



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**VIVIAN NARANA RIBEIRO EL ACHKAR**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA DA PAPILOMATOSE  
LARÍNGEA**

2018

**VIVIAN NARANA RIBEIRO EL ACHKAR**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA DA PAPILOMATOSE LARÍNGEA**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Profa. Adj. Estela Kaminagakura Tango

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

El Achkar, Vivian Narana Ribeiro  
Caracterização clínico-patológica da papilomatose laríngea / Vivian Narana Ribeiro El Achkar. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.  
65 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.  
Orientador: Estela Kaminagakura Tango.

1. Papilomatose laríngea. 2. Papilomavírus humano. 3. Epidemiologia. 4. Imunologia. I. Tango, Estela Kaminagakura, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

### **Profa. Adj. Estela Kaminagakura Tango (Orientadora)**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)  
Instituto de Ciência e Tecnologia  
Campus de São José dos Campos

### **Prof. Adj. Ana Lia Anbinder**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)  
Instituto de Ciência e Tecnologia  
Campus de São José dos Campos

### **Prof. Adj. Alfredo Ribeiro Silva**

Universidade de São Paulo (USP)  
Faculdade de Medicina  
Campus de Ribeirão Preto

### **Profa. Dra. Laura Sichero**

Universidade de São Paulo (USP)  
Instituto do Câncer do Estado de São Paulo  
Campus de São Paulo

### **Profa. Dra. Silvana Pasetto**

Faculdade Anhanguera  
Kroton Educacional  
Campus de Campinas

São José dos Campos, 17 de janeiro de 2018.

## DEDICATÓRIA

*A Deus: meu guia e protetor.*

*A minha família: minha luz, minha paz, meu tudo.*

*Aos futuros mestres e doutores.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, minha segunda casa, há 12 anos. Na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara e da vice-diretora Prof. Adj. Rebeca Di Nicoló.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira. Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À Profa. Estela Kaminagakura Tango, pela orientação e dedicação, pela amizade e paciência constante. Obrigada pela confiança e por estimular meu crescimento e a vontade de fazer melhor.

Aos professores da banca, pelo tempo dedicado a este momento e pelas contribuições científicas que enriquecem o trabalho e impulsionam sua publicação. Obrigada!

À Profa. Ana Lia Anbinder, pelo convívio, aprendizado e parceria nas publicações.

Aos professores-colaboradores deste trabalho, dos diversos centros de pesquisa: USP-RP, UNIFESP, CCCC-Guatelama. Que possibilitaram a coleta das amostras e a realização de parte deste trabalho: Prof. Alfredo Ribeiro Silva, Prof. Jorge Esquiche León, Profa. Shirley Pignatari e Prof. Román Carlos.

Às professoras, aos colegas e pacientes participantes da clínica de Propedêutica Estomatológica. À equipe formada pela Profa. Estela e seus orientados. Aos alunos de iniciação científica. Agradeço a todos a oportunidade de aprender e de dividir a rotina da pós-graduação com vocês.

Aos funcionários da Universidade, da secretaria de Pós-graduação, aos técnicos de laboratório, especialmente, ao Walter Cruz, obrigada! À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho. Aos técnicos da clínica de Propedêutica, especialmente ao Sérgio Alves. Todos tão essenciais no dia-a-dia.

À CAPES pela concessão de bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela

concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a realização deste trabalho e dos próximos desta linha de pesquisa.

Aos meus colegas/amigos de curso: Victor, Camila, Fernanda, Elis, Milagros, Ligia, Noala, Renata, Adriana e Celso. Meus parceiros dessa jornada que tornaram leves os momentos difíceis, cada um a sua maneira. Nós dividimos uma sala, cafés, microscópios, artigos, desabafos, experimentos, felicidades, estatísticas, angústias, alegrias, enfim, um pedaço generoso da vida. Obrigada por tudo!

Aos colegas de apartamento e aos amigos que fiz em São José dos Campos, especialmente ao Jonas Fulindi, que me ajudou a compreender cada momento dessa jornada.

Aos meus bons amigos. Amigos que me acompanharam de perto e de longe, que perdoaram minha ausências e me apoiaram: obrigada! Ao meu querido Luiz Garcia Jr, que me ajudou e incentivou muito nos últimos meses.

Aos amigos do tempo de graduação, aos mais recentes e aos mais antigos também! Alguns nos entendem melhor do que outros e tem aqueles que não precisamos falar, com um olhar nos decifram. Obrigada, Felipe Eduardo de Oliveira!

Ao meu grande amigo, Prof. Tit. Walter Niccoli Filho, obrigada pelo carinho e apoio, meu grande professor, da faculdade para a vida!

Nestes últimos parágrafos, deixo meus maiores agradecimentos. A Deus pela minha vida, como ela é, e pela oportunidade de chegar até aqui. A Ele, peço forças para daqui pra frente continuar e fazer mais e melhor.

A minha família: Jamil, Náira, Flávia, Elaine, Gilson, Renato, Karina, Luna, Mateus e Rafaela. Aos meus pais: é difícil ter palavras pra descrever tanta gratidão, foram tantas as vezes que precisei de apoio e compreensão, que nunca hesitaram em me dar. Aos meus irmãos e agregados que sempre me motivaram, entenderam as minhas faltas e momentos de tensão. E aos meus sobrinhos, por levarem alegria e felicidade aonde vão. Obrigada por tudo, por acreditarem neste sonho e serem a fonte de energia para realizá-lo. Amo vocês!

*"Não sou nada.  
Nunca serei nada.  
Não posso querer ser nada.  
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo."*

**Álvaro de Campos**



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>15</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 Coleta de dados e amostras</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 Construção do Tissue micro-array (TMA)</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3 Imuno-histoquímica</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4 Contagem de células</b> .....	<b>20</b>
<b>3.5 Análise estatística</b> .....	<b>21</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1 Estudo clínico e epidemiológico</b> .....	<b>22</b>
<b>4.2 Comparação histopatológica dos grupos PLJ e PLA</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3 Estudo clínico e histopatológico dos sub-grupos &lt;20 e ≥20</b> .....	<b>30</b>
<b>4.4 Correlações das células inflamatórias e as características clínicas e   histológicas</b> .....	<b>32</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>62</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>63</b>

El Achkar VNR. Caracterização clínico-patológica da papilomatose laríngea [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

## RESUMO

A papilomatose laríngea (PL) é uma doença rara e grave, dividida em dois grupos: juvenil (PLJ) e adulta (PLA), ambas causadas pelo papilomavírus humano (HPV). Seu curso pode ser agressivo, com inúmeras recidivas, risco de malignização, disseminação pulmonar e obstrução das vias aéreas. Para identificar os casos mais agressivos e nortear os tratamentos foram desenvolvidas escalas laringoscópicas, dentre elas; a escala desenvolvida por Derkay et al. (1998). O objetivo deste projeto foi caracterizar a PL e correlacionar suas características clínico-patológicas com a escala laringoscópica de Derkay. Os dados e biópsias de 36 pacientes com PLJ e 56 com PLA foram coletados e analisados por meio da microscopia de luz. Os pacientes foram separados em grupos de acordo com os índices de Derkay:  $\geq 20$  para os mais agressivos e  $< 20$  para os casos menos agressivos. Foram realizadas reações de imuno-histoquímicas anti- Fator XIIIa, CD3, CD4, CD8, CD15, CD20, CD68, FoxP3 e MUM-1. As células inflamatórias foram quantificadas. Todas as características clínico-patológicas e os resultados da reação imuno-histoquímica encontrados foram comparados entre os grupos propostos através do teste estatístico de Qui-Quadrado e correlacionados através do teste de correlação de *Spearman*. O nível de significância considerado foi de 5%. Ao comparar a severidade entre os grupos PLJ e PLA, o grupo PLJ foi considerado mais agressivo ( $P=0,02$ ). Os pacientes entre as amostras com *score*  $\geq 20$  apresentaram maior incidência de traqueostomia e dificuldade respiratória grave. As displasias de alto grau foram associadas à presença de células FatorXIII+ e CD68+ ( $P<0,05$ ) e tanto para PLJ quanto para PLA não houve associação destas displasias com a severidade ( $P=0,55$  e  $P=0,87$ , respectivamente). A média do índice de Derkay para as amostras com mitoses acima da camada basal e atípicas foi  $10,65 (\pm 5,93)$ , maior do que a média das amostras que não apresentavam esta característica ( $8,02 \pm 4,64$ ), sendo estatisticamente significativa ( $P=0,03$ ). Amostras de PLA apresentaram maior quantidade de células CD3+, CD8+ e MUM1+ ( $P<0,05$ ). A presença de CD15+ é diretamente proporcional ao índice de Derkay ( $P<0,05$ ), enquanto MUM-1 é inversamente proporcional ( $P=0,01$ ). Baseados nestes resultados, conclui-se que a PL é mais severa no pacientes jovens; mitoses atípicas e nas camadas mais superiores do epitélio foram mais frequentes na PLJ e estas foram correlacionadas com a maior severidade. As células inflamatórias também foram relacionadas a severidade e diferiram entre os grupos PLJ e PLA.

Palavras-chave: Papilomatose laríngea. Papilomavírus humano. Epidemiologia. Imunologia.

El Achkar VNR. *Clinical-pathological characterization of laryngeal papillomatosis*. [doctored thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

## **ABSTRACT**

Laryngeal papillomatosis (LP) is a rare and serious disease, divided into two groups: juvenile (JLP) and adult (ALP), both caused by the human papillomavirus (HPV). Its course can be aggressive, with numerous relapses, risk of malignancy, pulmonary dissemination and airway obstruction. To identify the most aggressive cases and guide the treatments, laryngoscopic scales were developed, among them; the scale developed by Derkay et al. (1998). The objective of this project was to characterize LP and to correlate its clinical-pathological characteristics with Derkay's laryngoscopic scale. The data and biopsies of 36 patients with JLP and 56 patients with ALP were collected and analyzed by light microscopy. The patients were separated into groups according to the Derkay indices:  $\geq 20$  for the most aggressive and  $< 20$  for the less aggressive cases. Anti-Factor XIIIa, CD3, CD4, CD8, CD15, CD20, CD68, FoxP3 and MUM-1 immunohistochemical reactions were performed and the inflammatory cells were quantified. All the clinical-pathological characteristics and the results of the immunohistochemical reaction were compared between the groups proposed using the Chi-Square test and correlated through the Spearman correlation test. The significance level considered was 5%. When comparing aggressivity between the JLP and ALP groups, the JLP group was considered more aggressive ( $P = 0.02$ ). Patients among the samples with score  $\geq 20$  had a higher incidence of tracheostomy and severe respiratory distress. High-grade dysplasias were associated with the presence of Factor XIII+ and CD68+ cells ( $P < 0.05$ ), and for both JLP and ALP there was no association of these dysplasias with aggressivity ( $P = 0.55$  and  $P = 0.87$ , respectively). The mean of the Derkay index for the samples with mitoses above the basal and atypical layer was  $10.65 (\pm 5.93)$ , higher than the mean of the samples that did not show this characteristic ( $8.02 \pm 4.64$ ), ( $P = 0.03$ ) being statistically significant. The ALP samples showed higher quantities of CD3+ cells, CD8+ and MUM1+ ( $P < 0.05$ ). The presence of CD15+ is directly proportional to the Derkay index ( $P < 0.05$ ), while MUM-1 is inversely proportional ( $P = 0.01$ ). Based on these results, it is concluded that LP is more aggressive in young patients; atypical mitoses and in the uppermost layers of the epithelium were more frequent in JLP and these were correlated with aggressivity. Inflammatory cells were also related to aggressiveness and differed between the groups PLJ e PLA.

**Keywords:** Laryngeal papillomatosis. Human papillomavirus. Epidemiology. Immunology.

## 1 INTRODUÇÃO

A papilomatose laríngea (PL) é uma doença grave que pode acarretar dificuldade respiratória com risco de óbito por obstrução das vias aéreas (Aaltonen et al., 2002). É considerada a manifestação clínica mais importante da infecção de laringe por papiloma vírus humano (HPV) (Aaltonen et al., 2002), sendo os tipos 6 e 11 de baixo risco de malignidade, os mais frequentes nos casos de PL recorrente (Gerein et al., 2005). Pode ocorrer em duas formas clínicas: juvenil (PLJ) e adulta (PLA), sendo a primeira de ocorrência, predominantemente, antes dos 5 anos de idade e sem preferência por sexo, e a segunda, prevalente em pacientes do sexo masculino de 20 à 40 anos de idade (Richardson et al., 2017).

Os papilomas laríngeos de início juvenil são associados aos HPVs transmitidos por via vertical de uma mãe com infecção anogenital ativa ou latente, embora o parto cesariano não proteja a criança contra a doença (Gale et al., 2005). Para a PLA existe a hipótese de transmissão orogenital, que é baseada no fato de que a papilomatose da laringe e os condilomas genitais apresentam os mesmos HPVs nas infecções associadas, HPVs 6 e 11, sendo o tipo 6 o mais frequente (Auborn et al., 1994; Aaltonen et al., 2002; Vancurova et al., 2002) embora o 11 seja o mais agressivo (Mounts, Kashima, 1984; Sanchez et al., 2012).

Heinzel et al. (1995) constataram a existência de variantes moleculares de HPV-6, através da avaliação da sequência nucleotídica de isolados de diversas regiões do mundo, porém não foi observada distribuição diferencial destas variantes ao redor do mundo. Entretanto, foi constatada maior prevalência de variantes do ramo B1 de HPV-6 em lesões no órgão genital feminino, comparado com sua presença em lesões na laringe, o que pode refletir uma diferença biológica na interação entre os vírus e os epitélios de diferentes mucosas (Godinez et al, 2014). Em papilomatose laríngea recorrente os tipos de HPV de baixo risco, 6 e 11, estiveram presentes em todas as amostras do estudo de Makiyama et al. (2013) e em 62% nos estudos de Davids et al. (2014).

A identificação dos tipos de HPV pode fornecer respaldo científico para incluir ou não a prevenção de papilomatose laríngea nos programas de vacinação contra esses tipos do vírus, protegendo, principalmente, as mulheres e,

subseqüentemente, reduzindo a incidência de papilomatose laríngea juvenil (Freed, Derkay, 2006). Para os câncer cervical, já foi comprovada a eficácia da vacina nove-valente contra o HPV (tipos: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58). Os resultados de um estudo demonstraram que esta pode, potencialmente, fornecer uma cobertura mais ampla e prevenir 90% dos casos de câncer cervical em todo o mundo (Huh et al., 2017). Porém, mais estudos devem ser direcionados a esta relação, visto que alguns autores não indicam a vacina contra HPV para prevenção de lesões em região de cabeça e pescoço (Wiezerbick et al., 2014).

Microscopicamente, a PL é caracterizada por múltiplos papilomas, descritos pela proliferação do epitélio escamoso estratificado queratinizado, disposto em projeções digitiformes com centros de tecido conjuntivo fibrovascular. A hiperqueratose é mínima. Ocasionalmente, alguns papilomas demonstram hiperplasia da camada basal e atividade mitótica elevada, o que pode fazer com que a lesão seja inadequadamente associada à um grau de displasia epitelial. Coilocitos, células epiteliais claras alteradas pelo vírus com o núcleo pequeno e intensamente corados (picnóticos), são algumas vezes observados nas porções mais altas da camada espinhosa (Gale et al., 2005; Davids et al., 2014). Também pode haver a presença de disqueratose individual das células (Gale et al., 2005). Os eixos de tecido conjuntivo podem apresentar alteração inflamatória, dependendo da quantidade de trauma ao qual é submetida (Gale et al., 2005).

A remissão da PL pode ocorrer espontaneamente, porém, na maioria dos casos é progressiva (Omland et al., 2014a). A progressão dos papilomas é lenta, gerando uma sintomatologia progressiva de dificuldade respiratória, disfonia e tosse persistente (Vancurova et al., 2002). Sua progressão pode acarretar obstrução da via aérea e a disseminação pulmonar, ambas as consequências fatais (Aaltonen et al., 2002). A raridade da doença pode retardar o diagnóstico médico levando a tratamentos inadequados (Fasunla, Lasisi, 2009). Geralmente, 100% das crianças apresentam sintomas 2 anos antes do diagnóstico de PLJ (Harris et al., 2012); sendo cinco, dentre sete crianças, tratadas para a asma. O diagnóstico tardio tem inúmeros efeitos sobre a criança como o defeito na voz, o que pode levar à diminuição do engajamento em atividades que envolvam a comunicação (Albert et al., 2008). A papilomatose juvenil pode ter sua remissão espontânea, mas tende a ser progressiva, podendo levar a morte por asfixia. Estudos ressaltam a importância

de garantir que as crianças recebam uma alimentação adequada e tenham um estilo de vida saudável para prevenir a recorrência da doença após o tratamento (Louw, Claassen, 2008; Seedat et al., 2010), visto que há correlação entre a baixa ingestão do ácido fólico com a infecção pelo HPV e a baixa ingestão de zinco ao risco de recidivas devido ao comprometimento do sistema imune. A terapia com ácido fólico como adjuvante evita a papilomatose recorrente, juntamente ao ácido linoléico e o ácido eicosapentaenoico, podem melhorar o prognóstico dos pacientes (Louw, Claassen, 2008).

