



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

VICTOR BERNARDES BARROSO DA COSTA

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA E DA INFLUÊNCIA DO
EPSTEIN-BARR VÍRUS NA SEVERIDADE DA
PAPILOMATOSE LARÍNGEA**

2019

VICTOR BERNARDES BARROSO DA COSTA

INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA E DA INFLUÊNCIA DO EPSTEIN-BARR VÍRUS NA SEVERIDADE 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. Linha de pesquisa: Diagnóstico em patologia.

Orientadora: Profa. Assoc. Estela Kaminagakura Tango

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Pimentel de Barros

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. 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).

Costa, Victor Bernardes Barroso

Investigação da presença e da influência do epstein-barr vírus na severidade da papilomatose laríngea. / Victor Bernardes Barroso Costa. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.

50 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, 2019.

Orientadora: Estela Kaminagakura Tango

Coorientadora: Patrícia Pimentel Barros

1. Papilomatose. 2. Papilomavírus humano. 3. Vírus Epstein-Barr. 4. CD21. 5. Agressividade. I. Tango, Estela Kaminagakura, orient. II. Barros, Patrícia Pimentel, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Estela Kaminagakura Tango (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcelos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Lia Mizobe Ono

Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas
Departamento de Odontologia

Profa. Dra. Luciana Yamamoto de Almeida

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

São José dos Campos, 11 de Janeiro de 2019.

DEDICATÓRIA

À minha avó, **Iracy de Lima Barroso** (*in memorian*), exemplo de amor, força e coragem. Nenhum dia se passa sem que eu lembre o quão importante ela foi nisso tudo, não há ato maior de amor do que ensinar e ela foi minha primeira professora, aprendi a juntar as primeiras palavras através dela.

Às minhas duas mães, **Rita e Luzia**, que sempre viram nos estudos a melhor maneira de mudar de vida e que proporcionaram, através de muito esforço, toda a base para que eu chegasse até este momento. Não há palavras que possam expressar o quanto sou grato por tê-las em minha vida.

Às minhas irmãs, **Iara e Bárbara**, e ao meu primo, **Ícaro**. Juntos crescemos e juntos seguiremos!

Ao meu na morado, **Adriano Delgado**, pelo suporte em todos os sentidos e pela paciência.

Ao futuro da ciência e deste País, resistiremos!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, **Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara**, e da vice-diretora **Profa. Dra. Rebeca di Nicoló**.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora do programa, **Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira**.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto do Câncer de São Paulo (ICESP), na pessoa da **Profa. Dra. Laura Cristina Sichero Vettorazzo**, e da monitora em pesquisa **Silvaneide Aparecida Ferreira**; e ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia das Doenças Associadas ao Papilomavírus Humano (Instituto do HPV), na pessoa da **Profa. Dra. Luisa Lina Villa**, da **Dra. Bárbara Mello** e da **Dra. Giana Rabello Mota**. Foi uma honra estar na presença de pessoas tão inspiradoras e ter aprendido tanto com cada uma delas, muito obrigado!

À Escola Paulista de Medicina da UNIFESP, na pessoa do **Prof. Assoc. Alfredo Ribeiro da Silva**; e ao Centro Clínico de Cabeza y Cuello da Guatemala, na pessoa do **Dr. Román Carlos Bregni**. Obrigado principalmente pelas amostras cedidas para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, **Profa. Assoc. Estela Kaminagakura Tango**, pelo imensurável conhecimento transmitido, dedicação e paciência. Eu cresci, amadureci e muito do que me tornei devo à minha orientadora. Obrigado por contribuir de forma tão rica para minha formação como docente e pesquisador!

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Patrícia Pimentel de Barros**, pela paciência, ensinamentos e ajuda, principalmente no final deste trabalho. Levo comigo uma amiga preciosa!

À **Profa. Assoc. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante**, pelo conhecimento transmitido, presença alegre, incentivo e cuidado para comigo esse tempo todo. Obrigado também por despertar em mim o amor pela Terapia Fotodinâmica, sinto muita falta do nosso ambulatório de laser!

Às professoras, **Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder**, **Profa. Tit. Janete Dias Almeida**, **Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira** e a **Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho** pelas ajudas durante a execução deste trabalho, pelo conhecimento transmitido e pelas parcerias que aconteceram nos últimos anos.

Aos demais membros da banca, **Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos** e **Prof. Dra. Luciana Yamamoto de Almeida** por deixarem seus afazeres e aceitarem o convite para fazer parte deste momento. Tenho certeza que ambas contribuirão de forma valorosa para este trabalho.

Ao assessor técnico da Disciplina de Propedêutica Estomatológica, **Sérgio Giovanni Alves**, obrigado pela animação de todas as quintas, pelas conversas sobre os bichanos e por toda a amizade!

Às professoras, **Profa. Dra. Cintia Iara Oda Carvalhal**, **Profa. Dra. Lia Mizobe Ono** e a **Profa. Dra. Silvana Pasetto** pelo incentivo, exemplo, apoio e amizade desde o meu início na odontologia. Estas foram as pessoas que abriram minha mente para a pesquisa e para a docência, e que continuam me inspirando até hoje!

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de doutorado - Processo FAPESP: 2016/24019-0 e pelo auxílio que proporcionou a execução desta pesquisa.

Aos meus amigos e colegas, **Anderson, Bruna, Bruno, Camila, Carlos, Cheyenne, Danielle, Diego, Elis, Felipe, Fernanda, Gabriel, Hanna, Jaqueline, Larissa, Lígia, Luciana, Milagros, Nayara, Noala, Renata Pilli, Renata Moraes, Rodnei, Tainá e Vivian**, pela amizade, ajuda e suporte emocional de sempre!

Aos técnicos de laboratório, **Profa. Dra. Ana Lourdes Machado, Maria Salette Faria e Walter Cruz**, pelo auxílio e ajuda nos momentos que precisei.

E finalmente, ao Centro Universitário do Norte (UNINORTE), a casa que me formou e agora a casa que me emprega, na pessoa do coordenador do curso de odontologia **Prof. Me. Glauber Palma**. Obrigado pela amizade, suporte e compreensão durante as minhas ausências para finalização deste trabalho.

“As convicções são cárceres”

Friedrich Nietzsche

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicas	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Amostras e Análise Clinicopatológica	16
3.2 Extração de DNA.....	18
3.3 Genotipagem do HPV	19
3.4 Detecção do EBV	22
3.5 Construção do microarranjo de tecidos.....	23
3.6 Hibridação <i>in Situ</i> para EBER.....	24
3.7 Imuno-histoquímica	25
3.8 Análise imuno-histoquímica	25
3.9 Análise estatística	26
4 RESULTADOS.....	27
4.1 Análise clinicopatológica.....	27
4.2 Resultados e análises dos testes de detecção viral e imuno-histoquímica...29	
4.3 Associação entre dados clinicopatológicos e HPV-DNA.....	32
4.4 Associação entre os dados clínicos patológicos e EBV-DNA.....	34
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE	48
ANEXO.....	49

Costa VBB. Investigação da presença e da possível influência do Epstein-Barr vírus na severidade da papilomatose laríngea [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

A papilomatose laríngea é uma neoplasia benigna causada pelo papilomavírus humano (HPV), sendo os tipos 6 e 11 os mais comuns, e que ocorre em dois grupos etários, juvenil e adulto. A possível coinfeção viral tem sido sugerida em lesões de cabeça e pescoço; nesse sentido, o Epstein Barr vírus (EBV), que também apresenta tropismo por células epiteliais vem sendo estudado neste grupo de lesões. Os objetivos deste estudo foram genotipar os HPVs, investigar a presença de EBV-DNA por PCR e EBV-RNA por hibridização *in situ*. Além disso, associar a presença de EBV com a imunoexpressão de CD21, os resultados obtidos com a escala laringoscópica de Derkay et al. (1998) e com os dados clinicopatológicos. Oitenta casos de papilomatose laríngea, juvenil ($n=36$) e adulta ($n=44$), foram retrospectivamente analisados e subdivididos em grupos de menor e maior severidade, baseando-se na escala de Derkay. Todas as amostras foram HPV positivas, com 49 casos HPV 6, 26 casos HPV 11, 4 casos HPV 6 e 11, e 1 caso HPV 16. A presença de EBV-DNA foi detectada em 9 amostras, entretanto EBV-RNA não foi não foi identificado em nenhuma amostra. Assim como a presença do EBV-DNA, a imunoexpressão de CD21 não se associou estatisticamente com quaisquer variáveis. A presença de HPV 6 foi mais comum em PLA e, o HPV 11 foi mais comum ($p=0,02$) e maior em casos de maior severidade ($p=0,04$), no grupo juvenil. A presença do EBV provavelmente não desempenha papel importante na progressão/severidade desta patologia.

Palavras-chave: Papilomatose. Papilomavírus humano. Vírus Epstein-Barr. CD21 Agressividade.

