

ICLÉIA SIQUEIRA BARRETO

**“ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA COMPOSIÇÃO
ESTRÔMATO-VASCULAR DOS PÓLIPOS TONSILARES”**

CAMPINAS

2010

ICLÉIA SIQUEIRA BARRETO

**“ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA COMPOSIÇÃO
ESTRÔMATO-VASCULAR DOS PÓLIPOS TONSILARES”**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências Médicas, na área de Anatomia
Patológica.*

Orientadora: Prof^a Dr^a Albina Messias de Almeida Milani Altemani

CAMPINAS

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B275e Barreto, Icléia Siqueira
Estudo imuno-histoquímico da composição estrômato-vascular dos pólipos tonsilares / Icléia Siqueira Barreto. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : Albina Messias de Almeida Milani Altemani
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Tecido linfóide. 2. Pólipos. 3. Imunoistoquímica. 3. Tonsila. 4. Matriz extracelular. I. Altemani, Albina Messias de Almeida Milani. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Immunohistochemical study of the stromal and vascular components of the tonsillar polyps

- Keywords:**
- Lymphoid tissue
 - Polyps
 - Immunohistochemical
 - Tonsil
 - Extracellular matrix

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Área de concentração: Anatomia Patológica

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

Prof^a Dr^a. Eliane Maria Ingrid Amstalden

Prof^a. Dr^a. Eliane Pedra Dias

Prof^a. Dr^a. Ester Maria Danielli Nicoli

Prof^a. Dr^a. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Souza

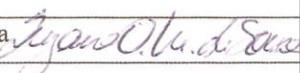
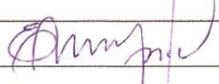
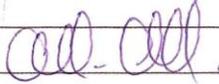
Data da defesa: 16-07-2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Icléia Siqueira Barreto

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Albina Messias De Almeida Milani Altemani

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Eliane Pedra Dias	
Professor (a) Doutor (a) Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa	
Professor (a) Doutor (a) Eliane Maria Ingrid Amstalden	
Professor (a) Doutor (a) Ester Maria Danielli Nicola	
Professor (a) Doutor (a) Albina Messias De Almeida Milani Altemani	

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16/07/2010

DEDICATÓRIA

Mais uma vez, ao meu avô João Siqueira Gomes pelo grande papel de pai, pelo eterno referencial nos meus estudos e na minha vida.

Ao meu falecido tio João Tobias, pelo enorme carinho, incentivo e amizade.

Aos meus padrinhos Joel e Marta, pelo papel de pais, sendo fundamentais para que muitos sonhos se tornassem realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à minha orientadora Prof^a Dr^a Albina Messias de Almeida Milani Altemani, por seus ensinamentos e pelo prazer de dividir comigo os seus conhecimentos em Patologia de Cabeça e Pescoço.

Agradeço aos meus pais Gil e Margarida, aos meus irmãos Edson, Irma e Gilmar, ao meu noivo Tarcísio, pelo grande apoio moral, paciência, carinho e dedicação que deles recebi durante os oito anos de estudo longe de casa.

A minha eterna gratidão a todos os docentes, residentes, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Anatomia Patológica da Unicamp.

Agradeço aos técnicos Geralda e Aparecido, pelo grande carinho e acolhimento que recebi em Campinas.

Agradeço à Ana Cláudia Piazza, à Camila Gonçalves, à Aline Moraes e a Adilson Piazza, pela contribuição na elaboração deste trabalho.

Agradeço à secretária Maria do Carmo, pelos cuidados que teve comigo, nos procedimentos para a defesa de tese. Como sempre, mostrou-se muito prestativa.

Aos meus amigos Cristiane, Janick, Francisco, Andresa, Catarina e Cecile, pelo grandioso incentivo, carinho em mais uma etapa importante da minha vida profissional.

EPÍGRAFE

“Para um grande sonho tornar-se verdadeiro, a primeira condição é ter uma grande capacidade de sonhar; a segunda é a perseverança – a fé no sonho”.

Hans Selye, MD

RESUMO

Pólipos tonsilares são lesões não neoplásicas usualmente constituídas por quantidades variáveis de tecidos linfóide, vascular e conjuntivo. Todos são considerados como proliferações hamartomatosas, mas o perfil dos componentes vascular e conjuntivo, necessita de estudo mais aprofundado. O sistema vascular das tonsilas é complexo e inclui estruturas altamente especializadas (Vênulas do Endotélio Alto- VEA), envolvidas no tráfico dos linfócitos para os tecidos linfóides. Foram estudados 14 pólipos tonsilares e 26 tonsilas palatinas, usando CD34 (para vasos sanguíneos e VEA), CD105 (para VEA), D2-40 (para vasos linfáticos), Ki-67 (para índice proliferativo), colágenos I e III, fibronectina e tenascina-C (para proteínas da matriz extracelular). Os pólipos mostraram aumento significativo da área linfática total, enquanto o número de vasos (sanguíneos e linfáticos) e a área vascular sanguínea não diferiram significativamente das tonsilas controles. Raras células endoteliais expressaram Ki-67. Nos pólipos, pela primeira vez foi demonstrada a presença de VEAs, as quais foram identificadas em meio ao tecido linfóide. A quantidade deste último correlacionou-se positivamente com a densidade destas estruturas. Os pólipos também apresentaram menor quantidade de fibronectina e colágenos I e III, os quais estavam distribuídos de forma desorganizada. A expressão de tenascina-C foi pouco frequente nos pólipos e nas tonsilas controles. Concluindo, os pólipos tonsilares são compostos por tecido conjuntivo desorganizado e canais linfáticos dilatados, que podem ser consideradas proliferações hamartomatosas. Todavia, o componente linfóide possivelmente é reacional, devido a sua relação com as VEA. O fenótipo altamente diferenciado das VEAs e sua biologia complexa não são condizentes com natureza hamartomatosa.

ABSTRACT

Tonsillar polyps are nonneoplastic lesions usually composed of a variable amounts of lymphoid, vascular and connective tissues. All are generally assumed to be hamartomatous proliferations but the profile of vascular and connective components has yet to be explored. The vascular system of the tonsils is complex and includes highly specialized structures (i.e. high endothelial venules -HEVs) involved in lymphocyte homing into lymphoid tissues. In 14 tonsillar polyps and 26 control tonsils an immunohistochemical study was performed using CD34 (for blood vessels and HEVs), CD105 (for HEVs), D2-40 (for lymphatic vessels), Ki-67 (for proliferating index), collagens I and III, fibronectin and tenascin-C (for proteins of the extracellular matrix). The polyps showed increased total lymphatic area, whereas number of vessels (sanguineous and lymphatic) and blood vascular area did not differ significantly from those of control tonsils. Rare Ki-67+ endothelial cells were found. In the polyps, HEV was encountered amid lymphoid tissue and its amount correlated positively with the HEV density. The polyps also presented lesser amounts of fibronectin and collagens I and III which were distributed in a disorganized fashion. Tenascin-C expression was uncommon in the polyps and control tonsils. In conclusion, the tonsillar polyps are composed of disorganized connective tissue and lymphatic channels which can be considered hamartomatous proliferations. However, the lymphoid component is possibly reactive due to its relationship with the HEVs. The highly differentiated phenotype of the HEVs and its complex biology are not in agreement with what would be expected for a component of hamartomatous nature.

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa (letra grega)
α -AML	Alfa actina de músculo liso.
AL	Área linfóide das tonsilas controles.
AMV	Área microvascular.
C	Cripta tonsilar.
Ca	Segmento de cápsula tonsilar.
DMV	Densidade microvascular.
E	Epitélio superficial.
F	Feminino.
FL	Folículo linfóide.
Fibronectina	Anticorpo policlonal anti-fibronectina humana.
G1	Pólipos linfóides.
G2	Pólipos não linfóides.
G3	Outras lesões polipóides.
HEV	High endothelial venule.
HEVs	High endothelial venules.
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1.
IL-1	Interleucina-1.
Kda	Quilodáltons (unidade de massa atômica).
L	Luz da cripta.
LE	Linfoepitélio.

LPSDE	Lesões polipóides sem denominação específica.
M	Masculino.
ME	Matriz extracelular.
mm	Milímetros.
NI	Não informado.
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas.
S	Septo tonsilares.
Se	Superfície do epitélio.
TGF β 1	Fator de transformação de crescimento beta-1.
TNF-beta	Fator de necrose tumoral beta.
VEA	Vênula do endotélio alto.
VEAS	Vênulas do endotélio alto.
Z	Zona do manto.
μ m	Micrômetro.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Pólipos tonsilares descritos na literatura inglesa.	55
Tabela 02	Aspectos diferenciais dos anticorpos utilizados no estudo.	75
Tabela 03	Depósito de fibronectina na matriz extracelular nas tonsilas controles.	84
Tabela 04	Depósito de fibronectina na matriz extracelular dos pólipos.	87
Tabela 05	Depósito de tenascina na matriz extracelular das tonsilas controles.	89
Tabela 06	Depósito de tenascina na matriz extracelular nos pólipos.	92
Tabela 07	Depósito de colágeno III na matriz extracelular das tonsilas palatinas controles.	99
Tabela 08	Depósito de colágeno III na matriz extracelular dos pólipos.	102
Tabela 09	Depósito de colágeno IV na matriz extracelular nas tonsilas controles.	105
Tabela 10	Depósito de colágeno IV na matriz extracelular dos pólipos.	106
Tabela 11	Dados estatísticos descritivos das variáveis número de vasos sanguíneos (CD34) e porcentagem da área marcada, por grupo nos pólipos e na região linfóide, das tonsilas palatinas.	114
Tabela 12	Dados estatísticos descritivos das variáveis número de vasos linfáticos (D2-40) e porcentagem da área marcada, por grupo nos pólipos e na região linfóide, das tonsilas palatinas.	115

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** **Figura 1: Tonsila Palatina Normal.** As imagens correspondem **49**
à lâmina digitalizada, contendo corte histológico de tonsila,
corada pela hematoxilina-eosina. Observe a arquitetura tonsilar
na imagem maior: **S-** septos tonsilares, **C-** cripta tonsilare
(seta), **Ca-** segmento de cápsula tonsilar, **E-** epitélio superficial.
Detalhe de uma cripta na figura menor, acima e à esquerda:
LE- linfoepitélio, **Z-** zona do manto, **FL-** folículo linfóide, **L-** luz
da cripta.
- Figura 02** **Tonsila Palatina Normal.** Observe corte histológico corado **50**
pela hematoxilina-eosina, destacando o linfoepitélio (entre
setas) e parte de um folículo linfóide subjacente (objetiva 40X).
- Figura 03** Composição celular dos diferentes compartimentos das **51**
tonsilas palatinas. Fonte: Nave et al. (27).
- Figura 04** **Tonsila Palatina Controle.** Expressão do anticorpo **82**
fibronectina (marrom) no conjuntivo da cápsula tonsilar. As
fibras positivas para fibronectina estão dispostas
ordenadamente, formando bandas (imuno-histoquímica-
objetiva 10X).
- Figura 05** **Tonsila Palatina Controle.** Expressão do anticorpo **82**
fibronectina (marrom) na parede dos vasos do folículo linfóide.
Os vasos estão distribuídos regularmente no centro
germinativo e formam uma fina rede circundando-o (setas
longas) (imuno-histoquímica- objetiva 20X).