Transformações malignas das papilomatoses laringeas foram descritas em cerca de 1-5% dos casos (Hobbs, Birchall, 2004; Richardson et al., 2017). Shetty et al. (2013) relataram um caso raro de disseminação de PLJ que progrediu para carcinoma de esôfago. O HPV-11 foi considerado o mais prevalente nestas lesões (Hobbs, Birchall, 2004). Entretanto, o HPV-6 pode ser integrado ao gene AKR1C3 no cromossomo 10p15.1 em associação à deleção da região cromossômica 10p14-p15.2 e silenciamento deste gene, como foi observado no estudo de um caso de malignização (Huebbers et al., 2013). Estes eventos foram muitos similares aos que ocorrem com os HPVs de alto risco, visto que este gene codifica uma hidroxisteróide desidrogenase envolvida na regulação das concentrações locais de andrógenos e estrogênios, particularmente em tecidos como próstata, mama e endométrio (Penning, Byrns, 2009). Já foi demonstrado que os níveis de proteína AKR1C1 e AKR1C3 são regulados positivamente sob a influência da proteína E6 HPV16 e são modulados pela proteína 16E6\*I em câncer de colo do útero, implicando um papel distinto das AKR1Cs na carcinogênese relacionada ao HPV (Wanichwatanadecha et al., 2012).

Os tratamentos incluem a utilização de aciclovir, cidofovir, laser CO<sub>2</sub>, microdebridação e coagulação com plasma de argônio e interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), e, apresentam resultados variáveis (Snoeck et al., 1982; Preuss et al., 2007; Pudzuhn et al., 2007). O interferon- $\alpha$  é administrado, especialmente para crianças, porque nestes casos em particular, a PL é mais severa que nos casos adultos, com recidivas frequentes e possibilidade da migração do vírus para as partes inferiores do trato respiratório. O objetivo do tratamento é manter as vias aéreas livres e a qualidade da voz (Thompson, 1997).

Existem escalas que auxiliam desde o planejamento quanto na avaliação da

eficácia dos tratamentos, baseadas na severidade da doença como por exemplo: Voice Handicap Index-10 (VHI-10) (Rosen et al., 2004), *Roughness, Breathiness, Asthenia, Strain* (GRBAS) (Kuet, Pitman, 2013) e a escala laringoscópica de Derkay et al. (1998). Uma revisão sistemática demonstrou que a escala laringoscópica de Derkay é a segunda mais utilizada nos estudos da PL, sendo que o método mais utilizado é o visual (Drejet et al., 2017). A escala laringoscópica de Derkay baseia-se nos dados clínicos como: dificuldade respiratória, urgência cirúrgica, alterações na voz e localização do tumor, para obter uma pontuação. Sendo assim, utilizando-se da escala de Derkay et al. (1998), os casos clínicos de papilomatose podem ser diferenciados entre mais agressivos ou menos agressivos. Tal método foi utilizado no presente estudo, para correlacionar as características clinicopatológicas e a severidade da doença.

Os revestimentos mucosos, como da laringe, por exemplo, estão expostos a vários carcinógenos nutricionais e ambientais, determinantes de lesões tumorais decorrentes de efeitos da infecção pelo HPV e mutagênese (Villiers et al., 1985; Scully, 2002). A colonização da orofaringe por HPV pode ocorrer, provavelmente, devido à justaposição entre o epitélio escamoso estratificado e o tecido linfático semelhante ao do trato genital (El-Mofty, Lu, 2003; Kreimer et al., 2005; Heck et al., 2010), invaginação de criptas que promovem ampla superfície epitelial e mucosa não queratinizada que facilita o acesso viral às células basais (Kreimer et al., 2005; Heck et al., 2010). Adicionalmente, receptores de membrana com afinidade específica para moléculas virais podem estar presentes nestas regiões (Godinez et al., 2014).

As células dendríticas detêm a capacidade de serem ativadas pelo HPV (Kovalenko et al., 2009). Um subtipo de células dendríticas (DC) migratórias, as Células de Langerhans (LC), são especializadas na captação, transporte, processamento e apresentação de antígenos às células T. Na PL recorrente, a LC imatura (LCi) é caracterizada pela expressão positiva de CD1a e langerina (CD207) e expressão negativa de CD14 e CD83 (DeVoti J et al., 2014). Nos achados de Kovalenko et al. (2009), a severidade da PL foi correlacionada à maior quantidade de DC maduras CD83+ no epitélio, podendo ser uma evidência do comprometimento da migração dessas células com sua retenção na camada epitelial.

A resposta das LCi pode estar diminuída nos papilomas, pois os HPVs

podem interferir na liberação de IL-36 $\gamma$  a partir dos queratinócitos infectado (DeVoti J et al., 2014). A diminuição da liberação de IL-36 $\gamma$  está correlacionada com o fenótipo mais agressivo da PL por contribuir para a ineficiência da resposta imune adaptativa contra o vírus (DeVoti J et al., 2014). Na PL, o desequilíbrio entre a resposta imune Th-1 e Th-2 pode contribuir para a persistência da infecção e recorrência da doença (DeVoti JA et al., 2008). Sabe-se que a interação entre a neoplasia e o microambiente tumoral é muito mais dinâmica e complexa do que previamente sugerido. As células neoplásicas produzem vários fatores que interagem com as células vizinhas e modulam suas funções em sua própria vantagem (Katara et al., 2014).

Notando o importante papel da inflamação, ou a escassez desta, relacionada à referida doença, este projeto visa identificar possíveis diferenças na população de células inflamatórias, que secretam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, entre pacientes que apresentaram baixo e alto índice de Derkay et al. (1998). A escala foi utilizada também para comparar tanto as características clínicas, quanto as microscópicas, além de auxiliar na comparação entre a PL juvenil e adulta.

Os resultados podem contribuir para detectar fatores prognósticos, que levam ao reconhecimento precoce de casos agressivos, determinando também possíveis causas que levam ao comportamento variado desta doença que pode ocorrer em casos isolados, múltiplas recidivas ou remissão espontânea.



## **2 PROPOSIÇÃO**

### **2.1 Objetivo geral**

Descrever as características clínicas e microscópicas da PL e determinar possíveis fatores prognósticos, que contribuem para sua severidade, desde o seu diagnóstico.

### **2.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos serão:

- Analisar a expressão proteica das células inflamatórias na PLJ e PLA (Fator XIIIa, CD3, CD4, CD8, CD15, CD20, CD68, FoxP3 e MUM-1);
- Correlacionar os dados clínico-patológicos e os resultados imuno-histoquímicos com a severidade determinada pela escala laringoscópica de Derkay et al. (1998).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto está aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa sob o protocolo: CAAE: 50419615.1.0000.0077 no Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP (ANEXO A). Foi contemplado pelo auxílio FAPESP processo 2016/24019-0.

#### 3.1 Coleta de dados e amostras

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa, amostras retrospectivas de PLJ e PLA foram coletadas em diferentes centros: 3 amostras do Ambulatório de Otorrinolaringologia Pediátrica da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP, 70 da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP e 19 do Centro Clínico de Cabeza y Cuello da Guatemala. Totalizando 36 amostras de PLJ e 56 amostras de PLA, sendo 46 do Brasil e 10 da Guatemala (Tabela 1), o período da coleta das amostras abrange desde 1997 ao ano de 2016.

Foram incluídas amostras cujos blocos parafinados das biópsias ou peças cirúrgicas estavam disponíveis e aquelas que os dados necessários constavam em prontuários clínicos e laudos. Os dados clínicos tais como: idade, sexo, localização das lesões, recidivas, sinais e sintomas foram coletados a partir dos prontuários médicos dos pacientes. Pacientes com idade  $\geq 16$  anos foram incluídos no grupo de PLJ e  $>16$  anos no grupo PLA (Hester et al., 2003).

Tabela 1 - Amostras coletadas nos países Brasil e Guatemala

<b>Grupos</b>	<b>Brasil</b>	<b>Guatemala</b>	<b>Total</b>
PLJ	27	9	36
PLA	46	10	56
Total	73	19	92

Fonte: Elaborada pela autora.

As lâminas de H&E, obtidas de biópsias ou peças cirúrgicas, foram

revisadas e descritas observando-se características tais como: morfologia da proliferação epitelial, coilocitose, disqueratose, mitoses, displasia epitelial e intensidade da inflamação. As displasias foram classificadas por 2 avaliadores independentes, submetidas ao teste de concordância e agrupadas em baixo e alto grau de malignidade de acordo com critérios de Gale et al. (2017):

- a) Displasia epitelial de baixo grau: atipias e anormalidades estruturais restritas ao terço inferior do epitélio, acompanhadas de poucas atipias celulares. Estratificação epitelial sem alterações, aumento da camada basal, raras mitoses e poucas células disqueratóticas;
- b) Displasia epitelial de alto grau: atipias e anormalidades estruturais a partir do terço médio do epitélio. Deve ser levado em consideração o grau de atipia citológica, mitoses acima da camada suprabasal e atípicas, células apoptóticas e disqueratóticas mais frequentes.

Além disso foi aplicada a escala laringoscópica de Derkay et al. (1998), para obter a pontuação (*score*) de cada caso, somente para os casos que continham todos os dados para a obtenção deste (APÊNDICE A). As amostras foram separadas em grupos para distinguir os casos de maior severidade ( $score \geq 20$ ) e menor severidade ( $score < 20$ ) (Hester et al., 2002; Matos et al., 2013) e compará-los histopatologicamente.

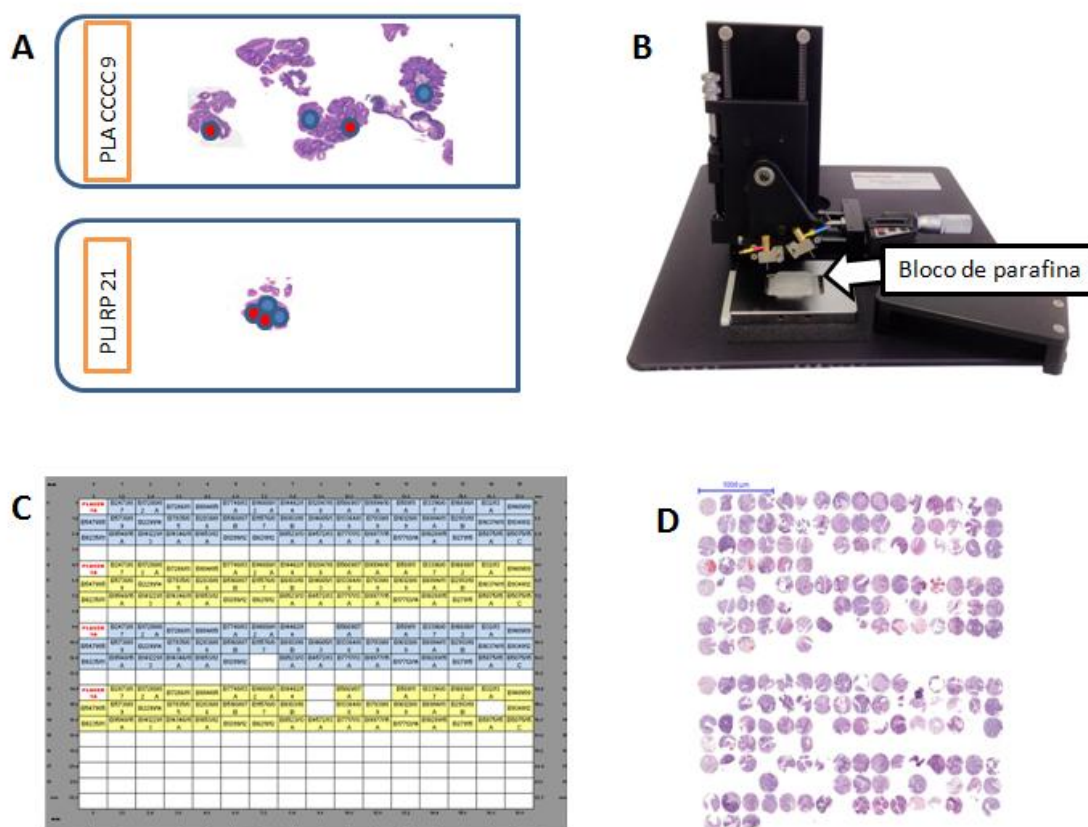
### **3.2 Construção do Tissue micro-array (TMA)**

Após a revisão morfológica de todos os casos encontrados, foram demarcadas regiões tumorais de pelo menos um bloco original de cada caso e foram selecionadas 4 áreas de cada caso, onde houvesse a área representativa para inflamação, assim discriminadas: predominantemente epitelial e, predominantemente, tecido conjuntivo subjacente.

Cilindros de tecido (cores) dos blocos de parafina originais (doadores) foram retirados com agulhas especiais de 1 mm de diâmetro e inseridos, de forma ordenada, em um bloco receptor de resina sintética (Histosec®, Merck), utilizando

um equipamento manual ou *arrayer* (Beecher Instrumedics, Microarray Technology) (Figura 1). Cortes de 4  $\mu\text{m}$  foram realizados a partir do bloco TMA, totalizando 20 cortes, recolhidos com o auxílio de filme aderente comercial (Instrumedics) e montados sobre lâminas comerciais com adesivo (Starfrost®, Instrumedics) e/ou carregadas positivamente (Superfrost Plus®, Erviegas). O tecido foi fixado através da exposição das lâminas à luz ultra-violeta por 15 minutos e o adesivo plástico foi removido com solvente não clorinado (TPC®, Instrumedics). As lâminas foram identificadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriormente se realizarem as reações imuno-histoquímicas.

Figura 1 - Demonstração das áreas seleccionadas e perfuradas para composição do TMA



Legenda: A) imagem demonstrando as demarcações feitas nas lâminas de H&E; em vermelho foram marcadas as áreas de tecido conjuntivo e em azul as áreas de epitélio, em seguida estas marcações foram espelhadas no bloco de parafina para sua perfuração; B) equipamento utilizado para confecção do bloco TMA, perfuração do bloco doador e inserção no bloco receptor (Beecher Instrumedics, Microarray Technology); C) mapa indicando os respectivos casos ordenados no bloco receptor; D) fotomicrografia em menor aumento da lâmina de TMA corada em H&E.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.3 Imuno-histoquímica

Das 20 lâminas obtidas a partir do TMA, 9 foram escolhidas de forma que os cortes selecionados foram: o primeiro, o vigésimo, o segundo, o décimo nono, o terceiro, o décimo oitavo e assim sucessivamente. Foram realizadas as reações imuno-histoquímicas para as proteínas a serem avaliadas em todos os casos coletados (Quadro 1).

Quadro 1 – Anticorpos e suas respectivas células a serem marcadas

<b>Anticorpo</b>	<b>Tipo de célula inflamatória</b>
CD3	Célula T
CD4	Célula T auxiliar
XIIIa	Células dendríticas
CD8	Célula T citotóxica
CD20	Células B
CD68	Macrófagos
CD15	Neutrófilos
MUM-1	Plasmócitos
FoxP3	Células T regulatórias

Fonte: Elaborado pela autora.

As lâminas de TMA silanizadas (Starfrost Knittel, Brasil) foram pré-aquecidas a 56°C durante 24 horas, desparafinizadas e re-hidratadas em soluções de etanol graduadas. A recuperação dos antígenos foi realizada numa panela de pressão Pascal (DakoCytomation, Dinamarca), à 125°C, por 4 minutos, em solução de ácido cítrico a 10 mM (pH 6,0) ou Trilogy (Cell Marque, Darmstadt, Germany). A peroxidase endógena foi bloqueada com 2 banhos de peróxido e hidrogênio 6%, 20 volumes (Merck, Brasil) durante 20 minutos cada à temperatura ambiente, seguido por uma lavagem com 10 mM de solução salina tamponada com fosfato (pH 7,4) durante 5 minutos. As incubações com os anticorpos primários contra: Fator XIIIa, CD3, CD4, CD8, CD15, CD20, CD68, FoxP3 e MUM-1 foram feitas nos tempos e diluições indicados no quadro 2. As reações foram desenvolvidas com EnVision

(Dako Cytomation, Dinamarca) e visualizadas usando o cromógeno DAB (diaminobenzidina, DakoCytomation, Dinamarca). Os cortes foram contrastados com hematoxilina de Mayer. Os controles positivos e negativos foram incluídos em todas as reações (Quadro 2).

