markers p53, -bl-2,CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 1996; 122: 627-632.
- STANLEY, M. A. Immunobiology of papillomavirus infections. **J Reprod Immunol.** 2001; 52: 45 – 59.
- STANLEY, M. A. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. **Best Prat Res Clin Obstet Gynaecol.** 2001; 15(5): 663-676.
- STERN, P. L. ;BROW, M.; STACEY, S.N. et al Natural HPV immunity and vaccination strategies. **J Clin Virol.** 2000; 19: 57–66.
- STOLER, M. H. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia. **Arch Pathol Lab Med.** 2003; 127: 935 -939.
- STUBENRAUCH, F.; LAIMINS, L. A. Human Papillomavirus life cycle active and latent phases. **Semin Cancer Biol.**1999; 9: 379-86.
- SYRJANEN, S. Human papillomavirus infections and oral tumors. **Med Microbiol Immunol.** 2003; 192: 123-128.
- SYRJÄNEN, K.; SYRJÄNEN ,S; LAMBERG,M. et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. **Int J Oral Surg.** 1983; 12(6):418-24.
- SYRJANEN, S. M. **Human Papillomavirus infection in the oral cavity.** In: Syrjanen KJ, Gissmann L, Koss LG (eds) Papillomaviruses and Human Disease. Heidelberg: Springer-Verlag.1987; 104 -137.
- SYRJANEN, S. M.; SYRJANEN, K. J. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. **Ann Med.** 1999; 31(3): 175-187.
- SUGIYAMA, M. ;BHAWAL, UK.; DOHMEN, T. et al. Detection of human papillomavirus – 16 and HPV- 18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod.** 2003; 95(5): 594-600.
- SZOSTEK, S.;KLIMEK, M.; ZAWILINSKA, B. et al. Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. **Acta Biochim Pol.** 2006; 53 (3): 603 -607.

TAY, S. K.; JENKINS, D.; MADDOX, P.; et al. Lymphocyte phenotypes in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus (HPV) infections. **Br J Obstet Gynaecol.** 1987; 94:16-21.

TANCREDI, A. R. C. **Estudo clínico, epidemiológico, histológico e papilomas da mucosa oral e sua relação com o Papilomavírus humano (HPV) através das técnicas de hibridização *in situ* e PCR.** [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.

TENTI P.; ZAPPATORE, R., MIGLIORA, P. et al. Perinatal transmission of human papillomavirus from gravidas with latent infections. **Obstet Gynecol.** 1999; 93(4):475–9.

TERAI, M. et al. High prevalence of human papillomaviruses in the normal oral cavity of adults. **Oral Pathol Med.** 1999; 14: 201-205.

THOMISSON J.III.; THOMAS, L. K.; SHROYER, K. R. Human papillomavirus: molecular and cytologic /histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Hum Pathol.** 2008; 39: 154 – 166.

TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nat Rev Cancer.** 2002; 2 (1): 59-65.

TINOCO, J. A. ; SILVA, A. F.; OLIVEIRA, C. A. B. et al. Correlação da infecção viral pelo papilomavírus humano com as Lesões papilomatosas e o carcinoma epidermóide na boca e orofaringe. **Rev Assoc Med Bras.** 2004; 50(3): 252-6.

TROTTIER, H.; BURCHELL, A. N. Epidemiology of mucosal human papillomavirus infection and associated diseases. **Public Health Genomics.** 2009; 12:291–307.

TUMULURI, V.; THOMAS, G. A.; FRASER, I. S. Analysis of the Ki-67 antigen et the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med.** 2002; 31 (10): 598-604.

TSENG, C.J.; LIANG, C.C.; SOONG, Y.K. et al. Perinatal transmission of human papillomavirus in infants: relationship between infection rate and mode of delivery. **Obstet Gynecol.** 1998; 91(1):92–6.

VÈLYVYTÉ, D.; ALYYDAS, L.; VIRGILIJUS, U.; ANNA GOZDZICKA-JOZEFIAK et al. Prevalence of human papillomavirus infection among patients with laryngeal papillomatosis and the influence of some risk factors on the persistence of papillomaviruses in the upper respiratory tract. **Medicina.** 2002; 38(5): 83-88.

