



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**ESTUDO PROSPECTIVO E GENOTIPAGEM DO HPV EM
PACIENTES COM PAPILOMATOSE LARÍNGEA E NASAL –
SÃO LUÍS, MARANHÃO**

Danielle Salgado De Brito

**São Luís
2019**

DANIELLE SALGADO DE BRITO

**ESTUDO PROSPECTIVO E GENOTIPAGEM DO HPV EM
PACIENTES COM PAPILOMATOSE LARÍNGEA E NASAL –
SÃO LUÍS, MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança

Área de Concentração: Laboratorial

Linha de Pesquisa: Genético/Laboratorial

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Flávia Castello Branco Vidal

Coordenadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

São Luís
2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Brito, Danielle Salgado de.

ESTUDO PROSPECTIVO E GENOTIPAGEM DO HPV EM PACIENTES
COM PAPILOMATOSE LARÍNGEA E NASAL SÃO LUÍS, MARANHÃO /
Danielle Salgado de Brito. - 2019.

54 p.

Orientador(a): Flávia Castelo Branco Vidal.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2019.

1. Papilomatose laríngea. 2. Papilomatose nasal. 3.
Papilomavirus humano. I. Vidal, Flávia Castelo Branco.
II. Título.

DANIELLE SALGADO DE BRITO

**ESTUDO PROSPECTIVO E GENOTIPAGEM DO HPV EM
PACIENTES COM PAPILOMATOSE LARÍNGEA E NASAL –
SÃO LUÍS, MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: ____/____/____.

Prof^a. Dr^a. Flávia Castello Branco Vidal
Orientadora

Prof. Dra Sally Cristina Moutinho Monteiro
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a Maria do Socorro de Sousa Cartagenes
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a Zulmira da Silva Batista
Universidade Federal do Maranhão

Dedico esta dissertação aos meus filhos, Leonardo e Cecília, por trazer mais amor, alegria, vida e motivação para os meus dias. Ao meu marido, David, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Aos meus pais, Augusto e Cristina, por serem responsáveis pela minha existência. Aos meus irmãos, Rafaelle e Anderson, por sempre torcerem por meu crescimento pessoal. E aos meus avós, Elba e Cleto, por me amarem incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar o meu caminho e sempre me direcionar a fazer as melhores escolhas; por me fazer ter fé e persistência para atingir meus objetivos e por me ajudar a manter a serenidade e tranquilidade nos momentos de maior aflição.

Agradeço também à profa. Dra. Flávia Vidal, pela competente orientação e pela imensa credibilidade em mim depositada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, pela oportunidade de crescimento e qualificação profissional.

Aos membros da Banca Examinadora, por se disporem a dividir comigo seus conhecimentos e por contribuírem com a minha formação neste momento tão especial.

Às queridas colegas de turma e parceiras nesta jornada: Fernanda Lima, Fernanda Gonçalves, Katia Borges e Marineide Sodré, pela companhia e estímulo nas diversas etapas desta caminhada.

Aos pacientes e familiares que aceitaram participar deste trabalho e colaboraram para sua execução.

À minha família, em especial ao meu esposo David, por diariamente dedicar grande parte do seu tempo aos nossos filhos, deixando-me tranquila para viabilizar este sonho.

Eu nunca perco. Ou eu ganho, ou aprendo!

Nelson Mandela

RESUMO

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus não envelopado que infecta o epitélio cutâneo e de mucosas. Sua transmissão é, principalmente, por via sexual, podendo ocorrer também por autoinoculação ou transmissão vertical. A papilomatose laríngea (PL) e papilomatose nasal (PN) são causadas pelos tipos 6 e 11 de HPV em 90% dos casos. Na laringe, a doença tende a ter um curso clínico agressivo principalmente em crianças e pode ser fatal devido a sua alta reincidência e tendência a se espalhar pelo trato respiratório. O objetivo deste trabalho foi analisar os dados sociodemográfico e clínico, bem como a genotipagem do HPV encontrado em pacientes com PL e PN, tratados em hospital de referência de São Luís - MA. Este estudo foi do tipo transversal, prospectivo, com 12 pacientes, utilizando amostras frescas de lesões papilomatosas de laringe e cavidade nasal. Os dados sociodemográficos e clínicos foram coletados a partir de um questionário aplicado e diretamente dos prontuários e laudos histopatológicos dos pacientes. Para análise de infecção pelo papilomavírus humano, o DNA foi extraído das amostras de papilomas coletadas durante a cirurgia e submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR). As amostras positivas foram submetidas à técnica de sequenciamento automatizado para genotipagem viral. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (58,33%), pardos (91,67%) e residentes no interior do estado (58,33%). Cerca de 75% apresentaram PL e 25% PN. O parto vaginal foi o mais frequente entre os pacientes (91,67%). Entre os pacientes com PL, o tipo juvenil foi a mais prevalente com 75% dos casos. Dentre as manifestações clínicas características do quadro de PL, observou-se que todos os pacientes apresentaram disfonia, 66,67% tiveram dispneia, 33,33% apresentaram disfagia e (77,78%) apresentou recorrência da doença. A presença do HPV foi detectada em 100% dos casos (laringe e cavidade nasal), sendo o tipo 6 mais prevalente (91,67%). Concluindo, a população avaliada de portadores de PL e PN eram compostas principalmente por crianças pardas do sexo masculino infectadas com HPV-6 e que apresentaram disfonia e alta taxa de reincidência da doença. O conhecimento clínico da PL e PN são essenciais para conferir o correto diagnóstico da doença e, conseqüentemente esclarecer e orientar a família sobre a remoção cirúrgica dos papilomas, considerando ser o principal tratamento, visto que a referida doença não possui cura definitiva.

Palavras-chave: Papilomavirus humano. Laringe. Cavidade nasal. Papilomatose.

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is a non-enveloped virus that infects the cutaneous and mucosal epithelium. Its transmission is mainly sexual, and may also occur by autoinoculation or vertical transmission. Laryngeal (PL) and nasal (PN) papillomatosis are caused by types 6 and 11 of HPV in 90% of cases. In the larynx, the disease tends to have an aggressive clinical course mainly in children and can be fatal due to its high recurrence and tendency to spread through the respiratory tract. The objective of this study was to analyze sociodemographic and clinical data, as well as HPV genotyping found in patients with PL and PN treated at a reference hospital in São Luís – Maranhão. This cross-sectional, prospective study was carried out with 12 patients, using fresh samples of papillomatous lesions of the larynx and nasal cavity. Sociodemographic and clinical data were collected from a questionnaire applied directly to the patient, medical and histopathological reports. For analysis of human papillomavirus infection, the DNA was extracted from papilloma samples collected during surgery and submitted to polymerase chain reaction (PCR). Positive samples were submitted to the automated sequencing technique for viral genotyping. The majority of the patients were males (58.33%), brown (91.67%) and residents in the interior of the state (58.33%). About 75% had PL and 25% PN. Vaginal delivery was the most frequent among patients (91.67%). Among the patients with PL, the juvenile type was the most prevalent with 75% of the cases. Among the clinical manifestations characteristic of the LP, it was observed that all patients had dysphonia, 66.67% had dyspnea and 33.33% had dysphagia. The majority (77.78%) presented recurrence of the disease. The presence of HPV was detected in 100% of the cases (larynx and nasal cavity), being type 6 more prevalent. In conclusion, the evaluated population of PL and PN patients was composed mainly of male infected by HPV-6 with dysphonia and a high rate of recurrence of the disease. The clinical knowledge of PL and PN are essential to verify the correct diagnosis of the disease and, consequently, to clarify and guide the family about the surgical removal of papillomas, considering it to be the main treatment since it does not have a definitive cure.

Keywords: Human papillomavirus. Larynx. Nasal cavity. Papillomatosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de nucleotídeos dos primers do estudo	26
Tabela 2 - Descrição sócio-demográfica e clínica de pacientes atendidos no HUUFMA com diagnóstico de PLN, São Luís, Maranhão.....	29
Tabela 3 - Descrição sócio-demográfica e clínica de pacientes atendidos no HUUFMA com diagnóstico de PN, São Luís, Maranhão.....	30
Tabela 4 - Descrição sócio-demográfica e clínica de pacientes atendidos no HUUFMA com diagnóstico de papilomatose laríngea, São Luís, Maranhão.	31
Tabela 5 - Presença do HPV em lesões papilomatosas de pacientes atendidos no HUUFMA com diagnóstico de PL e PN, São Luís, Maranhão.	32
Tabela 6 - Comparações entre as duas formas de apresentação clínica da PLN e as variáveis de agressividade.	33

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do HPV 16.....	16
Figura 2 - Progressão tumoral mediada pelo HPV.	17
Figura 3 - Exemplo de lesão papilomatosa na região laríngea.....	20

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDC	<i>Center of Disease Control</i>
HPV	Papilomavírus Humano
HUUFMA	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IDH	Índice de desenvolvimento humano
IST	Infecção sexualmente transmissível
PL	Papilomatose laríngea
PN	Papilomatose nasal
PRR	Papilomatose respiratória recorrente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1 Biologia do vírus e ciclo de vida	16
3.2 A infecção pelo HPV	18
3.3 O papel do HPV na papilomatose respiratória recorrente	19
3.4 Epidemiologia da PL e PN	22
3.5 Justificativa	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 População do estudo e participantes da pesquisa	24
4.2 Coleta de dados	24
4.3 Coleta das amostras	25
4.4 Extração e quantificação do DNA	25
4.5 PCR Nested	25
4.6 Visualização dos produtos amplificados	27
4.7 Purificação do produto de PCR	27
4.8 Seqüenciamento automático	27
4.9 Análise estatística	28
4.10 Aspectos éticos	28
5 RESULTADOS	29
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (menores de 18 anos)	45
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	47
APÊNDICE C – TERMO DE ASSENTIMENTO	49
APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO	50
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	52

1 INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus não envelopado, com um capsídeo de 55nm de diâmetro, uma dupla-fita de DNA circular e aproximadamente oito mil pares de base (pb) (AFONSO et al., 2016). A infecção pelo HPV é uma das infecções sexualmente transmissíveis mais comuns em todo o mundo (ALBERO et al., 2013).

Atualmente existem mais de cem tipos de HPV identificados, sendo mais de trinta deles transmitidos pelo contato sexual. Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o HPV é classificado de acordo com seu potencial oncogênico, podendo ser de alto ou baixo risco. A infecção por tipos de baixo risco pode causar verrugas nas mãos e pés, além de condilomas nas regiões genitais (WEI et al., 2016).

Por outro lado, os tipos virais de alto risco podem causar lesões intraepiteliais de alto e baixo grau e possuem a capacidade de causar carcinomas invasivos (GANGULY; PARIHAR, 2009; ZHOU et al., 2017). Os tipos de HPV 16, 18, 33, 39, 45, 52 e 56 são classificados como de alto risco e estão associados ao desenvolvimento de câncer ou lesões pré-cancerosas, sendo os tipos 16 e 18 responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de câncer cervical (ZACAPALA-GÓMEZ et al., 2016). Os subtipos considerados de baixo risco oncogênico, principalmente o HPV-6 e HPV-11, são responsáveis por até 90% dos casos de verrugas genitais em ambos os sexos (WEI et al., 2016).