Quadro 2 – Anticorpos primários utilizados, diluição, clone, controle positivo, controle negativo e marca

Anticorpo	Diluição	Clone	Controle positivo	Controle negativo	Fabricante
CD3	1:100	Policlonal	Tonsila	Placenta	DakoCytomation
CD4	1:500	4B12	Tonsila	Placenta	Leica Biosystems
XIIIa	1:100	E980.1	Placenta	Placenta	Leica Biosystems
CD8	1:100	C8/144B	Tonsila	Placenta	DakoCytomation
CD20	1:400	L26	Linfonodo	Placenta	DakoCytomation
CD68	1:3000	KP1	Tonsila	Placenta	DakoCytomation
CD15	1:40	BY87	Tonsila	Placenta	Leica Biosystems
MUM-1	1:100	EAU32	Tonsila	Placenta	Leica Biosystems
FoxP3	1:100	SP97	Tonsila	Placenta	Spring Bioscience

Legenda: DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca; Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha; Spring Bioscience, Pleasanton, Califórnia

Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.4 Contagem de células

A marcação membranosa e/ou citoplasmática e/ou nuclear foi quantificada pelo pesquisador, em contagem cega, sem o conhecimento da distinção dos grupos e amostras. As lâminas de TMA foram escaneadas, para isto foi utilizado o aparelho Panoramic DESK (3DHistech<sup>®</sup>, Budapest, Hungria). Para a contagem, foi utilizado o programa Panoramic Viewer (3DHistech<sup>®</sup>, Budapest, Hungria). Cinco áreas representativas foram escolhidas para a contagem em aumento de 40x. Para os resultados foram levados em consideração os números obtidos a partir da média desta contagem (Vorobjova et al., 2016; Du et al., 2017).

### 3.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no Software GraphPad Prism version 7.00 (La Jolla, California-USA). Os resultados finais foram apresentados com média, desvio padrão (DP) e porcentagem (%). As diferenças foram testadas pelo teste *t* ou q-quadrado ( $\chi^2$ ) e correlacionadas pelo teste de *Spearman*. Somente os resultados de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Estudo clínico e epidemiológico

A partir dos dados clínicos, para o grupo juvenil, obteve-se a idade média de 4,94 anos de idade, variando de 1 a 15 anos (Figura 2), com a ocorrência de 18 (50,00%) casos em pacientes do sexo masculino e 18 (50,00%) casos do sexo feminino (proporção de 1:1). Em 19 (57,57%) dos casos ocorreram recidivas, em 6 (18,18%) houve necessidade de realizar traqueostomia, 6 (16,67%) pacientes receberam algum tratamento adjuvante e 1 (2,78%) paciente estava recebendo tratamento para asma (Figura 3).

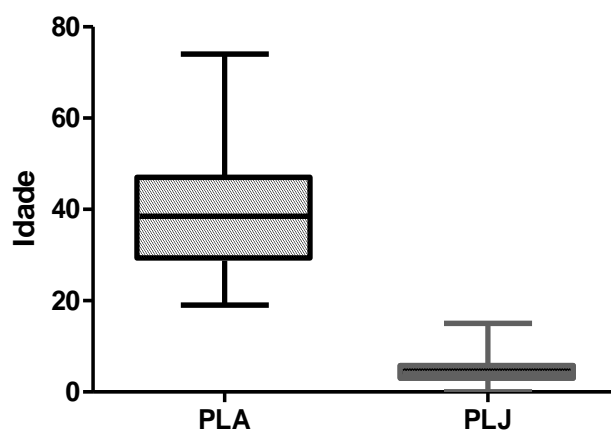
A média de idade do grupo adulto foi 41,62 anos, de 19 a 74 anos (Figura 2), 24 (50%) pacientes tinham mais de 40 anos, com a ocorrência de 41 (73,21%) casos em pacientes do sexo masculino e 15 (26,78%) casos no sexo feminino (proporção de 1:2,73). Ocorreram recidivas em 21 (45,65%) casos, em 2 (4,34%) casos houve necessidade de realizar a traqueostomia (Figura 3).

Em 1 (2,17%) caso ocorreu transformação maligna, em paciente do sexo masculino, aos 47 anos, com diagnóstico de PL e Carcinoma de Células Escamosas (CEC), simultaneamente, após apresentar 4 meses de sintomas. O paciente não era fumante e foi constatada presença de HPV de alto risco (16/18). Também entre os casos de pacientes adultos havia 2 (4,34%) casos em que os pacientes eram portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV).

As comparações entre as amostras dos países encontram-se na Tabela 2, onde nota-se que a incidência de PLA nas mulheres da Guatemala (60,00%) foi estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) maior do que no Brasil (19,57%).

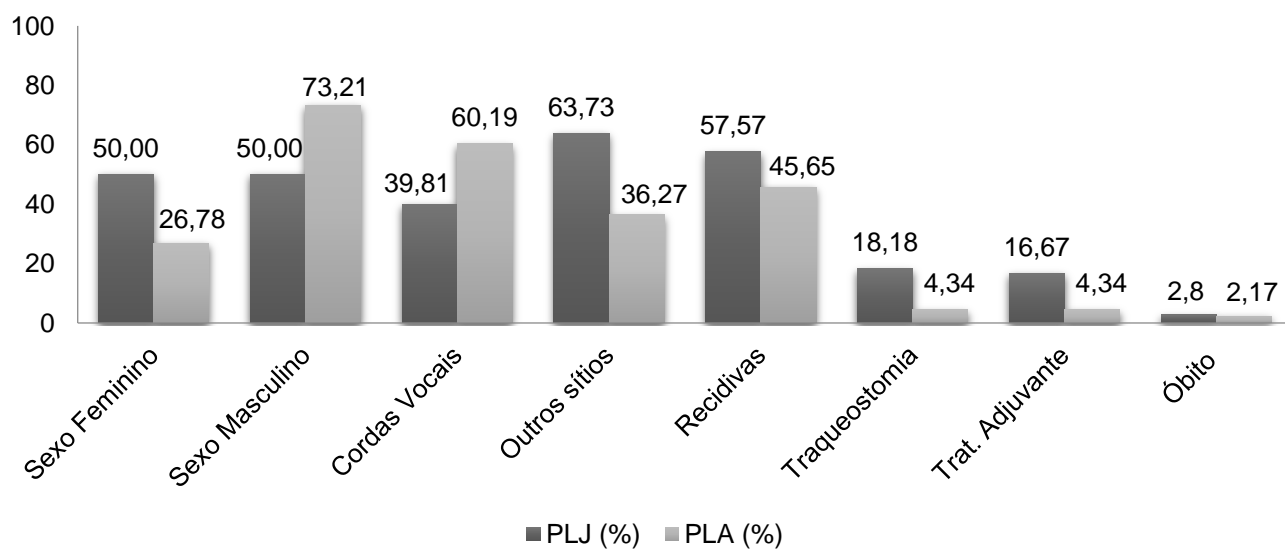


Figura 2 – Gráfico demonstrando a mediana e desvio padrão para idade dos grupos PLJ ( $4,94 \pm 3,30$ ) e PLA ( $41,62 \pm 14,01$ )



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3 – Gráfico demonstrando a porcentagem total dos casos de PLJ e PLA e suas características clínicas



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 - Resultados estatísticos dos dados clínicos e demográficos de ambos grupos PLJ e PLA (Brasil x Guatemala)

Dados	Brasil	Guatemala	Total	P(teste t)
<b>PLJ</b> Média idade $\pm$ DP	4,77 $\pm$ 0,62	5,44 $\pm$ 1,21	4,94 $\pm$ 3,30	0,60
	n (%)	T n (%)	T n (%)	T
Sexo Feminino	13 (48,15)	27 5 (55,55)	9 18 (50,00)	36 0,70
Sexo Masculino	14 (51,85)	27 4 (44,44)	9 18 (50,00)	36
Recidivas	12 (50,00)	24 7 (77,78)	9 19 (57,57)	33 0,15
Traqueostomia	4 (16,67)	24 2 (22,22)	9 6 (18,18)	36 0,71
Trat. adjuvante	6 (22,22)	27 0 (0)	9 6 (16,67)	36 0,12
Óbito	1 (3,70)	27 0 (0)	9 1 (2,78)	36 0,55
<b>PLA</b> Média de idade	40,59	42,71	41,62	0,70
	$\pm$ 2,05	$\pm$ 4,86	$\pm$ 14,01	
Sexo Feminino	9 (19,57)	46 6 (60,00)	10 15 (26,78)	56 P<0,05
Sexo Masculino	37 (80,43)	46 4 (40,00)	10 41 (73,21)	56
Recidiva	21 (45,65)	46 *	* 21 (45,65)	46
Traqueostomia	2 (4,34)	46 *	* 2 (4,34)	46
Trat. Adjuvante	2 (4,34)	46 *	* 2 (4,34)	46
Óbito	1 (2,17)	46 *	* 1 (2,17)	46

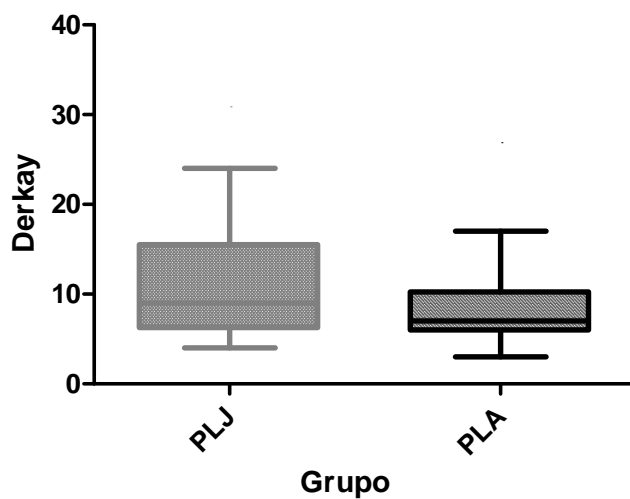
Legenda: T=total de amostras e \*=dados indisponíveis.

Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto ao índice de Derkay, a média para o grupo PLA foi 8,26 (mín. 3 e máx. 27) e 10,97 (mín. 4 e máx. 31) para o grupo PLJ sendo estatisticamente significativa para o teste *t* com  $P=0,02$  (Tabela 3) e para o teste de correlação de *Spearman* ( $P<0,05$ ). Este último demonstrou que quanto menor a idade maior o índice de Derkay, ou seja, maior a severidade (Figuras 4 e 5).

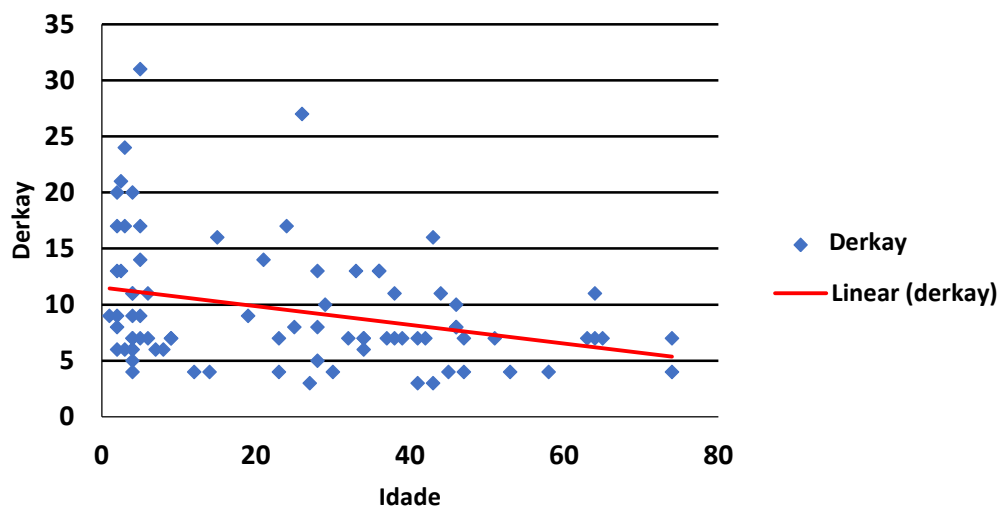
Dentre os casos coletados houve acometimento da laringe e da orofaringe (Figuras 6 e 7), com lesões em palato mole (1,08%), faringe (1,08%) e base de língua (1,08%). Os sítios mais acometidos foram as cordas vocais verdadeiras em PLJ (50,24%), seguido das cordas vocais falsas (12,68%), sendo que os pacientes adultos são os mais acometidos nas cordas vocais verdadeiras ( $P<0,05$ ).

Figura 4 – Gráfico demonstrando a média e desvio padrão para o índice de Derkay dos grupos PLJ ( $10,97 \pm 1,06$ ) e PLA ( $8,26 \pm 0,65$ )



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5 – Gráfico a correlação da idade de ambos grupos com o índice de Derkay



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 6 – Fotografia clínica de lesões papilomatosas em palato mole de paciente com PLJ



Fonte: Roman Carlos Bregni, Centro Clínico de Cabeza y Cuello da Guatemala.

Figura 7 – Fotografia clínica, pré cirúrgica, obtida através de câmera de laringoscopia, de lesões papilomatosas cordas vocais, bilateralmente, e comissura anterior



Fonte: Roman Carlos Bregni, Centro Clínico de Cabeza y Cuello da Guatemala.

Os sítios mais acometidos foram as cordas vocais em PLJ, n=41 (39,81%), e PLA, n=62 (60,19%), sendo que os pacientes adultos são os mais acometidos nas cordas vocais ( $P<0,05$ ) (Tabela 3). A média do índice de Derkay para os casos com

mais de uma corda vocal acometida ( $11,23 \pm 0,83$ ) foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) do que a média para os casos com apenas uma corda vocal acometida ( $6,08 \pm 0,59$ ), independente da idade.

Tabela 3 - Resultados estatísticos para as características clínicas da PLJ e PLA

Dados	PLJ	PLA	P
Score (Média $\pm$ DP)	10,97 $\pm$ 1,06	8,26 $\pm$ 0,65	P<0,05
Localização n (%)			
Cordas Vocais	41 (39,81)	62 (60,19)	P<0,05
Outros sítios	65 (63,73)	37 (36,27)	

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.2 Comparação histopatológica dos grupos PLJ e PLA

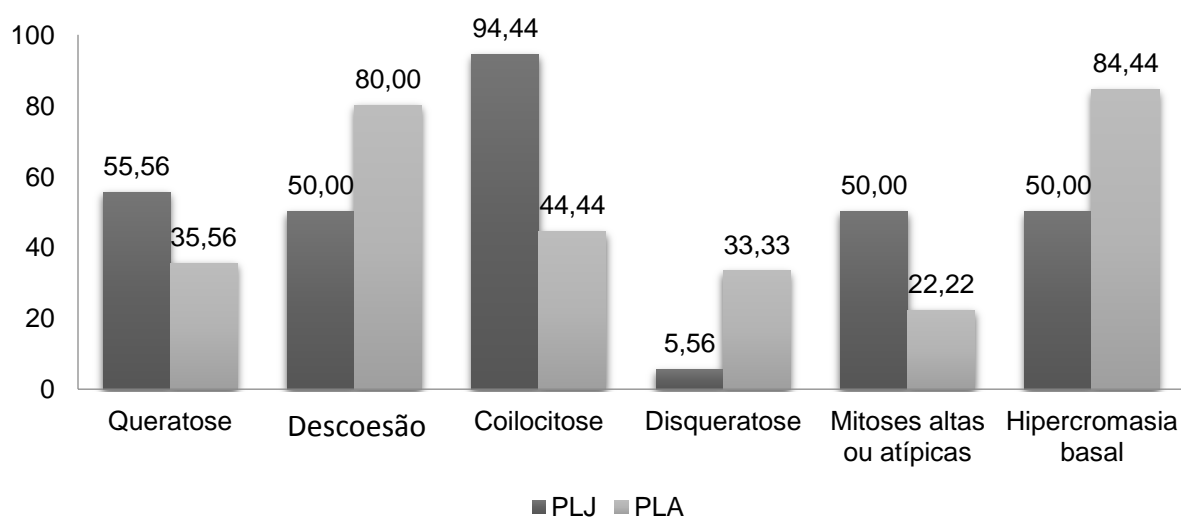
Quanto a relação entre as características histopatológicas e os grupos PLJ e PLA (Tabela 4 e Figura 8), as amostras de PLJ apresentaram maior incidência de células coilocíticas ( $P < 0,05$ ) e mitoses nas camadas mais altas do epitélio ou atípicas ( $P < 0,05$ ) (Tabela 3). Enquanto as amostras de PLA apresentaram maior incidência de descoesão ( $P < 0,05$ ), disqueratose ( $P < 0,05$ ) e hiperchromasia das células basais ( $P < 0,05$ ). A média do índice de Derkay para as amostras com mitoses acima da camada basal e atípicas foi 10,65 ( $\pm 5,93$ ), já a média para amostras que não apresentavam esta característica foi 8,02 ( $\pm 4,64$ ), com diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,03$ ) (Figura 9). A inflamação Fotomicrografias das características histológicas de amostras de cada grupo podem ser observadas na figura 10.