VIAC, J.; GUÉRIN-REVERCHON, J.; CHARDONNET, Y. et al. Langerhans cells and epithelial cell modifications in cervical intraepithelial neoplasia: Correlation with Human Papillomavirus infection. **Immunobiol.** 1990; 180:328-338.

VICENT, J. C. ; HERRERO-ZAPATERO, A. ; FRESNO, M.F. et al. Expression of ciclín D1 and ki- 67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. **Oral Oncol,** 2002; 38(3): 301-308.

- LLA, L. L. Aspectos moleculares da oncogênese por papilomavírus. In: BIBBO, M.; SILVA FILHO, A. M. **Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. p. 51-58.
- VILLA, L. L. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Advanc Canc Res**. 1997; 7:321-341.
- ULLMAN, E. V. On the aetiology of laryngeal papilloma. *Acta Otolaryngol*.1923; 5: 317.
- XAVIER, S. D.; BUSSOLOTI FILHO, I.; LANCELOTTI, C. L. P. Prevalência de achados sugestivos de papilomavírus humano (HPV) em biópsias de carcinoma espinocelular de cavidade oral e orofaringe: estudo preliminar. **Rev Bras Otorrinolaringol**. Jul/Ago 2005; 71(4): 510-4
- XIMENES FILHO, J. A.; SIMOCELI, L. ; JMAMURA, R. et al. Recurrent laryngeal papillomatosis: a 10-year experience. **Rev. Bras. Otorrinolaringol**. 2003; 69 (5).
- YEOH, T. L.; SANI, A. Recurrent respiratory papillomatosis. **Asian J Surg** 2003; 26(2): 112-6.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**. 2002; 2: 342-350.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta** 1996; 1288; F55-F78.
- ZUR HAUSEN, H: Papillomavirus causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. Review. **J Natl Cancer Inst**. 92:690-699, 2000.
- WANG, X.; ZHU, Q.; RAO, H. Maternal-fetal transmission of human papillomavirus. **Chin Med J (Engl)**. 1998; 111(8):726-7.
- WELKOBORSKY, H. J.;HINNI, M.; DIENES, H.P. et al. Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markes. **Ann Otol Rhinol Laryngol**. 1995; 104; 503 – 510.
- WIATRAC, B. J. ;WIATRAC, D.W. ; BROKER, T.R. et al. Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal stdy comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population. **Laryngoscope**. 2004; 114: 1 -23.
- WINCKWORTH, L.C.; NICHOL, R. Question 2: do caesarean sections reduce the maternal-fetal transmission rate of human papillomavirus infection? **Arch Dis Child**. 2010; 95(1):70-3.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION/ICO. Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). **Human Papillomavirus and Related Cancers in Brazil**. Summary Report 2010. Disponível em: [www.who.int/hpvcentre](http://www.who.int/hpvcentre). Acessado em: 22/10/2012.



**APÊNDICES**

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

*“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.”*

(Resolução nº. 196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde)

Instituições de Pesquisa: Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz / FIOCRUZ, Hospital Santa Izabel, Salvador – BA.

Título do Projeto: Papilomatose de vias aéreas superiores: Associação da resposta imunológica tecidual com aspectos clínicos epidemiológicos, morfológicos e moleculares da infecção por HPV.

Pesquisadores responsáveis: Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos (pesquisador titular) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ); Mitermayer Galvão dos Reis (FIOCRUZ); David Greco Varela (médico Otorrinolaringologista, Hospital Santa Izabel); Gentileza Santos Martins Neiva (Doutoranda).

Nome do Participante: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Este documento convida o (a) Sr. (Sra.) ou a seu filho participar do projeto de pesquisa acima mencionado, ao tempo em que fornece a (aos) mesmo(s) informações sobre a utilização de sua biópsia de lesões Papilomatose Laríngea Recorrente e papiloma nasal ou oral. O entrevistador responderá quaisquer perguntas que você/seu filho possa ter sobre este questionário ou sobre o estudo. Por favor, ouça com atenção e sinta-se à vontade para perguntar qualquer coisa sobre as informações fornecidas.

O estudo tem como objetivo pesquisar se há alteração nos tipos de HPV e na resposta imune celular dos pacientes com Papilomatose Laríngea Recorrente em comparação com pacientes com papiloma nasal ou oral.