O HPV possui tropismo por células epiteliais, infectando principalmente pele e mucosas (HONG; LAIMINS, 2017). Estas infecções geralmente são eliminadas pelo próprio sistema imunológico do hospedeiro, não evoluindo para manifestações clínicas em até 70% dos casos (ZUR-HAUSEN, 2009; AKOGBE et al., 2012; ZACAPALA-GÓMEZ et al., 2016). O vírus HPV infecta as células proloferativas da camada basal do epitélio escamoso através de microlesões (BIRYUKOV; MEYERS, 2015; SCHIFFMAN et al., 2016). Uma vez dentro da célula, o DNA do vírus é liberado do capsídeo e transportado para o núcleo onde se replica e se mantém na forma epissomal (cerca de cem cópias por célula) (FELLER et al., 2009).

Várias lesões papilomatosas de cabeça e pescoço tem sido atribuídas ao HPV, mas seu papel no desenvolvimento da lesão e a sua correlação com o prognóstico ainda não estão claros (NGUYEN et al., 2014; NIYIBIZI et al., 2014).

Apesar de a maioria das doenças não malignas associadas ao HPV serem atribuídas aos tipos 6 e 11 do vírus, estes também estão associados a lesões epiteliais que podem ter patologia mais agressiva, como é o caso da papilomatose laríngea e nasal. (NGUYEN et al., 2014; NIYIBIZI et al., 2014; OMLAND et al., 2014).

A papilomatose laríngea (PL) e nasal (PN) são doenças crônicas de etiologia viral que ocorrem tanto em crianças como em adultos. É causada pelos tipos 6 e 11 de HPV em 90% dos casos. Apesar de benigno, tendem a ter um curso clínico agressivo em crianças e pode ser fatal devido a sua alta reincidência e à tendência a se espalhar pelo trato respiratório. O principal sítio de desenvolvimento dos papilomas é a laringe, mas pode ocorrer também na cavidade nasal, traquéia e brônquios (DERKAY; WIATRAK, 2008; VENKATESAN; PINE; UNDERBRINK, 2012; WANG et al., 2015).

A forma de transmissão ainda é pouco discutida, uma vez que o HPV é um vírus de uma infecção sexualmente transmissível e acredita-se que a transmissão vertical da mãe para o bebê durante a passagem pelo canal vaginal seja a forma mais provável (VENKATESAN et al., 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os dados sociodemográficos, clínicos e a genotipagem dos HPV's encontrados nos pacientes com papilomatose laríngea e nasal, tratados em hospital de referência de São Luís, Maranhão.

2.2 Objetivos Específicos

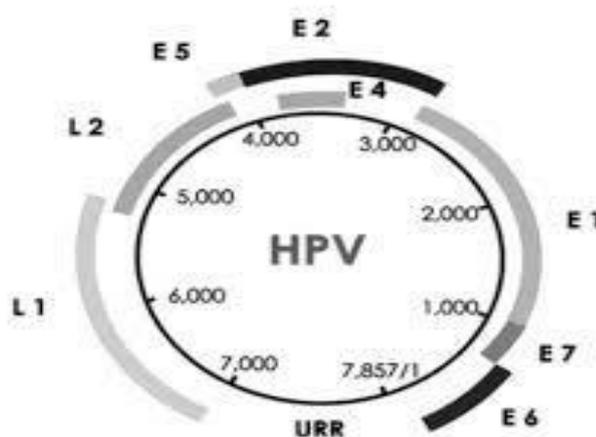
- Descrever os dados sociodemográficos da população estudada;
- Avaliar a prevalência da infecção pelo HPV nas lesões papilomatosas;
- Analisar os tipos mais prevalentes de HPV nas lesões papilomatosas;
- Comparar as duas formas de apresentação da papilomatose laríngea, juvenil e adulta, em relação às variáveis clínicas avaliadas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Biologia do vírus e ciclo de vida

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus não envelopado, com um capsídeo de 55 nm de diâmetro contendo uma dupla-fita de DNA com aproximadamente oito mil pares de base (EFTEKHAAR et al., 2017). O genoma é dividido em três regiões: uma não-codificante denominada LCR (*long control region*), uma codificante denominada E (*early*) e outra também codificante denominada L (*late*) (Figura 1) (GANGULY; PARIHAR, 2009).

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do HPV.



O genoma é composto por ± 8000 pb (ou 8kpb) e dividido em três regiões: URR, L e E. A região E codifica 6 diferentes genes: E1, E2, E4, E5, E6 e E7; a região L codifica dois genes: L1 e L2. A região URR não é codificante e controla a transcrição viral e a replicação do DNA. URR – região reguladora upstream.

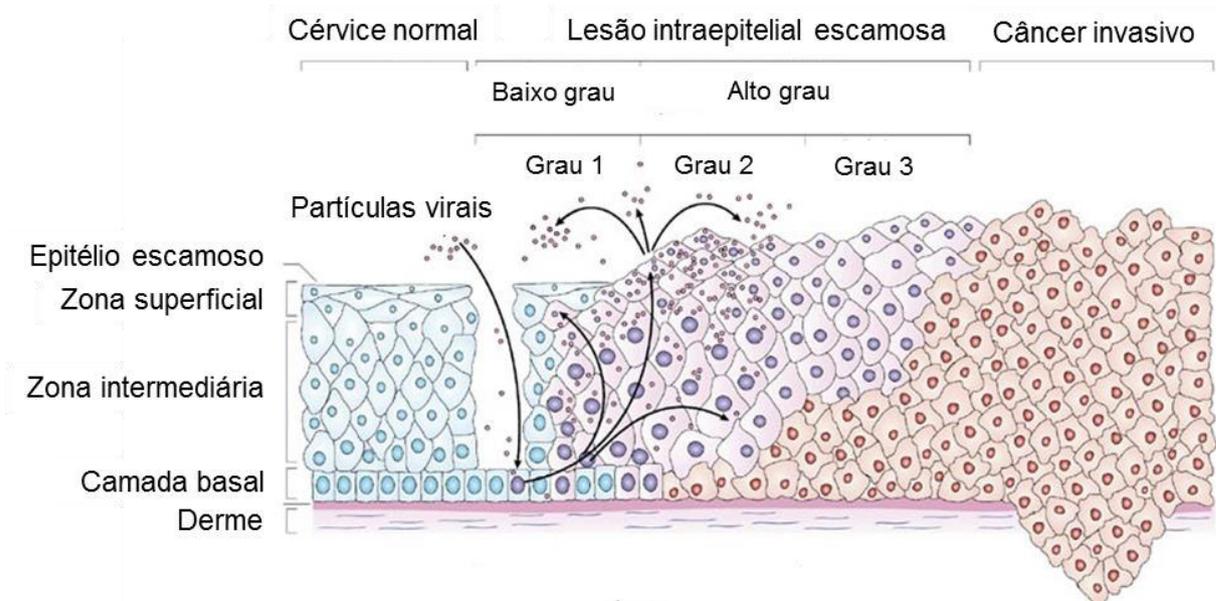
FONTE: Ganguly; Parihar, 2009.

Existem atualmente mais de cem tipos de HPV descritos e que infectam o epitélio cutâneo ou de mucosas (HEBNER; LAIMINS, 2006; GANGULY; PARIHAR, 2009). Sua transmissão é, principalmente, por via sexual, podendo ocorrer também através de autoinoculação, já que as mãos são consideradas reservatórios da infecção tanto em homens como em mulheres (HERNANDEZ et al., 2008). Estudos sugerem que o HPV também pode ser transmitido da mãe para o bebê durante o parto (RINTALA et al., 2005; IVANCIC et al., 2018).

O ciclo de vida do HPV está intimamente relacionado ao processo de

diferenciação e renovação do epitélio. O epitélio escamoso normal cresce como camadas estratificadas em que apenas as células da camada basal são capazes de proliferar, enquanto as células dos estratos superiores tornam-se diferenciadas e não proliferativas. Durante a renovação do epitélio, a célula basal se divide e uma das células-filha migra para as camadas superiores do tecido, iniciando sua diferenciação e interrompendo o seu ciclo proliferativo, enquanto a outra célula-filha permanece na camada basal com fenótipo proliferativo, perpetuando a linhagem. Células infectadas pelo HPV perdem a capacidade de controlar o ciclo celular mesmo quando diferenciadas (WOODMAN et al., 2012) (Figura 2).

Figura 2 - Progressão tumoral mediada pelo HPV.



O HPV acessa a camada basal através de microfissuras no epitélio. Após a infecção o DNA viral inicia sua replicação e nas camadas superficiais do epitélio, ocorre a liberação de novas partículas virais. A progressão de lesões não tratadas está associada a integração do DNA viral ao DNA da célula (núcleo vermelho).

FONTE: Adaptado de Woodman *et al.*, 2007.

A entrada do HPV na célula ocorre através de microfissuras na camada basal do epitélio. Por meio de um processo ainda não conhecido, o HPV penetra na célula, migra para o núcleo e permanece na forma episossômica, ou seja, circular no núcleo da célula do hospedeiro.

Após seu estabelecimento, o HPV inicia sua replicação extra cromossômica na célula hospedeira chegando ao número de 50/100 episossomos por célula (HEBNER; LAIMINS, 2006; GANGULY; PARIHAR, 2009).

À medida que a célula basal se divide, os epissomos do HPV também são replicados e se distribuem entre as células-filhas. Nas camadas mais superficiais do epitélio, o DNA viral é envolvido pelo capsídio recém-sintetizado e os vírions formados são liberados junto com a descamação normal do epitélio (Figura 2).

A malignização das lesões ocasionadas pelo HPV depende da integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira (SNIJDERS et al., 2006). Durante esse processo, a estrutura epissomal do DNA-HPV é aberta na região codificante E2 levando à deleção das regiões E4 e E5 e partes das regiões E2 e L2 (OLTHORF et al., 2012). A deleção de parte da região E2 leva à superexpressão das oncoproteínas virais E6 e E7. Portanto, a infecção relevante clinicamente é aquela que apresenta expressão detectável dos oncogenes virais E6 e E7 (OLTHORF et al., 2012; KAMINAGAKURA et al., 2012). As proteínas E6 e E7 ocasionam a proliferação desordenada das células hospedeiras através de diferentes processos.

3.2 A infecção pelo HPV

A infecção pelo HPV pode causar diferentes patologias na epiderme e nos tratos genital, gastrointestinal e respiratório de humanos (EFTEKHAAR et al., 2017). No trato genital, é considerada uma das infecção sexualmente transmissíveis (ISTs) mais comuns, uma vez que dois terços dos adultos jovens adquirem HPV nos dois primeiros anos de atividade sexual (HEBNER; LAIMONIS, 2006). Estima-se que até 70% da população contrai o HPV em algum momento de sua vida (KAHN; LAN; KAHN, 2007).

Dentre os fatores de risco para se contrair HPV podemos citar: (1) imunossupressão (transplantados e pacientes HIV positivos); (2) homens ou mulheres com mais de dez parceiros sexuais; (3) não utilização de preservativo; (4) pouca higiene; (5) tabagismo; (6) terapia com radiação; (7) fimose; (8) bebês cujas mães possuem HPV de alto risco (RINTALA et al., 2005; CROSIGNANI et al., 2013).