Costa VBB. Investigation of the presence and possible influence of the Epstein-Barr virus on the severity of papillomatosis [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

Laryngeal papillomatosis is a benign neoplasm caused by the human papillomavirus (HPV), been types 6 and 11 the most commonly related, and is divided into two groups: juvenile and adult. Viral coinfection has been suggested in head and neck lesions; in this sense, Epstein Barr virus (EBV), which also presents tropism for epithelial cells, has been studied in this group of lesions. The aims of this study are to perform HPV genotyping, investigate EBV-DNA presence by PCR and EBV-RNA by *in situ* hybridization; and associate EBV presence with CD21 immunoexpression. Finally, the results were associated with Derkay laryngoscopic score. Eighty cases of laryngeal papillomatosis, juvenile ($n = 36$) and adult ($n = 44$) were retrospectively subdivided into low-risk and high-risk of severity based on the Derkay index. All samples were HPV-positive, with 49 cases of HPV 6, 26 cases of HPV 11, 4 cases of HPV 6 and 11, and 1 case of HPV 16. The presence of EBV-DNA was detected in 9 samples, however EBV-RNA was not identified in any sample. As the presence of EBV-DNA, the CD21 immunoexpression was not statistically associated with any variables. The presence of HPV 6 was more common in ALP, HPV 11 was more common ($p = 0.02$) and higher in cases of higher severity ($p = 0.04$) in juvenile group. The presence of EBV probably does not play an important role in the progression/severity of this pathology.

Keywords: Papillomatosis. Human papillomavirus. Epstein-Barr virus. CD21. Aggressiveness.

1 INTRODUÇÃO

A papilomatose laríngea (PL) é uma patologia rara e considerada a manifestação clínica mais importante da infecção de laringe causada pelo papilomavírus humano (HPV), esta enfermidade é dividida em dois grupos distintos: a papilomatose laríngea de início juvenil (PLJ) e a papilomatose laríngea de início adulto (PLA) (Aaltonen et al., 2002). Nos papilomas laríngeos de início juvenil, o pico de incidência ocorre antes dos 5 anos de idade, não há predileção por sexo e geralmente estão associados aos HPVs transmitidos por via vertical, geralmente de uma mãe com infecção anogenital ativa ou latente, embora o parto cesariano não proteja a criança contra a infecção (El-Naggar et al., 2017).

Os papilomas laríngeos de início na idade adulta apresentam o pico de incidência entre 20 e 40 anos de idade, com predileção pelo sexo masculino (El-Naggar et al., 2017). Além disso, neste grupo de pacientes, a doença costuma acometer indivíduos com maior número de parceiros sexuais e com maior frequência de contatos orogenitais. Esta hipótese é baseada no fato de que a PL e os condilomas genitais apresentam os mesmos tipos de HPVs, os tipos 6 e 11, sendo o tipo 6 o mais frequente (Auborn et al., 1994; Aaltonen et al., 2002; Vancurova et al., 2002). O tipo 11, embora menos frequente é considerado o mais agressivo (Cook et al., 2000; Gerein et al., 2005; Donne et al., 2010; Lin et al., 2010; Reidy et al., 2004; Sanchez et al., 2013).

A progressão dos papilomas é lenta, gerando sintomatologias como a dificuldade respiratória progressiva, disfonia e tosse persistente (Vancurova et al., 2002). Sua progressão pode acarretar obstrução da via aérea e a disseminação pulmonar, ambas consequências podem ser fatais (Aaltonen et al., 2002). A raridade da doença pode retardar o diagnóstico médico levando a

tratamentos inadequados (Fasunla, Lasisi, 2009). Em geral, cerca de 100% dos pacientes jovens posteriormente diagnosticados com PL já apresentavam sintomas 2 anos antes do diagnóstico final (Harris et al., 2012); sendo que cinco a cada sete destes pacientes, recebiam tratamento para asma. O diagnóstico tardio da PLJ tem inúmeros efeitos sobre a criança, como o defeito na voz, levando ao isolamento e diminuição no engajamento em atividades que envolvam a comunicação (Merati et al., 2008).

As características morfológicas e estruturais da orofaringe favorecem a colonização da região pelo HPV. Isso ocorre, muito provavelmente, devido à justaposição entre o epitélio escamoso estratificado e o tecido linfático, além da presença de criptas que aumentam a área de superfície epitelial e de mucosa não queratinizada, o que facilita o acesso viral às células basais; ambos fatores que se assemelham aos encontrados nos tecidos do trato genital (El-Mofty, Lu, 2003; Kreimer et al., 2005; Heck et al., 2010). O epitélio da laringe é uma membrana mucosa com propensão para o desenvolvimento neoplásico, já que é rotineiramente exposto a vários carcinógenos nutricionais e ambientais (de Villiers et al., 1985; Scully, 2002). Adicionalmente, receptores de membrana com afinidade específica para moléculas virais podem estar presentes nestas regiões (Godínez et al., 2014).

O Epstein Barr Vírus (EBV) é um vírus DNA, comumente associado a neoplasias malignas de células B e epiteliais (Guidry, Scott, 2017). Seu maior receptor de ligação é o CD21 o qual é encontrado em todas as células B maduras e menos frequentemente nas células epiteliais da cavidade bucal e orofaringe (Jiang et al., 2015). A expressão de CD21 nas células epiteliais aumenta a possibilidade de coinfeção HPV+/EBV+, principalmente em locais ricos em tecido linfoide (Jiang et al., 2015). Na laringe, o tecido conjuntivo frouxo altamente celularizado também é composto por tecido linfoide próximos aos recessos laríngeos (Ovalle et al., 2013).

O EBV é o agente etiológico do carcinoma nasofaríngeo e de um subtipo de carcinoma gástrico. Este tropismo por células epiteliais e seu potencial oncogênico sugere o EBV como um cofator nos cânceres relacionados ao HPV (Guidry, Scott, 2017). O EBV também pode atuar de forma indireta, interferindo na resposta imune às células HPV-transformadas através da transcrição do gene viral *BCRF1*, um produto homólogo à interleucina-10 (Polz-Dacewicz et al., 2016). Além disso, a presença de EBV pode aumentar a instabilidade genômica das células do cérvix infectadas por HPV contribuindo para a malignização (Meckes et al., 2013; Aromseree et al., 2015).

Na PLA, o tipo de HPV (11 e 16) e a coinfeção viral (EBV e herpes simplex vírus) foram associados ao curso clínico agressivo da doença (Pou et al., 1995). Entretanto, nos carcinomas de cabeça e pescoço, a coinfeção HPV+/EBV+ foi rara (Deng et al., 2014). No papiloma sinusal de Schneiderian, o EBV-DNA também não foi encontrado pelas técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e nem por hibridização *in situ* (HIS) (Gaffey et al., 1996). Embora a técnica de PCR seja mais sensível, a HIS pode discriminar se o EBV está presente nas células epiteliais neoplásicas ou no infiltrado de células B no estroma (Aromseree et al., 2015; Guidry, Scott, 2017).

Microscopicamente, a PL é caracterizada por proliferação do epitélio escamoso estratificado queratinizado, disposto em projeções digitiformes, suportada por septos de tecido conjuntivo fibrovascular e superficialmente a presença de hiperqueratose é mínima. Ocasionalmente, alguns papilomas demonstram hiperplasia da camada basal e aumento da atividade mitótica, que podem ser inadequadamente consideradas com displasia epitelial leve. 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 (Davids et al., 2014; El-Naggar et al., 2017). Pode haver a presença de disqueratose individual das células (El-Naggar et al.,

2017). O infiltrado inflamatório observado nos septos de tecido conjuntivo pode variar dependendo da quantidade de trauma ao qual a lesão é submetida (El-Naggar et al., 2017).

Os tratamentos para esta patologia incluem a utilização de aciclovir, cidofovir, laser CO₂, microdebridação e coagulação com plasma de argônio e interferon- α (IFN- α), e apresentam resultados variáveis (Snoeck et al., 1998; Florian Preuss et al., 2007; Pudzuhn et al., 2007). O interferon- α é administrado, especialmente para crianças, porque nestes casos em particular, a PL é mais agressiva 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). O tratamento cirúrgico pode ser repetitivo, com o intuito de desobstruir as vias aéreas. Entretanto, não é a melhor modalidade de tratamento, devido à etiologia viral da doença. A PLJ 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).

A identificação dos tipos de HPV pode fornecer respaldo científico para incluir ou não a prevenção da PL nos programas de vacinação, protegendo, principalmente, as crianças e, subsequentemente, reduzindo principalmente a incidência de PLJ (Freed, Derkay, 2006). Com isso, estudos são necessários para esclarecer porquê em alguns pacientes a PL possui um curso mais agressivo, determinando se a presença concomitante de outros patógenos pode contribuir para a sua severidade.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Geral

Este projeto visa elucidar se o EBV pode estar associado ao HPV contribuindo para a severidade da PLJ e PLA.