Tabela 4 - Resultados estatísticos para as características histológicas da PLJ e PLA

Dados	PLJ	PLA	P
Características microscópicas	n (%)	n (%)	
Queratose	20 (55,56)	16 (35,56)	0,07
Descoesão	18 (50,00)	36 (80,00)	P<0,05
Coilocitose	34 (94,44)	20 (44,44)	P<0,05
Disqueratose	2 (5,56)	15 (33,33)	P<0,05
Mitoses altas ou atípicas	18 (50,00)	10 (22,22)	P<0,05
Hipercromasia basal	18 (50,00)	38 (84,44)	P<0,05
Displasia	n (%)	n (%)	
Ausente ou leve	34 (94,44)	44 (97,78)	0,42
Moderada ou grave	2 (5,56)	1 (2,22)	
Total	36 (100%)	45 (100%)	

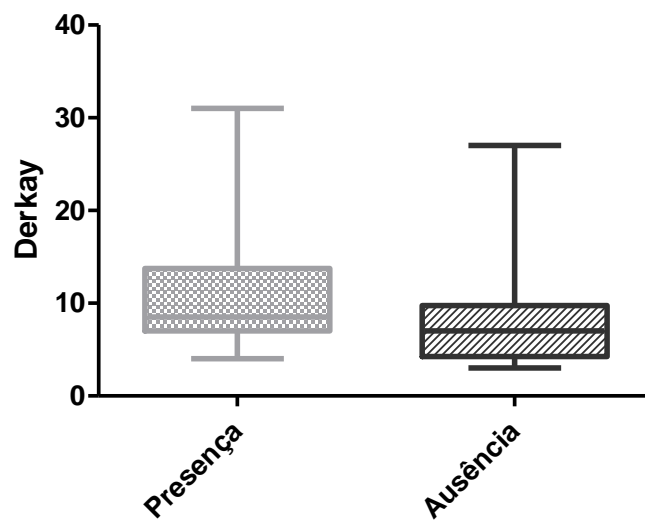
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 8 – Gráfico demonstrando em porcentagem (%) as diferenças histológicas entre os grupos PLJ e PLA



Fonte: Elaborada pela autora.

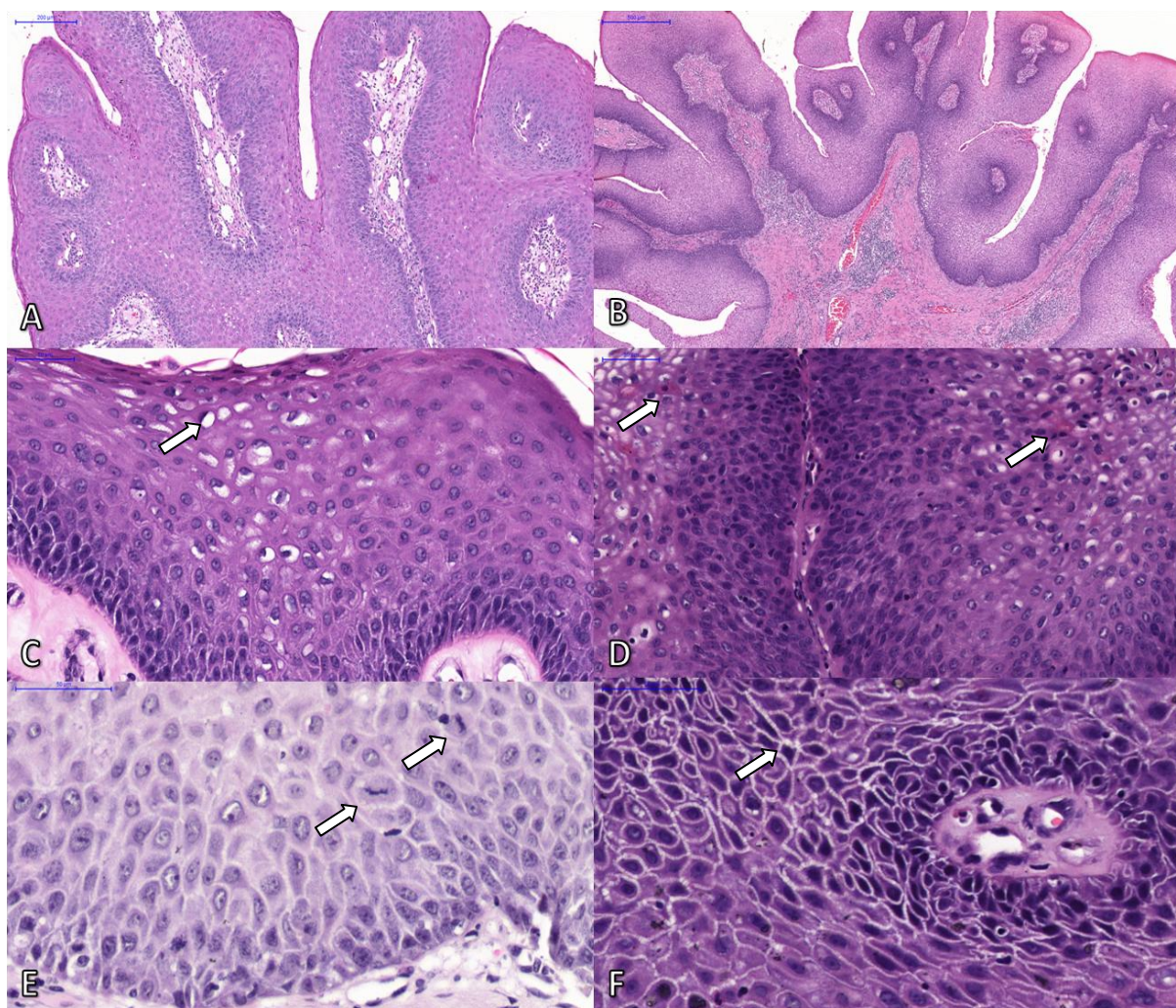
Figura 9 – Gráfico da média e desvio padrão do índice de Derkay, comparando ausência ( $8,02 \pm 4,64$ ), e a presença ( $10,65 \pm 5,93$ ) de mitoses altas e atípicas



Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 10 – Fotomicrografias de amostras de pacientes juvenis e adultos



Legenda: Proliferação papilar de epitélio escamoso em A: amostras pacientes juvenis e B: adultos; em C: células semelhantes a coilócitos são observadas nas camadas superiores do epitélio; em D: amostra de paciente adulto notam-se células em queratinização individual; em E: mitoses acima da camada basal e atípicas também são observadas em pacientes juvenis; em F: escassas mitoses e epitélio apresentando descoesão das células são encontrados nos pacientes adultos.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.3 Estudo clínico e histopatológico dos sub-grupos <20 e ≥20

Ao comparar as ocorrências de óbito, malignização, recidivas, traqueostomias e dados complementares ao índice de Derkay et al. (1998) observou-se diferença estatística para a dificuldade respiratória ( $P=0,01$ ) e traqueostomia ( $P<0,05$ ) no grupo PLJ. Não houve associação entre o grau de



displasia e a severidade da doença, tanto para PLJ (P=0,55) quanto para PLA e (P=0,87). As demais características histológicas também não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os sub-grupos <20 e ≥20 (Tabela 5 e 6).

Tabela 5 - Características clínicas e histológicas entre os sub-grupos <20 e ≥20, da PLJ

<b>Dados</b>	<b>Derkay &lt;20</b>	<b>Derkay ≥20</b>	<b>P</b>
Idade (Média ± DP)	5,21 ± 0,62	3,3 ± 0,53	0,23
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
Dificuldade resp.	13 (41,93)	5 (100)	P<0,05
Voz anormal	29 (83,87)	5 (100)	0,58
Presença de ruído	19 (61,29)	5 (100)	0,08
Recidivas	16 (51,61)	3 (60)	0,72
Traqueostomia	2 (6,45)	4 (80)	P<0,05
Malignização	0 (0,00)	(0,00)	-
Óbito	0 (0)	1 (25)	-
<b>Microscopia</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
Queratose	19 (61,29)	1 (20,00)	0,08
Descoesão	16 (51,61)	2 (40,00)	0,62
Coilocitose	29 (93,55)	5 (100,00)	0,55
Disqueratose	2 (6,45)	0 (0,00)	0,55
Mitoses altas	17 (54,84)	1 (20,00)	0,14
Displasia de baixo grau	29 (93,55)	5 (100)	0,55
Displasia de alto grau	2 (6,45)	0 (0,00)	
Total	31 (100%)	5 (100%)	

Legenda: Dificuldade resp.: dificuldade respiratória severa ou extrema.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 6 - Características clínicas e histológicas entre os sub-grupos <20 e ≥20 da PLA

Dados	Derkay <20	Derkay ≥20	P
Idade (Média ± DP)	-	-	-
	n (%)	n (%)	
Dificuldade resp.	0 (0)	0 (0,00)	-
Voz anormal	45 (100)	1 (100,00)	-
Presença de ruído	3 (6,67)	0 (0,00)	0,78
Recidivas	20 (42,55)	1 (100,00)	0,27
Traqueostomia	1 (2,22)	1 (100,00)	-
Malignização	1 (2,22)	0 (0,00)	0,88
Óbito	1 (2,22)	0 (0,00)	0,88
<b>Microscopia</b>			
Queratose	16 (36,36)	0 (0,00)	0,45
Descoesão	35 (79,55)	1 (100,00)	0,61
Coilocitose	19 (44,68)	1 (100,00)	0,25
Disqueratose	15 (34,09)	0 (0,00)	0,47
Mitoses altas	10 (22,73)	(0,00)	0,58
Displasia de baixo grau	43 (97,73)	1 (100,00)	0,87
Displasia de alto grau	1 (2,27)	0 (0,00)	
Total	44 (100%)	1 (100%)	

Legenda: Dificuldade resp.: dificuldade respiratória severa ou extrema; Hiper. basal: hiper Cromatismo basal; Infl. aus. ou dis.: inflamação discreta ou ausente; Infl. mod. ou int.: inflamação moderada ou intensa.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.4 Correlações das células inflamatórias e as características clínicas e histológicas

A média da quantificação das células foi utilizada para comparar os grupos PLJ e PLA (Tabela 7), para correlacionar a idade e o índice de Derkay com a quantidade das células inflamatórias (Tabelas 8 e 9) e, também, para correlacionar as células inflamatórias entre si (Figuras 11 e 12).

Tabela 7 - Tabela da média e desvio padrão da quantificação total das células inflamatórias e resultado da comparação entre PLJ e PLA

<b>Células</b>	<b>PLJ (Média ± DP)</b>	<b>PLA (Média ± DP)</b>	<b>P</b>
CD3+	10,55 ± 6,97	23,35 ± 18,59	<b>P&lt;0,05</b>
CD4+	4,07 ± 3,35	7,08 ± 7,27	0,23
CD8+	3,09 ± 3,90	9,94 ± 11,39	<b>P&lt;0,05</b>
CD15+	5,33 ± 5,72	4,89 ± 4,87	0,87
CD20+	1,34 ± 2,12	4,18 ± 10,26	0,33
CD68+	5,21 ± 4,21	4,20 ± 2,99	0,28
Fator XIIIa+	3,09 ± 3,90	2,84 ± 2,36	0,49
FoxP3+	3,45 ± 4,16	5,59 ± 7,91	0,42
MUM1+	2,62 ± 5,54	12,24 ± 15,30	<b>P&lt;0,05</b>

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 8 - Teste de correlação da *Spearman* entre a idade e a quantidade de células

<b>Células</b>	<b>n</b>	<b><i>Spearman</i> r</b>	<b>P</b>
CD3+	77	0,38	<b>P&lt;0,05</b>
CD4+	78	0,20	0,07
CD8+	76	0,39	<b>P&lt;0,05</b>
CD15+	79	-0,05	0,63
CD20+	77	0,28	<b>0,01</b>
CD68+	77	-0,03	0,77
Fator XIII+	78	0,26	<b>0,02</b>
FoxP3+	77	0,14	0,19
MUM1+	76	0,57	<b>P&lt;0,05</b>

Legenda: valores de *Spearman* r negativos representam relação inversamente proporcional, enquanto valor positivo demonstra relação proporcional

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9 - Teste de correlação da *Spearman* entre o índice de Derkay e a quantidade de células

<b>Células</b>	<b>n</b>	<b>Spearman r</b>	<b>P</b>
CD3+	77	0,02	0,80
CD4+	78	-0,07	0,53
CD8+	76	-0,16	0,15
CD15+	79	0,32	<b>P&lt;0,05</b>
CD20+	77	-0,13	0,22
CD68+	77	-0,00	0,97
Fator XIII+	78	-0,11	0,29
FoxP3+	77	-0,08	0,46
MUM1+	76	-0,28	<b>0,01</b>

Legenda: valores de *Spearman* r negativos representam relação inversamente proporcional, enquanto valor positivo demonstra relação proporcional

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 - Resultado das correlações entre as células inflamatórias dos grupo PLJ (teste de *Spearman*)

<b>PLJ</b>	<b>CD3</b>	<b>CD4</b>	<b>CD8</b>	<b>CD15</b>	<b>CD20</b>	<b>CD68</b>	<b>Fator XIII</b>	<b>FoxP3</b>	<b>MUM1</b>
<b>CD3</b>		P=0,36	P=0,58	P=0,97	P=0,86	-	P=0,94	P=0,16	P=0,08
<b>CD4</b>	P=0,36		+	P=0,73	+	P=0,27	P=0,05	P=0,06	+
<b>CD8</b>	P=0,58	+		P=0,15	+	P=0,52	+	P=0,12	+
<b>CD15</b>	P=0,97	P=0,73	P=0,15		P=0,61	+	P=0,56	+	P=0,98
<b>CD20</b>	P=0,86	+	+	P=0,61		+	+	+	+
<b>CD68</b>	-	P=0,27	P=0,52	+	+		+	+	+
<b>Fator XIII</b>	P=0,94	P=0,05	+	P=0,56	+	+		+	+
<b>FoxP3</b>	P=0,16	P=0,06	P=0,12	+	+	+	+		+
<b>MUM1</b>	P=0,08	+	+	P=0,98	+	+	+	+	

Legenda: +: correlação positiva dos casos em que  $P < 0,05$ , -: correlação negativa dos casos em que  $P < 0,05$ .

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 12 - Resultado das correlações entre as células inflamatórias dos grupo PLA (teste de *Spearman*)

PLA	CD3	CD4	CD8	CD15	CD20	CD68	Fator XIII	FoxP3	MUM1
CD3		+	+	+	+	+	+	+	+
CD4	+		+	P=0,10	+	+	+	+	+
CD8	+	+		P=0,15	+	+	+	+	+
CD15	+	P=0,10	P=0,15		P=0,07	+	+	+	P=0,06
CD20	+	+	+	P=0,07		+	+	+	+
CD68	+	+	+	+	+		+	+	+
Fator XIII	+	+	+	+	+	+		+	+
FoxP3	+	+	+	+	+	+	+		+
MUM1	+	+	+	P=0,06	+	+	+	+	

Legenda: +: correlação positiva dos casos em que  $P < 0,05$ , -: correlação negativa dos casos em que  $P < 0,05$ .

Fonte: Elaborada pela autora.

As células inflamatórias foram comparadas em relação a sua localização, epitélio e conjuntivo, dentre as amostras de cada grupo. No grupo PLJ a distribuição celular foi predominantemente no tecido conjuntivo de células positivas para: FoxP3, MUM1, Fator XIIIa, CD68, CD20 e CD4 ( $P < 0,05$ ). Para as células positivas para CD3, CD8 e CD15 não houve diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,72$ ,  $P = 0,21$  e  $P = 0,87$ , respectivamente). Quanto à marcação positiva de células no epitélio e no conjuntivo, no grupo PLA a distribuição foi predominantemente no tecido conjuntivo para: CD3, CD4, CD15, CD20, CD68, Fator XIIIa, MUM1 e FoxP3 ( $P < 0,05$ ). As células CD8+ estiveram presentes em igual quantidade, tanto no epitélio quanto no tecido conjuntivo ( $P = 0,22$ ).

Além disso, a média da quantidade de células inflamatórias foi correlacionada a idade (Tabela 10) e ao índice de Derkay (Tabela 11), conforme sua localização. A idade foi correlacionada à presença de células marcadas por CD3 e CD8, em epitélio e conjuntivo; e CD20 e MUM1, somente em conjuntivo, nestes casos, quanto maior a idade maior a quantidade de células inflamatórias (Figuras 13, 14, 15 e 16). O índice de Derkay foi correlacionado, independente da idade, com a presença de células positivas para MUM1, CD15 e Fator XIII; sendo que, para CD15 e Fator XIII, em epitélio, quanto maior a quantidade de células maior o índice e

Derkey e para MUM1, em conjuntivo, quanto maior a quantidade de células, menor o índice (Figuras 17, 18 e 19).