O HPV pode ser classificado como sendo de baixo risco ou alto risco, de acordo com a capacidade da lesão causada por ele se tornar maligna. A maioria dos vírus é de baixo risco e causam apenas verrugas benignas que não evoluem malignamente, mesmo se não tratadas. O HPV-1, HPV-2, HPV-4 e HPV-26 são alguns dos responsáveis pelas verrugas cutâneas comuns. HPV-6 e o HPV-11 são

geralmente os responsáveis pelo aparecimento das verrugas genitais (condiloma accuminata) (CROSIGNANI et al., 2013).

Os vírus HPV de alto risco são os responsáveis pelo aparecimento de lesões intraepiteliais que podem progredir para carcinomas escamosos invasivos. Dentre os tumores cuja presença de HPV já foi detectada, o câncer de colo de útero é o que apresenta maior associação com a infecção por este vírus. Cerca de 99% dos tumores cervicais estão associados à infecção pelos vírus HPV de alto risco, sendo o tipo 16 o mais prevalente, seguido pelos tipos 18 e 31 (HEBNER; LAIMINS, 2006; GANGULY; PARIHAR, 2009).

No Brasil, o câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais frequente entre as mulheres. Porém, quando analisadas as regiões separadamente, na região Norte e Nordeste sobem para, respectivamente, primeiro e segundo lugar entre os mais frequentes (INCA, 2017). Sua incidência é maior em países menos desenvolvidos, como o Brasil, e em regiões mais desfavorecidas socioeconomicamente, como as regiões Norte e Nordeste (INCA, 2017).

Outra patologia maligna associada à infecção pelo HPV é o câncer de pênis. Porém, diferente do câncer cervical, cujo desenvolvimento está intimamente relacionado à presença do HPV, o câncer de pênis pode ou não estar associado à presença do vírus (KIDD et al., 2017). Outros fatores de risco incluem: baixa condição socioeconômica, má higiene íntima, fimose e tabagismo (SOUSA et al., 2015).

A prevalência geral do HPV em câncer de pênis varia de 22% a 72%. A incidência é maior em países em desenvolvimento, onde o câncer de pênis pode atingir mais de 10% dos cânceres que afetam homens, como é o caso da África, Ásia e América do Sul (ALEMANY et al., 2016; COELHO et al., 2018).

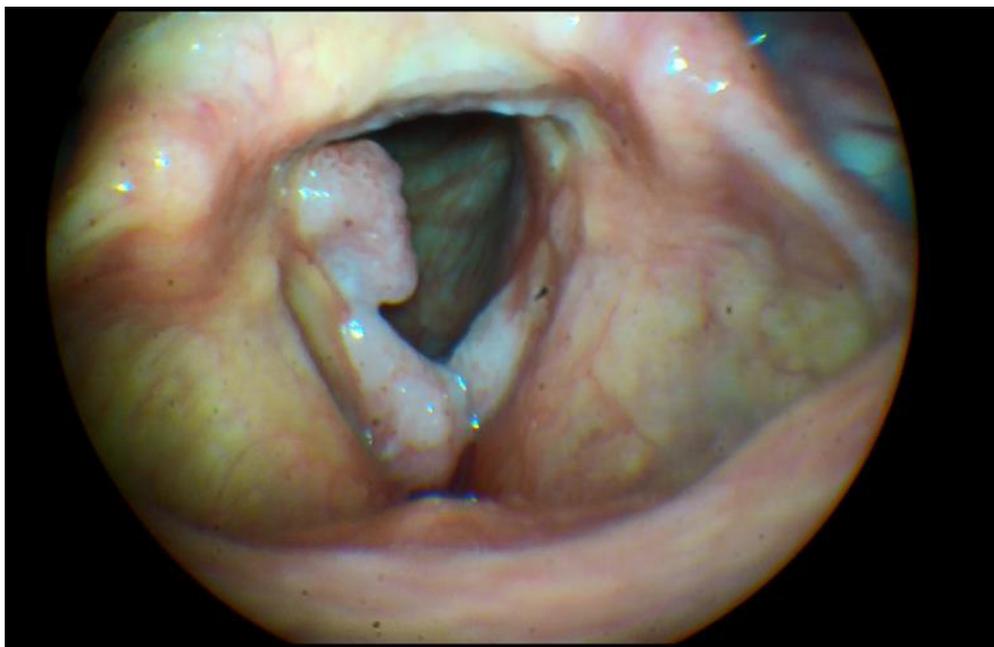
O carcinoma epidermóide anal é uma neoplasia rara com incidência estimada entre 0,2 a 2,8 para cada 100.000 habitantes, existindo uma ligeira predominância entre as mulheres (WHOCT, 2000; ABBASAKOOR; BOULOS, 2005). Aproximadamente 93% dos cânceres nessa região estão associadas à infecção pelo HPV.

3.3 O papel do HPV na papilomatose de laringe e nasal

Tanto a papilomatose laríngea (PL) como a nasal (PN) são doenças crônicas

raras, cujo agente etiológico é o HPV, sendo os tipos 6 e 11 presentes em 90% dos casos. O vírus provoca o surgimento de papilomas exofíticos na mucosa epitelial do trato respiratório (Figura 3).

Figura 3 - Exemplo de lesão papilomatosa na região laríngea



Acometimento glótico (mais comum). Lesões em toda extensão de prega vocal direita e 1/3 anterior de prega vocal esquerda.

FONTE: Beneviti, 2018.

A PL também é conhecida como papilomatose glotal devido à predileção das lesões em surgir na glote, que é a estrutura anatômica localizada na porção final na laringofaringe com a função de impedir a entrada de alimentos facilitando a saída e a entrada de ar para os brônquios e pulmões. Entretanto, os papilomas podem surgir em qualquer outra região ao longo do trato respiratório, como traqueia, brônquios e pulmões (REEVES et al., 2003; GÉLINAS et al., 2008; MAMMAS et al., 2009).

Baseado na idade do paciente, a PL pode ser classificada em PL-juvenil, quando atinge indivíduos até doze anos de idade; e PL-adulta, acometendo indivíduos acima dos 12 anos (FARHADI et al., 2016; IVANCIV et al., 2018). Alguns autores utilizam a idade de 18 anos para caracterizar as formas adulta e juvenil, considerando a forma adulta quando os sintomas se instalam após 18 anos de idade (LINDEBERG et al., 1986). Seguimos neste trabalho, a literatura mais recente de Ivancic e colaboradores (2018).

A PN apresenta uma etiologia variada que inclui a infecção pelo HPV,

inflamação crônica, poluição ambiental e exposição ocupacional (soldadores, carvoeiros) (RE et al., 2017). Acomete apenas uma das narinas em 90% dos casos (MAROLDI et al., 2004).

A forma de transmissão da PL e da PN ainda é pouco discutida, porém, a transmissão vertical é o meio mais provável e aceito (LEE et al., 2013; MÉSZNER et al., 2015; FARHADI et al., 2016).

Estudos observaram que cerca de 80% dos neonatos nascido de mulheres com HPV genital possuem o DNA do HPV no aspirado de nasofaringe e cavidade oral (SILVERBERG et al., 2003; ROMBALDI et al., 2009; LEE et al., 2013). Apesar disso, o desenvolvimento da doença clínica é incomum e parece estar relacionada a uma resposta imune disfuncional observada em alguns pacientes e que ainda não está bem elucidada (BONAGURA et al., 2010; DEVOTI et al., 2014).

A PL-juvenil possui um curso clínico mais agressivo do que a PL-adulta (IVANCIC et al., 2018). A transmissão da PL-adulta ainda não está clara. Estudos levam a crer que a transmissão poder ser via sexual ou por reativação de uma infecção latente adquirida na infância, porém nada está confirmado (OMLAND et al., 2014; RUIZ et al., 2014).

Os sintomas clássicos da PL são disfonia e dispneia. Já da PN é a obstrução nasal. O diagnóstico precoce é importante, já que as massas verrucosas crescem e, progressivamente, levam à afonia e à obstrução das vias aéreas superiores (EFTEKHAAR et al., 2016). Em pacientes onde a doença é mais agressiva, a traqueostomia torna-se necessária (IVANCIC et al., 2018). Além disso, estudos relatam uma malignização destas lesões em alguns casos (NEBESIO et al., 2001; DERKAY; WIATRAK, 2008; TIPLE et al., 2015; RE et al., 2018).

Não existe cura para a PL e PN. O tratamento é voltado à manutenção da voz do paciente, no caso da PL, e desobstrução das vias aéreas superiores tanto na PL como na PN. Para isso, o manejo tradicional é a excisão das lesões, em centro cirúrgico, com instrumentos a frio, laser de CO₂ ou microdebridação na PL e resecção endoscópica no caso da PN (IVANCIC et al., 2018). Geralmente, especialmente na PL-juvenil, são necessárias múltiplas cirurgias para melhorar a qualidade de vida do paciente (DERKAY; WIATRAK, 2008; SHETTY et al., 2013).

Tratamentos adjuvantes são utilizados em alguns casos em que somente a cirurgia não controla a reincidência da doença (SCHRAFF et al., 2004). Terapias

adjuvantes incluem imunomoduladores (interferons), antivirais (cidofovir), anti-angiogênicos (bevacizumab), anti-inflamatórios (celecoxib) e, mais recentemente, a vacina contra o HPV (IVANCIC et al., 2018).

A vacina contra o HPV, especificamente o Gardasil®, é utilizada no Brasil para a prevenção do HPV, por meio da imunização de meninas de nove a catorze anos, e meninos de onze a catorze anos (BRASIL, 2017). Estudos vêm relatando que o tratamento com a vacina de crianças com PL severa diminui o tempo de reincidência da doença (FORSTER et al., 2008; HOCEVAR-BOLTEZAR et al., 2014; YOUNG et al., 2015). Entretanto, apesar desses resultados promissores, estudos multicêntricos randomizados controlados são necessários para avaliar a real eficácia da vacinação contra o HPV como vacina terapêutica na população com papilomatose respiratória recorrente (PRR) (IVANCIC et al., 2018).

3.4 Epidemiologia da PL e PN

Como ambas as doenças são raras, existem poucos estudos que avaliam sua prevalência. Estes estão concentrados em países desenvolvidos, como Estados Unidos, Canadá e Dinamarca (LINDEBERG; ELBROND, 1990; DERKAY, 1995; ARMSTRONG et al., 2000; REEVES et al., 2003; CAMPISI et al., 2010).

A PL é uma doença relativamente rara, com incidência de 0,24 a cada 100.000 habitantes no Canadá, e 0,36 a 1,11 a cada 100.000 nos Estados Unidos (CAMPISI et al., 2010; LARSON; DERKAY., 2010). Derkay e Wiatrak (2008) estimaram uma taxa de incidência de 4.3 para cada 100.000 da PL-juvenil e 1.8 a cada 100.000 para a PL-adulta.

A PN possui uma incidência de 0,74 a 1,5 para cada 100.000 habitantes ao ano (RE et al., 2017).

A prevalência da PL e PN é bastante variável e depende de vários fatores, como localização geográfica, início da patologia e condição socioeconômica. Não existe ainda um estudo que avalie a incidência da PL no Brasil. O que existem são alguns trabalhos com coortes com pequenas amostras de pacientes portadores de papilomatose (XIMENES et al., 2003; MATOS et al., 2013; SILVA et al., 2014).