2.2 Específicas

Genotipar os tipos de HPVs presentes nas amostras de PLJ e PLA;
Investigar a presença de EBV-DNA por PCR;
Investigar a presença de EBV-RNA por Hibridização *in situ*;
Associar a presença de EBV-DNA com a imunexpressão de CD21;
Associar os resultados clinico-patológicos, moleculares e imuno-histoquímicos com a escala laringoscópica de Derkay et al. (1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 50419615.1.0000.0077, parecer nº 1.419.232) no Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP (ANEXO A).

3.1 Amostras e Análise Clinicopatológica

As amostras de PLJ e PLA, constituídas de blocos de tecido parafinado oriundos de biopsias e peças cirúrgicas, eram provenientes do Ambulatório da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, do Ambulatório de Otorrinolaringologia Pediátrica da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP e do Centro Clínico de Cabeza y Cuello da Guatemala. Além disso, as amostras foram coletadas num período entre 1997 e 2016. Dados clínicos como a idade, sexo, tempo de evolução da doença, número de papilomas laríngeos e histórico de fatores de risco associados (refluxo gástrico-esofágico, tratado ou não; e imunossupressão, transplantes ou má-nutrição) foram previamente coletados a partir dos prontuários médicos dos pacientes. Casos com dados incompletos ou casos onde os blocos de parafina não estavam disponíveis foram excluídos da pesquisa.

Tecidos parafinizados provenientes de biópsias incisionais bem como peças cirúrgicas realizadas para a confirmação do diagnóstico e tratamento foram utilizadas neste estudo. As lâminas de hematoxilina e eosina (H&E) foram revisadas por três pesquisadores independentemente e a calibração foi confirmada pelo teste *Kappa*. Dados como morfologia da proliferação epitelial, coilocitose, disqueratose, mitoses, displasias epiteliais e intensidade do infiltrado

inflamatório foram estudados e notados.

Os critérios da Organização Mundial da Saúde – Tumores de Cabeça e Pescoço foram utilizados para classificar casos onde houve a presença de displasia epitelial (El-Naggar et al., 2017). A classificação está descrita abaixo:

- a) baixo grau de displasia: alterações citológicas e arquiteturais restritas ao terço inferior do epitélio, presença de poucas atipias celulares.
- b) alto grau de displasia: alterações citológicas e arquiteturais presentes acima do terço inferior do epitélio. Alterações como maturação anormal, desordens de estratificação e polarização, irregularidades da morfologia celular e ausência de alterações no estroma.

Neste estudo, foram utilizados 80 casos de tecidos parafinados, obtidos dos acervos das respectivas instituições e assim divididos (Suter-Montano et al., 2013):

- a) grupo 1: PLJ - pacientes com ≤ 16 anos no momento do diagnóstico inicial ($n=36$);
- b) grupo 2: PLA - pacientes com > 16 anos no momento do diagnóstico inicial ($n=44$).

Além disso, a escala laringoscópica de Derkay et al. (1998) foi aplicada para obter a pontuação (*score*) de cada caso, apenas em 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., 2003).

3.2 Extração de DNA

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto do Câncer de São Paulo (ICESP). Para todos os casos, os cortes foram adquiridos da seguinte forma: o primeiro corte de 3 μm que foi corado com H&E e analisado, os 10 cortes subsequentes de 5 μm foram coletados e inseridos em tubos de polipropileno estéreis de 1,5 mL para extração de DNA. E finalmente, o corte seguinte (de 3 μm) foi submetido à coloração de H&E e analisado, a fim de certificar que o material coletado anteriormente continha PL. Além disso, após a confecção dos cortes de cada bloco, os instrumentais foram descontaminados e a navalha do micrótomo foi trocada com intuito de evitar a contaminação entre amostras.

O DNA foi extraído de maneira orgânica, utilizando o método descrito por Green e Sambrook (2012). Em resumo, as amostras foram desparafinizadas com xilol e soluções de etanol (100% e 50%), vortexadas por 1 minuto e centrifugadas à 12000 rpm durante 15 minutos, ao final de cada banho o sobrenadante era descartado por inversão. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem por 10 minutos a 55 °C (Eppendorf ThermoMixer). Após a secagem, as amostras foram digeridas com proteinase K 0,1% pelo período de 18 horas a 65 °C em agitação.

No dia seguinte, a proteinase K foi inativada a 95 °C por 10 minutos. As amostras foram submetidas a extração orgânica de DNA, utilizando fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Após uma centrifugação, a fase aquosa foi precipitada em 100 μL de acetato de amônio 7,5 M e 800 μL de etanol 100%, por 2 horas em freezer -70 °C.

Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos à

12000 rpm (em temperatura de 4 °C) e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado por inversão. Para lavagem, 1 mL de etanol 70% gelado foi adicionado e novamente centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos. Esta etapa foi repetida por mais uma vez e em ambas o sobrenadante foi descartado por inversão e as amostras passaram por nova secagem (10 minutos a 55 °C). Após a secagem, o material foi ressuspensionado em 30 µL de água deionizada livre de DNA. A qualidade e a quantidade do DNA extraído foram quantificadas no espectrofotômetro e posteriormente, estocadas a -20 °C até o uso.

3.3 Genotipagem do HPV

Esta etapa foi realizada no Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia das Doenças Associadas ao Papilomavírus Humano (Instituto do HPV) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Para a genotipagem do HPV o *kit* INNO-LiPA HPV *Genotyping Extra II* (Innogenetics N.V., Bélgica) foi utilizado. O *kit* é um ensaio de hibridização reversa em linha capaz de identificar 32 genótipos diferentes de HPVs. Oitenta amostras de PL, 1 controle negativo (água destilada livre de DNA) e 1 controle positivo (amostra HPV6+) foram submetidas ao teste de genotipagem.

Como descrito anteriormente por (Kleter et al., 1999), 40 µL de PCR *mastermix* foram pipetados em tubos livres de DNA para amplificação do DNA, em seguida 10 µL do DNA extraído foi adicionado a cada tubo. Ao fim desta etapa, os tubos foram inseridos em termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e as condições para a realização deste PCR de amplificação foram: descontaminação (37 °C por 10 minutos); denaturação, inativação de uracil-N-glycosylase e ativação da AmpliTaq Gold 360 DNA

polymerase (94 °C por 9 minutos); os próximos passos constituíam 40 ciclos de recepção: denaturação (94 °C por 30 segundos), anelamento dos *primers* (52 °C por 45 segundos); extensão dos *primers* (72 °C por 45 segundos); e extensão final de 72 °C por 10 minutos. Após a PCR de amplificação, deu-se início a detecção dos tipos de HPVs.

Em resumo, utilizando pinças estéreis, as tiras foram removidas da embalagem e identificadas, cada tira foi então inserida em uma calha da bandeja de incubação. Em seguida, 10 µL de solução de denaturação foi pipetada para cada uma das extremidades de calha e 10 µL de DNA amplificado foi aplicado e misturado à solução de denaturação (antes de dar início ao processo de incubação a solução permaneceu por cerca de 5 minutos em temperatura ambiente para a denaturação do material genético). Por fim, 2 mL de solução de hibridização foi adicionada em cada calha e a bandeja colocada em agitador (80 rpm) a 49 °C e incubada por 60 minutos.

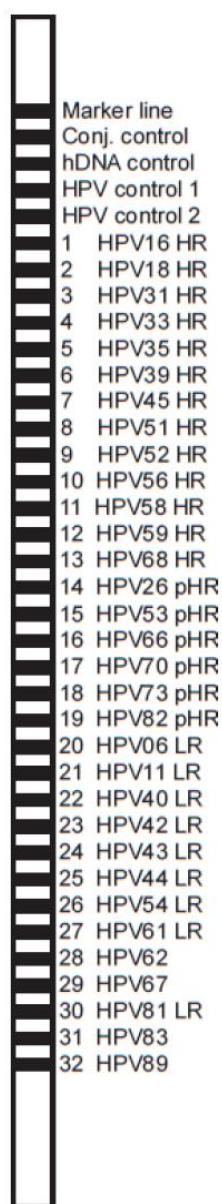
Após a incubação, as tiras passaram por dois banhos rápidos utilizando solução de lavagem. Um terceiro banho, utilizando a mesma solução, foi realizado em agitação por 30 minutos a 49 °C. Para a revelação da cor, 2 mL de conjugado foi aplicado sobre as tiras, passando por agitação durante 30 minutos para incubação do conjugado. Uma nova lavagem foi feita após os 30 minutos (2 mL por calha) e então 2 mL de substrato cromógeno foi adicionado a cada calha (agitação durante 30 minutos). Para parar a reação do cromógeno as tiras foram lavadas utilizando água destilada em agitação durante 3 minutos.

Ao final deste processo as tiras foram removidas e transferidas para papel absorvente, onde ficaram até a completa secagem. Os resultados foram então avaliados utilizando o cartão de leitura (Figura 1).