Para a realização deste estudo são removidos fragmentos de papiloma, através de procedimento cirúrgico, no qual paciente não sofrerá nenhum desconforto devido está sobre efeito de anestesia. Os quais são encaminhados para estudos anatomo patológicos, imunohistoquímicos, moleculares os quais permitirão favorecer o estabelecimento de fatores que indiquem o comportamento destas lesões, permitindo, futuramente, intervenções cirúrgicas mais específicas e acompanhamento mais criterioso dos pacientes com Papilomatose Laringea Recorrente.

Estamos solicitando a sua permissão para guardar e estudar fragmentos de sua lesão que não serão utilizados para o diagnóstico definitivo. A obtenção e o estudo dos referidos fragmentos não implicarão em riscos adicionais no seu tratamento e cirurgia. O (a) Sr. (Sra.) ou seu filho poderá

recusar-se a participar da pesquisa, ou dela se afastar a qualquer momento, sem que venha a sofrer qualquer perda de benefícios ou penalidades por parte das instituições de pesquisa.

Os pesquisadores se obrigam a não revelar sua identidade em nenhuma circunstância. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos. Todos os dados colhidos para a avaliação clínico-epidemiológica estarão codificados no computador, sob sigilo, não permitindo sua identificação.

Se você tiver quaisquer questões futuras sobre sua participação ou a de seu filho, neste estudo, ou sobre seus direitos ou os de seu filho como participante desta pesquisa, por favor, entre em contato com o Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 3356-4620 ou Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos, coordenador do projeto, telefone: (71) 3176-2209

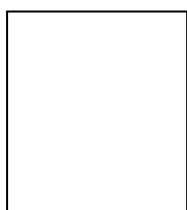
Consentimento: Eu ouvi e entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram devidamente respondidas. Sendo assim, eu voluntariamente, concordo em participar do estudo:

---

Assinatura do participante do estudo

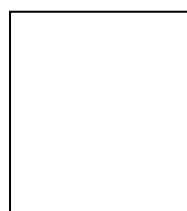
---

Data



Impressão digital do participante do estudo

Eu ouvi e entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram respondidas. Eu voluntariamente concordo que o paciente do qual sou responsável legal, participe deste estudo:



Impressão digital dos Pais ou Responsável

---

Assinatura dos Pais ou Responsável legal

---

Data

---

Assinatura da Testemunha

---

Data

---

Assinatura do Investigador

---

Data

## APÊNDICE B – Questionário

<b>QUESTIONÁRIO - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - CpGM / HOSPITAL SANTA IZABEL</b>			
NUMERO NO ESTUDO	<input type="text"/>	ENTREVISTADOR	<input type="text"/>
DATA DA AVALIAÇÃO:	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>		
<b>PARTE 1 - DADOS GERAIS</b>			
1.1- Nome:	<input type="text"/>	Tel contato ( )	<input type="text"/>
1.2 Data de nascimento	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>		
1.3 Procedência	<input type="text"/> Capital <input type="text"/> Interior		
1.4- Ocupação principal	<input type="text"/>		
1.5- Escolaridade	<input type="text"/>		
<b>PARTE 2 - ENTREVISTA</b>			
2.1- Qual(is) dos seguintes sintomas costuma apresentar?			
<input type="checkbox"/>	rouquidão	<input type="checkbox"/>	"bolo" na garganta
<input type="checkbox"/>	episódios de perda vocal	<input type="checkbox"/>	engasgos
<input type="checkbox"/>	cansaço vocal	<input type="checkbox"/>	pigarro
<input type="checkbox"/>	secura na garganta	<input type="checkbox"/>	azia / queimação
<input type="checkbox"/>	ardor na garganta	<input type="checkbox"/>	coceira na garganta
<input type="checkbox"/>	dificuldade ao engolir	<input type="checkbox"/>	coriza
<input type="checkbox"/>	regurgitação	<input type="checkbox"/>	espirros
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	coceira no nariz
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	obstrução nasal
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	falta de ar
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	chiado no peito
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	tosse
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	dor no peito
2.2- Sua voz sofreu alguma modificação?			
<input type="checkbox"/>	não	<input type="checkbox"/>	Sim. Se sim a quanto tempo ? <input type="text"/> meses
2.3- Se <b>sim</b> , como foi o início?			
<input type="checkbox"/>	súbito	<input type="checkbox"/>	progressivo <input type="text"/> desde infância
2.4- Se sim qual a frequência ?			
<input type="checkbox"/>	diária	<input type="checkbox"/>	semanal <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	mensal <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	trimestral <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	anual
2.5- A sua voz o atrapalha de exercer seu trabalho ?			
<input type="checkbox"/>	não atrapalha	<input type="checkbox"/>	prejudica, porém não impede <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	impede
2.6- Tem algum(ns) desses diagnósticos firmados?			
<input type="checkbox"/>	rinite ou sinusite	<input type="checkbox"/>	doença tireoidiana
<input type="checkbox"/>	asma	<input type="checkbox"/>	refluxo ou gastrite
<input type="checkbox"/>	tuberculose	<input type="checkbox"/>	outras patologias <input type="text"/>
2.7- Tem algum grau de perda auditiva?			
<input type="checkbox"/>	não	<input type="checkbox"/>	sim <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	não sei
2.8- Já realizou alguma cirurgia no pescoço?			
<input type="checkbox"/>	não	<input type="checkbox"/>	sim, especificar <input type="text"/>
2.9- Já teve algum trauma no pescoço?			
<input type="checkbox"/>	não	<input type="checkbox"/>	sim, especificar <input type="text"/>
2.10- É respirador bucal noturno?			
<input type="checkbox"/>	não	<input type="checkbox"/>	sim <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	não sei
2.11 - Ronca frequentemente ?			
<input type="checkbox"/>	sim	<input type="checkbox"/>	não
2.12 Sua qualide de sono é:			
<input type="checkbox"/>	boa	<input type="checkbox"/>	regular <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	ruim
2.13- Possui alguma enfermidade que exija cuidados permanentes:			
<input type="checkbox"/>	não	<input type="checkbox"/>	sim, especificar <input type="text"/>
2.14- Faz uso de algum medicamento de uso contínuo:			
<input type="checkbox"/>	não	<input type="checkbox"/>	sim, especificar <input type="text"/>
2.15 Apresenta alguma dor em região pré-auricular (ATM) ao mastigar ou ao falar ?			
<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Sim. Se sim a quanto tempo? <input type="text"/> meses
2.16- Se sim qual a frequência ?			
<input type="checkbox"/>	diária	<input type="checkbox"/>	semanal <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	mensal <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	trimestral <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	anual
2.17 Sente estalido em região pre-auricular ao falar ou ao mastigar ?			
<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Sim. Se sim a quanto tempo? <input type="text"/> meses