O Maranhão, assim como outros estados da região Norte e Nordeste, apresenta condições socioeconômicas, educacionais e de saúde inferiores a outros

estados do Brasil, principalmente àqueles localizados nas regiões Sul e Sudeste.

Segundo o IBGE (2006), o Maranhão é o segundo estado com menor IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) no Brasil. Devido a estas características, infelizmente, o Maranhão está sujeito a maiores índices de doenças que se dão por meio de má condição sanitária, higiene ou falta de informação, como é o caso das lesões causadas pelo HPV.

3.5 Justificativa

A PL e a PN devem estar presentes nos diagnósticos diferenciais de estridor (ruído audível durante a respiração observada em crianças que apresenta dificuldade respiratória), de modo a prevenir o crescimento de papilomas e a consequente obstrução grave das vias aéreas. Por ser rara, muitas vezes é erroneamente diagnosticada como asma, alergias, traqueomalacia, laringite, bronquite e nódulos ou cistos nas cordas vocais (ZACHARISEN et al., 2006).

Os resultados deste estudo podem servir de alerta para pediatras, alergologistas, pneumologistas e otorrinolaringologistas, no sentido de que a PL e PN existem e que podem ser confundidas com outras doenças respiratórias. Assim como, após o melhor entendimento sobre a doença, se tornará viável esclarecer às mães e familiares dos pacientes, sobre a possível infecção do HPV em outros filhos, que poderão nascer futuramente.

A incidência no Brasil ainda é desconhecida. Existem poucos estudos sobre a doença no país e nenhum no estado do Maranhão. Desta forma, este estudo irá contribuir para o melhor conhecimento do perfil clínico da doença, especificamente na população maranhense.

O conhecimento dos tipos virais envolvidos no desenvolvimento da PL e na PN é importante para se definirem medidas profiláticas e terapêuticas em uma determinada população. Assim, este estudo visa a identificar em uma população com PL e PN, os subtipos virais de HPV e comparar clinicamente as formas adulta e juvenil no caso da PL.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 População do estudo e participantes da pesquisa

A população do estudo consistiu-se em indivíduos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA), no período de julho de 2013 a agosto de 2018, diagnosticados com papilomatose laríngea ou nasal, totalizando 13 pacientes, porém, um destes foi excluído do estudo já que, posteriormente, o laudo histopatológico classificou a lesão como adenocarcinoma ao invés de papiloma. Portanto, a amostra final foi composta por 12 amostras com PL ou PN. Estas foram coletadas por conveniência, de acordo com o número de pacientes que deram entrada no referido hospital.

Como critérios de inclusão, os participantes da pesquisa foram indivíduos maiores e menores de idade, de ambos os sexos, submetidos à cirurgia para retirada dos papilomas.

Como critério de exclusão, foi retirada da pesquisa a amostra que apresentasse material biológico inadequado (necrótico) e/ou escasso para a realização da pesquisa.

Aos participantes e responsáveis pelos menores foi explicada toda a pesquisa e entregue o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices A e B). Às crianças letradas, geralmente àquelas acima de sete anos, foi aplicado, após aceite dos responsáveis, o termo de assentimento (Apêndice C).

4.2 Coleta de dados

Os participantes com PL e PN tratados no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão foram identificados e seus dados clínicos e sociodemográficos foram coletados por meio de revisão dos prontuários médicos e por um questionário sociodemográfico aplicado (Apêndice D).

4.3 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas durante a cirurgia e acondicionadas em RNA Later (*Life Technologies*) a 4°C e, no dia seguinte, armazenadas em *freezer* a -80°C.

4.4 Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA genômico total das amostras congeladas foi realizada como descrito pelo manual de uso do *kit Dneasy Blood and Tissue* (QIAGEN Ltd,UK). Resumidamente, o fragmento da lesão foi seccionado e depositado em tubos de 2 mL, onde foram ressuspensos em 180µL de tampão ATL e 20µL de Proteinase K. A digestão ocorreu a 56°C em termomixer por 24 horas. Posteriormente, os tubos foram incubados a 90°C por uma hora em termomixer e adicionado 200µL de Tampão AL. Em seguida, foi adicionado 200µL de Etanol (96-100%) à amostra e a mistura foi transferida para um tubo contendo uma coluna de sílica. O tubo foi centrifugado e a coluna lavada com diferentes tampões. Ao final, foi adicionado no centro da coluna 100µL de Tampão AE e, em seguida, centrifugada a 14.000 rpm, durante quatro minutos para a obtenção do DNA. As amostras foram identificadas e armazenadas a -20°C para posterior utilização nas reações de PCR.

A pureza e a concentração do DNA foram determinadas por meio do espectrofotômetro Nanovue (GE, USA). Quando as relações entre as densidades ópticas, A260/A280, foi igual ou maior que 1.7, o material foi considerado puro.

4.5 PCR Nested

Para detecção do vírus nas amostras, foi realizada a técnica de PCR Nested. Esta técnica consiste em duas reações subsequentes de PCR. A primeira utiliza como molde o DNA genômico e a segunda reação utiliza como molde o produto da primeira reação. Os primers utilizados foram PGMY 09 e PGMY11, e GP+5 e GP+6 (Tabela 1)

Tabela 1 - Sequência de nucleotídeos dos primers do estudo

Primers		Seqüência 5' → 3'
PGMY11	PGMY11-A PGMY11-B PGMY11-C PGMY11-D PGMY11-E	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG GCG CAG GGC CAT AAT AAT GG GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09	PGMY09-F PGMY09-G PGMY09-H PGMY09-Ia PGMY09-J PGMY09-K PGMY09-L PGMY09-M PGMY09-N PGMY09-Pa PGMY09-Q PGMY09-R HMB01b	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC G CCA AGG GGA AAC TGA TC CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC CGT CCAAGG GGA TAC TGA TC CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC G CCC AAC GGA AAC TGA TC CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT
GP+5		TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC
GP+6		GAA AAA TAAACT GTAAAT CAT ATT C

A primeira reação utilizou os primers PGMY09/11. A ciclagem ocorreu com uma desnaturação inicial por dois minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de desnaturação por 40 segundos a 95°C, 40 segundos de anelamento a 55°C, 40 segundos de extensão a 72°C. A reação consistiu em um volume final de 25 µl contendo 10 pmol de cada primer, 2.5µl de tampão 10X, 0.5µl de cloreto de magnésio a 50 Mm, 10 mM dNTP e 0.2 µl de *Taq Polimerase Platinum* (Invitrogen) (COUtlÉE et al., 2002).

A segunda reação foi realizada com os primers GP5+/GP6+, onde a desnaturação inicial ocorreu por quatro minutos a 95°C seguida por 45 ciclos de desnaturação por 45 segundos a 95°C por 1 minuto, anelamento a 40°C por 1 minuto e extensão por 1 minuto a 72°C. A reação consistiu em um volume final de 25 µl contendo 10 pmol de cada primer, 2.5µl de tampão 10X, 1.5µl de cloreto de magnésio a 50 Mm, 10 MmDntp e 0.3 µl de *Taq Polimerase Platinum* (Invitrogen) (COUtlÉE et

al., 2002).

4.6 Visualização dos produtos amplificados

Os produtos das reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1.5% em tampão TBE 1X. Uma alíquota de 5 μ L de DNA foi homogeneizada em uma solução de tampão de carregamento (Sigma-Aldrich, USA) e corante 0.1% de *Gel Red*, sendo toda a mistura aplicada no gel. A eletroforese foi realizada por 30 - 50 minutos a 5 V/cm² em cuba horizontal (*Life Technologies*, EUA). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta (BIO-RAD Laboratories, EUA).

4.7 Purificação do produto de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com o *kit Genelute PCR Clean up*, de acordo com o protocolo do fabricante (Sigma-Aldrich, USA). Em cada microtubo foi adicionado 500 μ L de tampão de captura a 100 μ L de produto de PCR. Esta solução foi transferida a uma coluna *Microspin* com tubo coletor e depois de uma série de lavagens com tampões, foram adicionados ao centro da coluna 25 μ L de tampão de eluição. O material foi centrifugado e armazenado a -20 °C para posterior sequenciamento.

4.8 Seqüenciamento automatizado

As reações de sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão localizado no Centro de Estudos Superiores de Caxias-CESC-UEMA, sob a supervisão do Doutor Elmary da Costa Fraga. O sequenciamento foi realizado com o *kit ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit* (GE Healthcare, UK), de acordo com o protocolo do fabricante. Foram utilizados, em cada reação, 2 μ L do produto de PCR purificado, 40 ng dos oligonucleotídeos específicos para cada exon (senso ou antisenso) e 2 μ L do kit. O sequenciador utilizado foi o MegaBACE 1000 (*GE Healthcare*, UK).

4.9 Análise estatística

As frequências das variáveis categóricas foram calculadas no programa Epi Info 7® (CDC). Nas comparações entre as duas formas de apresentação clínica da papilomatose laríngea, realizou-se comparação por meio do teste exato de *Fisher*, sendo os resultados considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Toda a análise estatística foi realizada também no programa Epi Info 7® (CDC).

4.10 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão e aprovado sob parecer nº 1.377.876b (Anexo A).

5 RESULTADOS

Analisaram-se os dados e as amostras de treze pacientes atendidos no Hospital Universitário Presidente Dutra, no período de julho de 2013 a agosto de 2018. Porém, um paciente foi excluído do estudo já que, posteriormente, o laudo histopatológico classificou a lesão como adenocarcinoma ao invés de papiloma. Portanto, a amostra final foi composta por 12 pacientes diagnosticados com papilomatose laríngea ou nasal.

Na Tabela 2 estão descritas as variáveis sociodemográficas e clínicas dos 12 pacientes incluídos no estudo. A maior proporção foi do sexo masculino (58,33 %), pardos (91,67%), residentes do interior do estado (58,33%) e nascidos em sua maioria via parto vaginal (91,67%). Dentro desta população, 75% apresentaram os papilomas na laringe, enquanto 25% possuíam papilomatose nasal.

Tabela 2 - Descrição sócio-demográfica e clínica de pacientes atendidos no HUUFMA com diagnóstico de PL e PN, São Luís, Maranhão

	N (12)	%
Sexo		
F	05	41,67
M	07	58,33
Cor declarada		
Branco	01	8,33
Pardo	11	91,66
Procedência		
Capital	05	41,67
Interior	07	58,33
Tipo de parto		
Vaginal	11	91,67
Cesária	01	8,33
Localização da lesão		
Laringe	09	75
Cavidade nasal	03	25

Entre os pacientes acometidos com PN, observou-se que todos eram do sexo masculino, pardos, procedentes do interior do estado e nascidos via parto vaginal. Somente 1 apresentou recorrência da doença (Tabela 3).

Tabela 3 - Descrição sócio-demográfica e clínica de pacientes atendidos no HUUFMA com diagnóstico de PN, São Luís, Maranhão.

	N (3)	%
Sexo		
F	00	0
M	03	100
Raça declarada		
Branco	00	0
Pardo	03	100
Procedência		
Capital	00	0
Interior	03	100
Tipo de parto		
Vaginal	03	100
Cesária	00	0
Nº de recorrências		
Nenhuma	02	66,67
≥ 2	01	33,33

Entre os pacientes com PL, pouco mais da metade eram do sexo feminino (55,56%) e procedentes da capital (55,56%). A maioria era de cor parda (88,89%) e haviam nascido via parto vaginal (88,89%). Dentre as duas formas da doença, a PL-juvenil foi a mais prevalente com 77,78% dos casos (Tabela 04).