Para garantir a confiabilidade e qualidade da extração de DNA e do resultado do teste, as tiras INNO-LiPA HPV *Genotyping Extra II* contam com 4 linhas de controle. O controle do conjugado, sua positividade garante que a

reação do conjugado e seu substrato foi efetiva; o controle de DNA humano (HLA-DPB1), sua positividade garante a qualidade e eficiência da extração de DNA do tecido utilizado no teste; e dois controles de DNA/HPV de uma porção comum entre todos os tipos de HPVs.

Figura 1 – Cartão de leitura do teste de genotipagem do HPV em tira



Legenda: Conj. control – controle conjugado; hDNA – DNA humano; HR – alto risco; pHR – provavelmente alto risco; LR – baixo risco.

Fonte: Bula do kit INNO-LiPA HPV *Genotyping Extra II*.

3.4 Detecção do EBV (EBV DNA)

Os iniciadores utilizados neste estudo estão descritos no Quadro 1. O gene da β -globina foi utilizado como controle interno da reação de PCR para avaliar a integridade do DNA extraído. Em todos os ensaios foram utilizados DNA purificado do vírus EBV (Amplirun[®] EBV DNA Control, Vircell, Granada, Espanha) como controle positivo e um controle negativo, sem adição de DNA molde.

Quadro 1 – Iniciadores utilizados

Nome	Sequência dos primers	Região amplificada	Tamanho Amplicon	Referência
EBV	F (5' CACTTTAGAGCTCTGGAGGA 3') R (5' TAAAGATAGCAGCAGCGCAG 3')	Sequência interna repetida de <i>BamHI</i> W	153 pb	Coates et al. (1991)
β -globina	F (5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3') R (5' CAACTTCATCCACGTTACACC 3')	Gene β -globina	268 pb	Bell et al. (1993)

Fonte: Elaborado pelo autor.

A reação de amplificação (PCR Multiplex) foi realizada em um volume final de 20 μ L, contendo 20 a 40 ng de DNA, 10 mM Tris HCl pH 8,3/50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,8 mM de desoxirribonucleotídeo, 0,2 μ L de cada iniciador (10 μ M/ μ L) e 1 U de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em termociclador Mastercycler[®] gradient (Eppendorf,

Hamburgo, Alemanha). As condições para a realização deste PCR foram: desnaturação inicial de 95 °C por 3 minutos, 40 ciclos de desnaturação de 95 °C por 30 segundos, anelamento de 60 °C por 30 segundos, extensão de 72 °C por 45 segundos e extensão final de 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 2,0% em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA), corados com 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, CA) e visualizados em um transiluminador UV (DyNA Light, LABNET, EUA). O marcador de peso molecular utilizado foi *Ladder* 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com recomendações do fabricante.

3.5 Construção do microarranjo de tecidos (MAT)

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Patologia Molecular do setor de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center. Após a revisão morfológica de todos os casos em lâminas coradas com H&E, áreas tumorais representativas foram identificadas, espelhadas e demarcadas nos blocos parafinados originais. Quatro áreas de cada caso foram selecionadas, assim discriminados: 1- duas áreas predominantemente compostas por tecido epitelial; 2- duas áreas compostas por interface epitélio e tecido conjuntivo.

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 *arrayer* (Beecher Instrumedics, Microarray Technology). Cortes de 4 µm foram realizados a partir do bloco MAT, recolhidos com o auxílio de filme aderente comercial (Instrumedics) e montados sobre lâminas comerciais silanizadas carregadas (StarFrost, Knittel Glass). O

tecido foi então fixado através da exposição das lâminas à luz ultra-violeta por 15 minutos e o adesivo plástico foi então removido com solvente não clorinado (TPC@, Instrumedics). As lâminas foram identificadas e armazenadas a -20 °C até o uso.

3.6 Hibridação in Situ (HIS) para EBER (EBV-RNA)

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). O teste de HIS para EBV-RNA foi realizado com o intuito de definir o local de detecção do vírus dentro das amostras, se o mesmo estaria localizado nas células epiteliais ou em infiltrado inflamatório.

Cortes de 4 µm de espessura do MAT foram colocados sobre lâminas comerciais silanizadas carregadas (StarFrost, Knittel Glass). Posteriormente, desparafinizadas, reidratadas, a peroxidase endógena foi bloqueada e digeridas com proteinase K. Os cortes foram então incubados com a sonda conjugada à fluoresceína EBER (Y5200, DakoCytomation) e hibridizados a 55 °C por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, as lâminas passaram por banho em solução de estringência pré-aquecida (Stringent Wash 50x concentrado, Dako 52500) a 55 °C por 25 minutos. Os cortes foram então incubados com anticorpo anti-FITC/AP por 30 minutos em temperatura ambiente. Após lavagens, as lâminas foram incubadas por 45 minutos em temperatura ambiente com substrato *bromo-4-chloro-3-indolylphosphatase* (BCIP) com *nitroblue tetrazolium* (NBT) para a visualização da hibridização. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer por 1 minuto.

Como controle positivo um caso de linfoma comprovadamente positivo para EBV foi utilizado, no controle negativo a sonda EBER foi omitida. Casos considerados positivos deveriam apresentar pontos azuis escuro ou enegrecidos no interior do núcleo celular.

3.7 Imuno-histoquímica (IHQ)

Cortes de 4 µm de espessura do MAT foram desparafinizados em uma estufa a 60 °C por 18 horas e passaram por dois banhos sucessivos em xilol, 20 minutos em 60 °C e 20 minutos em temperatura ambiente, respectivamente. Em seguida os cortes foram hidratados em decrescentes concentrações de álcool (100%, 95%, 80% e 70%); para a recuperação antigênica as lâminas foram submersas em tampão de citrato (pH 6,0) pré-aquecido em micro-ondas em potência máxima por 10 minutos a 100 °C. Para o bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram submersas a 4 banhos de H₂O₂ 6% por 2 minutos cada. As lâminas então foram incubadas utilizando o anticorpo primário anti-CD21 (1:500, clone NBP2-38895, Novus Biologicals, CO, EUA) por 18 horas a 4 °C.

Por fim, após 2 banhos com Tris (pH 7,4) as lâminas foram novamente incubadas utilizando o sistema comercial peroxidase HRP – EnVision™ (DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA) e a detecção da reação foi feita utilizando o substrato cromogênico DAB (diaminobenzidina, DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA). Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer por 3 minutos, desidratados e montados com lamínulas. Controles positivos (tonsila) e negativos (onde houve omissão do anticorpo primário) foram incluídos nas reações.

3.8 Análise imuno-histoquímica

Utilizando um microscópio de luz convencional (Olympus CX41, Tokio, Japão), sob aumento de 100 vezes, cada uma das amostras contidas nas lâminas de MAT foram observadas e qualificadas por 3 pesquisadores independentemente (VC, EK e VA), a fim de evitar discordância de resultados. Nas células epiteliais, a expressão foi observada em membrana e citoplasma, e para classificação das amostras este estudo seguiu o método descrito anteriormente por Burgos e Vera-Sempere (2000), onde amostras com mais de 10% de células exibindo imunomarcagem eram consideradas positivas.

3.9 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* SPSS, versão 24.0 (SSPInk, IL, USA). As variáveis clínicas e anatomopatológicas foram comparadas pelos testes Qui-Quadrado ou exato de Fisher. O teste de comparação entre duas variáveis foi feito por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para todos os testes estatísticos o nível de significância de 5% foi adotado.

4 RESULTADOS

4.1 Análise clinicopatológica

Os dados clinicopatológicos estão descritos na Tabela 1. Os resultados estabelecidos durante as análises dos dados clinicopatológicos evidenciaram que a média de idade do grupo PLJ foi de 4,9 anos de idade e do grupo PLA foi de 40 anos de idade. Além disso, a PLJ acometeu igualmente os sexos masculino e feminino, já a PLA acometeu principalmente pacientes do sexo masculino, numa proporção de 3,8:1.

Em relação à localização, em ambos os grupos a PL acometeu principalmente a região de pregas vocais, seguida pela região de comissuras das pregas vocais. A presença de ruído durante respiração, assim como dificuldade respiratória moderada e severa, foram constatadas principalmente no grupo PLJ ($p < 0,001$). A necessidade de traqueostomia causada pela obstrução de vias aéreas também foi estatisticamente significativa ($p = 0,03$), mostrando maior número de casos (16,7%) no grupo PLJ.

