

Papilomatose laríngea: análise morfológica pela microscopia de luz e eletrônica do HPV-6

Laryngeal papillomatosis: morphological study by light and electron microscopy of the HPV-6

Regina Helena Garcia Martins¹, Norimar H. Dias²,
Elisa Aparecida Gregório³, Mariângela Alencar
Marques⁴, Márcia Guimarães da Silva⁵, João
Manuel Grisi Candéias⁶

Palavras-chave: laringe, microscopia, papilomatose, ultra-estrutura.

Keywords: larynx, microscopy, papillomatosis, ultrastructure.

Resumo / Summary

Papilomatose laríngea é neoplasia benigna mais freqüente nas crianças, causada pelo HPV, principalmente subtipos 6 e 11 e caracteriza-se pela presença de lesões proliferativas exofíticas e recidivantes sobre a mucosa das vias aéreas, em especial na laringe. Forma de Estudo: Clínico prospectivo. **Objetivos:** Demonstrar alterações epiteliais morfológicas (pela microscopia de luz e eletrônica) em lesões papilíferas casadas pelo HPV-6. **Material e Métodos:** Fragmentos de lesões de papilomatose laríngea, colhidos durante procedimento cirúrgico de quatro crianças (1 masculino, 3 femininas), foram submetidos à tipagem do HPV (por método de PCR), análise pela microscopia de luz e microscopia eletrônica (varredura e transmissão). **Resultados:** Na tipagem, todos os papilomas eram do subtipo 6. A microscopia de varredura identificou projeções epiteliais de vários tamanhos, com células superficiais em descamação. A microscopia de luz demonstrou lesões exofíticas, revestidas por epitélio hiperplásico com coilócitos e binucleações, característicos do HPV. A membrana basal e o córion adjacente estavam íntegros. À microscopia eletrônica de transmissão identificou-se vacuolização perinuclear e alargamento das junções intercelulares. **Conclusões:** As alterações morfológicas apresentadas pelo HPV-6 demonstram o caráter não-invasivo da lesão, sendo necessário estudos morfológicos adicionais relacionando os outros tipos de HPV, considerados mais agressivos, com os achados ultra-estruturais.

Laryngeal papillomatosis is the most frequent benign neoplasia in children. It is caused by HPV 6 and 11. The lesions are exophytic and highly recurrent, compromising the airway mucosa, mainly the larynx. Study design - clinical prospective. **Aims:** to show morphologic alterations of the epithelium (light and electron microscopy) in the HPV-6 lesions. **Methods:** specimens of laryngeal lesions obtained during surgery of four children (1 male, 3 female) were submitted to HPV typing (PCR), light microscopy and electron microscopy. **Results:** in all specimens, HPV type 6 was found. Epithelial projections were found by electron microscopy with superficial cells in desquamation. Light microscopy showed exophytic projections of the keratinized stratified squamous epithelium overlying a fibrovascular core. Koilocytes (vacuolated cells), suggesting the viral infection by HPV, were identified. No alterations were seen in the basement membrane and corion. Ultrastructural analysis showed vacuolated cells with clear cytoplasmic inclusions, intercellular injuries and widening intercellular spaces. **Conclusions:** morphologic alterations of the epithelium in the HPV-6 lesions are superficial, and additional studies including the others HPV types are needed to show the more aggressive and extensive aspect of the disease.

¹ Professora Livre-Docente da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Professora Adjunta da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

² Médico contratado e Pós-graduando (Nível Doutorado) da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp.

³ Professora Titular do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu.

⁴ Professora Doutora do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

⁵ Professora Doutora do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

⁶ Professor Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências - UNESP, Botucatu.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Faculdade de Medicina de Botucatu.

Endereço para correspondência: Regina H. Garcia Martins - Disciplina de Otorrinolaringologia, Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Botucatu, Distrito de Rubião Junior, Botucatu SP 18618-970.

Tel/Fax: (0xx14) 3811-6256 - E-mail: rmartins@fmb.UNESP.br.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 31 de março de 2007. cod. 3944.

Artigo aceito em 10 de junho de 2007.