- Figura 06 Tonsila Palatina Controle.** Expressão de fibronectina (marrom) no conjuntivo dos septos fibrosos e na vênula de endotélio alto no tecido linfóide (seta) (imuno-histoquímica-objetiva 40X). **83**
- Figura 07 Tonsila Palatina Controle.** Expressão de fibronectina na membrana basal das nas vênulas do endotélio alto, que estão em íntimo contato com o linfoepitélio (seta) (imuno-histoquímica- objetiva 40x). **83**
- Figura 08 Pólipo Linfóide.** Expressão de fibronectina na parede dos vasos no folículo linfóide, delimitado entre setas. Observar a distribuição irregular destes vasos, em comparação com aqueles do folículo linfóide da tonsila controle (**figura 5**) (imuno-histoquímica- objetiva 20X). **85**
- Figura 09 Pólipo Não Linfóide.** Expressão de fibronectina na parede dos vasos. Em aumento maior (no canto superior direito) observar a expressão de fibronectina (marrom), na membrana basal do vaso sanguíneo à direita (imuno-histoquímica-objetiva 20X). **86**
- Figura 10 Lesão Polipóide Sem Denominação Específica.** Observe a deposição leve de fibronectina (marrom) na matriz extracelular de lesão polipóide tonsilar (imuno-histoquímica- objetiva 20X). **87**
- Figura 11 Tonsila Palatina Controle.** Observe a expressão de tenascina (marrom) na matriz extracelular abaixo do epitélio superficial (seta) (imuno-histoquímica- objetiva 10X). **88**
- Figura 12 Tonsila Palatina Controle.** Note a expressão de tenascina (marrom) na matriz extracelular abaixo do epitélio da cripta tonsilar (seta), que apresenta perda da reticulação (imuno-histoquímica- objetiva 20x). **89**

- Figura 13 Pólipo Linfóide.** Observe a expressão focal de tenascina (marrom) na matriz extracelular, abaixo do epitélio superficial (asterisco) (imuno-histoquímica- objetiva 20X). Note maiores detalhes da expressão, na imagem acima e à esquerda (asterisco) (imuno-histoquímica- objetiva 40X). **90**
- Figura 14 Pólipo Linfóide.** Observe a expressão focal de tenascina (marrom) na matriz extracelular, abaixo do epitélio superficial (asterisco) (imuno-histoquímica- objetiva 20X). Note maiores detalhes da expressão, na imagem acima e à esquerda (asterisco) (imuno-histoquímica- objetiva 40X). **91**
- Figura 15 Pólipo Não Linfóide.** Observe a expressão focal de tenascina (marrom) abaixo do epitélio superficial (seta) (imuno-histoquímica- objetiva 40X). **92**
- Figura 16 Pólipo Não Linfóide.** Observe a expressão focal de tenascina (marrom) abaixo do epitélio superficial (seta) (imuno-histoquímica- objetiva 40X). **93**
- Figura 17 Pólipo Não Linfóide.** Note a expressão de tenascina (marrom) na parede de alguns vasos (setas) (imuno-histoquímica- objetiva 20X). **93**
- Figura 18 Lesão Polipóide Sem Denominação Específica.** Note a intensa deposição difusa de tenascina (marrom) na matriz extracelular (imuno-histoquímica- objetiva 20X). **94**
- Figura 19 Tonsila Palatina Controle.** Note a expressão de colágeno I (marrom) nos septos tonsilares, sendo que as fibras estão ordenadas, formando bandas (imuno-histoquímica- objetiva 10X). Em aumento maior (canto superior esquerdo) observar o aspecto ordenado das fibras colágeno I positivas (imuno-histoquímica- objetiva 40X). **95**

- Figura 20 Tonsila Palatina Controle.** Expressão de colágeno I (marrom) 96
na membrana basal das vênulas de endotélio alto, localizadas
no epitélio da cripta tonsilar (imuno-histoquímica- objetiva
40X).
- Figura 21 Pólipo Linfóide.** Note a expressão menor de colágeno I 97
(marrom) na matriz extracelular, em relação às tonsilas
controles. As fibras positivas para colágeno I estão dispostas
de modo desordenado, sem formar bandas (comparar com
figura 19) (imuno-histoquímica- objetiva 10X).
- Figura 22 Pólipo Não Linfóide.** Observar o arranjo irregular das fibras 98
colágeno I positivas (marrom) na matriz extracelular, entre os
vasos imuno-histoquímica- objetiva 20X).
- Figura 23 Tonsila Palatina Controle.** Observe a expressão de colágeno 100
III (marrom) no tecido conjuntivo no septo tonsilar (imuno-
histoquímica- objetiva 20X). Veja maiores detalhes na **figura**
24.
- Figura 24 Tonsila Palatina Controle.** Observe a expressão de colágeno 101
III (marrom) no tecido conjuntivo no septo tonsilar. Observar o
arranjo ordenado das fibras, formando bandas (imuno-
histoquímica- objetiva 40X).
- Figura 25 Pólipo Linfóide.** Observe a expressão de colágeno III 102
(marrom) na matriz extracelular abaixo do epitélio da cripta,
que apresenta perda da reticulação (imuno-histoquímica-
objetiva 20X).
- Figura 26 Pólipo Não Linfóide.** Note a menor expressão de colágeno III 103
(marrom) na matriz extracelular do pólipo não linfóide (imuno-
histoquímica- objetivo 20X). Comparar com a **figura 23** da
tonsila controle.

- Figura 27 Tonsila Palatina Controle.** Observe a expressão de colágeno IV na parede dos vasos (marrom), no tecido linfóide tonsilar (imuno-histoquímica- objetiva 40X). **104**
- Figura 28 Tonsila Palatina Controle.** Note a expressão de colágeno IV (marrom) na membrana basal das vênulas de endotélio alto, no epitélio da cripta tonsilar (imuno-histoquímica- objetiva 40X). **105**
- Figura 29 Pólipo Linfóide.** Note a expressão de colágeno IV (marrom) na parede do vaso, de permeio ao tecido linfóide (imuno-histoquímica- objetiva 40X). **106**
- Figura 30 Pólipo Não Linfóide.** Observe a expressão acentuada e focal de colágeno IV (marrom) na matriz extracelular (imuno-histoquímica- objetiva 20X). **107**
- Figura 31 Tonsila Palatina Controle.** Observar as células estromais vimentina positivas no septo tonsilar (entre setas) (imuno-histoquímica- objetiva 20X). **108**
- Figura 32 Tonsila Palatina Controle.** Observar a quase ausência de miofibroblastos α -AML positivos no septo tonsilar (entre setas). Notar que a musculatura da parede dos vasos é, também, positiva para α -AML (imuno-histoquímica- objetiva 20X). **109**
- Figura 33 Pólipo Linfóide.** Note a expressão de vimentina (marrom) no eixo do pólipo linfóide, realçando as células estromais (imuno-histoquímica- objetiva 40X). **110**
- Figura 34 Pólipo Linfóide.** Note a expressão de α -AML na parede dos vasos e nos miofibroblastos, no eixo do pólipo linfóide. Observar que a quantia de células é semelhante a da **figura 33** (imuno-histoquímica- objetiva 40X). **110**

- Figura 35 Pólipo Não Linfóide.** Note a expressão de vimentina 111 (marrom) nas células estromais e na parede dos vasos. As células estromais estão dispostas irregularmente (imuno-histoquímica- objetiva 20X).
- Figura 36 Pólipo Não Linfóide.** Observe que o anticorpo α -AML é 112 positivo, quase que exclusivamente, nas células musculares do vaso (imuno-histoquímica- objetiva 40X).
- Figura 37 Tonsila Palatina Controle.** Note as vênulas de endotélio alto 113 CD105 positivas, no tecido linfóide tonsilar (imuno-histoquímica- objetiva 40X).
- Figura 38 Pólipo Linfóide.** Observe as vênulas de endotélio 119 alto CD105 positivas (marrom), de permeio ao tecido linfóide (imuno-histoquímica- objetiva 40X).
- Figura 39 Pólipo Não Linfóide.** Note, na figura maior, que apenas nos 120 escassos nódulos linfóides, foram observadas vênulas de endotélio alto CD105 positivas (marrom) (seta) (imuno-histoquímica- objetiva 10X). Observar no canto superior direito, a vênula apontada pela seta, em aumento maior (imuno-histoquímica- objetiva 40X).
- Figura 40 Pólipo Não linfóide.** Dupla marcação Ki-67/D2-40. Observe 121 uma única célula endotelial Ki-67 positiva (marcação nuclear- seta maior) em vaso linfático corado pelo anticorpo D2-40 e outra no estroma adjacente (seta menor) (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01	Dispersão da variável número de vasos, por grupo (CD34).	117
Gráfico 02	Dispersão da variável porcentagem de área marcada, por grupo (CD34).	117
Gráfico 03	Dispersão da variável número de vasos, por grupo (D2-40).	118
Gráfico 04	Dispersão da variável porcentagem de área marcada, por grupo (D2-40).	118

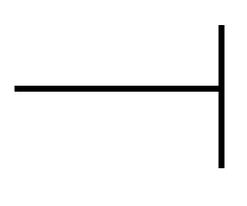
SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	43
1.1 Aspectos Embriológicos, Anatômicos, Morfológicos e Imunológicos das Tonsilas Palatinas.....	46
1.1.1 A Rede Vascular do Linfoepitélio e as Vênulas de Endotélio Alto.....	52
1.2 Pólipos Tonsilares.....	52
1.3 A Matriz Extracelular.....	56
1.3.1 Colágenos.....	57
1.3.2 Elastina.....	59
1.3.3 Glicosaminoglicanas e Proteoglicanos.....	59
1.3.4 Glicoproteínas Estruturais.....	59
1.3.5 Membrana Basal.....	62
1.3.6 Fibrogênese.....	62
2. OBJETIVOS	65
2.1. Objetivo Geral.....	67
2.2. Objetivos Específicos.....	67
3. MATERIAL E MÉTODOS	69
3.1 Desenho e Tamanho Amostral.....	71
3.2 Seleção dos Sujeitos.....	71
3.3 Imuno-histoquímica.....	72
3.4 Avaliação da Densidade Microvascular (DMV) e da Área Microvascular (AMV) pelo CD34 e D2-40.....	76
3.5 Quantificação da Expressão de Colágenos I, III e IV, Fibronectina e Tenascina-C e da Quantidade de Miofibroblastos, Fibroblastos e Vênulas do Endotélio Alto.....	76
3.6 Análise Estatística.....	76

4. RESULTADOS.....	79
4.1 PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	81
4.1.1 Fibronectina.....	81
4.1.1.1 Tonsilas Controles.....	81
4.1.1.2 Pólipos Linfóides.....	84
4.1.1.3 Pólipos Não Linfóides.....	85
4.1.1.4 Lesões Polipóides Sem Denominação Específica.....	86
4.1.2 Tenascina.....	88
4.1.2.1 Tonsilas Controles.....	88
4.1.2.2 Pólipos Linfóides.....	90
4.1.2.3 Pólipos Não Linfóides.....	92
4.1.2.4 Lesões Polipóides Sem Denominação Específica.....	94
4.1.3 Colágeno I.....	94
4.1.3.1 Tonsilas Controles.....	94
4.1.3.2 Pólipos Linfóides.....	96
4.1.3.3 Pólipos Não Linfóides.....	98
4.1.3.4 Lesões Polipóides Sem Denominação Específica.....	99
4.1.4 Colágeno III.....	99
4.1.4.1 Tonsilas Controles.....	99
4.1.4.2 Pólipos Linfóides.....	101
4.1.4.3 Pólipos Não Linfóides.....	103
4.1.4.4 Lesões Polipóides Sem Denominação Específica.....	103
4.1.5 Colágeno IV.....	104
4.1.5.1 Tonsilas Controles.....	104
4.1.5.2 Pólipos Linfóides.....	106
4.1.5.3 Pólipos Não Linfóides.....	107
4.1.5.4 Lesões Polipóides Sem Denominação Específica.....	107
4.2 COMPOSIÇÃO CELULAR DO ESTROMA.....	108