Tabela 1 – Análise descritiva dos clinicopatológicos

(continua)

CARACTERÍSTICAS		PLJ (n=36)	PLA (n=44)	<i>p</i>
Idade, anos	Média	4,9	40	< 0,001
	Variância	01 – 15	19 – 74	
Sexo	Masculino	18 (50,0%)	35 (79,5%)	0,01
	Feminino	18 (50,0%)	9 (20,5%)	

CARACTERÍSTICAS		PLJ (n=36)	PLA (n=44)	<i>p</i>
Índice Derkay	Baixo	31 (86,1%)	43 (97,7%)	0,08
	Alto	5 (13,9%)	1 (2,3%)	
Localização ^a	Pregas vocais	27	43	1,00
	Comissuras das pregas vocais	8	11	
	Epiglote e ariepiglote	8	5	
	Subglote	5	4	
	Outros	6	3	
Ruído	Ausente	11 (30,6%)	40 (90,9%)	< 0,001
	Repouso	17 (47,2%)	4 (9,1%)	
	Atividade	5 (13,9%)	-	
	NR	3 (8,3%)	-	
Dificuldade respiratória	Ausente	12 (33,3%)	39 (88,6%)	< 0,001
	Leve	1 (2,8%)	5 (11,4%)	
	Moderada	7 (19,4%)	-	
	Severa	15 (41,7%)	-	
	NR	1 (2,8%)	-	
Traqueostomia	Sim	6 (16,7%)	1 (2,3%)	0,03
	Não	27 (75,0%)	41 (93,2%)	
	NR	3 (8,3%)	2 (4,5%)	
Cirurgia	Eletiva	31 (86,1%)	43 (97,7%)	0,11
	Emergência	3 (8,3%)	-	
	Urgência	2 (5,6%)	1 (2,3%)	
Recidivas	Sim	19 (52,8%)	21 (47,7%)	0,53
	Não	14 (38,9%)	23 (52,3%)	
	NR	3 (8,3%)	-	
Óbitos	Sim	1 (2,8%)	2 (4,5%)	1,00
	Não	35 (97,2%)	41 (93,2%)	
	NR	-	1 (2,3%)	

Legenda: ^aO mesmo paciente pode apresentar mais de uma lesão por região; NR – não relatado.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Resultados e análises dos testes de detecção viral e imuno-histoquímica

Os resultados dos testes de detecção DNA-viral e de imuno-histoquímica estão descritos na Tabela 2. No teste de genotipagem, o HPV 6 foi detectado em 49 amostras (Figura 2), sendo 17 do grupo PLJ e 32 do grupo PLA; o HPV 11, foi detectado em 26 amostras, sendo 17 do grupo PLJ e 9 do grupo PLA; 4 amostras apresentaram a presença concomitante dos HPVs 6 e 11, apresentando 2 amostras em cada grupo; apenas 1 amostra apresentou positividade para o HPV 16, estando classificada no grupo PLA. Além disso, houve associação estatisticamente significativa entre os tipos de HPVs e os grupos ($p=0,02$), o HPV 11 foi mais comum no grupo PLJ e o HPV 6 foi mais comum no grupo PLA.

Dois testes para detecção do EBV foram realizados, o teste de detecção através de PCR qualitativa, mostrou a presença de EBV-DNA em 9 amostras, sendo 5 do grupo PLJ e 4 do grupo PLA (Figura 3), já o teste de HIS não detectou RNA de EBV em nenhuma das amostras.

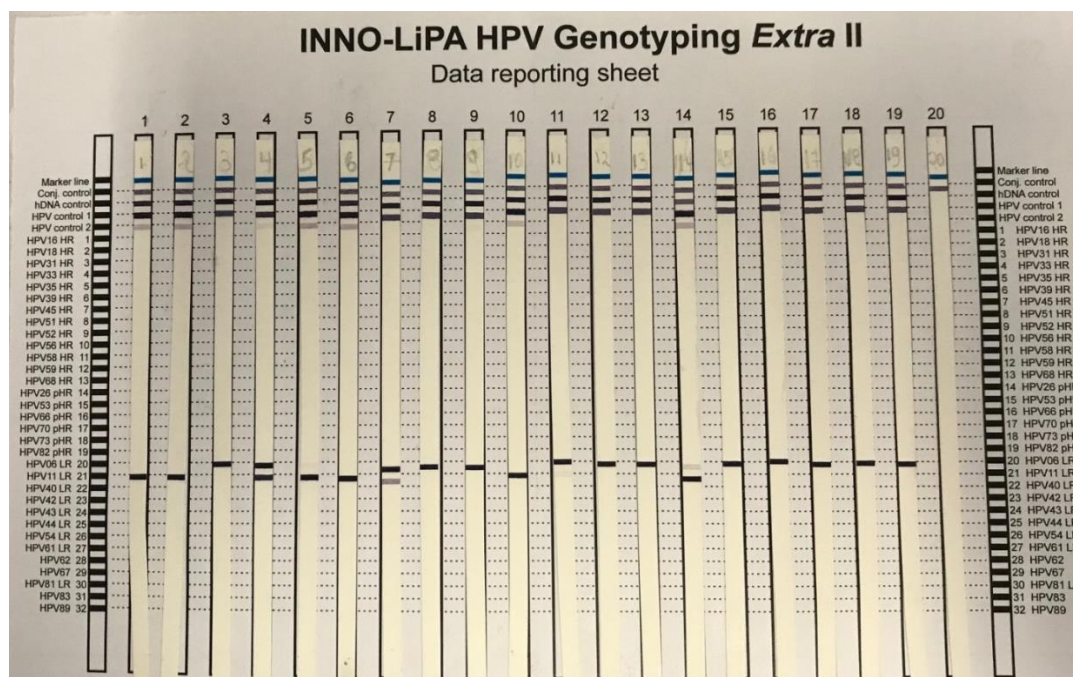
A reação de IHQ foi positiva para CD21 em 31 casos, sendo 16 em PLJ e 15 em PLA (Figura 4). Apenas 3 casos EBV-DNA positivos apresentaram positividade para CD21.

Tabela 2 – Resultado dos testes de genotipagem de HPV, presença de EBV-DNA, EBV-RNA e expressão proteica para CD21

		PLJ (n=36)	PLA (n=44)	P
HPV	6	17	32	0,02
	11	17	9	
	6 e 11	2	2	
	16	0	1	
EBV DNA	+	5 (13,9%)	4 (9,1%)	0,72
	-	31 (86,1%)	40 (90,9%)	
EBV RNA	+	0 (0,0%)	0 (0,0%)	NA
	-	36 (100%)	44 (100%)	
CD21	+	16 (44,4%)	15 (34,1%)	0,47
	-	20 (55,6%)	29 (65,9%)	

Fonte: Elaborada pelo autor.

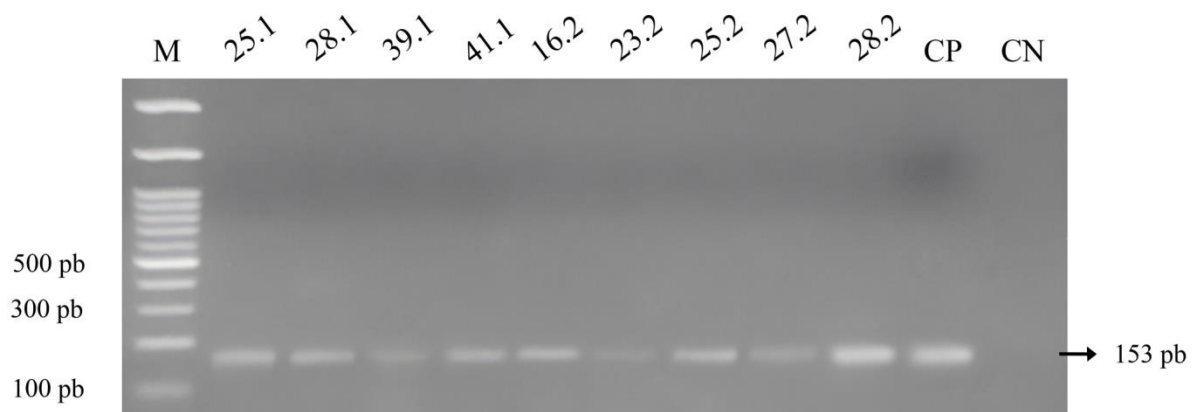
Figura 2 – Tiras do kit INNO-LiPA após genotipagem do HPV



Legenda: A tira 2 exibe positividade para HPV 11, a tira 3 exibe positividade para o HPV 6, a tira 4 exibe positividade para os HPVs 6 e 11, tira 19 exibe o controle positivo (HPV 6) e tira 20 exibe o controle negativo (água).

Fonte: Elaborada pelo autor.