INTRODUÇÃO

A papilomatose laríngea é uma neoplasia benigna, caracterizada pela presença de lesões proliferativas exofíticas de tecido conjuntivo revestido por epitélio. De maneira geral, inicia-se na comissura e terço anterior das pregas vocais, podendo afetar, posteriormente, todas as porções da laringe, envolvendo, em alguns casos, também traquéia, brônquios e parênquima pulmonar. As lesões são geralmente múltiplas, raramente solitárias¹⁻³.

A forma infantil ou juvenil acomete crianças logo nos primeiros anos de vida, manifestando-se por rouquidão fixa, que evolui para dispnéia progressiva, podendo chegar a quadros dramáticos de desconforto respiratório e estridor. Nestas situações, encontram-se múltiplas lesões vegetantes confluentes ocluindo a luz glótica, estendendo-se, muitas vezes, às estruturas da supraglote e da subglote. A forma adulta acomete adolescentes e adultos, manifestando-se com lesões menos numerosas, focais e menos recidivantes, porém com maior potencial de malignização^{3,4}.

A etiologia viral da papilomatose laríngea foi inicialmente descrita por Ullman em 1923⁵. Posteriormente foi definido o vírus HPV (papilomavírus humano) como agente etiológico, demonstrado por meio da microscopia eletrônica, das técnicas de hibridização *in situ* e pela reação em cadeia de polimerase (PCR)⁶⁻⁸. Com o avanço dessas técnicas, foram sendo identificados diferentes subtipos do papilomavírus, existindo atualmente mais de 60 deles. A papilomatose laríngea é a manifestação mais importante da infecção laríngea pelo HPV, particularmente dos subtipos 6 e 11, também relacionados aos condilomas genitais⁹. Por outro lado, os subtipos 16 e 18 relacionam-se tanto com as neoplasias laríngeas como com o carcinoma de colo uterino^{10,11}.

Apesar dos avanços nos estudos do DNA do HPV, seu modo de transmissão ainda não está totalmente esclarecido. Fortes evidências indicam sua transmissão através do canal do parto, em mães portadoras de condiloma genital, uma vez que, nesses casos, a pesquisa do HPV é positiva tanto nas vias aéreas dos neonatos como nos condilomas genitais maternos¹². Entretanto, em outras situações, o HPV é positivo nos recém-nascidos mesmo em mães sem antecedentes de condiloma genital, indicando a possibilidade de infecção subclínica e latente, explicando as recidivas após longos períodos de remissão da doença¹³.

Alguns estudos têm demonstrado ainda a presença de HPV em lesões benignas da laringe como em pólipos, edema de Reinke, leucoplasias, líquen plano e até mesmo em mucosa oral normal^{14,15}. Desta forma, fica cada vez mais evidente que a simples presença do HPV na mucosa das vias aéreas superiores não é o fator determinante para o desenvolvimento da doença. Outros fatores associados à

presença do vírus têm sido considerados, como a imunodeficiência e as infecções associadas, destacando-se entre estas o Herpes vírus, o Epstein Barr vírus (EBV) e o Citomegalovírus (CMV)^{16,17}. Neste sentido, alguns autores têm procurado demonstrar uma possível susceptibilidade genética que determinaria o desenvolvimento ou não da papilomatose laríngea em virtude da infecção epitelial pelo HPV^{18,19}.

Mesmo com os avanços diagnósticos, a papilomatose laríngea ainda é um grande desafio para médicos pediatras, infectologistas, imunologistas e otorrinolaringologistas, e cada pesquisa desenvolvida com HPV adiciona informações preciosas que colaboram para desvendar os mistérios da doença, havendo poucos estudos morfológicos nessa área.

O objetivo do presente estudo foi analisar as alterações morfológicas observadas na papilomatose de laringe causada pelo HPV de subtipo 6.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética da instituição onde foi realizado (Ofício 411/2006). Foram analisadas as espécimes obtidas durante procedimento cirúrgico de quatro crianças com diagnóstico de papilomatose laríngea, acompanhadas nos ambulatórios de Foniatria e Distúrbios da Voz do serviço onde o estudo foi realizado. Entre as crianças portadoras da doença, e incluídas neste estudo, 1 era menino e 3 eram meninas, sendo que três possuíam idade entre 3 e 6 anos e uma delas, 15 anos. Todas as crianças apresentavam sintomas de rouquidão e desconforto respiratório, principalmente aos grandes esforços e já haviam sido submetidas a vários procedimentos cirúrgicos anteriormente. Nenhuma mãe relatava a presença de lesões papilíferas genitais ou tratamento prévio de condiloma.