4.2.1 Tonsilas Controles.....	108
4.2.2 Pólipos Linfóides.....	109
4.2.3 Pólipos Não Linfóides.....	111
4.2.4 Lesões Polipóides Sem Denominação Específica.....	112
4.3 ESTRUTURA VASCULAR SANGUÍNEA (VASOS CD34 POSITIVOS E VASOS CD105 POSITIVOS) E LINFÁTICA (VASOS D2-40 POSITIVOS).....	112
4.3.1 Tonsilas Controles.....	112
4.3.2 Pólipos Linfóides.....	115
4.3.3 Pólipos Não Linfóides.....	119
4.3.4 Lesões Polipóides Sem Denominação Específica.....	122
5. DISCUSSÃO.....	123
5.1 Estrutura Vascular dos Pólipos.....	125
5.1.1 Vasos Linfáticos.....	125
5.1.2 Vasos Sanguíneos e as Vênulas de Endotélio Alto.....	126
5.2 A Matriz Extracelular dos Pólipos.....	129
6. CONCLUSÕES.....	135
7. REFERÊNCIAS.....	139
8. APÊNDICES.....	147

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA



As tonsilas são órgãos linfoepiteliais com funções imunológicas complexas, nos quais podem se originar uma variedade de lesões tumorais, a maioria de natureza neoplásica. Entre os tumores malignos, o carcinoma de células escamosas e os linfomas são as lesões mais comuns, enquanto que o papiloma escamoso representa cerca de 80% das benignas **(1)**. Em contrapartida, as lesões tumorais não neoplásicas tonsilares são muito raras e constituídas, em sua grande maioria, pelos pólipos. Embora os pólipos tonsilares necessitem remoção cirúrgica, pelos sintomas que causam ou pela necessidade de se identificar a natureza da lesão, eles não são abordados na maioria dos livros textos de patologia cirúrgica. Conseqüentemente, o conhecimento sobre pólipos tonsilares advém de relatos de casos e de raros estudos sistemáticos, o que tem propiciado numerosas denominações para, possivelmente, uma mesma entidade **(2-23)**.

Em relação à patogênese, muitos autores consideram que os pólipos tonsilares sejam de natureza hamartomatosa e, portanto, representariam crescimento exagerado e desorganizado de tecidos tonsilares, com predomínio de vasos linfáticos na maioria deles **(3, 21)**. Entretanto, também, tem sido aventada a possibilidade do pólipo tonsilar ser resultado de hiperplasia inflamatória crônica, causando obstrução linfática irreversível e linfangectasia secundária **(12)**. Estas duas hipóteses foram baseadas em estudos histológicos ou imunoistoquímicos, nos quais o componente vascular dos pólipos não foi completamente explorado **(12, 14, 19)**. O sistema vascular das tonsilas é complexo e contém estruturas altamente especializadas envolvidas na entrada de linfócitos para o parênquima tonsilar. Portanto, o quanto a estrutura vascular dos pólipos assemelha-se à da tonsila palatina é, ainda, uma questão a ser investigada.

Outro aspecto pouco explorado nos pólipos é o tecido conjuntivo que faz parte de sua composição. Os tecidos conjuntivos contem diversos componentes, com estruturas e funções variadas **(24)**. Enquanto alguns componentes são muito comuns, outros, tais como a tenascina e os miofibroblastos, são principalmente

associados ao processo de remodelação de tecidos (25, 26). Remodelação de tecidos é um fenômeno interessante de investigar nos pólipos tonsilares, visto que hiperplasia inflamatória é uma das patogêneses propostas para essas lesões (2). Além disso, os pólipos tonsilares, por serem lesões exofíticas, são propícios a traumatismo e, portanto, propensos à remodelação.

Neste contexto, com a finalidade de aprofundar o conhecimento sobre as estruturas estrômato-vasculares dos pólipos tonsilares e fornecer informações sobre a natureza destas lesões, delineamos esse estudo morfométrico e imunoistoquímico usando uma série de marcadores para diferentes tipos de endotélio e proteínas da matriz extracelular.

1.1. Aspectos embriológicos, anatômicos, morfológicos e imunológicos das tonsilas palatinas

As tonsilas palatinas são duas massas de tecido linfóide localizadas a cada lado da orofaringe. Esta posição estratégica na entrada do trato aerodigestivo, implica no papel das tonsilas como órgãos linfóides secundários, ao iniciar respostas imunes contra vários antígenos, que entram no corpo através da orofaringe e da nasofaringe. Esta característica as torna órgãos importantes na resposta a processos imunológicos, tanto humoral quanto celular (27).

Anatomicamente, cada tonsila está alojada na fossa tonsilar, limitada pelos arcos palatoglosso e palatofaríngeo e pela língua. O suprimento vascular arterial é proveniente dos ramos tonsilar e palatino ascendentes da artéria facial, do ramo dorsal da artéria lingual e do ramo palatino da artéria maxilar (28). As artérias

penetram nas tonsilas, preferencialmente, em seu pólo inferior (27). Quanto à *drenagem venosa*, após as veias tonsilares penetrarem no músculo constritor faríngeo superior, desembocam na veia palatina externa, veia faríngea e/ou veia facial. Os *vasos linfáticos eferentes*, a partir das tonsilas palatinas, penetram no músculo constritor faríngeo superior e na fáscia bucofaríngea e passam entre o músculo estilohióideo e a veia jugular interna para alcançar os linfonodos cervicais jugulodigástricos (28) e submandibulares (27). A *inervação* das tonsilas palatinas é derivada do gânglio ptérigopalatino (esfenopalatino), via nervos palatinos menores e nervo glossofaríngeo (28).

Os processos imunológicos, tanto humoral quanto celular são iniciados nos micro-compartimentos especializados das tonsilas palatinas: o epitélio da cripta ou linfoepitélio, o centro germinativo folicular com a zona do manto e a área interfolicular (29), também denominada de extrafolicular (27).

O epitélio da cripta é uma forma modificada do epitélio estratificado pavimentoso que reveste o resto da orofaringe, incluindo a superfície externa da tonsila, denominando-se, neste local, de **epitélio reticulado ou linfoepitélio**, por apresentar a co-existência de linfócitos e células epiteliais, além da descontinuidade da membrana basal (27). Este epitélio tonsilar, que tem papel importante na iniciação das respostas imunes, não é uniforme, contém trechos de epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado e trechos de epitélio reticulado “sponge-like”. O grau de reticulação das células epiteliais e a infiltração de células não epiteliais são variáveis. Os trechos de epitélio reticulado estão associados com a interrupção da membrana basal e apresentam numerosos pequenos vasos sanguíneos (30). Cada tonsila palatina contém de 10 a 30 criptas (27), sendo que ramificações do epitélio provenientes destas se estendem pela espessura do órgão, aumentando a sua superfície acima de 295 cm², em adição aos 45 cm² do epitélio que recobre a superfície da orofaringe (31). O conteúdo das criptas é composto, principalmente, por saliva e debris celulares (**figuras 1 e 2**). As principais funções propostas para o epitélio reticulado são: **a)** prover um ambiente favorável para o

íntimo contato entre células efectoras das respostas imunes; **b)** facilitar o transporte direto de antígenos; **c)** síntese de componente secretório continuamente; **d)** conter um “pool” de imunoglobulinas. Desta forma, o revestimento de epitélio reticulado das criptas tonsilares, representa um compartimento especializado importante nas funções imunológicas das tonsilas palatinas **(30)**.

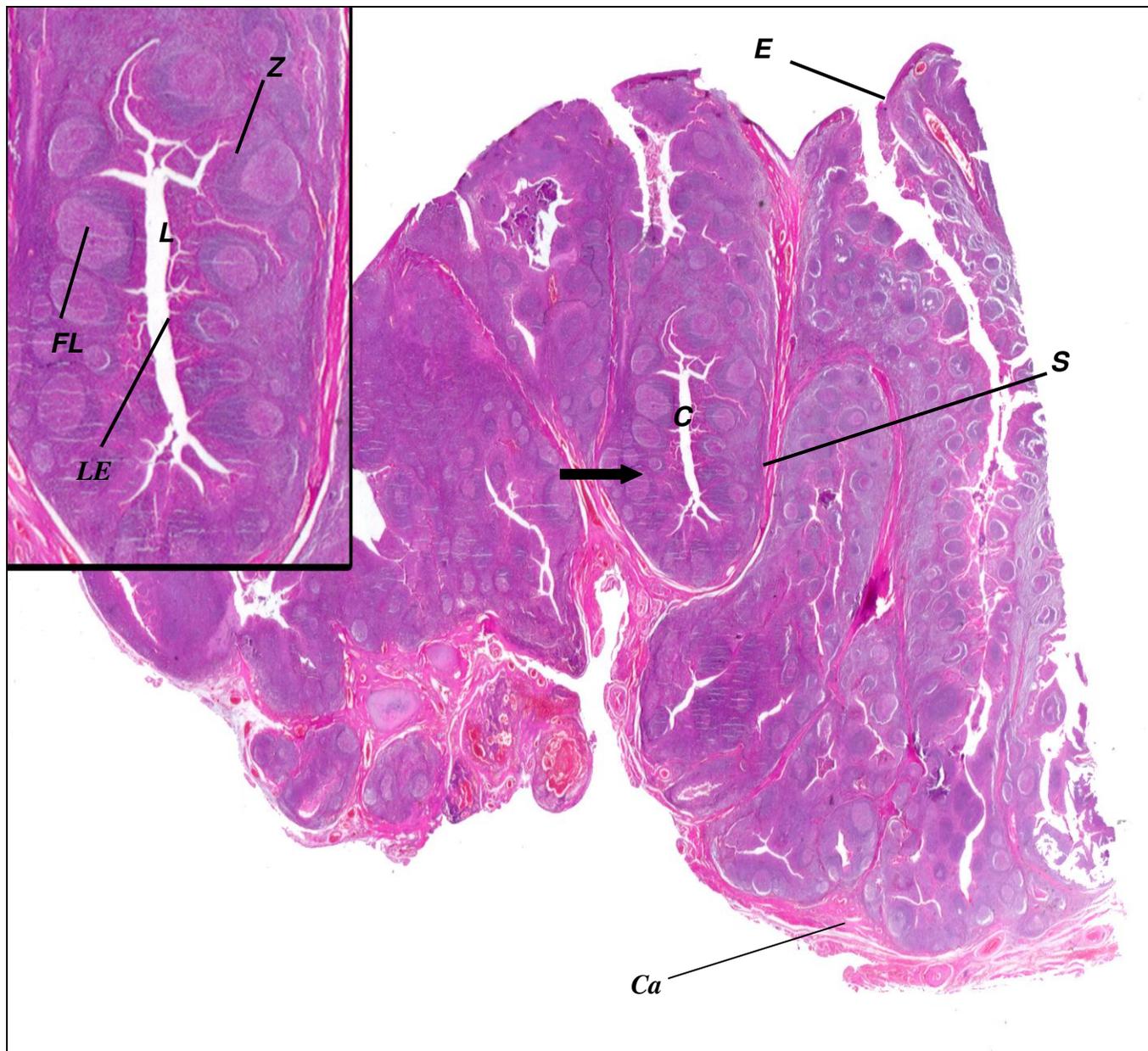


Figura 1: Tonsila Palatina Normal. As imagens correspondem à lâmina digitalizada, contendo corte histológico de tonsila, corada pela hematoxilina-eosina. Observe a arquitetura tonsilar na imagem maior: **S**- septos tonsilares, **C**- cripta tonsilar (**seta**), **Ca**- segmento de cápsula tonsilar, **E**- epitélio superficial. Detalhe de uma cripta na figura menor, acima e à esquerda: **LE**- linfoepitélio, **Z**- zona do manto, **FL**- folículo linfóide, **L**- luz da cripta.