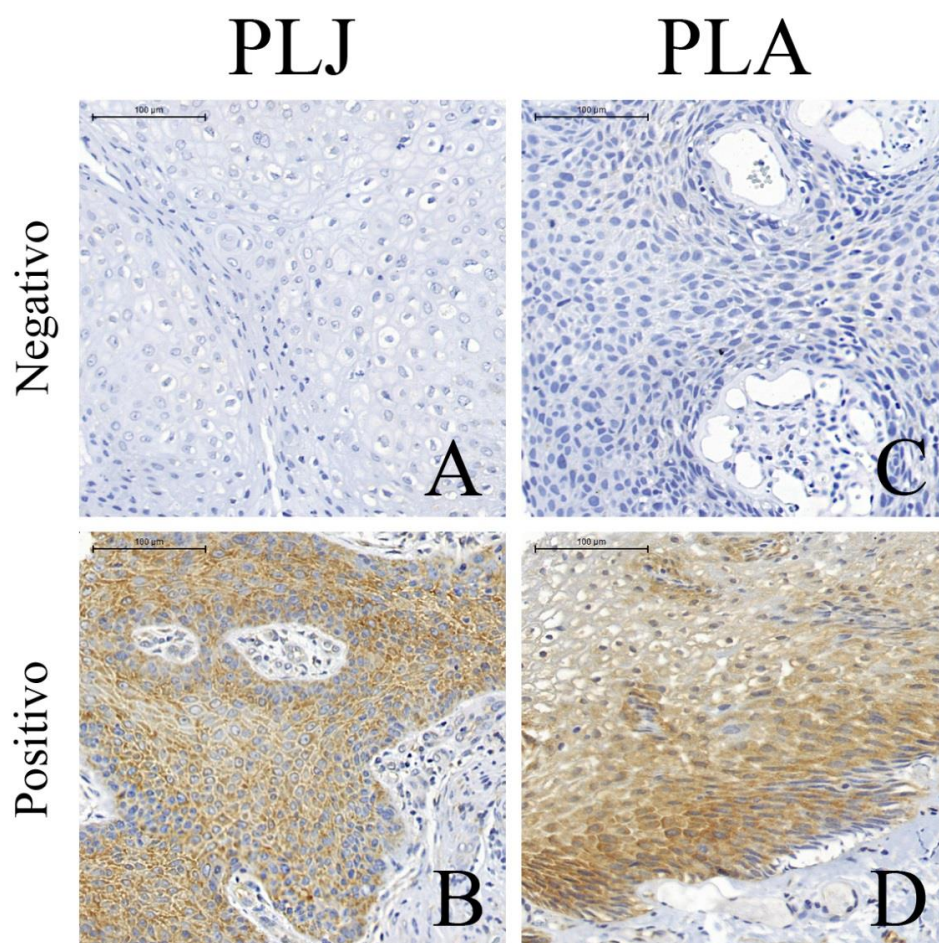
Figura 3 – Resultado do teste de PCR para detecção do EBV



Legenda: Gel de agarose a 2% exibindo todas as amostras que foram EBV positivas. M – escala de peso molecular (em pares de base); CP – controle positivo; CN – controle negativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4 – Resultado do teste de IHQ



Legenda: Casos do grupo PLJ, A) exibindo negatividade e B) exibindo positividade para proteína CD21; Casos do grupo PLA C) exibindo negatividade e D) exibindo positividade para proteína CD21 (cromógeno DAB; contracoloração com hematoxilina de Meyer).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Associação entre dados clinicopatológicos e HPV-DNA

Os resultados dos testes de associação das amostras sem estratificação dos grupos estão descritos na Tabela 3. Não houve associação estatisticamente significativa entre o tipo do HPV e o sexo dos pacientes analisados ($p=0,90$).

Houve associação estatisticamente significativa entre o tipo de HPV e o índice de Derkay, o HPV 11 foi observado em maior quantidade em pacientes com maior grau de severidade de doença ($p=0,002$), segundo a escala laringoscópica de Derkay.

Este estudo observou que pacientes infectados pelo HPV 11 apresentam maiores taxas de traqueostomia ($p=0,01$). Além disso, notou-se que a subglote e a comissura das cordas vocais foram as regiões de maior acometimento do HPV 11 ($p=0,02$ e $p=0,004$, respectivamente), independente do grupo. A presença de ruído durante repouso e em atividade esteve associada com a presença do HPV 11 ($p=0,04$). As recidivas das lesões não parecem ter associação com o tipo do HPV ($p=0,91$).

Tabela 3 – Testes de associação entre os tipos de HPV e os dados clinicopatológicos, independente de grupo

(continua)

CARACTERÍSTICAS		HPV 6	HPV 11	<i>p</i>
Índice Derkay	Baixo	49 (100%)	24 (80,0%)	0,002
	Alto	0 (0,0%)	6 (20,0%)	
L - Comissuras das pregas vocais	Ausente	43 (87,8%)	17 (56,7%)	0,004
	Presente	6 (12,2%)	13 (43,3%)	

CARACTERÍSTICAS		HPV 6	HPV 11	<i>p</i>
L - Subglote	Ausente	47 (95,9%)	23 (76,7%)	0,02
	Presente	2 (4,1%)	7 (23,3%)	
Ruído	Ausente	35 (74,5%)	15 (51,7%)	0,04
	Repouso	11 (23,4%)	10 (34,5%)	
	Atividade	1 (2,1)	4 (13,8%)	
Traqueostomia	Sim	1 (2,2%)	6 (20,7%)	0,01
	Não	44 (97,8%)	23 (79,3%)	

Legenda: L – localização.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados dos testes de associação estratificados por grupo estão descritos na Tabela 4. Durante as análises por grupo, o único fator que apresentou associação estatisticamente significativa foi a localização. Notou-se que o HPV 11 esteve mais presente, no grupo PLJ, em amostras de subglote e comissura das cordas vocais, $p=0,047$ e $p=0,044$, respectivamente. Já o grupo PLA, associou-se apenas à região de comissura das cordas vocais, com um número significativamente maior de HPV 11 ($p=0,01$).

Tabela 4 – Testes de associação entre os tipos de HPV e os dados clinicopatológicos, por grupo

(continua)

GRUPO	CARACTERÍSTICAS		HPV 6	HPV 11	<i>p</i>
PLJ	Índice Derkay	Baixo	17 (100%)	14 (73,7%)	0,04
		Alto	0 (0,0%)	5 (26,3%)	
PLA	Índice Derkay	Baixo	32 (100%)	10 (90,9%)	0,25
		Alto	0 (0,0%)	1 (9,1%)	

GRUPO	CARACTERÍSTICAS		HPV 6	HPV 11	<i>p</i>
PLJ	L - Subglote	Ausente	17 (100%)	14 (73,7%)	0,04
		Presente	0 (0,0%)	5 (26,3%)	
PLA	L - Subglote	Ausente	30 (93,8%)	9 (81,8%)	0,26
		Presente	2 (6,3%)	2 (18,2%)	

Legenda: L – localização.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Associação entre os dados clínicos patológicos e EBV-DNA

Não houve associação estatisticamente significativa entre a presença de EBV-DNA e os grupos analisados ($p=0,72$). Também não houve associação estatisticamente significativa entre a presença de EBV-DNA e o sexo dos pacientes ($p=0,47$), independente do grupo. A presença de EBV-DNA não influenciou a severidade da PL ($p=1,00$), verificada através da escala laringoscópica de Derkay, independente do grupo.

A presença de EBV-DNA não influenciou os outros fatores clinicopatológicos analisados: 1) ruído ($p=0,19$), independente do grupo; 2) recidivas ($p=0,73$), independente do grupo; 3) traqueostomia ($p=0,58$), independente do grupo; e 4) localização ($p>0,05$).

Além disso, não houve associação estatisticamente significativa entre a imunexpressão da proteína CD21 e a presença do EBV-DNA ($p>0,05$).

5 DISCUSSÃO

A PL é uma doença crônica do trato respiratório que ocorre tanto em crianças quanto em adultos e é causada pelos HPVs de baixo risco 6 e 11 (Ivancic et al., 2018). Os HPVs 6 e 11 infectam as células basais do epitélio de revestimento e causam uma disfunção imune local, que resulta na formação dos papilomas (Bonagura et al., 2010). Apesar disso, ainda não está claro porquê em alguns pacientes a PL apresenta um curso mais agressivo.

Estudos mostram que a PLJ acomete igualmente ambos os sexos e ocorrem normalmente antes dos 5 anos de idade; já a PLA acomete principalmente pacientes do sexo masculino, numa relação 4:1, e possui um pico de incidência na 4ª década de vida (Auborn, 2002; Dyrstad, Rao, 2008; El-Naggar et al., 2017; El-Achkar et al., 2019). Os achados epidemiológicos do presente estudo foram semelhantes aos descritos anteriormente, tanto para PLJ, quanto para PLA.

Estudo de Omland et al. (2014a) demonstrou que além do déficit vocal, uma das principais complicações da PL é a traqueostomia, principalmente em pacientes juvenis, o que corrobora com os resultados deste estudo, onde a presença de ruído, dificuldade respiratória e necessidade de traqueostomia foram estatisticamente significantes e maiores no grupo PLJ. Além disso, estudos associam a presença de HPV 11 ao grupo PLJ e maior severidade clínica da doença (Rabah et al., 2001; Maloney et al., 2006).

Inicialmente, este estudo contava com 83 amostras, das quais 3 foram excluídas, pois apesar da comprovada qualidade do DNA extraído, as 3 foram negativas durante a detecção do HPV. Estudo de revisão aponta que a presença de HPV em amostras de PL é reportada em cerca de 50 a 100% dos casos (Donne et al., 2010). Omland et al. (2014b) destacaram que a negatividade do

HPV pode representar uma descoberta possível e verdadeira, mas que também pode representar um falso negativo causado pelo tipo de técnica empregada para detecção do vírus, sensibilidade do método de detecção, baixa carga viral, baixa qualidade da amostra, perda da região L1 quando o HPV é integrado ao genoma humano e até mesmo a presença de tipos ainda não identificados de HPV. Nosso grupo especula que além das hipóteses anteriormente citadas, o HPV poderia estar presente em regiões da lesão que acabaram não sendo incluídas durante o processo de extração de DNA a partir dos blocos parafinados.