No momento da cirurgia, alguns fragmentos das lesões laríngeas foram reservados para análise de microscopia de luz e eletrônica (transmissão e varredura), bem como para a caracterização do subtipo do HPV, por meio de técnicas moleculares.

Microscopia de luz - para este estudo os fragmentos foram inicialmente fixados em formaldeído a 10%, por no mínimo 48 horas, incluídos em parafina, cortados e corados pela hematoxilina-eosina. Para melhor visualização da membrana basal, foram também submetidos à coloração pelo PAS (Periodic Acid-Schiff). Após a preparação do material, as lâminas histológicas foram examinadas em microscópio de luz com diferentes aumentos e captura de imagens em câmera digital (Software Leica Q-Win versão 3.1).

Microscopia eletrônica - para os estudos de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão novos fragmentos foram fixados em glutaraldeído a 2,5% e seguiram a seqüência de procedimentos estabelecida pelo Centro

de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências. No exame de microscopia eletrônica de varredura, após o preparo, as peças foram examinadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (SEM 515, Philips -Holanda), sob tensão de 15KV, rastreando-se quadrante por quadrante de toda superfície exposta, sendo então fotografados em aumentos crescentes. No exame de microscopia eletrônica de transmissão os cortes foram examinados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão (modelo EM 301, Philips AG - Holanda).

Os resultados das análises morfológicas foram apresentados de forma descritiva.

Tipagem do HPV - o DNA viral foi extraído com solução CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) e submetido à reação de cadeia de polimerase (PCR). Para realização da tipagem, o DNA do vírus foi transferido para uma membrana pela técnica de Dot Blot. Para a detecção de vários tipos de HPVs, foram utilizadas sondas marcadas, empregando-se o kit AlkPhos Direct (Amersham). A eficiência das ampliações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5% (Gibco BRL). O tamanho dos produtos amplificados foram comparados com o padrão de 123 pb (Gibco BRL) e posteriormente fotografados sob transiluminação ultravioleta.

RESULTADOS

No presente estudo, todas as espécimes examinadas correspondiam ao HPV subtipo 6. A mucosa das pregas vocais comprometida pelo HPV apresentava-se recoberta por brotos papilíferos e exofíticos de coloração pálida, com predileção para a região glótica anterior (Figura 1). Pela



Figura 1. Exame endoscópico da laringe. Observam-se brotos exofíticos de coloração pálida em ambas as pregas vocais.

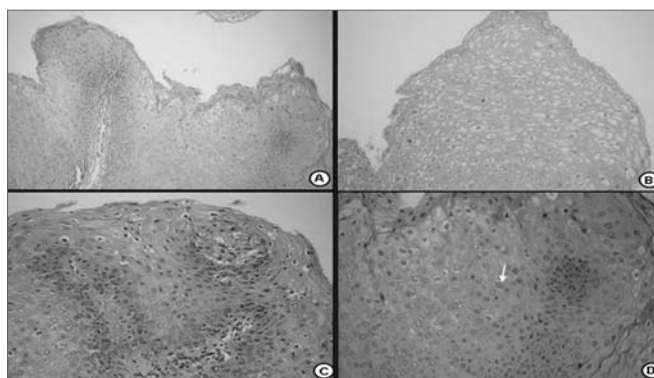


Figura 2. Em a corte histológico do papiloma escamoso (HE. 40X); b - numerosos coilócitos (HE,200X); c - detalhe dos efeitos citopáticos do vírus com inúmeras células apresentando vacuolização perinuclear, além de paraceratose (HE.- 400X); d - binucleação nos coilócitos (seta- HE. 400X).