Em relação às manifestações clínicas do quadro de PL, observou-se que todos os indivíduos apresentaram disfonia (100%), 66,67% tiveram dispneia e 33,33%, disfagia. Mais da metade dos pacientes (77,78%) apresentaram recorrência dos papilomas, sendo submetidos a múltiplas intervenções cirúrgicas. Em dois pacientes foi necessário o procedimento de traqueostomia. Pouco mais da metade dos pacientes com PL (55,55%) tinham menos de 5 anos de idade ao diagnóstico.

Tabela 4 - Descrição sócio-demográfica e clínica de pacientes atendidos no HUUFMA com diagnóstico de papilomatose laríngea, São Luís, Maranhão.

	N (9)	%
Sexo		
F	05	55,56
M	04	44,44
PRR		
Juvenil (≤ 12 anos)	07	77,78
Adulta (> 12 anos)	02	22,22
Cor declarada		
Branco	01	11,11
Pardo	08	88,89
Procedência		
Capital	05	55,56
Interior	04	44,44
Tipo de parto		
Vaginal	08	88,89
Cesária	01	11,11
Nº de recorrências		
Nenhuma	02	22,22
≥ 2	07	77,78
Dispneia		
Sim	06	66,67
Não	03	33,33
Disfagia		
Sim	03	33,33
Não	06	66,67
Disfonia		
Sim	09	100
Não	00	0
Traqueostomia		
Sim	02	22,22
Não	07	77,78
Idade ao diagnóstico		
≤ 5 anos	5	55,55
> 5 anos	4	44,44

Todos os doze pacientes avaliados foram submetidos à ressecção cirúrgica dos papilomas. Os que apresentaram papilomas de laringe realizaram o procedimento sob laringoscopia direta com utilização de pinças frias (microcirurgia de laringe convencional). Nos pacientes com papilomatose nasal, a cirurgia foi realizada através de acesso endoscópico.

Com relação à presença do vírus HPV, todas as amostras (100%) estavam infectadas. Entre os tipos virais identificados, 91.67% das amostras apresentaram o HPV de baixo risco tipo 6, enquanto somente em uma amostra foi identificado o HPV-18, conhecido como de elevado risco oncogênico (Tabela 5).

Tabela 5 - Presença do HPV em lesões papilomatosas de pacientes atendidos no HUUFMA com diagnóstico de PL e PN, São Luís, Maranhão.

	N (12)	%
Sim	12	100
HPV-6	11	91,67
HPV-18	1	8,33

O paciente que apresentou o HPV-18, de alto risco oncogênico, foi do sexo masculino e pertencia ao grupo de PL-adulta.

Quando comparadas as duas formas de PL (juvenil e adulta) com parâmetros relacionados à agressividade da doença, não foi encontrada associação com nenhuma das variáveis (Tabela 6).

Entre os nove indivíduos estudados, quatro eram do sexo masculino, sendo dois do grupo juvenil e dois do adulto. Cinco eram do sexo feminino, sendo todas do grupo juvenil. Comparando os dois grupos, não foi encontrada diferença estatística significativa em relação ao sexo ($p=0,16$). Todos os pacientes com PL-juvenil haviam nascido de parto normal, enquanto que o único nascido por meio de cesárea foi no grupo PL-adulta ($p=0,2$).

As recorrências das lesões foram mais frequente no grupo PL-juvenil, porém sem diferença significativa ($p=0,41$). A dispneia foi mais frequente no grupo PL-juvenil, mas sem significância estatística quando comparado ao grupo PL-adulto ($p=0,08$). O sintoma de disfagia ocorreu somente em pacientes do grupo PL-juvenil ($p=0,5$). Não houve relação quanto ao tipo de HPV entre as duas apresentações ($p=0,02$). Os dois pacientes que necessitaram do procedimento de traqueostomia eram do grupo PL-juvenil, e tinham idade de 2 a 3 anos.

Tabela 6 - Comparações entre as duas formas de apresentação clínica da PL e as variáveis de agressividade.

	PL-Juvenil	PL-Adulta	P
Sexo			0,16
Masculino	2	2	
Feminino	5	0	
Cor			1,0
Pardo	6	2	
Branco	1	0	
Parto			0,2
Natural	7	1	
Cesárea	0	1	
Recorrência			0,41
Sim	6	1	
Não	1	1	
Dispneia			0,08
Sim	6	0	
Não	1	2	
Disfagia			0,5
Sim	3	0	
Não	4	2	
Tipo de HPV			0,2
Baixo risco	7	1	
Alto risco	0	1	
Traqueostomia			1,0
Sim	2	0	
Não	5	2	

Teste exato de Fisher. A significância estatística foi considerada quando o $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Existe uma controvérsia nos estudos sobre a prevalência da PL entre os sexos. Alguns reportam uma maior ocorrência no sexo masculino e outros relatam uma taxa de prevalência igual da PL entre homens e mulheres (XIMENES et al., 2003; MCCLAY, 2004; CHIRILA; BOLBOACA, 2014; EFTEKHAAR et al., 2017). No presente estudo, não foi observado diferença estatística entre os grupos na forma juvenil e adulta no que diz respeito ao sexo ($p=0,16$).

Entre os pacientes com PN, observou-se que todos eram do sexo masculino. De fato, a literatura demonstra uma proporção 3:1 a 8:1 homens/mulheres nos casos de papiloma nasal (Cheng et al., 2006). Um estudo brasileiro realizado em São Paulo com 14 pacientes com PN revelou uma proporção de 2,5:1 homens/mulheres (Voegles et al., 2000).

A PL-juvenil foi a mais frequente no presente estudo com 77,78% dos indivíduos com até 12 anos de idade. Este resultado difere-se do observado em dois estudos brasileiros realizados no estado de São Paulo, onde a prevalência da PL-adulta foi de 56% e 52,27%, respectivamente (XIMENES et al., 2003; DE MATOS et al., 2013). Chirila & Bolboaca (2014) em estudo realizado com 31 pacientes romênicos com PL, observaram também uma predominância da PL-adulta (58,06%).

Segundo LARSON & DERKAY (2010), a maioria dos pacientes com PL-juvenil são diagnosticados até os cinco anos de idade. O resultado corrobora com os achados deste estudo, onde 55,55% dos indivíduos tinham até cinco anos de idade no momento do diagnóstico. O mesmo resultado foi observado por Hermann e colaboradores (2016), onde cinco dos nove pacientes avaliados (55,5%) com PL-juvenil tinham até cinco anos de idade.

No presente estudo, todos os pertencentes ao grupo PL-juvenil nasceram por parto normal. O único paciente nascido via cesárea foi do grupo PL-adulta, do sexo masculino, com idade de 24 anos ao diagnóstico.

Outros trabalhos também relataram maior prevalência de portadores de PL nascidos via parto normal. De fato, presume-se que a transmissão do vírus HPV na PL-juvenil ocorra via transmissão vertical de mães infectadas para seus bebês (SHAH et al., 1998). Um estudo usando registros dinamarqueses para avaliar a relação etiológica potencial entre o HPV materno e a PL-juvenil descobriu que os bebês

nascidos de mães com condilomas genitais, tinham 231 vezes mais chances de infecção do que os bebês nascidos de mães sem histórico de condilomas (SILVERBERG et al., 2003).

A disfonia é o sintoma mais comumente observado entre os pacientes com papilomatose laríngea (WETMORE et al., 2000, XIMENES et al., 2003; SILVA et al., 2014), o que corrobora com este estudo, o qual a disfonia esteve presente em 100% dos participantes.

A dispneia é o segundo sintoma mais relatado na literatura, também consistente com o observado em nosso trabalho (SILVA et al., 2014).

Ximenes e colaboradores (2003) observaram que a dispnéia foi mais prevalente na forma juvenil ($p=0,03$) quando comparada a PL-adulta. Neste trabalho o mesmo foi visto, porém com valor estatisticamente não significativo ($p=0,08$).

A taxa de recidiva geral da doença foi de 77,78%, sendo de 85,7% na forma juvenil e 50% na forma adulta ($p=0,41$). Números semelhantes foram observados por Ximenes e colaboradores (2003), em que a taxa de recidiva geral foi de 66%, sendo de 76,2% na forma juvenil e 56,5% na forma adulta ($p=0,17$); e por Garcia-Romero e colaboradores (2015), onde a taxa de recidiva de 35 indivíduos com PL-adulta foi de 40%.

A incidência de traqueotomia em pacientes com papilomatose laríngea observada na literatura varia de 1,8 a 64%. No presente estudo observou-se que somente dois pacientes, equivalente a 16,67% da população estudada, necessitaram do procedimento. Os dois eram do grupo PL-juvenil, o que pode demonstrar uma maior agressividade da doença neste grupo. Resultados semelhantes foram vistos por Silva e colaboradores (2014) que observaram a necessidade de traqueotomia em 14,2% dos pacientes com PL-juvenil.

Neste estudo, os participantes com PN tiveram uma idade média de 13 anos, muito abaixo do observado na literatura. Vorasubin e colaboradores (2013) avaliaram 70 pacientes com PN e revelaram uma média de idade de 44,2. Voegles e colaboradores (2000) observaram entre 14 indivíduos com PN uma média de idade de 47,6 anos ($dp = 13, 5$ anos). Em relação a papilomatose nasal, no presente estudo a amostra foi insuficiente ($n = 03$), sendo necessário número amostral maior para o desenvolvimento de uma discussão e conclusão sobre a PN.

O HPV-DNA foi encontrado em 100% das lesões de papilomatose laríngea, o

que corrobora com a literatura, sugerindo, desta forma, que o HPV seja o agente etiológico da papilomatose laríngea (XIMENES et al., 2003; de MATOS et al., 2013; GARCIA-ROMERO et al., 2015; EFTEKHAAR et al., 2017). Entre os casos de papilomatose nasal, não foi diferente, visto que todas as amostras foram positivas para HPV, ratificando os achados na literatura, que apontam o HPV como um dos principais agentes etiológicos também da PN (RE et al., 2017).

Os HPV de baixo risco 6 e 11 estão presentes em 90% das lesões da PL e PN, e apenas 2% dos casos apresentam os subtipos 16 e 18 (DERKAI, 2001; VENKATESAN et al., 2012; VORASUBIN et al., 2013; GARCIA-ROMERO et al., 2015). A genotipagem dos tipos virais na população deste estudo demonstrou que o único tipo viral de baixo risco encontrado foi o HPV-6. Outros estudos também observaram maior prevalência do HPV-6. Matos e colaboradores (2013) observaram em uma população brasileira a presença do HPV-6 (72%) sobre o HPV-11 (28%) em 25 pacientes com PL. Eftekhaar e colaboradores (2017) observaram em 12 indivíduos iranianos com PL, uma prevalência de 75% do HPV-6 em relação ao HPV-11 (16,7%). Em um estudo sueco, com 55 pacientes com PL, Tjon e colaboradores (2015) viram que dos 76% dos pacientes estavam infectados com HPV-6 e 24% com HPV-11. Garcia-Romero e colaboradores (2015) demonstraram a presença do HPV-6 em 80% dos casos e viram que apenas 8% possuíam o HPV-11. Assim como este estudo, um dos pacientes apresentou um HPV de alto risco, no caso o tipo 18.