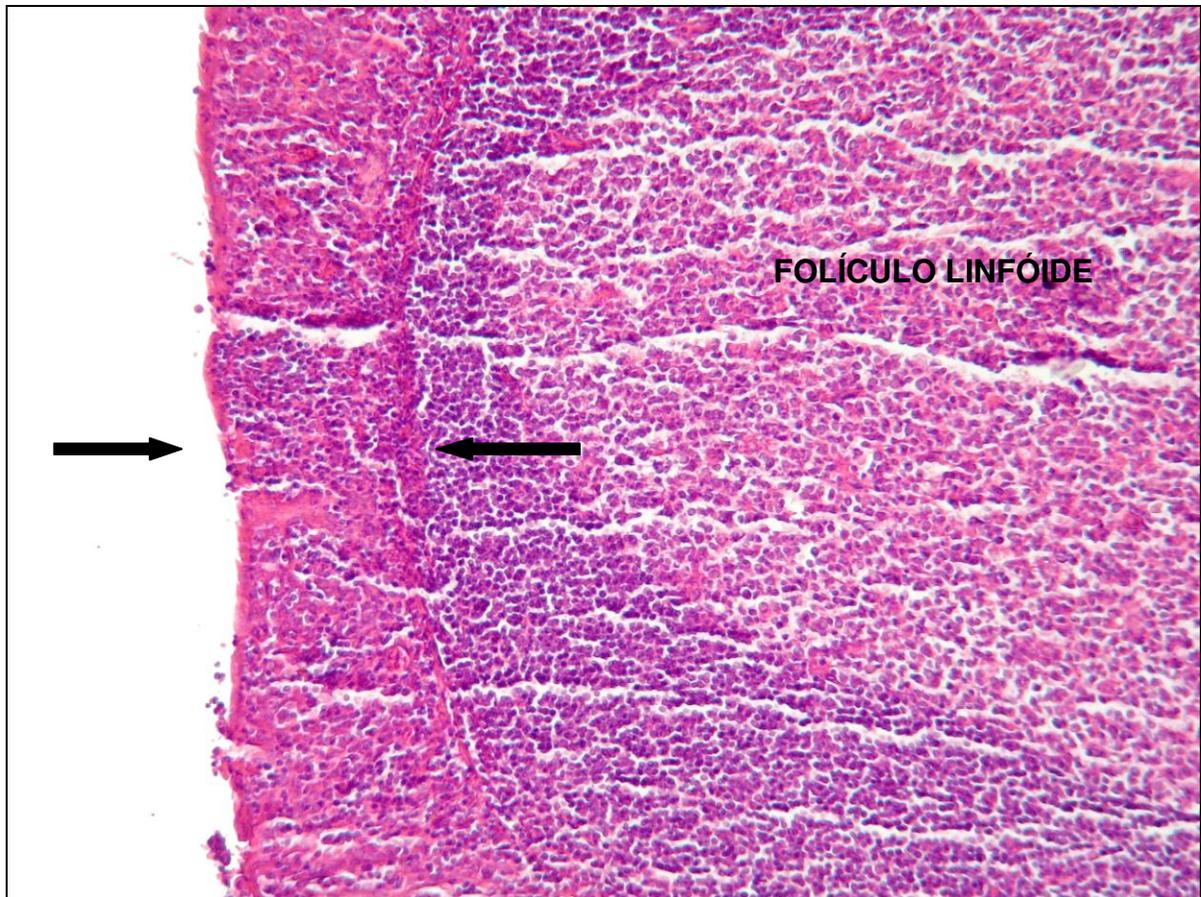


Figura 2: Tonsila Palatina Normal. Observe o corte histológico corado pela hematoxilina-eosina, destacando o linfoepitélio (**entre setas**) e parte de um folículo linfóide subjacente (objetiva 40X), referentes à cripta da figura 1.

O tecido linfóide formando folículos, em geral, com centros germinativos cujas regiões centrais, do mesmo modo que nos folículos linfóides do baço e dos linfonodos, são áreas ricas em linfócitos B (**32**). Os folículos linfóides das tonsilas palatinas são redondos ou elípticos e podem ser vistos exatamente abaixo do epitélio (**figuras 1 e 2**). São sítios de maturação e diferenciação de linfócitos B, bem como de ativação dos linfócitos T. Os folículos linfóides secundários contêm centros germinativos e são compostos por uma zona negra, com grande número de centroblastos, por uma zona branca apresentando, predominantemente, centrócitos e por uma zona do manto mostrando células B virgens (“Naive”) (**figura 3**).

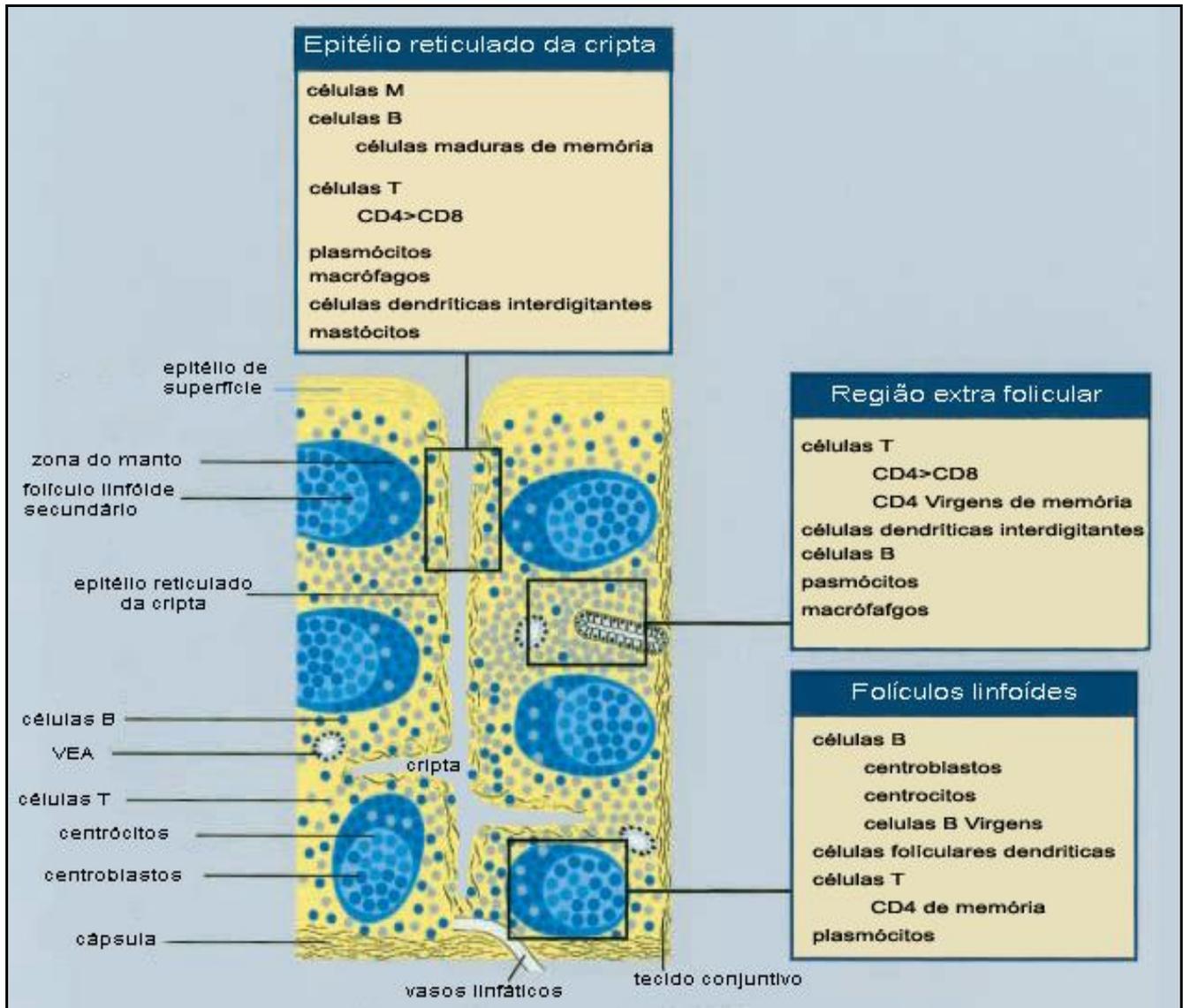


Figura 3: Composição celular dos diferentes compartimentos das tonsilas palatinas. Fonte: Nave et al. (27)

Além dos linfócitos T e B, existem nos folículos linfóides, as células foliculares dendríticas (27).

A região extrafolicular contém células T primariamente com linfócitos T auxiliares (“T helper”) fenótipo CD4+, células dendríticas interdigitantes, macrófagos e vênulas do endotélio alto, que são essenciais para a saída de linfócitos T e B do

sangue para as tonsilas.

1.1.1 A Rede Vascular do Linfoepitélio e as Vênulas de Endotélio

Alto:

No interior do linfoepitélio existe uma rede de vasos sanguíneos, na qual os capilares são arranjados em arcos orientados perpendicularmente à superfície da cripta e, vênulas do endotélio alto (VEA) estão localizadas na borda inferior deste epitélio reticulado (**figura 3**). O rico fluxo sanguíneo intra-epitelial promove aumento da área para interações entre células endoteliais e leucócitos, o transporte de imunoglobulinas e de outras substâncias através das paredes dos vasos (**31**).

As tonsilas não contem linfáticos aferentes e, portanto, a entrada de linfócitos ocorre por transmigração através das vênulas de endotélio alto. O extravasamento de linfócitos do sangue para as tonsilas palatinas, através das vênulas de endotélio alto e o seu retorno através dos vasos linfáticos, é essencial para a competência imunológica destes órgãos. Várias moléculas de adesão, como por exemplo, selectina-L e ICAM-1, citocinas e quimiocinas são essenciais para a entrada dos linfócitos nas tonsilas, mas pouco se sabe sobre os fatores que regulam o trânsito dos linfócitos entre os micro-compartimentos dos órgãos linfóides (**27**).

1.2 PÓLIPOS TONSILARES

Os pólipos tonsilares apresentam em sua constituição morfológica, tecidos fibrosos, linfóides e vasculares, formando um grupo pouco conhecido que, dependendo da quantidade relativa das partes constituintes, têm recebido diferentes denominações tais como pólipos fibrosos linfangiectásicos (**12**), pólipos linfangiomatosos (**14, 18, 21, 23**), linfangiomas (**6, 8**), linfangioma polipóide (**13, 15**), pólipos fibrosos (**14**), pólipos fibrolipomatosos linfangiectásicos (**20**), fibroma (**2, 5, 17**) ou simplesmente, em relatos mais antigos de casos como pólipos benignos tonsilares e amigdalianos (**3, 4, 7, 9**). Também existem relatos de pólipos

denominados hamartomatosos por apresentarem em sua constituição morfológica, um revestimento epitelial escamoso não ceratinizado, infiltrado linfóide, estroma fibroso **(11, 16)**, gordura, vasos sanguíneos ou linfáticos **(10, 20)**.