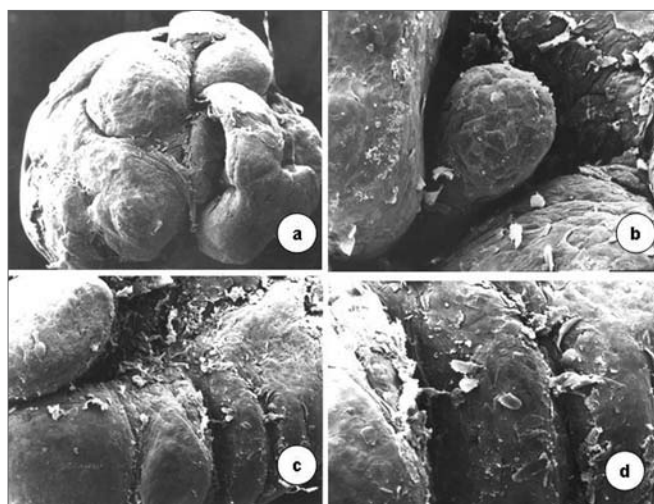


Figura 3. Superfície da mucosa laringea comprometida pelo papiloma vírus tipo 6. Aspecto mamelonado da mucosa com brotos se projetando da superfície em diferentes tamanhos apresentando várias células em descamação (Microscopia eletrônica de varredura; a-50X; b-1.000X; c-2.500X; d-200X).

microscopia de luz, as lâminas coradas pela HE mostraram lesões exofíticas revestidas por epitélio hiperplásico com papilomatose, acantose e hiperparaceratose. Os ceratinócitos apresentavam núcleos hipercondensados, irregulares com cromatina de aspecto aveludado e halo perinuclear claro e bem definido, caracterizando os coilócitos. Figuras de mitose raras e típicas e as binucleações foram freqüentes (Figura 2).

Quando examinadas pela microscopia eletrônica de varredura as pregas vocais apresentavam-se recobertas por projeções epiteliais com várias células superficiais em descamação. Os brotos variavam de tamanho; entre brotos maiores surgem outros menores, com características semelhantes. Em determinadas áreas a descamação das células parecia mais intensa (Figura 3).

Pela microscopia eletrônica de transmissão as células apresentavam seus núcleos com a cromatina descondensada e nucléolos bem evidentes. No citoplasma foram identificadas várias organelas, em especial as mitocôndrias, indicando intenso metabolismo celular. Os espaços intercelulares, que deveriam ser do tipo interdigitação, encontravam-se alargados, destorcendo as estruturas dos desmossomos. A vacuolização perinuclear, observada na microscopia de luz, foi também evidente à microscopia eletrônica de transmissão (Figura 4).

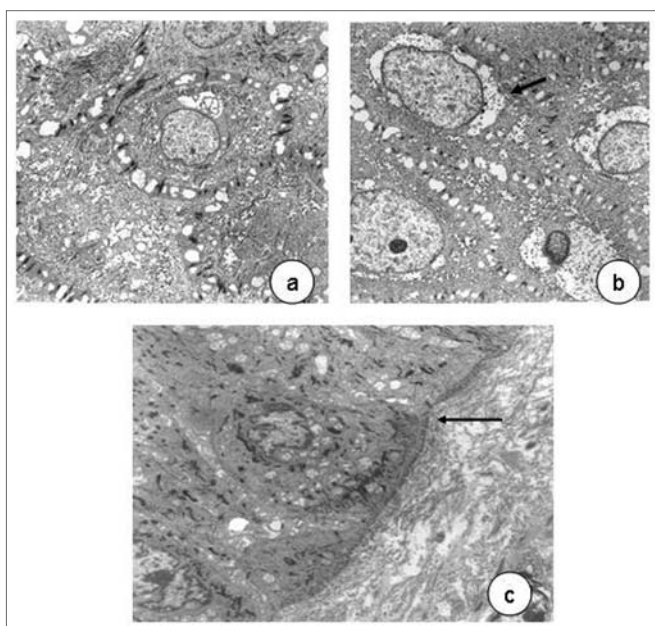


Figura 4. Em a, células epiteliais com cromática descondensada, nucléolos bem evidentes (3.250X) alargamento das junções celulares. Em b destaque para a vacuolização perinuclear (seta, 11.000X); em c - detalhe da membrana basal com aspecto normal e íntegra (seta, 6.300X)- Microscopia eletrônica de transmissão.