Tabela 10 - Teste de correlação de *Spearman* entre a idade e a quantidade de células para cada localização

<b>Células</b>	<b>Localização</b>	<b>n</b>	<b><i>Spearman r</i></b>	<b>P</b>
CD3+	Epitélio	76	0,28	<b>P&lt;0,05</b>
	Conjuntivo	72	0,41	<b>P&lt;0,05</b>
CD4+	Epitélio	77	0,08	0,46
	Conjuntivo	69	0,81	0,12
CD8+	Epitélio	73	0,40	<b>P&lt;0,05</b>
	Conjuntivo	68	0,27	<b>P&lt;0,05</b>
CD15+	Epitélio	76	-0,13	0,22
	Conjuntivo	69	0,04	0,69
CD20+	Epitélio	74	0,17	0,13
	Conjuntivo	72	0,24	<b>0,03</b>
CD68+	Epitélio	74	-0,13	0,26
	Conjuntivo	71	0,01	0,93
Fator XIII+	Epitélio	75	-0,10	0,36
	Conjuntivo	69	0,13	0,27
FoxP3+	Epitélio	74	0,15	0,17
	Conjuntivo	63	0,22	0,07
MUM1+	Epitélio	73	0,10	0,36
	Conjuntivo	73	0,57	<b>P&lt;0,05</b>

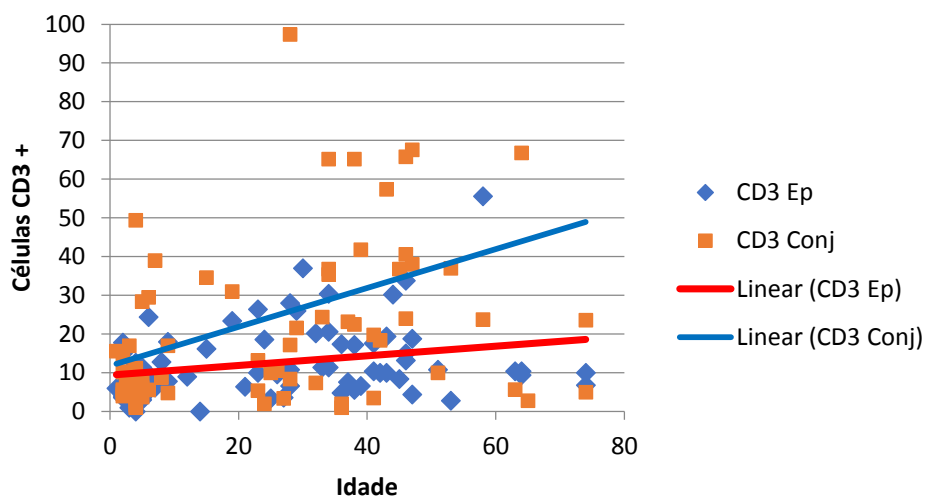
Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 11 - Teste de correlação de *Spearman* entre a pontuação do índice de Derkey e a quantidade de células para cada localização

<b>Células</b>	<b>Localização</b>	<b>n</b>	<b><i>Spearman r</i></b>	<b>P</b>
CD3+	Epitélio	76	0,00	0,94
	Conjuntivo	72	-0,22	0,05
CD4+	Epitélio	77	0,04	0,72
	Conjuntivo	69	-0,17	0,14
CD8+	Epitélio	73	-0,22	0,06
	Conjuntivo	68	-0,17	0,16
CD15+	Epitélio	76	0,35	<b>P&lt;0,05</b>
	Conjuntivo	69	0,21	0,07
CD20+	Epitélio	74	-0,09	0,41
	Conjuntivo	72	-0,14	0,23
CD68+	Epitélio	74	-0,01	0,90
	Conjuntivo	71	-0,06	0,57
Fator XIII+	Epitélio	75	0,27	0,01
	Conjuntivo	69	-0,16	0,18
FoxP3	Epitélio	74	-0,17	0,13
	Conjuntivo	63	-0,11	0,36
MUM1	Epitélio	73	-0,11	0,31
	Conjuntivo	73	-0,32	<b>P&lt;0,05</b>

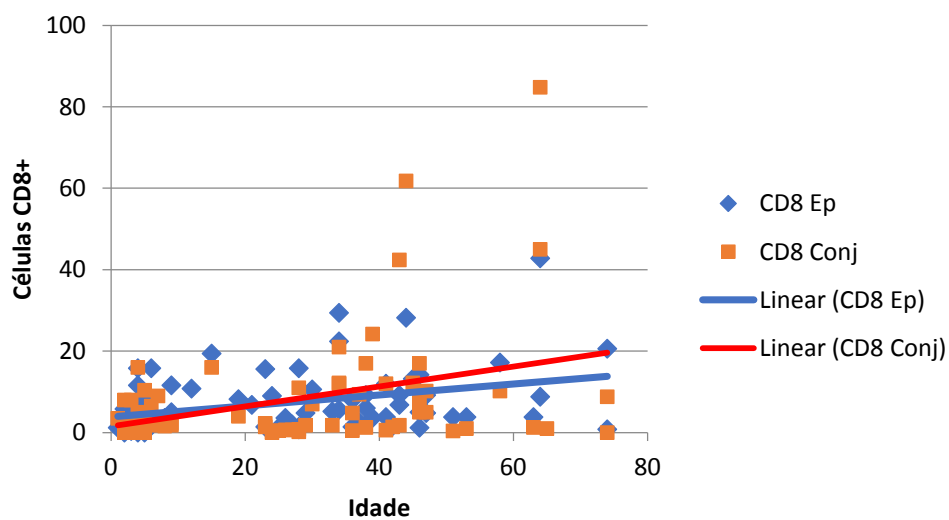
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13 – Gráfico da correlação de células CD3+ e a idade



Fonte: Elaborada pela autora.

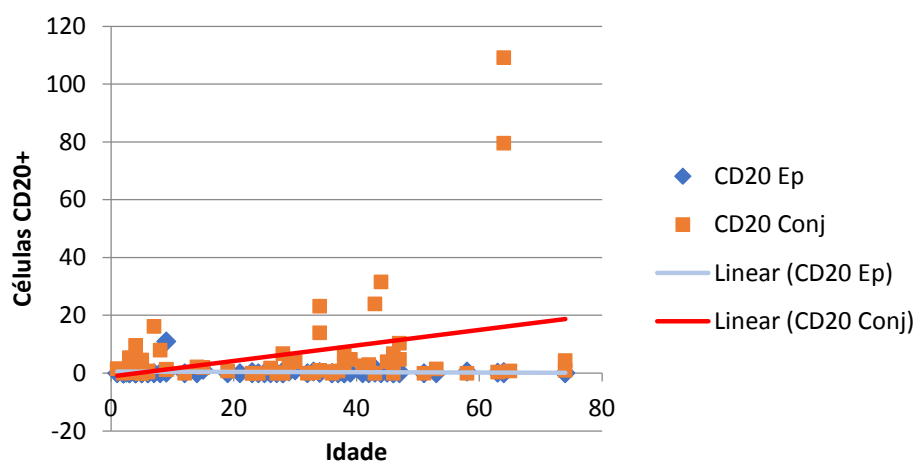
Figura 14 – Gráfico da correlação de células CD8+ e a idade



Fonte: Elaborada pela autora.

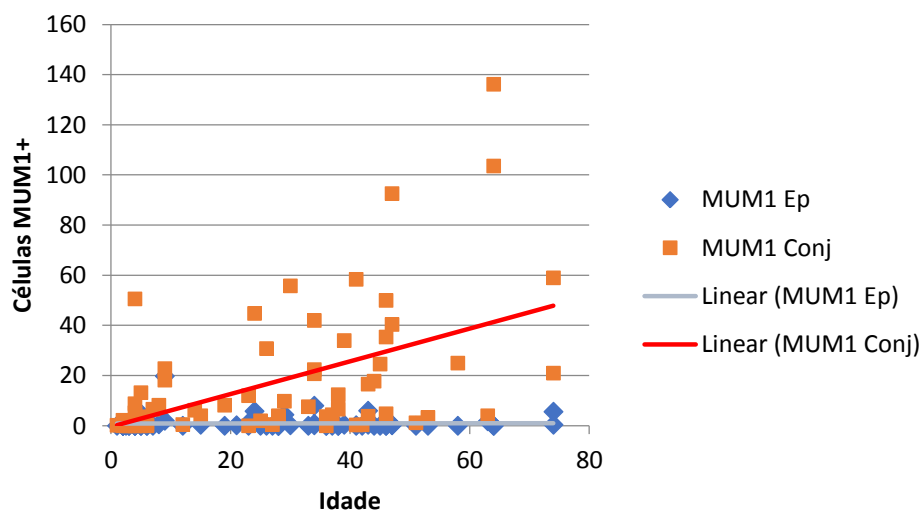


Figura 15 – Gráfico da correlação da quantidade de células CD20+ e a idade



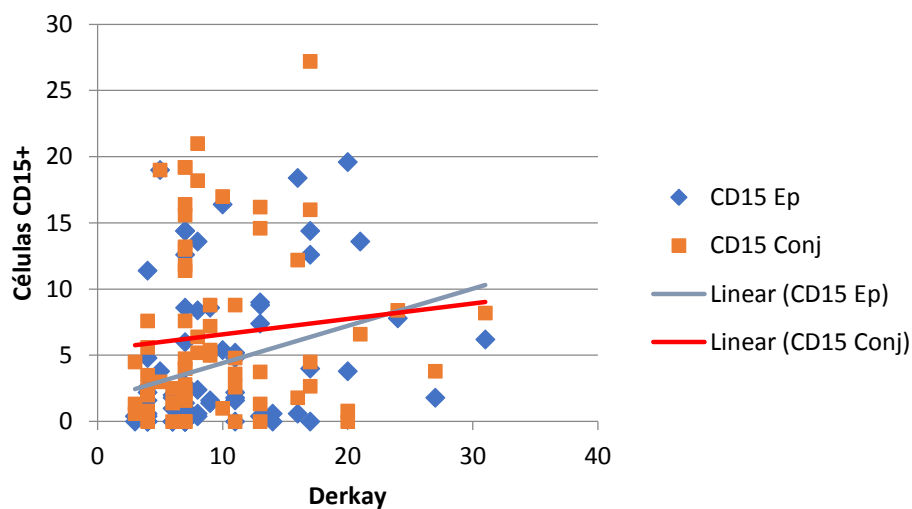
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 16 – Gráfico da correlação de células MUM1+ e a idade



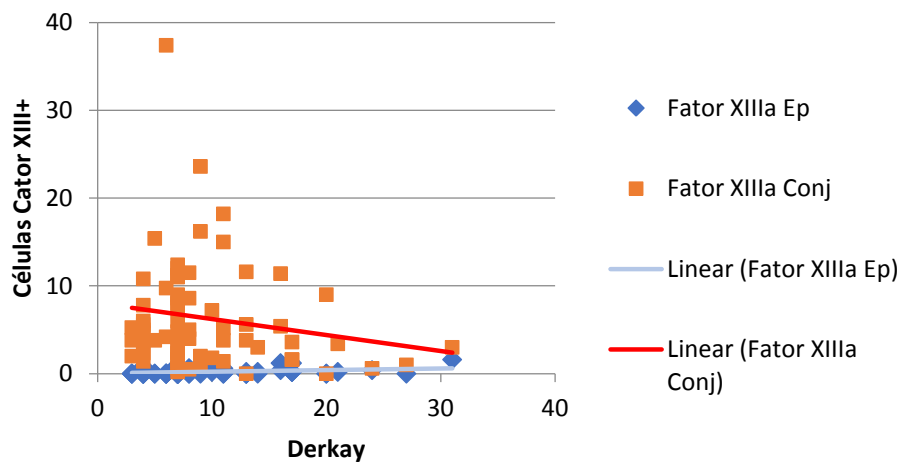
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 17 – Gráfico da correlação de células CD15+ e o índice Derkay



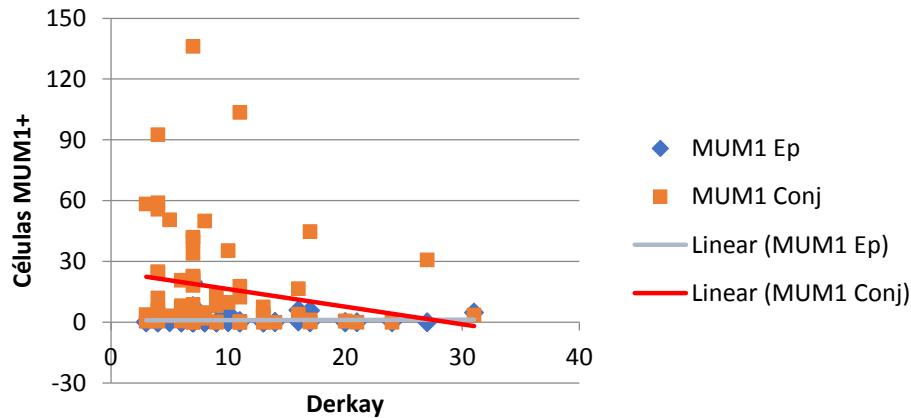
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 18 – Gráfico da correlação de células Fator XIIIa+ e o índice de Derkay



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 19 – Gráfico da correlação de células MUM1+ e o índice de Derkay



Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto à ocorrência de recidivas e a presença das células inflamatórias, os casos de PLA que recorreram apresentavam maior quantidade ( $P=0,02$ ) de células inflamatórias positivas para CD20 ( $0,35 \pm 0,44$ ) no epitélio, que os casos sem recidivas ( $0,10 \pm 0,23$ ). As demais células inflamatórias não demonstraram relação com os casos que recidivaram.

Os subgrupos Derkay  $<20$  e  $\geq 20$ , independentemente da idade, também foram correlacionados à presença das células inflamatórias. As marcações celulares que apresentaram diferença estatisticamente significativa foram: CD3+ no conjuntivo ( $P=0,04$ ), sendo o grupo mais agressivo apresentava menor quantidade de células ( $6,11 \pm 3,08$ ) que o grupo menos agressivo ( $26,29 \pm 28,32$ ) e CD15 no epitélio ( $P=0,02$ ), onde o grupo mais agressivo apresentava maior quantidade de células ( $8,80 \pm 6,65$ ) que grupo menos agressivo ( $3,92 \pm 5,10$ ). Também foram testadas as células inflamatórias e o grau de displasia epitelial. Os resultados estatisticamente significantes encontram-se na tabela 12.

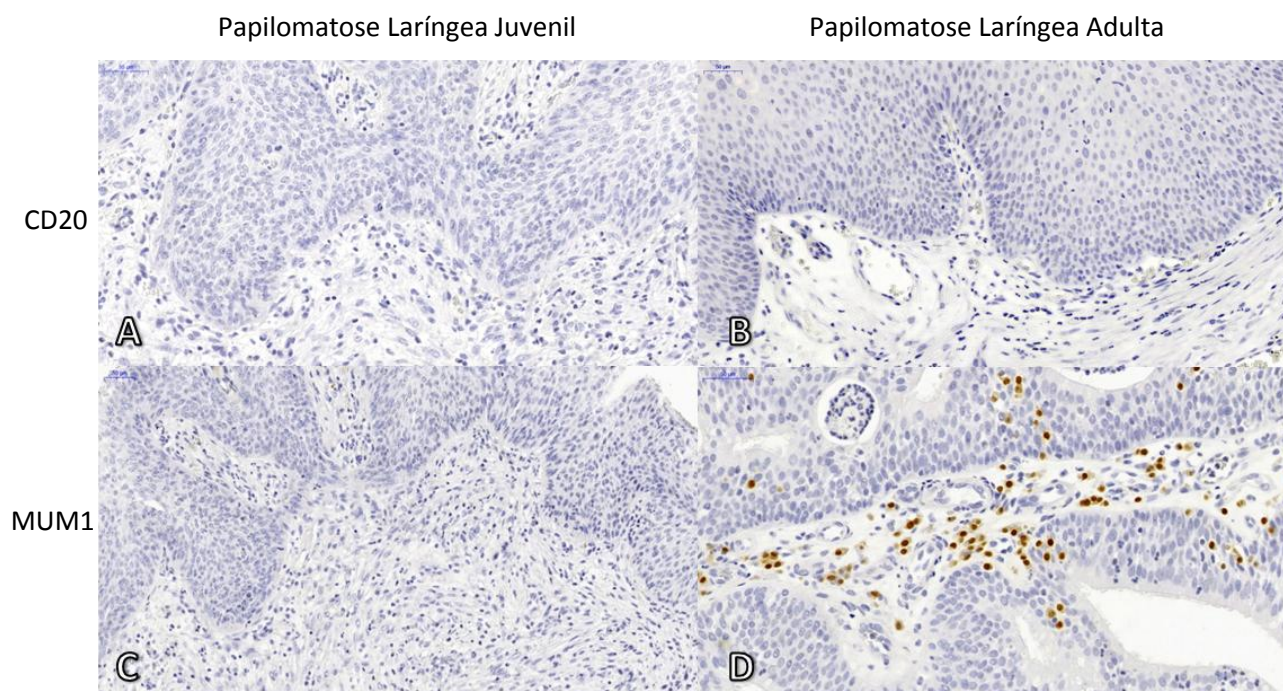
As figuras 20, 21 e 22 representam os achados imunohistoquímicos obtidos a respeito das células inflamatórias dos grupos PLJ e PLA.