Os pólipos tonsilares ocorrem numa faixa etária ampla, desde a infância até a idade avançada, com média de apresentação de 25,2 anos **(19)**. Geralmente a lesão é unilateral, varia de tamanho de 0,5 cm a 3,8 cm (média de 1,6 cm) e são descritos como polipóides, pediculados ou sésseis. Clinicamente os pacientes podem ser assintomáticos ou apresentam disfagia, tosse, dificuldade para deglutição ou episódios de tonsilites.

Em contraste aos pólipos tonsilares, que são lesões únicas, a Hiperplasia Linfóide Papilífera, também denominada de Hipertrofia Papilomatosa, Hipertrofia Papilífera, Hipertrofia Tumor Símile, Tumor Papiloma Símile, Hipertrofia Não Usual, Tonsilite Proliferativa e Hiperplasia Papilífera caracteriza-se por múltiplas projeções papilíferas na superfície tonsilar e são, geralmente, bilaterais **(33)**. É uma condição rara, que acomete predominantemente o sexo feminino, numa faixa etária variando de 2 a 45 anos de idade. Foi descrita, primeiramente, por Roberts em 1896, como Papiloma da Tonsila **(33)**. A etiologia é desconhecida, porém estimulação inflamatória de repetição, influências hormonais, neoplasia e herança autossômica dominante têm sido arroladas como possíveis fatores etiológicos para a Hiperplasia Linfóide Papilífera **(33, 34, 35)**. Esta condição tem sido mais comumente relatada na população asiática, com somente um caso reportado, até o momento, no Brasil **(33)**. Neste caso (um paciente feminino de 16 anos) foram identificadas duas lesões papilomatosas bilaterais que, à macroscopia, mediam cerca de 3,5 x 2,0 X 1,5 cm. O aspecto microscópico era o de projeções papilíferas, compostas por um eixo conjuntivo vascular, com hiperplasia linfóide folicular marcante. O acompanhamento clínico da paciente não revelou recorrência local, não foi possível determinar se outro membro da família também foi afetado e nem foi evidenciada anormalidade hormonal, que pudesse contribuir para o aparecimento da lesão.

Na literatura, os estudos sobre os pólipos tonsilares são, na maioria, relatos de casos (**tabela 1**), exceto por duas publicações, nas quais foram estudados um grupo maior de pólipos. A maior série foi descrita por Kardon et al. (**19**), que avaliaram 26 pólipos tonsilares denominados de linfangiomatosos. Embora Kardon et al. (**19**) tenham denominado estes pólipos de linfangiomatosos, morfológicamente os componentes estromais eram mais proeminentes que os vasos linfáticos na maioria dos casos, sendo que em 69% deles a fibrose estromal foi classificada como proeminente. O componente vascular era representado por vasos linfáticos dilatados, e outros positivos para CD31 e / ou CD 34 e a parede continha tecido muscular positivo para actina músculo liso. Recentemente, **Barreto et al. (22)**, descreveram a segunda maior série de pólipos tonsilares denominados linfóides, por serem constituídos predominantemente por tecido linfóide. Neste estudo, foram analisadas 16 tonsilas palatinas controles e 6 pólipos caracterizados, microscopicamente, por folículos linfóides proeminentes, com centros germinativos e criptas revestidas por linfoepitélio, além de uma pequena quantidade de tecido fibroso no eixo da lesão. Nestes pólipos, o padrão arquitetural e as distribuições de linfócitos B (CD20+) e T (CD45RO+) e de vasos (sanguíneos, CD34+ e linfáticos, D2-40+), foram muito semelhantes aos das tonsilas controles. Baseado no fato que os constituintes proliferados nestes pólipos (tecido fibroso, linfócitos e vasos) são os mesmos encontrados na tonsila, embora dispostos num padrão mais complexo, **Barreto et al. (22)**, assim como Heffner, (**14**) Abu Shara et al. (**16**) e Kardon et al. (**19**), sugerem que estas lesões sejam hamartomatosas ou remanescentes bronquiogênicos (**11**) e não tumores verdadeiros, podendo ocasionalmente tornar-se grandes e causar sintomas obstrutivos. Nestes casos é suposto que o tamanho do pólipo tenha relação com a sua duração. Em contraposição, outros autores consideram como hipótese mais provável que o pólipo tonsilar seja resultado de hiperplasia inflamatória crônica, que causa obstrução irreversível dos vasos linfáticos, com conseqüente congestão e formação da lesão, cujos constituintes celulares e estromais, são comparáveis aos da tonsila palatina (**12**).

Tabela 1: Pólipos tonsilares descritos na literatura inglesa.

Autor	n	Ano	Idade (anos)	Sexo	Clínica	Diagnóstico
Goris (19)	1	1910	NI	M	Disfagia e dispnéia	Linfangioma cavernoso
Menzel (36)	1	1919	NI	NI	Tonsilite aguda	Linfangioma
New e Childrey (37)	1	1931	44	M	NI	Pólipo fibromixomatoso
Hara (2)	1	1933	7 1/2	F	Achado ao exame clínico	Fibroma
Evans (3)	1	1939	13	F	Assintomático, descoberto acidentalmente	Pólipo benigno
Hanckel (4)	1	1943	38	M	Tosse	Pólipo bilateral
McKibben (5)	1	1958	27	M	Assintomático	Fibroma benigno
Harrison (6)	1	1960	27	F	Odinofagia, escarro sanguinolento	Linfangioma
Ash (38)	1	1962	20	M	Frequente odinofagia	Hamartoma
Lake (7)	1	1962	30	F	Massa na garganta	Descritivo (não classificado)
Visvanathan (8)	1	1971	31	M	Disfagia para sólidos	Linfangioma pediculado
Araújo (19)	1	1977	18	M	Tonsilite aguda, massa	Linfangioma
Hyams (39)	4	1978	NI	NI	NI	Pólipo linfóide
Enomoto (34)	1	1980	5	F	Sensação de obstrução na garganta	Hipertrofia papilífera
Gerberi (9)	1	1982	26	M	Sensação de corpo estranho e irritação na garganta	Pólipo benigno
Carrilo-Farga (35)	1	1983	9	F	Massa, dispnéia	Hiperplasia linfóide papilífera
Vardhan (10)	1	1985	22	M	Disfagia, dificuldades para respirar	Hamartoma
Hiraide (12)	1	1985	60	M	Sensação de corpo estranho	Pólipo fibroso linfangiectásico
Pyun (40)	1	1985	13	F	Massa na garganta, dificuldade para falar	Pólipo linfóide papilífero
Al Samarrae (13)	1	1985	35	F	Massa	Linfangioma polipóide
			35	M	Odinofagia, sensação de corpo estranho	Linfangioma polipóide
Nayak (17)	1	1985	35	F	Salivação excessiva, sensação de engasgo	Fibroma
Kasznicza (15)	1	1991	3	M	Otite média serosa bilateral	Linfangioma polipóide
Shara KA (16)	1	1991	41	M	Disfagia, massa na garganta	Pólipo hamartomatoso
Lupovitch (11)	1	1993	30	F	Achado endoscópico	Pólipo benigno hamartomatoso
Roth (18)	1	1996	14	M	Tonsilites recorrentes, massa	Pólipo linfangiomatoso
Kardon (19)	26	2000	3 a 63	M	disfagia, dor e sensação	Pólipos linfangiomatosos
			13	F	de massa na garganta	
Sah (20)	1	2000	23	M	Massa	Pólipo linfangiomatoso linfangiectásico
Hockstein (21)	1	2002	18	F	Roncos, respiração bucal, apnéia, halitose	Linfangioma
Dias (33)	1	2003	16	F	Odinofagia, disfagia, tonsilites de repetição	Hiperplasia linfóide
Barreto (22)	6	2007	4 a 17	M	Massa tonsilar e/ou	Pólipos linfóides
			2 a 56	F	disfagia	
Chen (23)	1	2009	4	F	Obstrução respiratória	Pólipo linfangiomatoso bilateral

M = masculino; F = feminino; NI = não informado.

¹⁹ Goris e ¹⁹ Araújo *apud* Kardon DE, Wenig BM, Heffner DK, Thompson LD. Tonsillar lymphangiomatous polyps: a clinicopathologic series of 26 cases. Mod Pathol. 2000 Oct;13(10):1128-33.

Como demonstrado na **tabela 1**, os diagnósticos dos pólipos tonsilares são variados, refletindo sua morfologia diversa. Dos 31 autores, 13 descreveram que os vasos linfáticos eram exuberantes e dilatados, de tal modo que denominaram a lesão de linfangioma, linfangiomatosa e linfangiectásica. O segundo componente mais freqüente descrito dos pólipos tonsilares, na literatura, é o tecido conjuntivo que, levou a alguns autores a denominá-lo de fibroso.

1.3 A Matriz Extracelular

O tecido conjuntivo tem como função, a sustentação de várias estruturas do corpo, ocupando o espaço entre elas. A maior parte dos tecidos conjuntivos deriva do mesênquima, uma camada germinativa do embrião, situada entre o ectoderma e o endoderma. Do mesênquima derivado do mesoderma, originam-se os sistemas muscular, circulatório, linfático, urogenital e esquelético. No adulto, os tecidos conjuntivos especializados incluem os tendões, ossos e cartilagens. Uma característica comum a todos os tecidos conjuntivos é consistirem de Matriz Extracelular (ME), na qual as células do tecido conjuntivo estão distribuídas **(41)**.

A matriz extracelular (ME) é uma rede de macromoléculas que circunda as células, sendo considerada um componente substancial do ambiente celular **(42)**. Dentre os constituintes da ME referenciam-se vários tipos de macromoléculas (proteoglicanas e glicosaminoglicanas), além de proteínas fibrosas como o colágeno e a elastina, ambas com função estrutural e, as glicoproteínas adesivas como a laminina, a tenascina e a fibronectina **(43)**. Interações e ligações entre as células e os componentes da ME são realizadas por receptores específicos denominados integrinas, que são proteínas transmembranas com um domínio extracelular, que se prende aos componentes da ME e um citoplasmático, ligado à porção do citoesqueleto constituída por actina **(43)**. De acordo com a concentração dos componentes da matriz, esta poderá ter variações morfológicas e funcionais, constituindo os diferentes tipos de tecido conjuntivo, ou seja, fibroso, ósseo, elástico

e cartilaginosa. Também, a matriz pode se condensar abaixo de revestimentos endoteliais, mesoteliais e epiteliais, formando a membrana basal **(44)** ou lâmina basal, interposta entre as células e o tecido conjuntivo sobre o qual se apóiam **(45)**.

A ME tem como funções mais importantes: **a)** o preenchimento dos espaços não ocupados pelas células; **b)** o fornecimento à resistência à compressão; **c)** funcionar com pontos de fixação a diversos tipos celulares, para que elas possam se ancorar; **d)** funcionar como um veículo por onde migram as células, quando estas se deslocam no organismo; **e)** funcionar como um meio através do qual chegam às células, as substâncias indutoras provenientes de outras células **(45)**.

Os componentes da ME são classificados em fluidos e fibrosos. Os fluidos compreendem as glicosaminoglicanas e proteoglicanas, já os fibrosos, em proteínas adesivas (laminina e fibronectina) e proteínas estruturais (colágeno) **(45)**.