DISCUSSÃO

A papilomatose pode se manifestar como grave comprometimento da mucosa laríngea, apresentando lesões recidivantes não apenas nas pregas vocais, mas também em faringe e em traquéia levando, em casos extremos, aos quadros de insuficiência respiratória aguda. É a neoplasia benigna laríngea mais comum em crianças e, embora descrita há décadas, sua fisiopatologia e o tratamento ainda tem sido motivo de várias pesquisas^{20,21}.

O HPV é um DNA vírus que parasita o núcleo das células epiteliais. A identificação do vírus é difícil pela microscopia de luz e eletrônica, como demonstrado neste estudo, sendo necessária à utilização da biologia molecular para a confirmação do parasita e determinação do subtipo. Neste estudo, uma alteração epitelial marcante, registrada tanto na microscopia de luz como na de transmissão, foi

a vacuolização perinuclear, característica da infecção pelo HPV²², e incluída como critério maior dentre os aspectos citológicos da infecção pelo HPV no Consenso Brasileiro do HPV²³. Pela análise da microscopia de luz e eletrônica observamos integridade da membrana basal e ausência de envolvimento do córion ou da musculatura laríngea, demonstrando o caráter superficial e não-infiltrativo da lesão causada pelo HPV-6.

Neste estudo, todos os HPV tipados nas lesões laríngeas das quatro crianças eram do subtipo 6. Sabe-se que os HPV-6 e 11 são freqüentes em crianças e adolescentes e que, embora altamente recidivantes, não se relacionam com malignização, como ocorre com os subtipos 16 e 18, que também podem ser, ocasionalmente, identificados na papilomatose laríngea. Padayachee e Prescott²⁴ sugeriram que a doença causada pelo HPV-6 tende a ser mais agressiva do que pelo HPV-11, entretanto, a maioria dos estudos tem constatado que a infecção pelo subtipo 11 apresenta um comportamento mais agressivo, com recidivas mais precoces e mais freqüentes²⁵⁻²⁷. Wiatrak et al.²⁸ em pesquisa com 73 pacientes portadores de papilomatose laríngea, identificaram o HPV-6 em 53,5% dos casos, HPV-11 em 39,7% e a associação de ambos os subtipos em 6,9% dos pacientes.

Poucas pesquisas realizaram estudos morfológicos demonstrando as alterações ultra-estruturais promovidas por cada subtipo do vírus. Na maioria dos estudos não há sequer informações quanto a tipagem do HPV. O estudo morfológico com HPV-6 permitiu-nos constatar que as alterações epiteliais são superficiais, sendo poupadas as estruturas mais profundas como a membrana basal e o córion adjacente; entretanto, devido ao comportamento mais agressivo dos subtipos 11, 16 e 18, é provável que alterações mais profundas do epitélio sejam identificadas, bem como a presença de atipias, visto que os subtipos 16 e 18 têm sido relacionados com neoplasias malignas de vias aéreas.

CONCLUSÕES

As alterações morfológicas apresentadas pelo HPV-6 demonstram o caráter não-invasivo da lesão, sendo necessário estudos morfológicos adicionais relacionando os outros tipos de HPV, considerados mais agressivos, com os achados ultra-estruturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benhamou C, Raji A, Laraqui N, Mokrim B, Touhami M, Chekkoury IA, Benchakroun Y. Papillomatose laryngée de lenfant. A propos de 68 cas. *J Forl* 1996;45:17-20.
2. Wiatrak BJ. Overview of recurrent respiratory papillomatosis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;11:433-41.
3. Soldatski IL, Onufrieva EK, Steklov AM, Schepin NV. Tracheal, bronchial, and pulmonary papillomatosis in children. *Laryngoscope* 2005;115:1848-54.
4. Doyle JD, Gianoli JG, Espinola T, Miller RH. Recurrent respira-