Neste estudo detectamos 3 tipos de HPVs, os tipos 6, 11 e 16; com 4 casos onde os tipos 6 e 11 foram detectados na mesma amostra e 1 caso de HPV 16. No entanto, a presença dos HPVs 6, 11, 16, 31, 33, 35 e 39 já foi relatada anteriormente (Peñaloza-Plascencia et al., 2000). Do mesmo modo, observou-se uma maior taxa de HPV do tipo 11 em jovens e, em adultos o HPV 6 foi o mais prevalente. A prevalência de HPV 11 em pacientes jovens já foi observada em estudos anteriores (Buchinsky et al., 2008; Draganov et al., 2006; Omland et al., 2014b). Ainda, os tipos distintos de vírus encontrados em cada grupo reforça a teoria de diferentes tipos de infecção, onde na PLJ a infecção provavelmente ocorra por via vertical, de mãe para filho, e na PLA por contato orogenital (Auborn et al., 1994; Aaltonen et al., 2002; Vancurova et al., 2002; El-Naggar et al., 2017).

Além de determinar a presença e tipo do HPV, este estudo investigou a presença do EBV em amostras de PL. Estudo anterior, realizado por Pou et al. (1995) contendo 24 amostras, revelou a presença de 3 casos positivos para EBV. O interessante é que se compararmos a população dos estudos, o presente trabalho apresenta um resultado similar ao encontrado anteriormente. O papel do EBV em patologias causadas pelo HPV é investigado há tempo (Zhang et al., 1992). Estudo recente de meta-análise, realizado por um grupo brasileiro, mostrou que carcinomas de cérvix uterino são 4 vezes mais comuns em

pacientes EBV positivos (de Lima et al., 2018), no entanto a maneira de como os vírus interagem ainda não está clara.

Para detecção do EBV, as taxas de concordância entre os testes de PCR e ISH costumam ser maiores que 95% (Hassan et al., 2006; Nonogaki et al., 2016). Muitas causas podem ser apontadas para justificar a discordância de resultados encontradas neste estudo, já que nenhum dos casos mostrou reatividade para EBER, diferente do encontrado na PCR. EBER representa duas espécies de RNA, codificadas a partir de dois genes virais, EBER1 e EBER2, e são expressos em células infectadas de forma latente em níveis próximos a um milhão de cópias por célula (Gulley, 2001). Acreditamos que a ausência de EBER pode ser explicada pela ausência do EBV nas áreas obtidas através da técnica de MAT, pela regulação negativa do gene EBER, ou pela perda de epissomas que pode ocorrer durante o processo de replicação celular (Hänel et al., 2001).

A infecção do EBV em células epiteliais, assim como em linfócitos B, se dá através do receptor de membrana CD21 (Young, Rickinson, 2004; Jiang et al., 2015). Estudos demonstram que a proteína viral EBNA1 regula negativamente a apoptose, o reparo do DNA e favorece a integração de DNA do HPV, contribuindo para a tumorigênese de patologias que apresentam coinfeção EBV/HPV (Frappier, 2011; Kahla et al., 2012). Neste estudo, a presença do EBV não foi associada com nenhuma das variáveis clínicas, provavelmente por causa do pequeno número de amostras positivas para EBV-DNA.

Assim como a presença do EBV, a expressão da proteína CD21 não foi associada a nenhuma das variáveis analisadas. Apesar do CD21 ser considerado um dos principais receptores que mediam a entrada do EBV (Young, Rickinson, 2004), estudo recente aponta que a entrada do EBV em células T/NK (*natural killers*) não ocorre através do receptor CD21 (Lee et al., 2018). A

imunoexpressão de CD21 não é usualmente encontrada em carcinoma nasofaríngeo, uma neoplasia maligna da região de cabeça e pescoço (Burgos, Vera-Sempere, 2000). No entanto, o mesmo estudo relata que células do epitélio de revestimento próximas aos tumores expressavam a proteína, sugerindo que a perda do receptor de membrana CD21 poderia ser uma das alterações imunofenotípicas das células neoplásicas (Burgos, Vera-Sempere, 2000).

A maneira de como o EBV infecta as células epiteliais não é clara. Apesar deste estudo demonstrar que células epiteliais expressam CD21, alguns casos positivos para EBV-DNA não apresentaram imunoexpressão de CD21. Diferentes modelos de infecção são propostos para explicar a entrada do EBV em células epiteliais na ausência do receptor CD21; como a infecção através do englobamento dos vírions revestidos por imunoglobulinas A em células epiteliais, mediado também pela proteína do componente secretor, resultando em internalização do EBV por via endocítica; outra hipótese é a alta afinidade entre EBV derivados de células B e células epiteliais negativas para CD21, através de interação direta entre o complexo gH-gL e as integrinas $\alpha V\beta 6$ e $\alpha V\beta 8$, funcionando como gatilho para a fusão do EBV com a membrana plasmática das células epiteliais; e por fim, a possível interação entre a proteína de membrana codificada pelo EBV, a proteína BMRF2, e as integrinas $\beta 1$, $\alpha 5$, $\alpha 3$ e αV , funcionando como ligante entre células epiteliais polarizadas e o EBV (Iizasa et al., 2012).

Além da positividade, o padrão de imunomarcção observado neste estudo não é o esperado para um receptor de membrana, já que todos os casos positivos exibiram marcação em região de citoplasma. O CD21 é uma glicoproteína de membrana do tipo 1, que possui um domínio extracelular, uma região transmembranar e um peptídeo intracelular (Arredouani et al., 2014); a presença do peptídeo intracelular provavelmente explica a presença de imunomarcção em citoplasma.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- a) a presença do EBV-DNA em amostras de PL é baixa;
- b) apesar da presença de EBV ser baixa, provavelmente sua presença não desempenha papel na progressão/severidade da PL;
- c) não há correspondência entre a imunexpressão de CD21 e a detecção do EBV;
- d) o HPV 6 é mais comum em PLA e, o HPV 11 é mais comum e está associado a maior severidade, segundo a escala laringoscópica de Derkay, na PLJ.

REFERÊNCIAS*

Aaltonen L-M, Rihkanen H, Vaheri A. Human Papillomavirus in Larynx. *Laryngoscope*. 2002;112(4):700-7.

Arredouani MS, Bhasin MK, Sage DR, Dunn LK, Gill MB, Agnani D, et al. Analysis of host gene expression changes reveals distinct roles for the cytoplasmic domain of the Epstein-Barr virus receptor/CD21 in B-cell maturation, activation, and initiation of virus infection. *J Virol*. 2014;88(10):5559-77. doi: 10.1128/JVI.03099-13.

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;73:70-6. doi: 10.1016/j.jcv.2015.10.015.

Auborn KJ. Therapy for recurrent respiratory papillomatosis. *Antivir Ther*. 2002;7(1):1-9.

Auborn KJ, Little RD, Platt TH, Vaccariello MA, Schildkraut CL. Replicative intermediates of human papillomavirus type 11 in laryngeal papillomas: site of replication initiation and direction of replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(15):7340-44.

Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85(14):1159-64.

Bonagura VR, Hatam LJ, Rosenthal DW, De Voti JA, Lam F, Steinberg BM, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: A complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and -11. *Apmis*. 2010;118(6-7):455-70.

Buchinsky FJ, Donfack J, Derkay CS, Choi SS, Conley SF, Myer CM, et al. Age of child, more than HPV type, is associated with clinical course in recurrent respiratory papillomatosis. *PLoS One*. 2008;3(5):1-8.

* 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

Burgos JS, Vera-Sempere FJ. Immunohistochemical Absence of CD21 Membrane Receptor in Nasopharyngeal Carcinoma Cells Infected by Epstein-Barr Virus in Spanish Patients. *Laryngoscope*. 2000;110(12):2081-84. doi: 10.1097/00005537-200012000-00020.

Coates PJ, d'Ardenne AJ, Khan G, Kangro HO, Slavin G. Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections. *J Clin Pathol*. 1991;44(2):115-8.

Cook JR, Hill DA, Humphrey PA, Pfeifer JD, El-Mofty SK. Squamous cell carcinoma arising in recurrent respiratory papillomatosis with pulmonary involvement: emerging common pattern of clinical features and human papillomavirus serotype association. *Mod Pathol*. 2000;13:914-8.

Dauids T, Muller S, Wise JC, Johns MM 3rd, Klein A. Laryngeal papillomatosis associated dysplasia in the adult population: an update on prevalence and HPV subtyping. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2014;123:402-8.