1.3.1 Colágenos

As fibras colágenas correspondem às proteínas estruturais mais importantes da ME **(45)**, que são sintetizadas por fibroblastos e células afins, cuja estrutura molecular é formada por cadeias alfas, dispostas e arranjadas em tripla hélice, caracterizadas por apresentar seqüências repetidas de três aminoácidos: glicina-X-Y. Os dois últimos são representados frequentemente por prolina e lisina, que costumam estar hidroxilados, dando uma resistência maior e força ao colágeno, ao permitir a formação de pontes estabilizadoras entre suas moléculas (“cross-linkings”) **(44)**. O tropocolágeno é a unidade básica da fibrila, que é uma molécula protéica fibrosa de cerca de 300nm de comprimento e 1,5 nm de espessura **(45)**.

Os colágenos podem ser classificados em dezoito isótopos, devido a ligeiras diferenças encontradas nas subunidades de cadeias peptídicas, as quais

acarretam uma heterogeneidade aos colágenos **(44)**. Os isótopos de colágeno são denominados através de algarismos romanos, sendo os mais abundantes, os tipos I, III e IV. O tipo II se limita ao tecido cartilaginoso. Os colágenos tipos I, II, V e XI são denominados colágenos fibrilares, pois formam fibras estriadas, à microscopia eletrônica. Estão presentes em quase todos os órgãos. Já os colágenos IX, XII e XV são denominados como colágenos associados às fibrilas, distinguindo-se dos colágenos fibrilares por apresentarem cadeias laterais de proteoglicanas presentes nas suas moléculas. Outros colágenos, tais como os de cadeias pequenas (VIII) e longas (X, VII), têm como característica funcionar como filamentos de ancoragem matriz/célula e matriz/matriz **(44)**.

O **colágeno tipo I** é o mais abundante e o predominante nas áreas de tecido conjuntivo denso, tais como tendões, osso, córnea, cápsula dos órgãos, na dentina e no derma. Sua estrutura molecular é composta por duas cadeias alfa (α), a $\alpha 1(I)$ e $\alpha 2(I)$ **(44)**.

Os **colágenos II, IX e XI** são encontrados na cartilagem **(45)**.

O **colágeno tipo III** é composto por três cadeias idênticas $\alpha 3$ e está localizado predominantemente no tecido conjuntivo frouxo, como o da aréola **(44)**, na derme fetal, nas paredes dos vasos sanguíneos, no rim, e nos tecidos hematopoiéticos e linfático **(45)**.

Os **colágenos tipos IV e VII** são denominados como não fibrilares e predominam na constituição da membrana basal **(44)** e no tecido conjuntivo subjacente **(45)**; O colágeno IV é formado por dois tipos de cadeias alfa: $\alpha 1(IV)$ e $\alpha 2(IV)$ **(44)**.

1.3.2 Elastina

A elastina é uma proteína insolúvel, amorfa, hidrofóbica, não glicosilada, que constitui o elemento fundamental das fibras elásticas. Existem pontes de lisina (“cross-linkings”) nas suas moléculas, dando maior elasticidade. Está amplamente distribuída na ME de vários órgãos, por exemplo, na camada média das artérias elásticas como a aorta. Sua degradação se deve à ação de metaloproteinases da ME (44).

1.3.3 Glicosaminoglicanas e Proteoglicanas

As glicosaminoglicanas compõem a fase líquida da ME e representam um tipo especial de polissacarídeo que pode estar associado entre si, ou a proteínas, formando as proteoglicanas (45), que constituem um meio gelatinoso e viscoso, onde estão localizados os outros componentes da matriz (44). As glicosaminoglicanas são carboidratos constituídos por uma seqüência de unidades dissacarídicas repetidas e alternadas, onde um dos monossacarídeos possui um grupo amina (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina) (45). Toda glicosaminoglicana está associada à proteína, exceto a heparina e o ácido hialurônico (44).

As proteoglicanas podem ter variações na sua proteína axial e nas suas glicosaminoglicanas e, por conseqüência, no seu tamanho e peso molecular. Por serem sulfatadas, adquirem uma carga elétrica negativa forte, que atrai íons como o sódio, que acarreta hidratação destas moléculas, tornando-se porosas e permitindo circulação de líquido intersticial (44).

1.3.4 Glicoproteínas Estruturais

As glicoproteínas são de fundamental importância nas conexões

intercelulares, entre célula/matriz e entre matriz/matriz, na facilitação da movimentação e estímulos para a proliferação (44).

Dentre as glicoproteínas, as mais importantes são:

a) **Laminina**: trata-se de uma glicoproteína fibrosa de aproximadamente 900 kDa, constituída por três subunidades peptídicas unidas por pontes dissulfeto. É abundante nas membranas basais onde se acha associada ao colágeno IV e a uma proteoglicana rica em heparansulfato (45), sendo sintetizada por células epiteliais de revestimento. Estruturas que apresentam membrana basal e que estão sendo formadas, apresentam elevado nível de concentração de laminina, como por exemplo, nas neoplasias e nos tecidos em regeneração (44).

b) **Fibronectina**: trata-se de um glicoproteína fibrosa de 440 kDa, constituída por duas subunidades polipeptídicas, que encontram-se ligadas entre si por pontes dissulfeto (45). Encontra-se no plasma, onde tem função de opsonina, na superfície celular, exercendo o papel de molécula de adesão e, também, como fibrilas da matriz. É produzidas por diversos tipos celulares, tais como macrófagos e fibroblastos (47) e é considerada como a maior glicoproteína da ME, envolvida adesão célula/matriz e célula/célula, na migração celular, na morfogênese, na diferenciação e na transformação observadas na oncogênese (42).

c) **Tenascinas**: são uma grande família de cinco glicoproteínas presentes em vertebrados, denominadas Tenascina-C, -X, -R, Y e -W, sendo que cada uma tem um padrão específico de expressão, que distingue uma da outra (25, 26). As Tenascinas são capazes de modular a função das integrinas na adesão celular, na migração e no crescimento celular (46). Estão presentes em diferentes tipos de tecidos conjuntivos, contribuindo na estrutura da ME e na sobrevivência das células imersas nesta matriz. Cada tecido conjuntivo expressa diferentes membros ou grupos de tenascinas, sendo que a regulação desta expressão é distinta para cada gene (41).

A **Tenascina-C** consiste de seis subunidades idênticas, constituídas de um número variável de domínios repetidos. Tais subunidades são dissulfetos ligados com domínio N-terminal, resultando em seis grandes moléculas, melhor vistas à microscopia eletrônica (46). Durante a embriogênese, a Tenascina-C é abundante nos tecidos mesenquimais, mas sua distribuição nos tecidos maduros é restrita (48). Na pele normal, a Tenascina-C tem expressão restrita ao tecido conjuntivo ao redor da junção dermo-epidérmica, dos folículos pilosos e das glândulas écrinas, além da íntima de grandes vasos sanguíneos (46). A expressão de Tenascina-C é regulada por mecanismo de estresse (41, 46), sendo notavelmente encontrada em tecidos submetidos a elevado grau de tensão mecânica, como os tendões, ligamentos e paredes arteriais (46) e, também, em condições patológicas, tais como: no tecido conjuntivo ao redor de tumores, em feridas e em tecidos inflamados, onde pode regular a morfologia, crescimento e migração celular, através de diversas formas de sinalização intracelular envolvendo fatores de crescimento e citocinas (41, 46). Diferente de outras proteínas da ME, as Tenascinas promovem, somente, fraca adesão celular e não ativam a migração celular, por isso, tem sido denominadas de proteínas da ME anti-adesivas ou repelentes (25), ou ainda, proteínas da ME moduladoras da adesão, por serem capazes de modular a adesão celular à fibronectina. Dentre as demais Tenascinas, é a Tenascina-C a mais estudada, pois é um marcador útil nas fases iniciais da remodelação do tecido conjuntivo, associado a muitas doenças (46).

O segundo membro da família é a **Tenascina-R**, uma molécula trimérica, exclusivamente expressa no Sistema Nervoso Central, onde é sintetizada por oligodentrócitos, embora, a Tenascina-C seja o maior constituinte da ME cerebral, durante o desenvolvimento, persistindo no adulto apenas em algumas regiões (46).

À semelhança às Tenascinas -C e -R, a **Tenascina-X** tem pouca atividade como proteína de adesão celular, sendo o seu maior sítio de expressão, os tecidos conjuntivos do coração, do músculo esquelético e a derme cutânea (46).

A **Tenascina Y** é altamente expressa no tecido conjuntivo do músculo esquelético. Na pele, a Tenascina-Y mostra um padrão de expressão complementar à tenascina-C, enquanto que no pulmão e nos rins, as expressões se sobrepõem **(48)**.

A **Tenascina-W** é o membro do grupo mais recentemente descrito **(46)** e ainda pouco estudada.

1.3.5 Membrana Basal

A membrana basal é uma condensação da ME que constitui a interface entre o tecido conjuntivo e as estruturas epiteliais, musculares, nervosas e vasculares. À microscopia eletrônica, é trilaminar por apresentar uma lâmina densa de 20µm a 300µm de espessura na parte central, ladeada por duas lâminas raras. Sua porção central é constituída por uma lâmina de colágeno tipo IV, envolta por proteoglicanas. Já a porção clara superior, próxima ao epitélio, contém laminina e entactina, ao passo que a porção inferior, contém fibronectina, entactina e perlecan **(44)**.

As lâminas basais são constituídas, fundamentalmente, por colágeno IV, laminina, fibronectina, entactina e perlecan **(44)**, entretanto, os dois primeiros constituem os maiores componentes intrínsecos das membranas basais e estão envolvidos na adesão celular entre a membrana basal e a ME. Também, formam uma barreira protetora contra uma infiltração inicial de células malignas nos tecidos **(43)**.

1.3.6 FIBROGÊNESE

O protocolágeno é o colágeno sob a forma solúvel, sintetizado pelos fibroblastos, células contituíntes da ME. Esta solubilidade é devida à presença de

telopectídeos não helicoidais encontrados nas cadeias alfa. Os colágenos tornam-se insolúveis graças à ação de uma telopeptidase e perdem a suas cadeias terminais. Há a tendência das moléculas de colágeno se agregarem logo em seguida, formando as protofibrilas e, a reunião de protofibrilas, se formam as fibrilas, que uma vez agrupadas formam as fibras. Estas se arranjam, inicialmente, em padrão frouxo e ao acaso, de permeio a proteoglicanas. Há a tendência de substituição por um padrão denso, no qual as fibras colágenas se tornam orientadas em feixes paralelos. A estabilização do colágeno ocorre devido a ligações intra e intermoleculares entre as cadeias alfa e pela ação das cadeias de lisina, processo denominado de “cross-linking” (reticulação), que conduz ao amadurecimento do colágeno.

Mensageiros químicos denominados citocinas são secretados por vários tipos celulares como, por exemplo, macrófagos e linfócitos T, e são capazes de levar à proliferação celular do tecido conjuntivo. Desta forma, no processo inflamatório crônico costuma-se observar a formação excessiva de matriz extracelular, principalmente quando há o envolvimento de um mecanismo imunológico mediado por células. Dentre as citocinas fibrogênicas se destacam o fator de transformação de crescimento beta (TGF-beta), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), a interleucina 1 (IL-1) e o fator de estimulação fibroblástica **(44)**.