Tadavia, outros trabalhos demonstraram uma prevalência do HPV-11 sobre o tipo 6 em determinadas populações (IZADI et al., 2012; INTAKORN; SONSUWAN, 2014).

Um dos pacientes deste estudo, de 14 anos, do sexo masculino, apresentou infecção pelo HPV de alto risco oncogênico, do tipo 18. Baseado na classificação de Farhadi e colaboradores (2016) e Ivancic e colaboradores (2018), a PL neste caso é classificada como adulta. De acordo com alguns autores, neste caso, a forma de transmissão mais provável seria por via sexual, especificamente através do sexo oral (KASHIMA et al., 1992; RUIZ et al., 2014). Contudo, não é possível inferir que este foi o caso.

A prevalência da PL é bastante variável e depende de vários fatores, como localização geográfica, início da patologia e condição socioeconômica. Não existe ainda um estudo que avalie a incidência da PL no Brasil. O que há são alguns

trabalhos de coorte utilizando pequenas amostras de pacientes portadores de papilomatose laríngea e nasal. Ximenez Filho e colaboradores (2003) realizaram um estudo de coorte retrospectivo de dez anos com 44 pacientes do estado de São Paulo. Matos e colaboradores (2013) avaliaram 25 indivíduos com PL também do estado de São Paulo. Silva e colaboradores (2014) avaliaram em estudo retrospectivo de dez anos, 21 pacientes atendidos no estado de São Paulo. Observa-se, portanto, com os exemplos que, por ser uma doença rara, os trabalhos possuem um reduzido número amostral e estão limitados à indivíduos da região Sudeste. Este estudo é o primeiro trabalho que analisa uma população com PL na região Nordeste brasileira.

A incidência do HPV em uma população está diretamente relacionada a sua condição socioeconômica (SOUSA et al., 2015). Leung et al (2007), revelaram com uma pesquisa que a papilomatose de laringe é mais frequente em pacientes com menor condição socioeconômica, o que concorda com o primeiro autor citado.

A papilomatose, embora rara, deve estar presente nos diagnósticos diferenciais de estridor na criança, de modo a prevenir o crescimento de papilomas e a consequente obstrução grave das vias aéreas. Devido à raridade da doença, muitos casos de PL são inicialmente diagnosticados como asma, bronquite, laringite, rinosinusite alérgica ou nódulos nas cordas vocais (SILVERBERG et al., 2004; VENKATESAN et al., 2012). O diagnóstico definitivo vem em média após um ano do início dos sintomas (DERKAY, 1995; SILVERBERG et al., 2004). A descoberta tardia da doença pode afetar seu prognóstico (KASHIMA et al. 1992; GALLAGHER; DERKAY, 2008; SILVA et al., 2014).

A expectativa dos pesquisadores com este trabalho é o melhor entendimento da natureza progressiva da PL e suas seqüências potencialmente letais. Desta forma, o estudo contribuiu para o melhor conhecimento acerca da doença, podendo favorecer rapidez no diagnóstico, evitando o avançar dos sintomas e, conseqüentemente a piora do quadro patológico. Espera-se que através da vacinação contra o HPV ocorra a longo prazo a redução dos casos de PL em até 85% (CHIRILĂ; BOLBOACĂ, 2014).

7 CONCLUSÃO

Observou-se com o presente estudo que a população avaliada de portadores de papilomatose laríngea e nasal era composta, principalmente, por crianças de cor parda, do sexo masculino, residentes no interior do estado. Notou-se a prevalência do HPV 6 (baixo risco oncogênico) em 91,6% das amostras. Disfonia foi o sintoma relatado por todos os participantes da pesquisa. 77,78% dos indivíduos entrevistados sofreram duas ou mais lesões recorrentes, caracterizando uma alta taxa de reincidência da doença.

A prevalência da localização das lesões foi na laringe. O HPV-18, considerado de alto risco oncogênico e associado ao desenvolvimento do câncer, esteve presente em apenas uma amostra.

Todos os pacientes do grupo PL-juvenil nasceram de parto natural, corroborando com os achados na literatura, sugerindo que a via mais aceita de transmissão é durante o parto vaginal.

REFERÊNCIAS

- ABBASAKOOR, F.; BOULOS, P. B. Anal intraepithelial neoplasia. **British Journal of Surgery**. Mar 2005. 92(3):277-90.
- AFONSO, L. A.; CORDEIRO, T. I.; CARESTIATO, F. N et al. High Risk Human Papillomavirus Infection of the Foreskin in Asymptomatic Men and Patients with Phimosis. **Journal of Urology**. 2016 Jun;195(6):1784-9
- AKOGBE, G. O.; AJIDAHUN, A.; SIRAK, B. et al. Race and prevalence of human papillomavirus infection among men residing in Brazil, Mexico and the United States. **International Journal of Cancer**. 2012 Aug 1;131(3): E282-91
- ALBERO, G.; VILLA, L. L.; LAZCANO-PONCE, E. et al. Male circumcision and prevalence of genital human papillomavirus infection in men: a multinational study. **BMC Infectious Diseases**. 2013 Jan 17;13:18.
- ALEMANY, L.; SAUNIER, M.; ALVARADO, I. et al. HPV DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. **International Journal of Cancer**. Author manuscript; available in PMC 2016 Jan 1
- ARMSTRONG, L. R.; PRESTON, E. J.; REICHERT, M. et al. Incidence and prevalence of recurrent respiratory papillomatosis among children in Atlanta and Seattle. **Clinical Infectious Diseases**. 2000 Jul;31(1):107-9.
- BIRYUKOV, J.; MEYERS, C. Papillomavirus Infectious Pathways: A Comparison of Systems. **Viruses**. 2015. Aug 4;7(8):4303-25.
- BONAGURA, V. R.; HATAM, L. J.; ROSENTHAL, D. W. et al. Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and -11. **APMIS**. 2010 Jun;118(6-7):455-70
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018. **Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ. 2017, 128 p.
- CAMPISI, P.; HAWKES, M.; SIMPSON, K. Canadian Juvenile Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis Working Group. The epidemiology of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis derived from a population level national database. **The Laryngoscope**. Vol;120, Issue June 2010 p. 1233-1245.
- CHENG, T. Y.; UENG, S. H.; CHEN, Y. L. et al. Oncocytic Schneiderian papilloma found in a recurrent chronic paranasal sinusitis. **Chang Gung Medical Journal** 29:336–341, 2006.
- CHIRILĂ, M.; BOLBOACĂ, S. D. Clinical efficiency of quadrivalent HPV (types 6/11/16/18) vaccine in patients with recurrent respiratory papillomatosis. **European Archives of Otorhinolaryngology**. 2014 May;271(5):1135-42.
- COELHO, R. W.; PINHO, J. D.; MORENO, J. S. et al. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? **BMC Urology**. 2018; 18: 50.

COUPLÉE, F.; GRAVITT, P.; KORNEGAY, J. et al. Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. **Journal of Clinical Microbiology**. 2002 Mar;40(3):902-7.

CROSIGNANI, P.; STEFANI, A.; FARA, G. M. et al. Towards the eradication of HPV infection through universal specific vaccination. **BMC Public Health**. 2013 Jul 11;13:642.

DERKAY, C. S.; WIATRAC, B. Recurrent respiratory papillomatosis: a review. **Laryngoscope**. 2008 Jul;118(7):1236-47.

DEVOTI, J.; HATAM, L.; LUCS, A. et al. Decreased Langerhans cell responses to IL-36 γ : altered innate immunity in patients with recurrent respiratory papillomatosis. **Molecular Medicine**. 2014 Aug 28;20:372-80.

EFTEKHAAR, N. S.; KARBALAIE, N. M. H.; IZADI, F. et al. Human Papillomavirus (HPV) Genotype Distribution in Patients with Recurrent Respiratory Papillomatosis (RRP) in Iran. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. 2017 Jul 27;18(7):1973-1976.

FARHADI, M.; IZADI, F.; BAHRI, M. et al. Contovir - A New Adjuvant Therapy in Recurrent Respiratory Papillomatosis: A Case Study. **Iran Red Crescent Medical Journal** (Inpress): e21577. Doi:10.5812/ircmj.21577.

FELLER, L.; KHAMMISSA, R. A.; WOOD, N. H. et al. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. **Infectious Agent Cancer**. 2009 Nov 25;4:16.

FÖRSTER, G.; BOLTZE, C.; SEIDEL, J. et al. Juvenile laryngeal papillomatosis--immunisation with the polyvalent vaccine gardasil. **Laryngorhinootologie**. 2008;87(11):796-9.

GANGULY, N.; PARIHAR, S. P. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. **Journl of Biosciences**. 2009 Mar;34(1):113-23.

GARCÍA-ROMERO, C. S.; AKAKI-CABALLERO, M.; SAAVEDRA-MENDOZA, A. G. et al. Molecular subtyping of human papillomavirus in male adult individuals with recurrent respiratory papillomatosis. **Auris Nasus Larynx** April 2015. 42(5):385-9.

GÉLINAS, J. F.; MANOUKIAN, J.; CÔTÉ, A. Lung involvement in juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis: a systematic review of the literature. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**. 2008 Apr;72(4):433-52.

HAWKES, M.; CAMPISI, P.; ZAFAR, R. et al. Time course of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis caused by human papillomavirus. **Pediatric Infectious Disease Journal**. 2008 Feb;27(2):149-54.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Reviews in Medical Virology**. 2006 Mar-Apr;16(2):83-97.

HERMANN, J. S.; WECKX, L. Y.; NÜRMBERGER, J. N. et al. Effectiveness of the

human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) vaccine in the treatment of children with recurrent respiratory papillomatosis. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**. 2016 Apr;83:94-8.

HERNANDEZ, B. Y.; WILKENS, L. R.; ZHU, X. et al. Transmission of human papillomavirus in heterosexual couples. **Emerging Infectious Diseases Journal**. 2008 Jun;14(6):888-94.

HOČEVAR-BOLTEŽAR, I.; MATIČIČ, M.; SEREG-BAHAR, M. et al. Human papilloma virus vaccination in patients with an aggressive course of recurrent respiratory papillomatosis. **European Archives of Otorhinolaryngology**. 2014 Dec; 271(12):3255-62.

HONG, S.; LAIMINS, L. A. Manipulation of the innate immune response by human papillomaviruses. **Virus Research**. 2017 Mar 2;231:34-40.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Perfil dos municípios brasileiros: gestão pública 2005/IBGE**, Coordenação de População e Indicadores Sociais. Rio de Janeiro, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa | 2018. **Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2017.

INTAKORN, P.; ROONGROTWATTANASIRI, K. Human papillomatosis genotyping and severity in patients with recurrent respiratory papillomatosis. **Journal of the Medical Association of Thailand**. 2014; 97 (Suppl. 6): S136-S141.

IVANCIC, R.; IQBAL, H.; SILVA, B. et al. Current and future management of recurrent respiratory papillomatosis. **Laryngoscope Investigate Otolaryngology**. 2018 Jan 14;3(1):22-34.

IZADI, F.; HAMKAR, R.; GHANBARI, H. et al. The role of Human papilloma virus (HPV) genotyping in recurrent respiratory papillomatosis in Rasoul Akram Hospital. **Medical Journal Islam Republic of Iran**. 2012 May;26(2):90-3.