PARTE 3 - HÁBITOS E QUALIDADE DE VIDA			
3.1- Em termos de tensão, estresse e ansiedade, você se qualifica como sendo uma pessoa:			
<input type="checkbox"/>	tranquila	<input type="checkbox"/>	moderadamente tensa e ansiosa
<input type="checkbox"/>	um pouco tensa e ansiosa	<input type="checkbox"/>	muito tensa e ansiosa
3.2-Tem como hábito diariamente:			
<input type="checkbox"/>	falar muito		
<input type="checkbox"/>	falar alto		
<input type="checkbox"/>	gritar		
<input type="checkbox"/>	cantar		
<input type="checkbox"/>	falar em ambiente ruidoso		
<input type="checkbox"/>	ar condicionado		
<input type="checkbox"/>	tomar alimentos gelados		
<input type="checkbox"/>	tomar alimentos muito quentes		
3.3- Com relação ao tabagismo, você:			
<input type="checkbox"/>	nunca fumou		
<input type="checkbox"/>	é ex-fumante		
<input type="checkbox"/>	é fumante		
3.4- Se <b>ex-fumante</b> :			
Fazia uso de:			
<input type="checkbox"/>	cigarro		
<input type="checkbox"/>	charuto		
<input type="checkbox"/>	cachimbo		
<input type="checkbox"/>	outro, especificar _____		
3.5 Fumou por quantos anos?	<input type="text"/>	meses	
3.6 Parou há quanto tempo?	<input type="text"/>	meses	
3.7 Fumava quantos cigarros (unidades) por dia?	<input type="text"/>		
3.8- Se <b>é fumante</b> :			
Faz uso de:			
<input type="checkbox"/>	cigarro		
<input type="checkbox"/>	charuto		
<input type="checkbox"/>	cachimbo		
<input type="checkbox"/>	outro, especificar _____		
Fuma há quantos anos?	<input type="text"/>		
Fuma quantos cigarros (unidades) por dia?	<input type="text"/>		
4- Faz uso de bebidas alcoólicas?			
<input type="checkbox"/>	não	<input type="checkbox"/>	sim
4.1.- Se <b>sim</b> , qual o consumo médio?			
<input type="text"/>	latas de cerveja/semana		
<input type="text"/>	doses de destilado/semana		
<input type="text"/>	taças de vinho/semana		
5- Faz uso de alguma droga psicoativa?			
<input type="checkbox"/>	não		
<input type="checkbox"/>	sim, especificar _____		
6- Pratica alguma atividade esportiva?			
<input type="checkbox"/>	não		
<input type="checkbox"/>	sim (ao menos 30 minutos ao dia, 3 vezes na semana)		
7- Hábitos e comportamentos			
7.1	<input type="text"/>	Vive com parceiro - 1=sim e 2=não	
7.2	<input type="text"/>	Idade de início de atividade sexual - anos	
7.3	<input type="text"/>	número de parceiros nos últimos 12 meses	
7.4	<input type="text"/>	número de parceiros nos últimos 24 meses	
7.5	<input type="text"/>	usa contraceptivos 1=sim, 2= não, 8= não se aplica	
7.6	<input type="text"/>	há quanto tempo usa contraceptivos - meses 8888= não se aplica	
7.7	<input type="text"/>	Já possuiu diagnóstico de dst 1= sim , 2=não	
7.8	<input type="text"/>	Se sim, quais-	
7.9	<input type="text"/>	Seu parceiro já possuiu diagnóstico de DST 1=sim e 2= não	
7.10	<input type="text"/>	Se sim, quais-	
8- Há quanto tempo possuía sintomas citados no item 2 do questionário	<input type="text"/>		
9- Há quanto tempo foi diagnosticada pailomatose de laringe	<input type="text"/>		
10- Há quanto tempo foi admitido neste serviço	<input type="text"/>		
11- Quantos médicos o avaliaram antes de chegar a este serviço	<input type="text"/>		
12- Quantas cirurgias necessitou realizar para tto da papilomatose	<input type="text"/>		
13- Qual o impacto da doença no relacionamento com pessoas desconhecidas	<input type="text"/>	0=nada a 4=completa	

## APÊNDICE C – Protocolo de Análise Histológica de Papilomas de Laringe, Cavidades

### Oral e Nasal

Caso Nº: \_\_\_\_\_ Local: ( ) Laringe ( ) Cavidade Nasal ( ) Cavidade Oral

1. MATERIAL PARA EXAME: ( ) Suficiente ( ) Insuficiente	9. DISCERATOSE: ( ) Ausente ( ) Discreta ( ) Moderada ( ) Intensa	17. QUANTIFICAÇÃO DA FIBROSE: ( ) Ausente ( ) Discreta ( ) Moderada ( ) Intensa
2. PAILOMATOSE: ( ) Ausente ( ) Discreta ( ) Moderada ( ) Intensa	10. EXOCITOSE: ( ) Ausente ( ) Discreta ( ) Moderada ( ) Intensa	18. INFILT. INFLAMATÓRIO POLIMORFONUCLEAR: ( ) Ausente ( ) Discreto ( ) Moderado ( ) Intenso
3. ACANTOSE: ( ) Ausente ( ) Discreta ( ) Moderada ( ) Intensa	11. EROSIÃO: ( ) Ausente ( ) Presente	19. INFILT. INFLAMATÓRIO MONONUCLEAR: ( ) Ausente ( ) Discreto ( ) Moderado ( ) Intenso
4. COILOCITOSE: ( ) Ausente ( ) Discreta ( ) Moderada ( ) Intensa	12. ULCERAÇÃO SUPERFICIAL: ( ) Ausente ( ) Discreta ( ) Moderada ( ) Intensa	20. PROLIFERAÇÃO PEQ. VASOS SANGUÍNEOS: ( ) Ausente ( ) Discreta ( ) Moderada ( ) Intensa
5. VACUOLIZAÇÃO CELULAR NÃO COILOCITÓTICA: ( ) Ausente ( ) Discreta ( ) Moderada ( ) Intensa	13. ULCERAÇÃO PROFUNDA: ( ) Ausente ( ) Discreta ( ) Moderada ( ) Intensa	21. DIAGNÓSTICO FINAL: ( ) Papiloma ( ) Papilomatose
6. HIPERCERATOSE: ( ) Ausente ( ) Discreta ( ) Moderada ( ) Intensa	14. LESÕES PRÉ-MALIGNAS: ( ) Ausente ( ) Displasia discreta ( ) Displasia moderada ( ) Displasia intensa ( ) Carcinoma “ <i>in situ</i> ”	22. POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM HPV: ( ) Sim ( ) Não
7. GRÂNULOS DE CERATO-HIALINA: ( ) Ausente ( ) Discreta ( ) Moderada ( ) Intensa	15. QUANTIDADE DE LÂMINA PRÓPRIA: ( ) Suficiente ( ) Insuficiente	
8. PARACERATOSE: ( ) Ausente ( ) Discreta ( ) Moderada ( ) Intensa	16. EDEMA: ( ) Ausente ( ) Discreta ( ) Moderada ( ) Intensa	