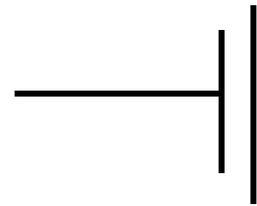
Existem vários fatores que regulam a síntese colágena, ou seja, fatores denominados inibidores e potencializadores. Dentre os primeiros, são conhecidos o fator de necrose tumoral beta (TNF-beta) e os interferons alfa e gama **(44)**.

Em contrapartida, as mesmas células que secretam a ME são capazes de secretar outras enzimas que levam à degradação da mesma **(44)**, desta forma, os componentes da ME são renovados constantemente **(49)**. Tais enzimas são denominadas metaloproteinases, que são: as colagenases (cliva moléculas de colágeno), a estromalisina (cliva as proteoglicanas) e a elastase (cliva a elastina)

(44). De forma semelhante ao processo de síntese da ME, a degradação da mesma depende de estímulos moleculares provenientes de vários tipos celulares, como os fibroblastos e macrófagos. A modulação é decorrente de vários fatores, já que se observa a ação de enzimas ativadoras e inibidoras da ação de collagenases **(44)**. A atividade das metaloproteinases está sob controle de citocinas, de produtos secretados por fagócitos, de inibidores enzimáticos naturais do plasma e inibidores naturais produzidos nos tecidos. As metaloproteinases são sintetizadas por células fagocitárias e por todas as células do tecido conjuntivo, porém não estão estabelecidas quais são as células que produzem seus inibidores naturais nos tecidos **(49)**.

Nos tecidos, a remodelação e a reabsorção da matriz ocorrem simultaneamente. A fibrose tecidual é evidenciada quando há um predomínio da síntese da ME. Por outro lado, pode haver o desaparecimento parcial ou total da fibrose se o processo de degradação da matriz predominar, principalmente nos processos inflamatórios crônicos nos quais a fibrose desaparece com a diminuição do infiltrado inflamatório. Sabe-se que quanto mais recente é a fibrose, mais rápida será a sua degradação, ao passo que nas fibroses mais antigas, a degradação é mais lenta, o que talvez decorra da intensificação dos “cross-linkings”. Aparentemente, a reabsorção mais rápida na fibrose recente independe do tipo de colágeno **(45)**. A renovação normal da matriz extracelular depende, desta forma, do equilíbrio entre sua produção e a ação de metaloproteinases e dos seus inibidores naturais **(52)**.

2.OBJETIVOS



2.1. Objetivo Geral

Descrever os pólipos tonsilares através de estudos histológico e imunoistoquímico, com a finalidade de fornecer informações sobre a composição estrômato-vascular e a natureza destas lesões.

2.2. Objetivos Específicos

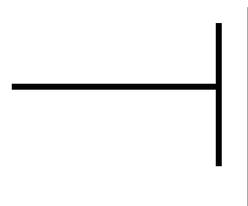
a) Avaliar a composição do estroma dos pólipos tonsilares através de: exame histológico e colorações imunoistoquímicas para proteínas da matriz extracelular e para o componente celular (fibroblastos e miofibroblastos).

b) Avaliar quantidade e área ocupada pelos vasos sanguíneos e linfáticos, nos pólipos tonsilares.

c) Avaliar a quantidade de vasos neoformados e a quantidade de vênulas de endotélio alto, nos pólipos tonsilares.

d) Comparar a constituição estrômato-vascular dos pólipos tonsilares com a da tonsila palatina.

3. MATERIAL E MÉTODOS



3.1 Desenho e Tamanho Amostral

Este é um estudo descritivo que foi realizado em 19 lesões tonsilares e 26 tonsilas palatinas cirurgicamente removidas por motivo não neoplásico, todos pertencentes e selecionados do arquivo de Patologia Cirúrgica do Departamento de Anatomia Patológica (UNICAMP), no período de 1983 a 2008. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Universidade (número 493/2003) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos pacientes não foi necessário, por se tratar de material emblocado em parafina. Inicialmente, foram analisadas as características morfológicas, pela coloração com a hematoxilina-eosina, das 19 lesões tonsilares e 26 tonsilas palatinas controles. Pelo fato das lesões tonsilares apresentarem diferenças marcantes quanto à complexidade arquitetural, estas foram separadas em dois grupos: os **pólipos** e as **lesões polipóides sem denominação específica**. Denominamos de **pólipos** aquelas que apresentavam composição complexa, contendo eixo conjuntivo e pedículo, enquanto que as **lesões polipóides sem denominação específica** eram geralmente pequenas, sem eixo central e com constituição simples. Estas eram ora formadas por alguns nódulos linfóides de aspecto hiperplásico circundando uma cripta, ora por uma área de estroma alterado na superfície da tonsila. Os pólipos, por sua vez, foram subdivididos, conforme sua constituição histológica em: a) linfóide – quando o tecido linfóide representava mais do que 80% da lesão e b) não linfóide – quando o tecido linfóide correspondia até 80% do pólipo **(22)**.**(lâminas de pólipos e lesões polipóides sem denominação específica, encontram-se digitalizadas- ver apêndices 1, 2 e 3).**

Deste modo, a amostra de 19 lesões tonsilares era composta por: 7 pólipos linfóides, 7 pólipos não linfóides e 5 lesões polipóides.

3.2 Seleção dos Sujeitos

As informações clínicas e demográficas foram coletadas dos prontuários

dos pacientes. O grupo de lesões tonsilares incluiu 13 homens e 6 mulheres e a média de idade era 33,47 anos; o grupo das tonsilas controles continha: 15 homens e 11 mulheres e a média da idade era de 21,84 anos. O tamanho das lesões tonsilares variou de 0,6 cm a 2,4 cm (média de 1,27). **(ver apêndices 4 e 5).**

Os critérios de inclusão foram: **a)** para as lesões tonsilares – ter a informação clínica de formação polipóide em tonsila palatina e material suficiente em parafina para o exame imuno-histoquímico, **b)** para as tonsilas palatinas controles – arquitetura tonsilar conservada e ter material suficiente em parafina para o exame imuno-histoquímico. As tonsilas controles foram selecionadas do arquivo de Patologia Cirúrgica, do Departamento de Anatomia Patológica (UNICAMP) e, todas removidas por motivos não neoplásicos **(dados demográficos e resultados dos exames histopatológicos das lesões tonsilares e das tonsilas palatinas controles- ver apêndices 4 e 5, respectivamente).**

Os critérios de exclusão foram: a) para as lesões tonsilares e tonsilas palatinas – material insuficiente para os exames imuno-histoquímico e, particularmente para as tonsilas – arquitetura tonsilar alterada por doença ou por corte histológico inadequado.

3.3 Imuno-histoquímica

Um bloco de cada caso foi escolhido, dentre as 19 lesões tonsilares e as 26 tonsilas palatinas, para a realização do estudo imuno-histoquímico. Foram utilizados os seguintes anticorpos **(tabela 2)**: CD34 para vasos sanguíneos e vênulas do endotélio alto **(19, 50)**, CD105 para vasos sanguíneos neoformados e vênulas do endotélio alto **(51, 52, 53)**, D2-40 para vasos linfáticos **(52)**, Ki-67 para células endoteliais proliferadas, alfa actina de músculo liso (α -AML) para miofibroblastos, vimentina para fibroblastos e miofibroblastos e, colágenos I, III e IV, fibronectina e tenascina-C, para proteínas da matriz extracelular.

Foi realizada marcação simples utilizando-se o Sistema EnVision (DAKO, Dinamarca) para CD34, CD105, D2-40, α -AML, vimentina, colágenos I, III e IV, fibronectina e tenascina-C. Resumidamente, dos 45 blocos relativos aos casos em estudo, foram obtidos 11 cortes histológicos de 5 μ m de espessura de cada bloco, realizados em micrótomo de parafina, os quais foram estendidos em lâminas de vidro, previamente tratadas com adesivo à base de silano (3- aminopropil-trietoxi-silano) da marca SIGMA, USA (código A-3648) e, deixados em estufa a 110°C, durante 1 hora, para adesão desses à lâmina. Os cortes foram submetidos a desparafinização, colocando as lâminas em estufa a 110°C por 30 minutos e depois, mantidas em 3 banhos de xilol, em temperatura ambiente por 10 minutos cada. A seguir, as lâminas foram colocadas em cinco banhos de álcool, sendo os 3 primeiros absolutos, 1 álcool 80% e 1 álcool 50%, dois minutos em cada, conforme procedimento histotécnico usual, em temperatura ambiente. Em seguida, após lavagem em água corrente por cinco minutos, foi realizado o bloqueio da atividade da peroxidase endógena, através da imersão das lâminas (três banhos de 5 minutos cada) em peróxido de hidrogênio a 3%, à temperatura ambiente. Após a lavagem com água destilada por 5 minutos, seguiu-se a recuperação antigênica, que foi realizada por desnaturação em calor úmido, mediante a incubação dos cortes em solução tampão (pH 6,0), durante 30 minutos a 96°C, exceto para o CD105. Para este anticorpo, a recuperação antigênica foi realizada com pepsina a 0.4% por 30 minutos, a 37°C (tabela 2). Somente os cortes para CD105 foram incubados a 37°C com bloqueador livre de proteína sérica (código x0909, Dako, SA, Dinamarca) por 30 minutos. Posteriormente, para todos os anticorpos, os cortes foram incubados a 37°C por 30 minutos e, depois, “overnight” a 4°C com o anticorpo primário. Em seguida com o Polímero EnVision HRP e Envision+ (código K1491, DAKO, SA, Dinamarca) por 1h a 37°C. Os cortes foram incubados por 5min at 37°C, com 3.3'- tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB), marca DAKO, código K3468 e contracolorados com hematoxilina. Nos controles negativos foram omitidos os anticorpos primários. Foi realizada dupla marcação imunistoquímica (EnVision Double stain, código K1395, Dakopatts S/A, Dinamarca) para Ki67/D2-40. Resumidamente, anti-Ki-67 foi aplicado após a recuperação antigênica a vapor,

durante 30 minutos a 96°C, utilizando-se o tampão Tris-EDTA (pH: 8,9) e incubação “overnight” a 4°C. A detecção foi realizada usando o Polímero EnVision HRP e DAB para visualizar a ligação do primeiro anticorpo. Posteriormente, os cortes foram incubados “overnight” a 4°C com o segundo anticorpo (D2-40). Para completar a segunda imunocoloração foi utilizado como substrato cromógeno, o polímero EnVision ligado a fosfatase alcalina e ao “fast red”, durante 5 minutos a 37°C. Em seguida, lavou-se e contracorou-se com hematoxilina de Mayer, passou-se pela água destilada e montou-se com gelatina de glicerina, para as lâminas de dupla reação. Para as lâminas das demais reações, foram realizadas desidratação com álcool absoluto e diafanização com xilol e foi utilizado o Entellan (marca MERCK-código 1079610100- Alemanha), como meio de montagem.