KAHN, J. A.; LAN, D.; KAHN, R. S. Sociodemographic factors associated with high-risk human papillomavirus infection. **Obstetrics Gynecology**. 2007 Jul;110(1):87-95.

KAMINAGAKURA, E.; VILLA, L. L.; ANDREOLI, M. A. et al. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. **International Journal of Cancer**. 2012 Apr 15;130(8):1726-32.

KASHIMA, H. K.; KESSIS, T.; HRUBAN, R. H. et al. Human papillomavirus in sinonasal papillomas and squamous cell carcinoma. **The Laryngoscope**. 1992 Sep;102(9):973-6.

KIDD, L. C.; CHAING, S.; CHIPOLLINI, J. et al. Relationship between human papillomavirus and penile cancer—implications for prevention and treatment. **Translational Andrology and Urology**. 2017 Oct; 6(5): 791–802.

LARSON, D. A.; DERKAY, C.S. Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis.

APMIS. 2010 Jun;118(6-7):450-4.

LEE, C. J.; ALLEN, C. T.; MERATI, A. L. Prevalence of diabetes mellitus and its impact on disease severity in adult recurrent respiratory papillomatosis.

Otolaryngology Head Neck Surgery. 2013 Oct;149(4):603-7.

LINDEBERG, H.; ELBRØND, O. Laryngeal papillomas: the epidemiology in a Danish subpopulation 1965-1984. **Clin Otolaryngol Allied Sci.** 1990 Apr;15(2):125-31.

LINDEBERG H, OSTER S, OXLUND I. et al. Laryngeal papillomas: classification and course. **Clinical Otolaryngology and Allied Sciences.** 1986 Dec;11(6):423-9.

MCCLAY, J. E. **Recurrent respiratory papillomatosis.** EMedicine. 2004

MAMMAS, I. N.; SOURVINOS, G.; SPANDIDOS, D. A. Human papilloma virus (HPV) infection in children and adolescents. **European Journal of Pediatrics.** 2009 Mar;168(3):267-73.

MAROLDI, R.; FARINA, D.; PALVARINI, L. et al (2004) Magnetic resonance imaging findings of inverted papilloma: differential diagnosis with malignant sinonasal tumors. **American Journal of Rhinology and Allergy** 18:305–310.

MATOS, R. P.; SICHERO, L.; MANSUR, I. M. et al. Nucleotide and phylogenetic analysis of human papillomavirus types 6 and 11 isolated from recurrent respiratory papillomatosis in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution.** 2013 Jun;16:282-9.

NEBESIO, C. L.; MIROWSKI, G. W.; CHUANG, T. Y. Human papillomavirus: clinical significance and malignant potential. **International Journal of Dermatology.** 2001 Jun;40(6):373-9

NGUYEN, H. P.; MCNIECE, K. L.; DUONG, A. A. et al. Human papillomavirus infections of the oral mucosa and upper respiratory tract. **Current Problems in Dermatology.** 2014;45:132-53.

NIYIBIZI, J.; RODIER, C.; WASSEF, M. et al. Risk factors for the development and severity of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis: a systematic review. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.** 2014 Feb;78(2):186-97.

OLTHOF, N. C.; STRAETMANS, J. M.; SNOECK, R. et al. Next-generation treatment strategies for human papillomavirus-related head and neck squamous cell carcinoma: where do we go? **Reviews in Medical Virology.** 2012 Mar;22(2):88-105.

OMLAND, T.; AKRE, H.; LIE, K. A. et al. Risk factors for aggressive recurrent respiratory papillomatosis in adults and juveniles. **PLoS One.** 2014 Nov 24;9(11):e113584.

RE, M.; GIOACCHINI, F. M.; BAJRAKTARI, A. et al. Malignant transformation of sinonasal inverted papilloma and related genetic alterations: a systematic review. **European Archives in Otorhinolaryngology.** 2017 Aug;274(8):2991-3000.

REEVES, W. C.; RUPARELIA, S. S.; SWANSON, K. I. et al.. National registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. **Archives of Otolaryngology**

Head Neck Surgery. 2003 Sep;129(9):976-82.

RINTALA, M.A.; GRÉNMAN, S. E.; PURANEN, M. H. et al. Transmission of high-risk human papillomavirus (HPV) between parents and infant: a prospective study of HPV in families in Finland. **Jounal of Clinical Microbiology.** 2005 Jan;43(1):376-81.

ROMBALDI, R. L.; SERAFINI, E. P.; MANDELLI, J. et al.. Perinatal transmission of human papilomavirus DNA. **Virology Journal.** 2009 Jun 21;6:83

RUIZ, R.; ACHLATIS, S.; VERMA, A. et al.. Risk factors for adult-onset recurrent respiratory papillomatosis. **The Laryngoscope.** 2014 Oct;124(10):2338-44.

SCHIFFMAN, M.; DOORBAR, J.; WENTZENSEN, N. et al., Franceschi S. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers.** 2016 Dec 1;2:16086.

SCHRAFF, S.; DERKAY, C. S.; BURKE, B. et al.. American Society of Pediatric Otolaryngology members' experience with recurrent respiratory papillomatosis and the use of adjuvant therapy. **Archives of Otolaryngology Head Neck Surgery.** 2004 Sep;130(9):1039-42.

SNIJDERS, P. J.; STEENBERGEN, R. D.; HEIDEMAN, D. A. et al.. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. **Journal of Pathology.** 2006 Jan;208(2):152-64.

SOUSA, I. D. B.; VIDAL, F. C. B.; VIDAL, J. B. C. B. et al.. Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: viral genotyping and clinical aspects. **BMC Urology.** 2015; 15(1): 13.

VENKATESAN, N. N.; PINE, H. S.; UNDERBRINK, M. P. Recurrent respiratory papillomatosis. **Otolaryngology Clinics of North America.** 2012 Jun;45(3):671-94.

VOEGLES, R. L.; ANGÉLICO-JUNIOR, F. V.; MORAES, F. V. et al. Papilomas Invertidos: aspectos clínicos e cirúrgicos / Inverted Papiloma: clinical and surgical considerations. **Rev. bras. otorrinolaringol;**66(1):18-21, jan.-fev. 2000.

VORASUBIN, N.; VIRA, D.; SUH, J. D. et al.. Schneiderian papillomas: comparative review of exophytic, oncocyctic, and inverted types. **American Journal of Rhinology and Allergy.** 2013 Jul-Aug;27(4):287-92.

WANG, R.; GUO, X. L.; WISMAN, G. B. et al. Nationwide prevalence of human papillomavirus infection and viral genotype distribution in 37 cities in China. **BMC Infectious Disease.** 2015 Jul 4;15:257.

WEI, F.; YIN, K.; WU, X. et al.. Human papillomavirus prevalence and associated factors in women and men in south China: a population-based study. **Emerging Microbes and Infections.** 2016 Nov 23;5(11):e119.

WOODMAN, C. B., COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Review Cancer.** 2007 Jan;7(1):11-22. Review.

ZACAPALA-GÓMEZ, A. E.; MORAL-HERNÁNDEZ, O. D.; VILLEGAS-SEPÚLVEDA, N. et al. Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. **Virology**. 2016 Jan 15;488:187-95.

ZHOU, X. H.; SHI, Y. F.; WANG, L. J. et al. Distribution Characteristics of Human Papillomavirus Infection: A Study Based on Data from Physical Examination. **Asian Pacif Journal of Cancer Prevention**. 2017 Jul 27;18(7):1875-1879.

ZUR-HAUSEN, H. Human papillomavirus & cervical cancer. **Indian Journal of Medical Research**. 2009 Sep;130(3):209.

**APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(menores de 18 anos)**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(menores de 18 anos)**

ESTUDO: *Envolvimento do papilomavírus humano na progressão de lesões papilomatosas de laringe em pacientes de São Luís, Maranhão*

Prezado(a) Senhor(a),

Você está sendo convidado a autorizar a participação de seu filho (a) ou menor sob sua responsabilidade no presente estudo. O objetivo deste estudo é determinar através de exames de laboratório, a presença e o tipo de vírus presente na lesão que será retirada na cirurgia.

Não será realizado nenhum procedimento a mais no menor. É solicitada a vossa senhoria somente uma pequena amostra da lesão que será retirada durante a cirurgia.

Os dados do menor como o nome e idade, serão consultados nos registros médicos somente pela equipe de pesquisadores envolvidos nesse estudo. O nome do menor e seus dados pessoais (endereço, telefone) não serão revelados.

Esta pesquisa tem como benefícios conseguir novas informações sobre a papilomatose de laringe no Maranhão, podendo ajudar no futuro, indivíduos com a mesma doença. Os benefícios, portanto, não são direcionados ao menor.

Sua autorização deverá ser voluntária. Você não receberá nenhum valor em dinheiro e também não terá despesas referentes à participação do menor. Você poderá entrar em contato com a nossa equipe a qualquer momento para tirar dúvidas.

No caso de aceitação no estudo, assine ao final deste documento que está em duas vias assinada pelo pesquisador responsável. Uma das vias é sua.

Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao menor. Você terá a garantia de sigilo, direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem prejuízo da continuidade na forma de tratamento, assistência, cuidado, ou acompanhamento proporcionado ao menor.

A pesquisa será encerrada após a publicação dos resultados em meios de

divulgação da área científica.

Eu _____ aceito que o menor sob minha responsabilidade participe da presente pesquisa. Entendi os riscos e benefícios da pesquisa e que eu posso a qualquer momento desistir da participação, sem qualquer prejuízo. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas. Recebi uma cópia deste termo de consentimento, li e concordo.

Responsável:

Data do aceite ____ / ____ / ____

São Luís, de de 20

Pesquisador responsável:

Danielle Salgado de Brito
Telefone de contato (98) 99973-4861

Pesquisador:

Dra. Flávia Castello Branco Vidal
Telefone de contato (98) 98225-9660

Impressão do dedo polegar
Caso não saiba assinar

Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital Universitário – UFMA

Rua Barão de Itapary, 227, 4º andar, Centro. Telefone: 2109-1250

E-mail: cep@huufma.br

Responsável: Dr. Rita da Graça Carvalhal Frazão Corrêa

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: *Envolvimento do papilomavírus humano na progressão de lesões papilomatosas de laringe em pacientes de São Luís, Maranhão*

Prezado(a) Senhor(a),

Você está sendo convidado a participar do estudo que pretende analisar através de exames de laboratório, a presença e o tipo de vírus presente na sua lesão.

Para a realização dos exames, não será realizado nenhum procedimento a mais no senhor (a). Será solicitada somente, uma pequena amostra da lesão que será retirada durante a cirurgia pelo médico. Após os exames, as amostras serão desprezadas de forma adequada.

Seu registro no hospital (prontuário) será consultado pela equipe de pesquisadores envolvidos nesse estudo. Seu nome e dados pessoais (endereço, telefone) não serão revelados.

Os benefícios da sua participação serão representados pela obtenção de dados importantes para a epidemiologia da papilomatose de laringe no Maranhão. Desta forma os pesquisadores e médicos poderão melhorar o conhecimento sobre a doença e estudar a possibilidade de novas formas de tratamento. Os benefícios, portanto, não são direcionados à você.