Tabela 12 - Tabela com o resultado do teste t, comparando as amostras de displasia de baixo grau e alto grau com a presença das células inflamatórias

<b>Células</b>	<b>Baixo grau (Média ± DP)</b>	<b>Alto grau (Média ± DP)</b>	<b>P</b>
Fator XIII+ (Epitélio)	0,20 ± 0,33	0,33 ± 0,16	0,04
Fator XIII+ (Conjuntivo)	5,70 ± 5,78	11,80 ± 8,10	0,03
CD3+ (Epitélio)	13,11 ± 9,57	5,86 ± 3,30	0,02
CD8+ (Epitélio)	7,68 ± 7,89	2,93 ± 3,30	0,05
CD68+ (Conjuntivo)	7,29 ± 9,77	10,80 ± 6,15	0,04

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 20 - Fotomicrografias para demonstrar as marcações dos anticorpos CD20 e MUM1 nas amostras de PLJ e PLA

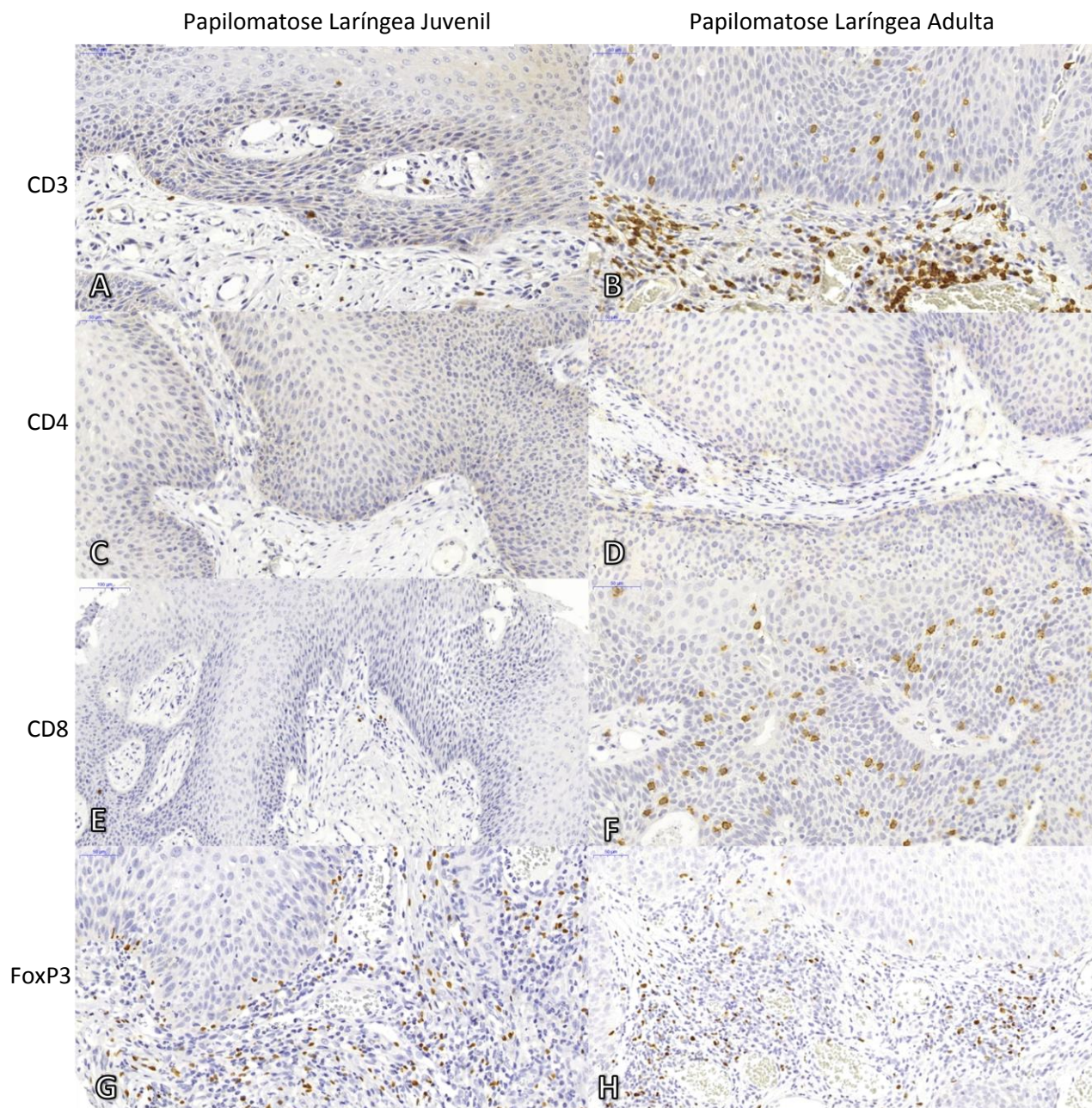


Legenda: ausência de células CD20+ (A) e ausência de células MUM1+ (C) em amostras de PLJ. Em amostras de PLA notam-se: ausência de células CD20+ (B) e células MUM1+ (D) dispersas.

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 21 - Fotomicrografias para demonstrar as marcações dos anticorpos CD3, CD4, CD8 e FoxP3 nas amostras de PLJ e PLA

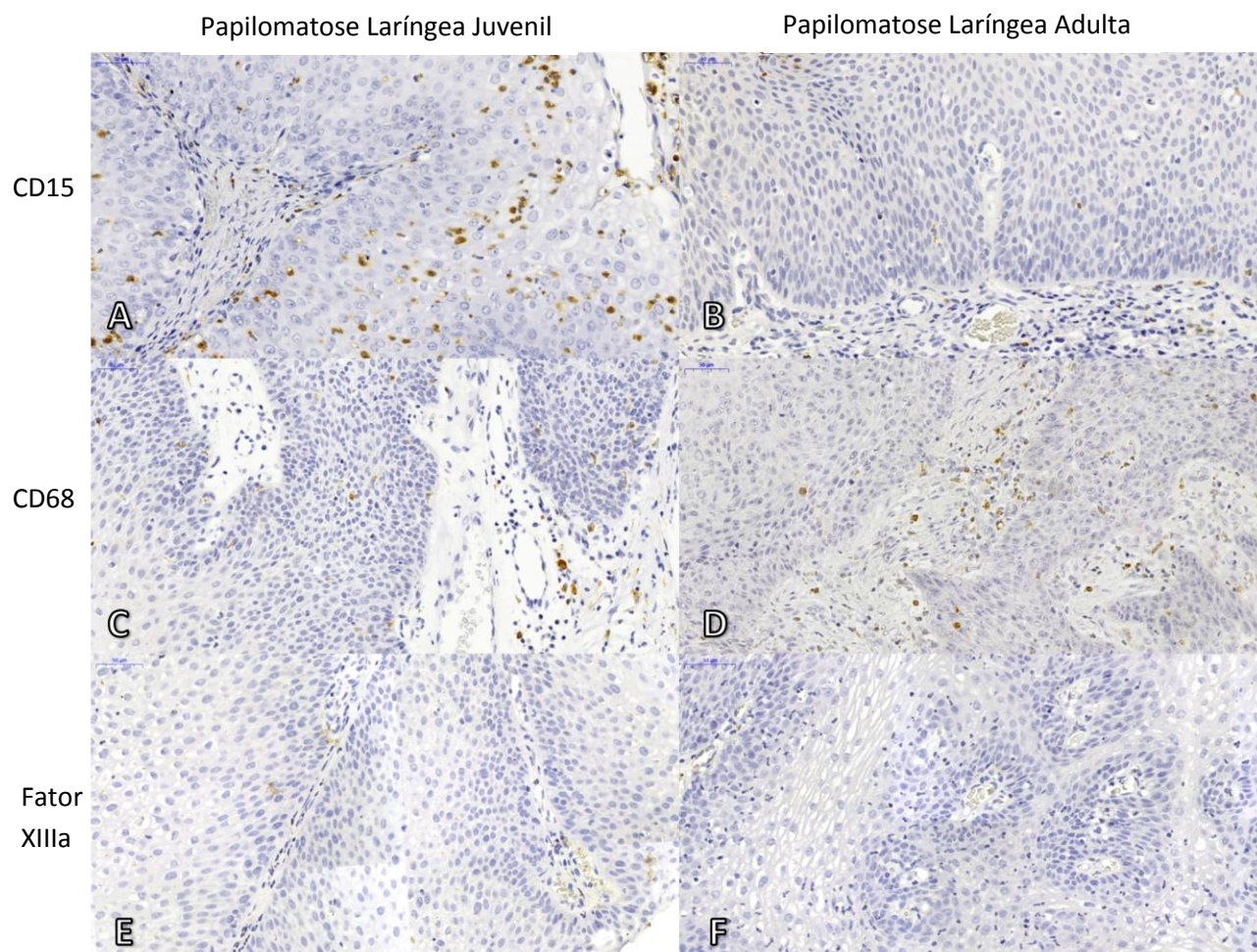


Legenda: escassas células CD3+ (A), ausência de células CD4+ (C), raras CD8+ (E) e células FoxP3+ dispersas no tecido conjuntivo (G) em amostras de PLJ. Em amostras de PLA foram observadas: células CD3+ (B) dispersas no epitélio e em grande quantidade no tecido conjuntivo, raras células CD4+ (D), células CD8+ (F) dispersas, e células FoxP3+ dispersas (H) em amostra de PLA.

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 22 – Fotomicrografias para demonstrar as marcações dos anticorpos CD15, CD68 e Fator XIII nas amostras de PLJ e PLA



Legenda: área de exocitose demonstrada por células CD15+ (A), raras células CD68+ (C) e escassas células Fator XIII+ (E), em amostras de PLJ. Em amostras de PLA foram observadas: escassas células CD15+ (B), células CD68+ (D) e ausência de células Fator XIII+ (F)  
Fonte: Elaborada pela autora.

## 5 DISCUSSÃO

A PL é uma doença rara, em crianças estima-se que a incidência anual seja de 4,3/100.000 e em adultos de 1,8/100.000. Seu curso clínico agressivo pode levar à transformação maligna e ao óbito por estender-se pelo trato respiratório inferior (Richardson et al., 2017). Os pacientes de PLJ apresentam os sintomas mais severos do que os adultos devido ao crescimento rápido das lesões que podem ser fatais (Carifi et al., 2015). O pico de incidência da PLJ é antes dos 5 anos de idade e não há predileção por sexo (Richardson et al., 2017). Tais dados semelhantes aos resultados deste estudo, que apresentou média de idade para PLJ de 4,94 e não houve predileção por sexo. Para os pacientes adultos, sugere-se que a associação com HPV-11 e o tempo de evolução maior que 10 anos são os fatores de risco para uma doença mais severa (Omland et al., 2014b). A faixa etária dos pacientes com PLA é entre 20-40 anos (Richardson et al., 2017), neste estudo foi entre 19 à 74 anos e foi mais prevalente no sexo masculino. A alta incidência de casos no sexo masculino é relatada na literatura (Richardson et al., 2017) e similar aos dados encontrados nas amostras do Brasil, porém, pacientes adultas do sexo feminino foram predominantes da Guatemala.

A raridade da doença pode retardar o diagnóstico levando a tratamentos inadequados (Fasunla, Lasisi, 2009). Harris et al. (2012) reportaram que 100% das crianças apresentaram sintomas 2 anos antes do diagnóstico correto de PLJ; sendo 5 (71,43%) tratadas para a asma e 2 (5,56%) apresentaram obstrução extrema das vias aéreas. Neste presente estudo, um paciente estava sendo submetido a tratamento para asma e 16 (50,00%) dos pacientes juvenis encontravam-se com dificuldade respiratória severa ou extrema. Existe uma demanda por tratamento adjuvante em torno de 10% dos casos, entre os critérios adotados estão: 4 ou mais cirurgias em 1 ano, espalhamento distal, múltiplas localizações e crescimento rápido com comprometimento de vias aéreas (Kayode, 2012). O índice anatômico de Derkay foi desenvolvido também para auxiliar no manejo dos pacientes com PL, através dele é prevista a necessidade de tratamento adjuvante para pacientes com score de pelo menos 20 pontos (Derkay et al., 2004).

A média do índice de Derkay encontrada na literatura varia de 6,4 a 22,68 (Montano et al., 2013; Bonfim et al., 2015). Já foi demonstrado que crianças que apresentam a doença até os 3 anos de idade tem maior número de sítios anatômicos acometidos e são submetidas a um maior número de cirurgias do que crianças diagnosticadas em idade mais avançada (Derkay et al., 2001; Omland et al., 2014a). O início de doença mais jovem também é relacionado ao desenvolvimento de carcinoma (Karatayli-Ozgunsoy et al., 2016). No presente estudo, a média do índice para PLJ foi de 10,97 (mín. 4 e máx. 31) e, ao comparar a severidade entre os grupos PLJ e PLA, o grupo PLJ foi considerado mais agressivo. Dado semelhante é reportado na literatura (Omland et al., 2014a). Além disso, a taxa de mortalidade neste estudo foi de 2,78% e, na literatura, autores concluíram que até 3% dos pacientes juvenis com PL morrem com a doença (Armstrong et al., 2000).

Neste presente estudo, a média do índice de Derkay para PLA foi de 8,26. A média deste grupo encontrada na literatura é de 10,8 para pacientes operados em ambulatório e 13,9 para pacientes operados em centro cirúrgico (Tatar et al., 2017). Em PLA, há relação diretamente proporcional entre o score de Derkay e o score de qualidade de vida relacionado à voz (VHI-10). Ou seja, quanto mais alto o índice de Derkay mais severa é a doença e quanto maior o índice VHI-10 pior a qualidade de vida relacionada à voz (Kupfer et al., 2016). Este estudo não avaliou o VHI-10, porém, todos os pacientes do grupo PLA e os casos mais agressivos do grupo PLJ apresentaram alterações na voz, devido ao envolvimento significativo das cordas vocais. Além disso, o envolvimento de múltiplas cordas vocais foi correlacionado ao maior índice de Derkay.

Otorrinolaringologistas concordaram quanto ao *cut off* em 20 pontos na escala de Derkay para casos de PLJ de alto risco de recidivas (Hester et al., 2003). O presente estudo demonstrou que características como: traqueostomia, dificuldade respiratória grave e número de óbitos predominaram nos pacientes com score  $\geq 20$  para o grupo de PLJ, porém o índice de recidivas não diferiu entre os grupos. Para o grupo PLA, o score foi significativo somente para a traqueostomia. Desta forma, sugere-se que mais estudos sejam direcionados à classificação da severidade para a PLA, visto que o score norteia o planejamento terapêutico. Também, após



observar o comportamento distinto entre a PLJ e a PLA, sugere-se que estas devem ser classificadas de formas diferentes.

Microscopicamente, as lesões podem ter duplicação da camada basal e atividade mitótica intensa. Disqueratose e coilócitos podem ser observados nas porções mais altas da camada espinhosa (Davids et al., 2014; Richardson et al., 2017). Neste estudo, a presença das células coilocíticas e de mitoses altas ou atípicas foram maiores entre as amostras do grupo PLJ, a presença de disqueratose e descoesão foram maiores para o grupo PLA. De acordo com Richardson et al. (2017) a queratose é mínima, entre os casos apresentados o grupo PLJ apresentou a maior porcentagem de amostras com queratose.

De acordo com a classificação mais recente da Organização Mundial da Saúde, as displasia de baixo grau, ou seja, lesões com baixo potencial para malignidade, incluem as lesões com hiperplasia escamosa e displasia discreta (Gale et al., 2017). No presente estudo, a presença de mitoses atípicas e acima da camada basal foram correlacionadas às maiores pontuações no índice de Derkay, bem como as amostras de PLJ com índice  $\geq 20$  apresentaram maior incidência de hiper cromasia da camada basal. Lesões que apresentam variações na morfologia da crista epitelial e displasia do epitélio de revestimento tem sido relacionadas a presença do HPV 6 e 11 (McCord, Bradley, 2014), estes genótipos estão presentes em, aproximadamente, 95% dos casos de PL (Richardson et al., 2017).

A incidência de displasia moderada ou severa tanto para PLA quanto PLJ está entre 10,00% e 17,6% (Sanchez et al., 2012; Omland et al., 2014b; Karatayli-Ozgursoy et al., 2016). No presente estudo, as taxas de displasia severa ou moderada foram menores tanto para PLJ quanto para a PLA e não foram correlacionadas com as características clinicopatológicas semelhante aos estudos de Omland et al. (2014b) e Karatayli-Ozgursoy et al. (2016). Lesões que microscopicamente apresentam variação na morfologia das cristas epiteliais e displasia do epitélio de revestimento estão correlacionadas com a presença de HPV 6 e 11 (McCord, Bradley, 2014), ao invés de serem correlacionadas com os tipos de HPV de alto risco 16 e 18 (Davids et al., 2014).

Os índices de malignização da PL estão em torno de 1 à 4% (Richardson et al., 2017). Algumas condições podem favorecer a transformação maligna, como o uso do tabaco, irradiação (Lie et al., 1994), infecção pelo HPV-11 (Byrne et al.,

1987), mutação da p53 (Rady et al., 1998), entre outros (Lie et al., 1994; Gerein et al., 2004). Porém também pode ocorrer na ausência desses fatores (Bewtra et al., 1982). No caso de transformação maligna deste estudo, o paciente não era fumante, não havia sofrido irradiação e havia sido detectado HPV de alto risco. Nos CEC originados da PL de início juvenil, são encontrados os HPVs 6 e 11 de baixo risco, enquanto os tipos de alto risco, 16 e 18, raramente são detectados (Jeong et al., 2009).