### APÊNDICE D – Protocolo de Análise Imunohistoquímica

CASO Nº: \_\_\_\_\_ Local: ( ) Cavidade Nasal ( ) Cavidade Oral ( ) Laringe Infiltrado Inflamatório: Mononuclear (Ausente/ Discreto/ Moderado/ Intenso) Polimorfonuclear (Negativo/ Discreto/ Moderado/ Intenso).

Anticorpos	0 – 3+	Local (Mb, N, C)	Intensidade (F, Md, I)	Distribuição (Foc, Dif)	Observações
CD1a					
CD3					
CD4					
CD8					
CD15					
CD20					
CD68					
CD117					
VS38					
Ki67					
Vimentina					

Obs.: 0: negativo (0 - 5% células +); 1+: discreto (>5% e <25% de células +); 2+: moderado (26-50% de células +); 3+: intenso (>50% células +). Local da reação: Mb- padrão membranar; N- padrão nuclear; C- padrão citoplasmático. Intensidade da reação: F- fraco, Md- médio, I- intenso.

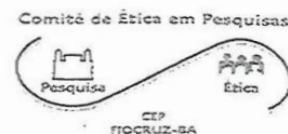
**ANEXOS**



## ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA CPqGM/FIOCRUZ.



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz



Comitê de Ética em Pesquisa – CPqGM/FIOCRUZ

### PARECER Nº 196/2009

**Protocolo: 299**

**Projeto de Pesquisa:** “Papilomatose de vias aéreas superiores: associação da resposta imunológica com aspectos clínicos, epidemiológicos, morfológicos e moleculares da infecção por HPV”.

**Pesquisador Responsável:** Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos

**Instituição ou Departamento:** LPBM/CPqGM-FIOCRUZ

**Considerações:**

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados ao responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32-04/97), com base na Resolução 196/96 e suas complementares, julga **aprovado** o projeto supracitado.

O CEP/CPqGM-FIOCRUZ especifica, abaixo, o período de vigência, bem como, determina as datas para o envio dos relatórios semestral e final, referentes ao desenvolvimento do protocolo de pesquisa aprovado.

**Vigência:** 21/08/2009 a 21/08/2012.

**Envio do Relatório Anual em:** 21/08/2010 – 21/08/2011.

**Relatório Final:** 21/09/2012.

*The present study, entitled “Papilomatose de vias aéreas superiores: associação da resposta imunológica com aspectos clínicos, epidemiológicos, morfológicos e moleculares da infecção por HPV” (protocol number 299) has been approved by the Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ (IORG00002090 / IRB000026120) in August 21<sup>th</sup> 2009 meeting. The protocol and procedures presented in the project are in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human subject (institutional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. In the present version, this project is licensed and valid until August 21<sup>th</sup> 2012.*

Salvador, 21 de agosto de 2009.

Dr<sup>a</sup> Maria Fernanda Rios Grassi  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
CPqGM/FIOCRUZ  
IORG-0002090 / IRB-00002612