- tory papillomatosis: juvenil versus adult forms. *Laryngoscope* 1994;104:523-7.
5. Ullmann EV. On the etiology of laryngeal papilloma. *Acta Otolaryngol* 1923;5:317-74.
 6. Duggan MA, Lim M, Gill MJ, Inoue M. HPV DNA typing of adult-onset respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 1990;100:639-42.
 7. Maisel R, Rimell F, Dayton V. In situ hybridization and laryngeal papillomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992;101:119-26.
 8. Mulhaupt HAB, Fessler JN, Warhol MJ. Detection of human papillomavirus in laryngeal lesions by in situ hybridization. *Human Pathol* 1994;25:1302-5.
 9. Quick CA, Krzyzek RA, Watts SL, Faras AJ. Relationship between condylomata and laryngeal papillomata. Clinical and molecular virological evidence. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1980;89:467-71.
 10. Niv A, Sion-Vardi N, Gatot A, Fliss DM. Identification and typing of human papillomavirus (HPV) in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *J Laryngol Otol* 2000;114:41-6.
 11. Kashima HK, Kutcher M, Levin LS, Kessiss, de Villiers EM, Shah KT. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus and clinically normal epithelium of the oral cavity. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;99: 55-61.
 12. Smith EM, Johnson SR, Pignatari S, Cripe TP, Turek L. Perinatal vertical transmission of human papillomavirus and subsequent development of respiratory tract papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991;100:479-83.
 13. Martins RHG. Papilomatose da Laringe. Em: *A Voz e seus Distúrbios*. São Paulo: Cultura Acadêmica Editora; 2005. p.86-9.
 14. Pignatari S, Smith EM, Shive C, Gray SD, Turek LP. Detection of human papillomavirus infection in diseased and non diseased sites of the respiratory tract in recurrent. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992;101:408-12.
 15. Rihkanen H, Peltomaa J, Syrjänen S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in vocal cords without laryngeal papillomas. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1994;114:348-51.
 16. Élő J, Hídvégi J, Bajtai A. Papova viruses and recurrent laryngeal papillomatosis. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1995;115:322-25.
 17. Rimell FL, Shoemaker DL, Pou AM, Jordan JA, Post JC, Ehrlich GD. Pediatric respiratory papillomatosis: prognostic role of viral typing and cofactors. *Laryngoscope* 1997;107:915-8.
 18. Aaltonen LM, Rihkanen H, Vaheri A. Human papillomavirus in larynx. *Laryngoscope* 2002;112:700-7.
 19. Buchinsky FJ, Derkay CS, Leal SM, Donfack J, Ehrlich GD, Post JC. Multicenter initiative seeking critical genes in respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 2004;114:349-57.
 20. Pontes PAL, Jimenes LH, Pontes AAP. Papiloma laríngeo. Em: *Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia. Tratado de otorrinolaringologia*. São Paulo: Roca; 2003. p.416-20.
 21. Silverman DA, Pitman MJ. Current diagnostic and management trends for recurrent respiratory papillomatosis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;12:532-7.
 22. Green GE. Juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. In: Ossoff RH, ed. *The Larynx*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2003:479-96.
 23. Lancelliti CLP, Levi JE, Silva MALG, Schwarzschild M, Nicolau SM. Diagnóstico laboratorial. Em: *Carvalho JJM, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro do HPV, 1ª edição*, São Paulo: BG Cultural; 2000. 4: 45-60.
 24. Padayachee A, Prescott CA. Relationship between the clinical course and HPV typing of recurrent laryngeal papillomatosis: The Red Cross War Memorial Children's Hospital experience 1982-1988. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1993;26:141-7.
 25. 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.
 26. Gabbott M, Cossart YE, Kan A, Konopka M, Chan R, Rose BR. Human papillomavirus and host variables a predictors of clinical course in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *J Clin Microbiol* 1997;35:3098-103.
 27. Rimell FL, Shoemaker DL, Pou AM, Jordan JA, Post JC, Ehrlich GD. Pediatric respiratory papillomatosis: prognostic role of viral typing and cofactors. *Laryngoscope* 1997;107:915-8.
 28. Wiatrak BJ, Wiatrak DW, Broker TR, Lewis L. Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal study comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population. *Laryngoscope* 2004;114 (Suppl 104):1-23.