Além do tipo de HPV, o sistema imunológico também pode exercer um papel importante no curso clínico da doença (Kovalenko et al., 2009). A resposta imune é, dentre outras funções, responsável pela eliminação das células infectadas pelo vírus, e esta resposta é iniciada pelas células dendríticas (Manickam et al., 2007).

As células dendríticas (DCs) são importantes para a resposta imunológica porque interagem nas junções estreitas do epitélio (Kubo et al., 2009), podem ser identificadas como FatorXIII+ (Strieder et al., 2015). Seus prolongamentos alongados estabelecem conexões celulares com queratinócitos, interação que permite a absorção e penetração de antígenos mesmo quando a integridade do revestimento epitelial é mantida (Novak, 2012). Estas células podem ser ativadas pelo HPV e sua concentração no epitélio, na forma de células CD83+ (Kovalenko et al., 2009) foi correlacionada aos casos mais agressivos de PL. Este achado se deve ao comprometimento da capacidade migratória destas células (Kovalenko et al., 2009). Ao distinguir os grupos pela severidade (Derkay <20 e ≥20), a presença destas células no epitélio foi associada ao maior índice de Derkay, resultado similar ao estudo anterior.

Um importante papel das DCs é induzir células T CD4+ produtoras de IL-22, que desempenha um importante papel na cicatrização e ao mesmo tempo induz a hiperplasia epitelial (Boniface et al., 2005). As células T são as principais mediadoras da resposta imune mediada por células. O número de células T CD3+ representa o número total de linfócitos T. A função primária dos linfócitos T CD4+ é a secreção de citocinas como o *interferon-γ*, que promove ativação da resposta imune. Já os linfócitos T CD8+ tem atividade imunossupressora (Du et al., 2017). Dois padrões distintos de secreção de citocinas são definidos entre as células T CD4+ (Mosmann et al., 1986), o tipo T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2. O tipo Th1 produz interleucina (IL)-2, *interferon-γ* e fator de necrose tumoral-α (TNF-α), relacionados

principalmente com a defesa mediada por fagocitose contra agentes infecciosos intracelulares. Já o subtipo Th2, expressa IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, relacionadas com a produção de anticorpos IgE e reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos contra alérgenos e helmintos. Th1 e Th2 influenciam-se mutuamente e de forma antagônica. O INF- $\gamma$  produzido pelas Th1 inibe as Th2, e a IL-10 produzida pelas Th2 inibe as Th1 (Vaz et al., 2007).

Outras citocinas são produzidas por ambos subconjuntos de células (Mosmann, Moore, 1991). A infecção viral persistente na PL e a recorrência podem estar relacionadas ao desequilíbrio entre a resposta imune Th-1 e Th-2 (DeVoti JA et al., 2008). Outras IL, como a IL-36 $\gamma$ , secretada pelos queratinócitos, estão correlacionadas com o fenótipo mais agressivo da PL, sua diminuição contribuiu para a ineficiência da resposta imune adaptativa contra o vírus (Devoti J et al., 2014).

As células T, que expressam CD3+, são importante para evitar a transformação maligna de lesões leucoplásicas, pois os pacientes que desenvolveram CEC tinham um número de células CD3+ significativamente menor do que no epitélio displásico e no tecido conjuntivo subepitelial (Öhman et al., 2015). A presença de células CD3+ na PL foi prevalente nos pacientes adultos e sua presença no epitélio foi predominante nos casos de displasia de baixo grau.

Em neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), a carga viral elevada leva ao predomínio de linfócitos T CD8+. Isto porque, nas fases iniciais da replicação viral, a presença de células que possam desencadear um papel imune efetivo é escassa (Alves et al., 2010). Lesões de alteração histopatológica de alto risco (NIC III e NIC IV) foram relacionadas a maior quantidade de linfócitos T CD4+ e CD8+ (Alves et al., 2010). O presente trabalho demonstrou uma tendência das células CD8+ estarem presentes nas amostras de displasia de baixo grau, enquanto a quantidade de células CD4+ foi semelhante nos diferentes graus de displasia.

Os tipos de HPV prevalentes nas lesões cervicais são os de alto risco, enquanto na PL são os de baixo risco, logo, a resposta imunológica também pode ser diferente. O HPV 16 E6 (alto risco), por exemplo, pode estimular uma maior secreção de IL-17A pelas células T (Paaso et al., 2015). Na PL pode ocorrer uma inversão na proporção de células CD4+ e CD8+ e alta produção de citocinas em comparação aos controles saudáveis (Holm et al., 2017).

No presente estudo, o predomínio das células CD8+ foi observado nos pacientes adultos. Neste grupo a doença é menos severa, e este pode ser um dos fatores que justifica a diferença de comportamento da doença entre os grupos. De fato, um dos períodos críticos do desenvolvimento do sistema imunológico ocorre entre os 4 e 6 anos de idade (Kovalenko et al., 2009), este período abrange a média de idade dos pacientes juvenis, o que justifica os resultados encontrados quanto a resposta imune ser mais eficiente nos pacientes adultos. Presença de células T, CD8+ e CD4+ mostraram melhor prognóstico de CEC de boca (Watanabe et al., 2010). Por outro lado, a presença de células T regulatórias (CD4+/CD25+) foi associada a um pior controle do carcinoma (Whiteside et al., 2012).

As células T regulatórias (Treg) são uma subpopulação de células T, responsáveis pela autotolerância imunológica, suprimindo de forma efetiva a ativação de células T (Azab et al., 2008). Existem vários subtipos de células Treg CD4+, como as Th, NKT e as CD4+CD25+FoxP3+ (Vocanson et al., 2009), sendo, a função do FoxP3 estabilizar a função das células Treg (Wing, Sakaguchi, 2010). No presente estudo observou-se uma tendência à uma menor quantidade destas células (FoxP3+) no tecido conjuntivo dos casos que apresentaram recidivas.

A presença do fenótipo M2-macrófago (CD68+) exerce funções diferentes do fenótipo M1, age como um regulador da imunidade e como auxiliar no reparo tecidual (Canton, 2014), além de provocar crescimento tumoral, por ser um promotor da angiogênese (Mantovani et al., 2002). A presença de células CD68+ na PL foi associada às displasias de alto grau e, na PLJ, houve correlação negativa entre as células CD68+ e CD3+, ou seja, quanto mais células CD68+ menor a quantidade das células CD3+. Este papel supressor da resposta imune adaptativa dos M2-macrófagos já é conhecido (Mantovani et al., 2002) e neste estudo, este papel ficou evidente entre as amostras de pacientes juvenis, onde a doença é mais severa.

Com relação ao processo inflamatório agudo, os polimorfonucleares CD15+ que participam dos microabcessos epiteliais (Kaminagakura et al., 2007), estiveram presentes no epitélio dos casos considerados mais agressivos deste estudo (Derkay  $\geq 20$ ). A presença células CD15+ foi relacionada ao maior crescimento de carcinoma colo retal (Jang et al., 2013). Sugere-se que um processo de agudização pode elevar o índice de Derkay, provocando nas lesões aumento de volume, causando ao paciente os malefícios dos sintomas mais severos da doença.

Na sífilis são encontradas altas concentrações de células CD3+, CD20+ e XIII+; linfócitos, células B e células dendríticas, respectivamente (Strieder et al., 2015). As células B e os plasmócitos (MUM1+) são células capazes de produzir anticorpos (Abbas et al., 2000). Na PL, as células MUM1+, foram correlacionadas ao menor índice de Derkay e também tiveram sua maior incidência nos pacientes adultos, o papel imunológico desta célula, foi relacionado a menor severidade, podendo auxiliar no combate à doença.

Entre os vários antígenos expressos nas moléculas dessas células, os CD19, CD20 e CD22, são marcadores utilizados na identificação de células B humanas e em camundongos (Roitt et al., 1999). Na literatura, há um relato de 2 casos de pacientes, portadores do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), com úlceras intrabuciais apresentando infiltrado inflamatório, predominantemente, de células B, positivas para CD20, e positivas para RNA-EpsteineBarr Vírus (EBV). As lesões foram consideradas um transtorno linfoproliferativo associado a imunossupressão (Bunn, van Heerden, 2015). Na PL, as altas mais altas concentrações de CD20+ estavam no tecido conjuntivo dos pacientes adultos com PL, já a sua presença no epitélio foi relacionada à ocorrência de recidivas.

O EBV pode atuar de forma indireta, interferindo na resposta imune às células transformadas pelo HPV (Polz-Dacewicz et al., 2016), sua presença pode contribuir para a transformação maligna (Meckes et al., 2013; Aromseree et al., 2015). Na PL adulta, o tipo de HPV e a coinfeção viral foram correlacionados com o curso clínico agressivo da doença (Pou et al., 1995).

O aparecimento de lesões, causadas por HPV ou EBV, na mucosa oral podem significar imunocomprometimento. Estas lesões podem ser desde assintomáticas, como também podem gerar lesões benignas ou até mesmo malignas potencialmente fatais (Stojanov, Sook, 2015).

O presente estudo sobre a PL, sugere que a resposta imune do indivíduo tanto juvenil quanto adulto, influencia o curso clínico da doença.

## 6 CONCLUSÃO

Com este estudo sugere-se que a PLJ e a PLA diferem em seu curso clínico e nas características histopatológicas. Sendo assim:

- a) A severidade da doença é maior em pacientes juvenis;
- b) O índice de Derkay não mensura a agressividade da PLA;
- c) A presença de mitoses acima da camada basal e atípicas podem indicar maior severidade e foram mais frequentes nos pacientes jovens.

As células inflamatórias desempenham um importante papel na severidade da PL:

- a) Amostras de PLA apresentaram maior quantidade de células CD3+. CD8+ e MUM1+;
- b) A presença de CD15+ é diretamente proporcional ao índice de Derkay, enquanto MUM-1 é inversamente proporcional ao índice;
- c) Houve associação das células CD3+ e CD8+ com as displasia de baixo grau e das FatorXIII+ e CD68+ com as displasia de alto grau.

## REFERÊNCIAS\*

Aaltonen LM, Rihkanen H, Vaeheri A. Human papillomavirus in larynx. *Laryngoscope*. 2002;112:700-7. doi:10.1097/00005537-200204000-00020.

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000.

Albert L, Merati MD, Keppel K. Paediatric voicerelated quality of life: findings in healthy children and in common laryngeal disorders. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008;117: 259–62. doi: 10.1177/000348940811700404

Alves DB, Tozetti IA, Gatto FA, Cassandri F, Ferreira AMT, Fernandes CES, et al. CD4 and CD8 T lymphocytes and NK cells in the stroma of the uterine cervix of women infected with human papillomavirus. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Jul-Aug;43(4):425-9.

Armstrong LR, Preston EJ, Reichert M, Phillips DL, Nisenbaum R, Todd NW, et al. Incidence and prevalence of recurrent respiratory papillomatosis among children in Atlanta and Seattle. *Clin Infect Dis*. 2000 Jul;31(1):107-9. Epub 2000 Jul 11. doi: 10.1086/313914

Aromseree S, Pientong C, Swangphon P, Chaiwongkot A, Patarapadungkit N, Kleebkaow P, et al. Possible contributing role of Epstein-Barr virus (EBV) as a cofactor in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *J Clin Virol*. 2015 Dec;73:70-6.

Auborn KJ, Little RD, Platt THK, Vaccariello MA, Schildkraut CL. Replicative intermediates of human papillomavirus type 11 in laryngeal papillomas: site of replication initiation and direction of replication. *Cell Biol*. 1994;91:7340-4. PubMed PMID: 8041792.

Azab NA, Bassyouni IH, Emad Y, Abd El-Wahab GA, Hamdy G, Mashahit MA. CD4+CD25+ regulatory T cells (TREG) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: the possible influence of treatment with corticosteroids. *Clin Immunol*. 2008;127(2):151-7. doi: 10.1016/j.clim.2007.12.010

Bewtra C, Krishnan R, Lee SS. Malignant changes in nonirradiated juvenile laryngotracheal papillomatosis. *Arch Otolaryngol*. 1982;108:114-6.

Bonfim CM, Sobrinho JS, Nogueira RL, Kupper DS, Valera FCP, Nogueira ML, et al. Differences in Transcriptional Activity of Human Papillomavirus Type 6 Molecular Variants in Recurrent Respiratory Papillomatosis. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132325. doi: 10.1371/journal.pone.0132325. eCollection 2015.

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol*. 2005 Mar 15;174(6):3695-702.

Bunn B, van Heerden W. EBV-positive mucocutaneous ulcer of the oral cavity associated with HIV/AIDS. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015 Dec;120(6):725-32. doi: 10.1016/j.oooo.2015.06.028. Epub 2015 Jul 3.

Byrne JC, Tsao MS, Fraser RS, Howley PM. Human papillomavirus- 11 DNA in a patient with chronic laryngotracheobronchial papillomatosis and metastatic squamous-cell carcinoma of the lung. *N Engl J Med*. 1987;317:873-8. doi: 10.1056/NEJM198710013171406

Canton J. Phagosome maturation in polarized macrophages. *J Leukoc Biol*. 2014 Nov;96(5):729-38. doi: 10.1189/jlb.1MR0114-021R.

Carifi M, Napolitano D, Morandi M, Dall'Olio D. Recurrent respiratory papillomatosis: current and future perspectives. *Ther Clin Risk Manag*. 2015;5(11):731-8. doi: 10.2147/TCRM.S81825.

Dauids T, Muller S, Wise JC, Johns MM, Klein A. Laryngeal Papillomatosis associated dysplasia in the adult population: an update on prevalence and HPV subtyping. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2014 Jun;123(6):402-8. doi:10.1177/0003489414526848.

Derkay CS. Recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*. 2001; 111(1):57–69.

Derkay CS, Hester RP, Burke B, Carron J, Lawson L. Analysis of a staging assessment system for prediction of surgical interval in recurrent respiratory papillomatosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2004 Dec;68(12):1493-8. doi: 10.1016/j.ijporl.2004.06.007

Derkay CS, Malis DJ, Zalzal G, Wiatrak BJ, Kashima HK, Coltrera MD. A staging system for assessing severity of disease and response to therapy in recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*. 1998 Jun;108(6):935-7. PubMed PMID: 9628513.

DeVoti J, Hatam L, Lucs A, Afzal A, Abramson A, Steinberg B, et al. Decreased Langerhans cell responses to IL-36 $\gamma$ : altered innate immunity in patients with recurrent respiratory papillomatosis. *Mol Med*. 2014;28(20):372-80. doi: 10.2119/molmed.2014.00098.

DeVoti JA, Rosenthal DW, Wu R, Abramson AL, Steinberg BM, Bonagura VR. Immune dysregulation and tumor-associated gene changes in recurrent respiratory



papillomatosis: a paired microarray analysis. *Mol Med*. 2008;14(9-10):608-17. doi: 10.2119/2008-00060.

Drejet S, Halum S, Brigger M, Skopelja E, Parker NP. A systematic review: outcomes in adult recurrent respiratory papillomatosis treated with intralesional cidofovir or bevacizumab. *Otolaryng Head Neck*. 2017;1–7.

Du J, Cheng Q, Zhang Z, Wu JF, Li F, Chen SY, et al. 5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy stimulates local immunity in patients with condylomata acuminata via activation of T lymphocytes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017 Mar;21(5):1125-35. PubMed PMID: 28617562.

El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity, in young patients: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:1463–70. PubMed PMID: 14576481.

Fasunla AJ, Lasisi OA. Diagnostic challenges of laryngeal papillomatosis and its implications among children in developing country. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2009;73:593–5. doi: 10.1016/j.ijporl.2008.12.009.

Freed GL, Derkay CS. Prevention of recurrent respiratory papillomatosis: role of HPV vaccination. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2006;70:1799–803.

Gale N, Hille J, Jordan RC, Nadal A, Williams MD. Epithelial precursor lesions In: El-Naggar AK, Chan JK, Grandis JR, Takata T, Slotweg. WHO classification of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2017. p. 91-3.

Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, Westra WH, Califano J. Epithelial precursor lesions In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. WHO classification of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005. p. 177-9.

Gerein V, Rastorguev E, Gerein J, Draf W, Schirren J. Incidence, age at onset, and potential reasons of malignant transformation in recurrent respiratory papillomatosis patients: 20 years experience. *Otolaryng Head Neck*. 2005;132:392–4. doi: 10.1016/j.otohns.2004.09.035.

Gerein V, Rastorguev E, Gerein J, Lodemann E, Pfister H, Draf W, et al. 2', 5'-Oligoadenylate synthetase activity analysis and human papilloma virus typing as prognostic factors in patients with recurrent respiratory papillomatosis. *J Laryngol Otol*. 2004;118:750-6 doi: 10.1258/0022215042450733

Godinez JM, Nicolas-Parraga S, Pimenoff VN, Mengual-Chulia B, Muñoz N, Bosch FX, et al. Phylogenetically related, clinically different: human papillomaviruses 6 and 11 variants distribution in genital warts and in laryngeal papillomatosis. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jun;20(6):406-13. doi: 10.1111/1469-0691.12420.