Os riscos potenciais de participação nesta pesquisa são mínimos e representados por algum constrangimento ou intimidação que o(a) senhor(a) possa sentir com o pesquisador que vai lhe explicar a pesquisa. A entrevista será realizada por profissional treinado, portanto, não tema. Além disso, o (a) senhor(a) está livre para se recusar a participar da pesquisa.

Sua autorização deverá ser voluntária. Você não receberá nenhum valor em dinheiro e também não terá despesas referentes à participação. Você poderá entrar em contato com a nossa equipe a qualquer momento para tirar dúvidas.

Caso aceite participar, assine ao final deste documento que está em duas vias assinada pelo pesquisador responsável. Uma das vias é sua!

Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo. Você terá a garantia de sigilo, direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem prejuízo da continuidade na forma de tratamento, assistência, cuidado ou acompanhamento.

A pesquisa será encerrada após a publicação dos resultados em meios de divulgação da área científica.

Eu _____ aceito participar da pesquisa Envolvimento do papilomavírus humano na progressão de lesões papilomatosas de laringe em pacientes de São Luís, Maranhão. Entendi os riscos e benefícios da pesquisa q eu posso a qualquer momento desistir da minha participação, sem qualquer prejuízo. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas. Recebi uma cópia deste termo de consentimento, li e concordo em participar da pesquisa.

Participante da Pesquisa:

.....

Data do aceite ____ / ____ / ____

São Luís, de de 20

Pesquisador responsável:

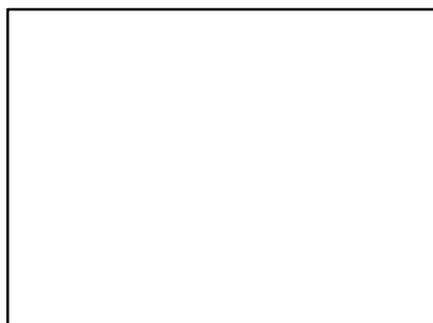
Danielle Salgado de Brito

Telefone de contato (98) 99973-4861

Pesquisador:

Dra. Flávia Castello Branco Vidal

Telefone de contato (98) 98225-9660



Impressão do dedo polegar
Caso não saiba assinar

Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital Universitário

UFMA

Rua Barão de Itapary, 227, 4º andar, Centro. Telefone: 2109-1250

E-mail: cep@huufma.br

Responsável: Dr. Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa

APÊNDICE C – TERMO DE ASSENTIMENTO

TERMO DE ASSENTIMENTO

ESTUDO: *Envolvimento do papilomavírus humano na progressão de lesões papilomatosas de laringe em pacientes de São Luís, Maranhão*

Olá,

Você está sendo convidado para participar na nossa pesquisa. Seus pais permitiram que você participe.

A pesquisa que nós vamos fazer tem como objetivo descobrir o tipo de vírus que está no machucado que será retirado na cirurgia. Iremos trabalhar somente com o que será retirado pelo médico. Nada a mais será realizado em você.

Outras crianças e adultos vão participar dessa pesquisa. Você não precisa participar se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será feita no Banco de Tumores e DNA do Maranhão, próximo ao Hospital onde será realizada sua cirurgia.

As coisas boas que podem acontecer com sua participação na pesquisa será o melhor conhecimento dos pesquisadores e médicos sobre a sua doença. Conhecendo melhor o seu machucado, poderemos criar novas formas de tratamento e controle para crianças e adultos no futuro.

Você pode sentir alguma vergonha quando o pesquisador for lhe explicar a pesquisa. Não Fique! Ele é treinado para isto. Além disso, você pode dizer que não quer participar!

Caso você tenha alguma dúvida, nos procure pelos telefones que estão no final da página.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. A pesquisa será encerrada após a publicação dos resultados em meios de divulgação da área científica. mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa.

Após estas informações, se você aceitar, assine ao final deste documento que está em duas vias assinada pelo pesquisador responsável. Uma das vias é sua.

Sua colaboração será muito importante para nós.

Eu _____ aceito participar da pesquisa Envolvimento do papilomavírus humano na progressão de lesões papilomatosas de laringe em pacientes de São Luís, Maranhão. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Participante da Pesquisa:

.....

Data do aceite ____ / ____ / ____

Pesquisador:.....

São Luís, de de 20

Pesquisador responsável:

Danielle Salgado de Brito
Telefone de contato (98)99973-4861

Pesquisador:

Dra. Flávia Castello Branco Vidal
Telefone de contato (98) 98225-9660



Impressão do dedo polegar
Caso não saiba assinar

Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital

Universitário – UFMA

Rua Barão de Itapary, 227, 4º andar, Centro. Telefone: 2109-1250

E-mail: cep@huufma.br

Responsável: Dr. Rita da Graça Carvalhal Frazão Cor

APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO

QUESTIONÁRIO SÓCIO-DEMOGRÁFICO DO PROJETO *Envolvimento do papilomavírus humano na progressão de lesões papilomatosas de laringe em pacientes de São Luís, Maranhão.*

Nº do Prontuário:	
Nome do paciente:	
Idade:	
Cor: () branca () parda () preta () outra: _____	
Data da coleta :	Naturalidade:
Data de Nascimento:	Telefone/Celular:
Endereço:	
Renda familiar: () Programas Sociais () até ½ salário mínimo () entre ½ a 1 salário mínimo () sem renda () mais de 1 a 2 salários mínimos () mais de 3 salários mínimos	Nível de Educação: () analfabeto () ensino fundamental () ensino médio () ensino superior () Completo () Incompleto
Tipo de parto: () natural () cesárea Idade dos primeiros sintomas: Idade do diagnóstico: Idade da primeira intervenção/cirurgia: Quantidade de recorrências: () Uma () Duas () Três () Quatro ou mais Intervalo de tempo entre as recorrências: () Meses () Anos	
Sintomas: () Dispneia () Disfagia () Disfonia () Estridor () Vômitos	
Traqueostomia: () Sim () Não	
Vacinação contra HPV: () Sim () Não	
Melhora após vacinação: () Sim () Não	
Entrevistador:	

Observações do entrevistador:

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO UFMA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Envolvimento do papilomavírus humano na progressão de lesões papilomatosas de laringe em pacientes de São Luís, Maranhão

Pesquisador: Flávia Castello Branco Vidal Cabral

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 2

CAAE: 49681215.6.1001.5087

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHAO

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO MARANHAO - FAPEMA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.377.876

Apresentação do Projeto:

Introdução: O papilomavírus humano (HPV) é um vírus não envelopado que infecta o epitélio cutâneo ou de mucosas. Sua transmissão é principalmente por via sexual, podendo ocorrer também através de auto-inoculação ou transmissão vertical, da mãe para o bebê durante o parto. A papilomatose respiratória recorrente (PRR) é causada pelos tipos 6 e 11 de HPV em 90% dos casos. Apesar de benigno, tende a ter um curso

clínico agressivo em crianças e pode ser fatal devido a sua alta reincidência e tendência a se espalhar pelo trato respiratório. A forma de contágio

mais aceita seria através do canal vaginal durante o parto normal. Objetivos: Analisar o papel do HPV na progressão de lesões papilomatosas de

laringe em pacientes de São Luís, Maranhão. Materiais e Métodos: Trata-se de um estudo epidemiológico, do tipo analítico, prospectivo e seccional

de casos de lesões papilomatosas de laringe em crianças e adolescentes (menores de 18 anos). As amostras serão coletadas no Hospital

Universitário da Universidade Federal do Maranhão Unidade Materno-Infantil. Após leitura do TCLE

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética **CEP:** 65.080-040

UF: MA **Município:** SÃO LUIS

Telefone: (98)3272-8708 **Fax:** (98)3272-8708 **E-mail:** cepufma@ufma.br

e consentimento do responsável pelo menor, as amostras serão coletadas durante a cirurgia e o DNA extraído para análise da infecção pelo HPV. As amostras positivas para o vírus serão genotipadas e a correlação entre a presença e o tipo de HPV com o desfecho clínico dos pacientes, será analisado. Outros parâmetros laboratoriais como observação da integração do DNA viral ao DNA humano serão realizados para enriquecimento dos resultados da pesquisa. Para a avaliação da relação entre os dados epidemiológicos e clínicos e a presença de HPV, serão utilizados o teste Qui-quadrado e o teste exato de Fisher, sendo os resultados considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Toda a análise estatística será feita no programa GraphPad. Resultados Esperados: Com os dados obtidos neste projeto, pretende-se adicionar informações e esclarecer questões que envolvam a patologia papilomatose respiratória recorrente. Através da análise molecular da presença do HPV e sua genotipagem, poderemos monitorar a prevalência do HPV nas lesões papilomatosas, e apontar o tipo viral mais comum, associando a gravidade da doença com algum tipo viral específico. A análise do status do HPV, se integrado ou não ao genoma humano, nas células infectadas nos dará informações valiosas acerca da patogênese do vírus nas lesões avaliadas. Conclusão: Este tipo de estudo em lesões papilomatosas de laringe será o primeiro do Estado do Maranhão, e um dos poucos no Brasil.

A solicitação de recurso financeiro para este projeto foi enviada à FAPEMA e aguarda resultado.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar o papel do papilomavírus humano na progressão de lesões papilomatosas de laringe em pacientes de São Luís, Maranhão.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar a prevalência da infecção pelo HPV em lesões de laringe.
2. Analisar os tipos mais prevalentes de HPV nas lesões de laringe.
3. Correlacionar a presença e o tipo de HPV com a expressão do marcador p16 e de genes de proliferação celular e os desfechos clínicos de pacientes com papilomas de laringe.
4. Analisar a integração do HPV ao DNA humano por PCR em tempo real nas amostras de papilomas de laringe.

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho		
Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética	CEP: 65.080-040	
UF: MA	Município: SAO LUIS	
Telefone: (98)3272-8708	Fax: (98)3272-8708	E-mail: cepufma@ufma.br

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Nenhum procedimento cirúrgico adicional será realizado no paciente para a realização do presente estudo. As amostras utilizadas na pesquisa serão coletadas durante a cirurgia de rotina para retirada dos papilomas de laringe nos pacientes. Os potenciais riscos e incômodos que a pesquisa possa acarretar é representado por algum possível constrangimento ou intimidação que o profissional de saúde possa causar na hora da explanação da pesquisa. Este risco será minimizado através da atuação de um profissional treinado especialmente para este fim.

Benefícios:

Os benefícios desta pesquisa para o paciente são indiretos baseados no ganho de conhecimento acerca da patologia. Com a avaliação da incidência da infecção pelo HPV em papilomas de laringe, poderemos comparar os dados obtidos com os nacionais e internacionais de incidência assim como avaliar os tipos virais mais prevalentes especificamente na região maranhense. Os resultados da pesquisa poderão contribuir para melhor conhecimento sobre a etiologia da PRR que pode levar ao desenvolvimento de novas formas de tratamento desta patologia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta todos os elementos necessários para o seu desenvolvimento de maneira satisfatória.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Recomendações:

Todas as recomendações foram acatadas e corrigidas pela pesquisadora.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram acatadas e corrigidas pela pesquisadora e estão de acordo com a resolução 466/12 CNS.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética CEP: 65.080-040
UF: MA Município: SAO LUIS
Telefone: (98)3272-8708 Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br