Deng Z, Uehara T, Maeda H, Hasegawa M, Matayoshi S, Kiyuna A, et al. Epstein-Barr virus and human papillomavirus infections and genotype distribution in head and neck cancers. *PLoS One*. 2014;9(11):e113702. doi: 10.1371/journal.pone.0113702.

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;108(6):935-7.

Donne AJ, Hampson L, Homer JJ, Hampson IN. The role of HPV type in recurrent respiratory papillomatosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2010;74(1):7-14. doi: 10.1016/j.ijporl.2009.09.004.

Draganov P, Todorov S, Todorov I, Karchev T, Kalvatchev Z. Identification of HPV DNA in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis using SYBR® Green real-time PCR. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. 2006;70(3):469-73. doi: 10.1016/j.ijporl.2005.07.018.

Dyrstad S, Rao K. Recurrent Respiratory Papillomatosis (RRP)—Juvenile Onset. *Clin Med Oncol*. 2008;2:481-6.

El-Achkar V, Duarte A, Carlos R, León JE, Ribeiro-Silva A, Pignatari S, et al. Histopathological features of juvenile-onset laryngeal papillomatosis related to severity. *Head Neck*. 2019;1-6. doi: 10.1002/hed.25602.

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.

El-Naggar A, Chan JCK, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ editors. WHO classification of head and neck tumours. Lyon: WHO Press. 2017; 91-5.

Fasunla AJ, Lasisi OA. Diagnostic challenges of laryngeal papillomatosis and its implications among children in developing country. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2009;73(4):593-5. doi: 10.1016/j.ijporl.2008.12.009.

Florian Preuss S, Peter Klussmann J, Jungehulsing M, Edmund Eckel H, Guntinas-Lichius O, Damm M. Long-term results of surgical treatment for recurrent respiratory papillomatosis. *Acta Otolaryngol*. 2007 Jan;127(11):1196-201. doi: 10.1080/00016480701200350.

Frappier L. Viral disruption of promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies by hijacking host PML regulators. *Virulence*. 2011;2(1):58–62.

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

Gaffey MJ, Frierson HF, Weiss LM, Barber CM, Baber GB, Stoler MH. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in sinonasal Schneiderian papillomas. An in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Clin Pathol*. 1996;106(4):475-82.

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. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;132(3):392-4. doi: 10.1016/j.otohns.2004.09.035.

Godínez JM, Nicolás-Parraga S, Pimenoff VN, Mengual-Chuliá 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;20(6):406-13. doi: 10.1111/1469-0691.12420.

Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.

Guidry JT, Scott RS. The interaction between human papillomavirus and other viruses. *Virus Res.* 2017;231:139-47. doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.002.

Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn.* 2001;3(1):1-10. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60642-3.

Hänel P, Hummel M, Anagnostopoulos I, Stein H. Analysis of single EBER-positive and negative tumour cells in EBV-harboursing B-cell non-Hodgkin lymphomas. *J Pathol.* 2001;195(3):355-60. doi: 10.1002/path.954.

Harris AT, 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.

Hassan R, White LR, Stefanoff CG, de Oliveira DE, Felisbino FE, Klumb CE, et al. Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. *Diagn Pathol.* 2006;1:17. doi: 10.1186/1746-1596-1-17.

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(1):166-181. doi: 10.1093/ije/dyp350.

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

Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, Jinushi M, Yoshiyama H. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma. *Viruses.* 2012;4(12):3420-3439.

Ivancic R, Iqbal H, de Silva B, Pan Q, Matrka L. Current and future management of recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope Investig Otolaryngol.* 2018;3(1):22-34. doi: 10.1002/lio2.132.

Jiang R, Ekshyyan O, Moore-Medlin T, Rong X, Nathan S, Gu X, et al. Association between human papilloma virus/Epstein-Barr virus coinfection and oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2015;44(1):28-36. doi: 10.1111/jop.12221.

Kahla S, Oueslati S, Achour M, Kochbati L, Chanoufi MB, Maalej M, et al.

Correlation between EBV co-infection and HPV16 genome integrity in Tunisian cervical cancer patients. *Brazilian J Microbiol.* 2012;43(2):744-53. doi: 10.1590/S1517-83822012000200039.

Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol.* 1999;37(8):2508-17.

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.

Lee JH, Choi J, Ahn YO, Kim TM, Heo DS. CD21-independent Epstein-Barr virus entry into NK cells. *Cell Immunol.* 2018;327:21-5. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.01.011.

de Lima MAP, Neto PJN, Lima LPM, Gonçalves Júnior J, Teixeira Junior AG, Teodoro IPP, et al. Association between Epstein-Barr virus (EBV) and cervical carcinoma: A meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2018;148(2):317-28. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.10.005.

Lin HW, Richmon JD, Emerick KS, de Venecia RK, Zeitels SM, Faquin WC, et al. Malignant transformation of a highly aggressive human papillomavirus type 11-associated recurrent respiratory papillomatosis. *Am J Otolaryngol.* 2010;31(4):291-6. doi: 10.1016/j.amjoto.2009.02.019.

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.

Maloney EM, Unger ER, Tucker RA, Swan D, Karem K, Todd NW, et al. Longitudinal measures of human papillomavirus 6 and 11 viral loads and antibody response in children with recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;132(7):711-5. doi: 10.1001/archotol.132.7.711.

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;110(31):E2925-33. doi: 10.1073/pnas.1303906110.

Merati AL, Keppel K, Braun NM, Blumin JH, Kerschner JE. Pediatric voice-related quality of life: findings in healthy children and in common laryngeal disorders. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2008;117:259-62. doi: 10.1177/000348940811700404.

Nonogaki S, Shirata NK, Kimura LM, Guerra JM, Medeiros RSS, Paes RAP, et al. Comparative study of five commercial probes for the detection of Epstein-Barr virus (EBV) by in situ hybridization in cases of nodular sclerosis Hodgki's lymphoma. *J Bras Patol Med Lab*. 2016;52(6):416-25.

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. doi: 10.1371/journal.pone.0099114.

Ovalle WK, Nahirney PC, Netter FH. Frank H. Netter's essential histology. 2nd ed. cidade. Elsevier/Saunders; 2013.

Peñaloza-Plascencia M, Montoya-Fuentes H, Flores-Martínez SE, Fierro-Velasco FJ, Peñaloza-González JM, Sánchez-Corona J. Molecular identification of 7 human papillomavirus types in recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000;126(9):1119-23.

Polz-Dacewicz M, Strycharz-Dudziak M, Dworzański J, Stec A, Kocot J. Salivary and serum IL-10, TNF- α , TGF- β , VEGF levels in oropharyngeal squamous cell carcinoma and correlation with HPV and EBV infections. *Infect Agent Cancer*. 2016;11:45. doi: 10.1186/s13027-016-0093-6.

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;104:758-62.

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/s00405-011-1599-6.

Rabah R, Lancaster WD, Thomas R, Gregoire L. Human papillomavirus-11-associated recurrent respiratory papillomatosis is more aggressive than human papillomavirus-6-associated disease. *Pediatr Dev Pathol*. 2001;4:68-72.

Reidy PM, Dedo HH, Rabah R, Field JB, Mathog RH, Gregoire L, et al. Integration of human papillomavirus type 11 in recurrent respiratory papilloma-associated cancer. *Laryngoscope*. 2004;114(11):1906-9. doi: 10.1097/01.mlg.0000147918.81733.49.

Sanchez GI, Jaramillo R, Cuello G, Quintero K, Baena A, O'Byrne A, et al. Human papillomavirus genotype detection in recurrent respiratory papillomatosis (RRP) in Colombia. *Head Neck*. 2013;35(2):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;38:227-234.

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(3):255-9. doi: 10.1016/j.ijporl.2009.11.016.

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*. 1998;54(3):219-25.

Suter-Montano T, Montaña E, Martínez C, Plascencia T, Sepulveda MT, Rodríguez M. Adult recurrent respirator papillomatosis: a new therapeutic approach with pegylated interferon alpha 2a (Peg-IFN α -2a) and GM-CSF. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013;148(2):253-60. doi: 10.1177/0194599812466226.

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

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

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

Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 Years on. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(10):757-68. doi: 10.1038/nrc1452.

Zhang W, Jin S, Li J, Liang X, Ming L, Wang X, et al. The infection of EBV for cervical epithelium - a new causitive agent in the development of cervical carcinomas? *Chinese J Cancer Res*. 1992;4(4):23-9.

APÊNDICE A – Escala clínica e laringoscópica adaptado de Derkay et al. (1998)

Classificação clínica (pontuação)	Pontuação total: máxima de 86
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)	
Classificação anatômica para cada local: nenhuma lesão (0), superficial (1), elevada-exofítica(2), volumosa (3)	
Laringe	
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 (___)	
Traquéia	
Terço superior (___) Terço médio (___) Terço inferior (___) Brônquios: direito (___), esquerdo (___) Traqueostomia (___)	
Outros	
Nariz (___), palato (___), faringe (___), esôfago (___), pulmão (___), outros (___).	

ANEXO A — Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

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