Harris T, Atkinson H, Vaughan C, Knight LC. Presentation of laryngeal papilloma in childhood: the Leeds experience. *Int J Clin Pract.* 2012;66(2):183–4. doi: 10.1111/j.1742-1241.2011.02861.x.

Heck JE, Berthiller J, Vaccarella S, Winn DM, Smith EM, Shan'gina O, et al. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol.* 2010;39:166–81. doi: 10.1093/ije/dyp350.

Heinzel PA, Chan SY, Ho L, O'Connor M, Balaram P, Campo MS, et al. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol.* 1995;33(7):1746-54.

Hester RP, Derkay CS, Burke BL, Lawson ML. Reliability of a staging assessment system for recurrent respiratory papillomatosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2003 May;67(5):505-9. PubMed PMID: 12697352.

Hobbs CG, Birchall MA. Human papillomavirus infection in the etiology of laryngeal carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;12:88–92. PubMed PMID: 15167043.

Holm A, Nagaeva O, Nagaev I, Loizou C, Laurell G, Mincheva-Nilsson L, et al. Lymphocyte profile and cytokine mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with recurrent respiratory papillomatosis suggest dysregulated cytokine mRNA response and impaired cytotoxic capacity. *Immun Inflamm Dis.* 2017 Dec;5(4):541-550. doi: 10.1002/iid3.188.

Huebbers CU, Preuss SF, Kolligs J, Vent J, Stenner M, Wieland U, et al. Integration of HPV6 and downregulation of AKR1C3 expression mark malignant transformation in a patient with juvenile-onset laryngeal papillomatosis. *PLoS One.* 2013;8(2):e57207. doi: 10.1371/journal.pone.0057207.

Huh WK, Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, de Andrade RP, Ault KA, et al. Final efficacy, immunogenicity, and safety analyses of a nine-valent human papillomavirus vaccine in women aged 16-26 years: a randomised, double-blind trial. *Lancet.* 2017 Nov 11;390(10108):2143-59. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31821-4.

Jang TJ, Park JB, Lee J. The expression of CD10 and CD15 is progressively increased during colorectal cancer development. *Korean J Pathol.* 2013 Aug;47(4):340–7. doi: 10.4132/KoreanJPathol.2013.47.4.340

Jeong WJ, Park SW, Shin M, Lee YJ, Jeon YK, Jung YH, et al. Presence of HPV type 6 in dysplasia and carcinoma arising from recurrent respiratory papillomatosis. *Head Neck.* 2009;31:1095-101. doi: 10.1002/hed.20998

Kaminagakura E, Bonan PR, Jorge J, Almeida OP, Scully C. Characterization of inflammatory cells in oral paracoccidioidomycosis. *Oral Dis.* 2007 Jul;13(4):434-9. doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01319.x

Karatayli-Ozgursoy S, Bishop JA, Hillel A, Akst L, Best SR. Risk factors for dysplasia in recurrent respiratory papillomatosis in an adult and pediatric population. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2016 Mar;125(3):235-41.

Katara GK, Jaiswal MK, Kulshrestha A, Kolli B, Gilman-Sachs A, Beaman KD. Tumor-associated vacuolar ATPase subunit promotes tumorigenic characteristics in macrophages. *Oncogene.* 2014;33:5649-54.

Kayode AS. The descriptive review, from recurrent respiratory papillomatosis of the disease, an enigmatic. *Arq. Int. Otorrinolaringol.* 2012;16(1):108-114 doi: 10.7162/S1809-48722012000100016

Kovalenko S, Lukashenko P, Romanovskaya A, Soldatski IL, Bakanov SI, Pfister H, et al. Distribution and density of CD1a+ and CD83+ dendritic cells in HPV-associated laryngeal papillomas. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009;73:249-56. doi: 10.1016/j.ijporl.2008.10.016.

Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:467–75. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0551.

Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med.* 2009 Dec 21;206(13):2937-46. doi: 10.1084/jem.20091527.

Kuet ML, Pitman MJ. Photoangiolytic Laser Treatment of Recurrent Respiratory Papillomatosis: A Scaled Assessment. *J Voice.* 2013;27(1):124-8. doi: 10.1016/j.jvoice.2012.07.003.

Kupfer RA, Çadalli Tatar E, Barry JO, Allen CT, Merati AL. Anatomic Derkey Score Is Associated with Voice Handicap in Laryngeal Papillomatosis in Adults. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2016 Apr;154(4):689-92.

Lie ES, Engh V, Boysen M, Clausen OP, Kvernfold H, Stenersen TC, et al. Squamous cell carcinoma of the respiratory tract following laryngeal papillomatosis. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1994;114:209-12.

Louw L, Claassen A. HPV-induced recurrent laryngeal papillomatosis: rationale for adjuvant fatty acid therapy. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008;17(2):187-93.

Makiyama K, Hirai R, Matsuzaki H, Ikeda M. Assessment of human papilloma virus infection in adult laryngeal papilloma using a screening test. *J Voice*. 2013 Mar;27(2):230-5.

Manickam A, Sivanandham M, Tourkova IL. Immunological role of dendritic cells in cervical cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2007;601:155-62.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization:tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23,549–55.

Matos RP, Sichero L, Mansur IM, do Bonfim CM, Bittar C, Nogueira RL, et al. Nucleotide and phylogenetic analysis of human papillomavirus types 6 and 11 isolated from recurrent respiratory papillomatosis in Brazil. *Infect Genet Evol*. 2013;16:282-9. doi: 10.1016/j.meegid.2012.12.033.

McCord C, Bradley G. Histopathologic features of high risk HPV-associated oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014 Jan;117(1):120-1.

Meckes DG Jr, Gunawardena HP, Dekroon RM, Heaton PR, Edwards RH, Ozgur S, et al. Modulation of B-cell exosome proteins by gamma herpesvirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Jul 30;110(31):E2925-33.

Montano T, Montano E, Martínez C, Plascencia T, Sepulveda MT, Rodríguez M. Adult recurrent respirator papillomatosis: a new therapeutic approach with pegylated interferon alpha 2a (Peg-IFNa-2a) and GM-CSF. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013;148(2);253–60.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T-cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986 Apr 1;136(7):2348-57.

Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in cross-regulation of Th1 and Th2 responses. *Immunol Today*. 1991 Mar;12(3):A49-53.

Mounts P, Kashima H. Association of human papillomavirus subtype and clinical course in respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*. 1984;94:28–33. PubMed PMID: 6318005.

Novak N. An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:879–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.062>.

Öhman J, Mowjood R, Larsson L, Kovacs A, Magnusson B, Kjeller G, et al. Presence of CD3-positive T-cells in oral premalignant leukoplakia indicates prevention of cancer transformation. *Anticancer Res.* 2015 Jan;35(1):311-7.

Omland T, Akre H, Lie KA, Jebsen P, Sandvik L, Brøndbo K. Risk factors for aggressive recurrent respiratory papillomatosis in adults and juveniles. *PLoS One.* 2014a;9(11):e113584. doi: 10.1371/journal.pone.0113584.

Omland T, Lie KA, Akre H, Sandlie LE, Jebsen P, Sandvik L, et al. Recurrent Respiratory Papillomatosis: HPV Genotypes and Risk of High-Grade Laryngeal Neoplasia. *PLoS One* 2014b;9(6):e99114.

Paaso A, Koskimaa HM, Welters MJ, Grénman S, Syrjänen K, van der Burg SH, et al. Cell mediated immunity against HPV16 E2, E6 and E7 peptides in women with incident CIN and in constantly HPV-negative women followed-up for 10-years. *J Transl Med.* 2015;20(13):163. doi: 10.1186/s12967-015-0498-9.

Penning TM, Byrns MC. Steroid hormone transforming aldo-keto reductases and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1155:33–42.

Polz-Dacewicz M, Strycharz-Dudziak M, Dworzański J, Stec A, Kocot J. Salivary and serum IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , VEGF levels in oropharyngeal squamous cell carcinoma and correlation with HPV and EBV infections. *Infect Agent Cancer.* 2016 Aug 20;11:45.

Pou AM, Rimell FL, Jordan JA, Shoemaker DL, Johnson JT, Barua P, et al. Adult respiratory papillomatosis: human papillomavirus type and viral coinfections as predictors of prognosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995 Oct;104(10):758-62.

Preuss SF, Klussmann JP, Jungehulsing M, Eckel HE, Guntinas-Lichium O, Damm M. Long-term results of surgical treatment for recurrent respiratory papillomatosis. *Acta Otolaryngol.* 2007; 127:1196–201. doi: 10.1080/00016480701200350.

Pudszuhn A, Welzel C, Bloching M, Neumann K. Intralesional cidofovir application in recurrent laryngeal papillomatosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2007;264:63–70. doi: 10.1007/s00405-006-0151-6.

Rady PL, Schnadig VJ, Weiss RL, Hughes TK, Tyring SK. Malignant transformation of recurrent respiratory papillomatosis associated with integrated human papillomavirus type 11 DNA and mutation of p53. *Laryngoscope.* 1998;108:735-40.

Richardson M, Gale N, Hille J, Zidar N. Epithelial precursor lesions. In: El-Naggar AK, Chan JK, Grandis JR, Takata T, Slotweg. WHO classification head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2017. p. 93-5.

Roitt I, Brostoff J, Male D. *Imunologia.* 5. ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1999.

Rosen CA, Lee AS, Osborne J, Zullo T, Murry T. Development and validation of the voice handicap index-10. *Laryngoscope*. 2004;114:1549–56. doi: 10.1097/00005537-200409000-00009.

Sanchez GI, Jaramillo R, Cuello G, Quintero K, Baena A, O'Byrne A. Human papillomavirus genotype detection in recurrent respiratory papillomatosis (rrp) in Colombia. *Head Neck*. 2012;35:229–34. doi: 10.1002/hed.22953.

Scully C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol*. 2002;38:227-34. PubMedPMID: 11978544.

Seedat RY, Thukane M, Jansen AC, Rossouw I, Goedhals D, Burt FJ. HPV types causing juvenile recurrent laryngeal papillomatosis in South Africa. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2010;74:255–9.

Shetty N, Prabhash K, Joshi A, Sayed SI, Sharma S, Noronha V, et al. Case of childhood laryngeal papillomatosis with metastatic carcinoma esophagus in adulthood. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2013;34(1):34–7. doi: 10.4103/0971-5851.113420.

Snoeck R, Wellens W, Desloovere C, Van Ranst M, Naesens L, De Clercq E, et al. Treatment of severe laryngeal papillomatosis with intralesional injections of cidofovir [(S)-1-(3-hydroxyl-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine]. *J Med Virol*. 1982;79:5425–9. PubMed PMID: 9515772.

Stojanov IJ, Woo SB. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus associated conditions of the oral mucosa. *Semin Diagn Pathol*. 2015 Jan;32(1):3-11. doi: 10.1053/j.semmp.2014.12.003.

Strieder LR, León JE, Carvalho YR, Kaminagakura E. Oral syphilis: report of three cases and characterization of the inflammatory cells. *Ann Diagn Pathol*. 2015 Apr;19(2):76-80. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2015.01.003.

Tatar EC, Kupfer RA, Barry JY, Allen CT, Merati AL. Office-Based vs Traditional Operating Room Management of Recurrent Respiratory Papillomatosis Impact of Patient Characteristics and Disease Severity. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2017;143(1):55-9.

Thompson LD. Diagnostically challenging lesion in head and neck pathology. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1997;254(8):357-66. PubMed PMID: 9332890.

Vancurova I, Wu R, Miskolci V, Sun S. Increased p50/p50 NF-KB activation in human papillomavirus type 6- or type 11-induced laryngeal papilloma tissue. *J Virol*. 2002;76(3):1533-6. PubMed PMID: 11773428.

Vaz AJ, Takei K, Bueno EC. *Imunoensaios: fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

Villiers EM, Weidauer H, Otto H, Zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer*. 1985; 36:575-8.

Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*. 2009;64(12):1699-714. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02082.x.

Vorobjova T, Ress K, Luts K, Uibo O, Uibo R. The impact of langerin (CD207)+ dendritic cells and FOXP3+ Treg cells in the small bowel mucosa of children with celiac disease and atopic dermatitis in comparison to children with functional gastrointestinal disorders. *APMIS*. 2016 Aug;124(8):689-96. doi: 10.1111/apm.12552.

Wanichwatanadecha P, Sirisrimangkorn S, Kaewprag J, Ponglikitmongkol M. Transactivation activity of human papillomavirus type 16 E6\*1 on aldo-keto reductase genes enhances chemoresistance in cervical cancer cells. *J Gen Virol*. 2012;93:1081–92 .

Watanabe Y, Katou F, Ohtani H, Nakayama T, Yoshie O, Hashimoto K. Tumor-infiltrating lymphocytes, particularly the balance between CD8(+) T cells and CCR4(+) regulatory T cells, affect the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109:744-52. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.12.015.

Whiteside TL. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Semin Cancer Biol*. 2012 Aug;22(4):327-34. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.03.004.

Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2010;11(1):7-13. doi: 10.1038/ni.1818.

Wierzbicka M, Józefiak A, Jackowska J, Szydłowski J, Goździcka-Józefiak A. HPV vaccination in head and neck HPV-related pathologies. *Otolaryngol Pol*. 2014 Jul-Aug;68(4):157-73. doi: 10.1016/j.otpol.2014.05.004.

## APÊNDICE A - Índice de Derkay

Quadro 3 - Como obter o índice de Derkay et al. (1998)

<b>Classificação clínica (pontuação)</b>	<b>Pontuação total: máxima de 86</b>
Voz: normal (0) anormal (1) afônico (2) Estridor: ausente (0) presente em atividade (1) presente em repouso (2) Urgência: programada (0) eletiva (1) urgente (2) emergencial (3) Dificuldade respiratória: nenhuma (0) leve (1) moderada (2) severa (3) extrema (4)	
<b>Classificação anatômica para cada local:</b> <b>nenhuma lesão (0), superficial (1), elevada-exofítica(2), volumosa (3)</b>	
<b>Laringe</b>	
Epiglote: superfície lingual (___), superfície larígea (___) Pregas ariepiglóticas: direita (___), esquerda (___) Cordas vocais falsas: direita (___), esquerda (___) Cordas vocais verdadeiras: direita (___), esquerda (___) Aritenóides: direita (___), esquerda (___) Comissura anterior (___) Comissura posterior (___) Subglote (___)	
<b>Traquéia</b>	
Terço superior (___) Terço médio (___) Terço inferior (___) Brônquios: direito (___), esquerdo (___) Traqueostomia (___)	
<b>Outros</b>	
Nariz (___), palato (___), faringe (___), esôfago (___), pulmão (___), outros (___).	

Fonte: Elaborado pela autora.



## ANEXO A — Comitê de Ética

INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO  
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA DA PAPILOMATOSE LARÍNGEA

**Pesquisador:** Estela Kaminagakura Tango

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 50419615.1.0000.0077

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.419.232

#### **Apresentação do Projeto:**

A papilomatose laríngea é uma neoplasia benigna dividida em dois grupos: papilomatose laríngea juvenil e papilomatose laríngea adulta, ambas causadas pelo papiloma vírus humano (HPV). Sua raridade pode retardar o diagnóstico podendo resultarem dificuldade respiratória grave com risco de óbito por obstrução das vias aéreas. O presente estudo através da caracterização clínica, microscópica, imuno-histoquímica e molecular da papilomatose laríngea visa contribuir para a identificação de biomarcadores que possam reconhecer precocemente casos agressivos e propensos a se malignizar.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivos: investigar e genotipar os HPVs na lesão juvenil; avaliar a expressão proteica de AKR1C3 correlacioná-la com a presença HPV; averiguar a população de células dendríticas: S100, XIIIa, HLA-DR, CD83, CD1a, CD11c; comparar as características clínico-patológicas encontradas entre os grupos propostos.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não há riscos pois trabalharão com blocos de parafina.

O benefício deste estudo será a caracterização das lesões juvenis correlacionadas ao tipo de HPV, que direcionarão outros estudos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

nd

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

não se aplica

**Recomendações:**

nd

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências foram atendidas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado acata o parecer da relatora.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_600958.pdf	10/01/2016 21:19:35		Aceito
Declaração de Pesquisadores	pesquisadores.pdf	10/01/2016 21:04:08	Estela Kaminagakura Tango	Aceito
Folha de Rosto	Fderosto.pdf	05/10/2015 11:18:13	Estela Kaminagakura Tango	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Papilomatose.docx	05/10/2015 11:16:56	Estela Kaminagakura Tango	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 22 de Fevereiro de 2016

---

Assinado por:  
Denise Nicodemo  
(Coordenador)

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777  
 Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000  
 UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS  
 Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: ceph@fosjc.unesp.br