Tabela 2: Aspectos diferenciais dos anticorpos utilizados no estudo

Anticorpo	Clone	Isotipo	Diluição	Marca	Recuperação antigênica	Polímero
Fibronectina	Policlonal	IgG	1:1700	DAKO*	Pepsina	En Vision anti-mouse/anti-rabbit ¥
Tenascina-C	T2H5	IgG1	1:300	NeoMarkers#	Pepsina	En Vision+ (Plus) anti-mouse §
Colágeno I	Policlonal	IgG	1:75	Biogenesis€	Pepsina	En Vision anti-mouse/anti-rabbit ¥
Colágeno III	4B11.1	IgG1	1:300	Chemicon&	Pepsina	En Vision+ (Plus) anti-mouse §
Colágeno IV	CIV22	IgG1	1:100	DAKO*	Citrato	En Vision+ (Plus) anti-mouse §
α-AML	1A4	IgG2	1:200	DAKO*	Citrato	En Vision+ (Plus) anti-mouse §
CD105 (endoglina)	SN6h	IgG	1:10	DAKO*	Pepsina	En Vision+ (Plus) anti-mouse §
CD34	QBEnd	IgG1	1:50	DAKO*	Citrato	En Vision anti-mouse/anti-rabbit ¥
D2-40	D2-40	IgG1	1:200	DAKO*	Tris-EDTA	En Vision+ (Plus) anti-mouse §
Ki-67	MIB-1	IgG1	1:150	DAKO*	Tris-EDTA	En Vision+ (Plus) anti-mouse §

* Dako Corporation Glostrup, Dinamarca.; ¥ En Vision polymer HRP, código K1491, DAKO, Dinamarca; § En Vision+ HRP, código K4001, DAKO, Dinamarca; € Biogenesis, Poole, UK; & Chemicon, Millipore Corporate, USA; # NeoMarkers, Thermo Scientific, USA.

3.4 Avaliação da Densidade Microvascular (DMV) e da Área Microvascular (AMV) pelo CD34 e D2-40

Em cada pólipo e tonsila controle (tecido linfóide interfolicular) foram escolhidas as áreas mais vascularizadas ao menor aumento (“hotspots”) para a análise quantitativa. Nas áreas “hotspots” foram obtidas três imagens digitais por caso, usando uma câmera CCD adaptada a um microscópio Olympus CX30 (objetiva X40, diâmetro do campo 0.44 mm). Estas imagens foram analisadas com o “software” Imagelab (versão 2.4), que permite segmentação manual das áreas alvos (vasos) (**ver apêndice**). A DMV foi definida como a média dos números de vasos corados pelo CD34 e pelo D2-40. A área vascular total foi definida como a área ocupada pelos vasos por unidade de área do pólipo ou do tecido linfóide interfolicular das tonsilas, isto é, a correspondente a um campo usando uma objetiva de X40- 0.152 mm². A proliferação endotelial linfática foi avaliada pela contagem do número de células endoteliais ki-67 positivas.

3.5 Quantificação da Expressão de Colágenos I, III e IV, Fibronectina e Tenascina-C e da Quantidade de Miofibroblastos, Fibroblastos e Vênulas do Endotélio Alto

A quantidade de vênulas do endotélio alto (detectadas por CD105 ou CD34), fibroblastos vimentina positivos e miofibroblastos (células do tecido conjuntivo com morfologia de fibroblastos e positivas para α -AML) e a extensão da expressão de colágenos I, III e IV, fibronectina e tenascina-C foram graduadas segundo uma escala de 0-3, onde 0 representa ausência de células imunopositivas ou nenhuma imunoeexpressão e 3 o valor máximo.

3.6 Análise Estatística

Na comparação das variáveis números de vasos e porcentagens de área

marcada entre grupos, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), com transformação de Rank, devido a não existência de normalidade dos dados. Quando a diferença foi significativa, realizaram-se testes de comparação múltipla, (teste de Tukey), para identificar as diferenças.

O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, valor de $p \leq 0.05$.

4. *RESULTADOS* —||

4.1 PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR

4.1.1 Fibronectina

4.1.1.1 Tonsilas Controles

Nas tonsilas controles a fibronectina foi encontrada:

a) na matriz extracelular, sendo abundante e fibrilar nos septos fibrosos e na cápsula tonsilar (**figuras 4 e 6**) e focal no conjuntivo abaixo do epitélio da superfície tonsilar e das criptas (**tabela 3**).

b) nos vasos (área subendotelial e parede) de todas as regiões da tonsila, isto é, dos septos tonsilares, do tecido linfóide e do epitélio das criptas. Nos vasos do tecido linfóide, a fibronectina delimitava: **1)** uma rede de calibre fino e estrutura delicada que circundava externamente os folículos linfóides, no pólo oposto ao da cripta tonsilar (**figura 5**), **2)** as vênulas de endotélio alto e **3)** vasos dentro dos folículos linfóides (**figura 5 e 6**). No epitélio das criptas, a fibronectina formava uma camada fina que circundava os delicados capilares, dispostos perpendicularmente à superfície (**figura 7**).

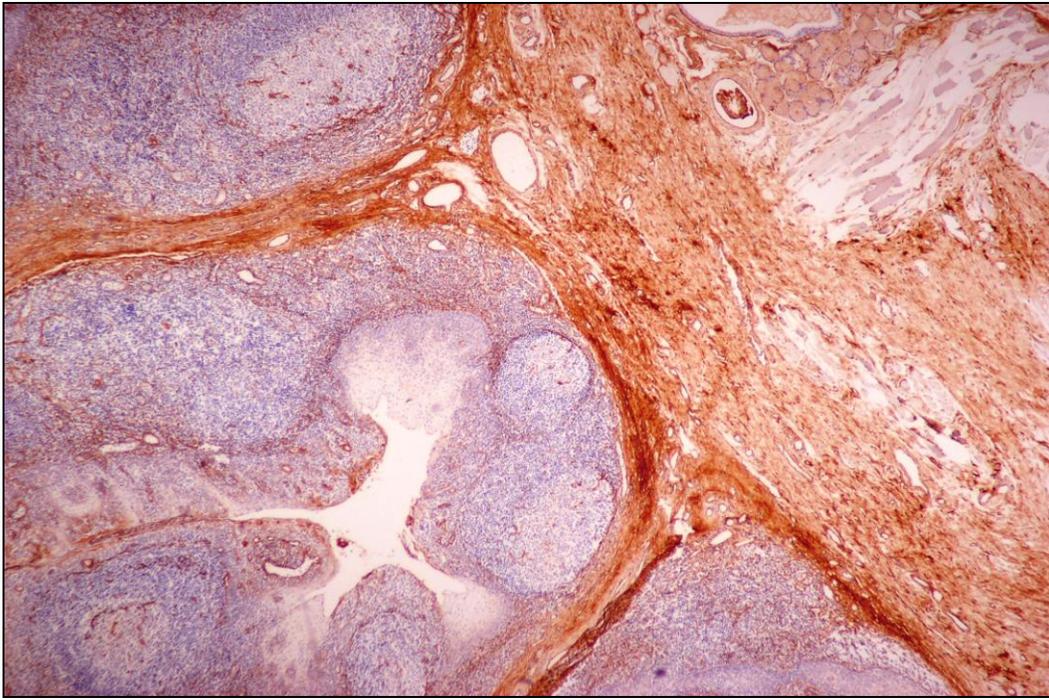


Figura 4: Tonsila Palatina Controle. Expressão do anticorpo fibronectina (marrom) no conjuntivo da cápsula tonsilar. As fibras positivas para fibronectina estão dispostas ordenadamente, formando bandas (imuno-histoquímica- objetiva 10X).

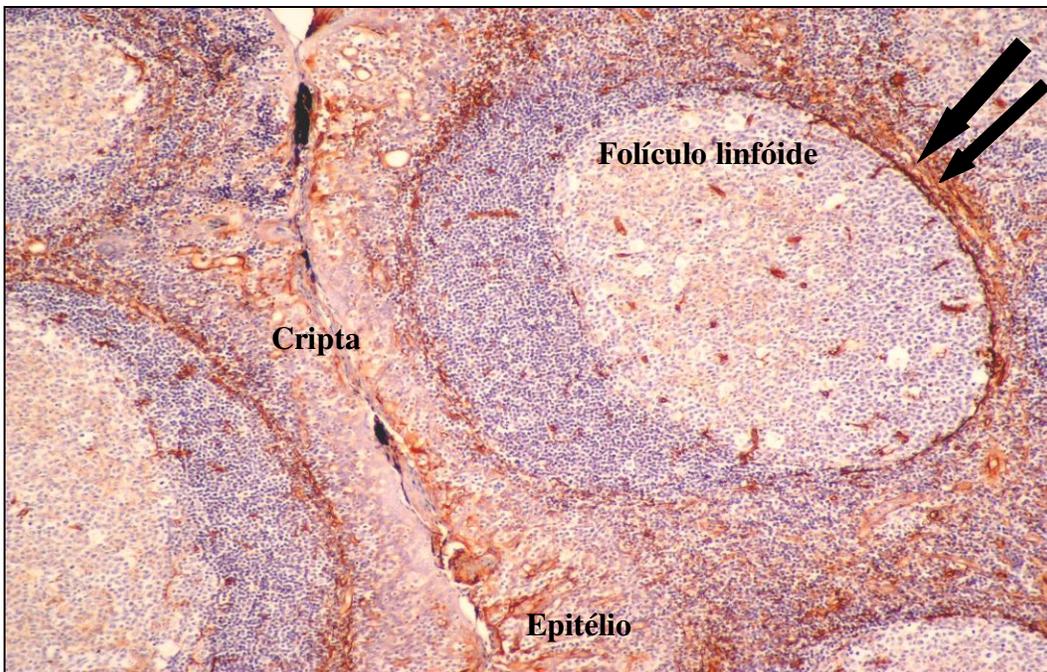


Figura 5: Tonsila Palatina Controle. Expressão do anticorpo fibronectina (marrom) na parede dos vasos do folículo linfóide. Os vasos estão distribuídos regularmente no centro germinativo e formam uma fina rede circundando-o (setas longas) (imuno-histoquímica- objetiva 20X).

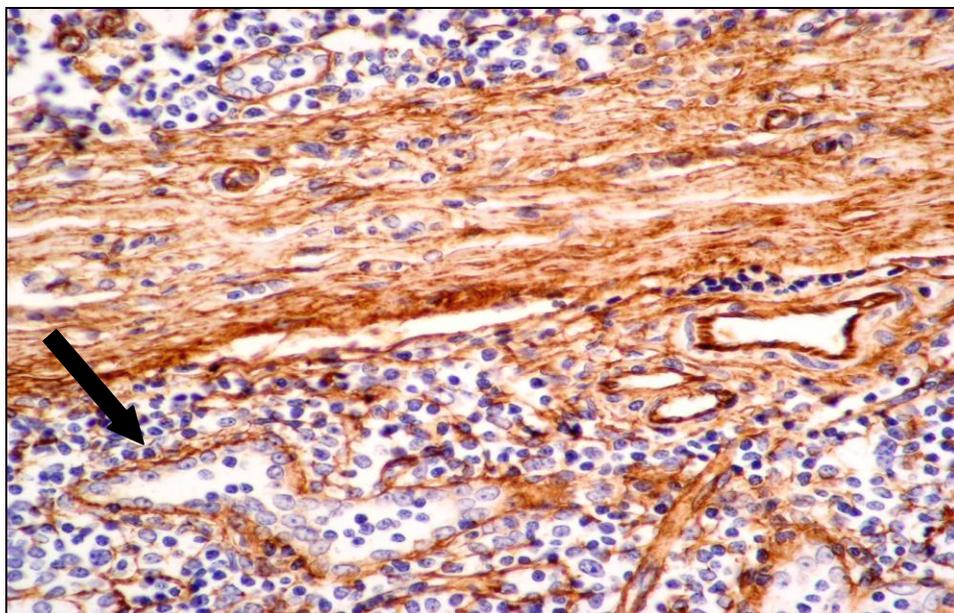


Figura 6: Tonsila Palatina Controle. Expressão de fibronectina (marrom) no conjuntivo dos septos fibrosos e na vênula de endotélio alto no tecido linfóide (seta) (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

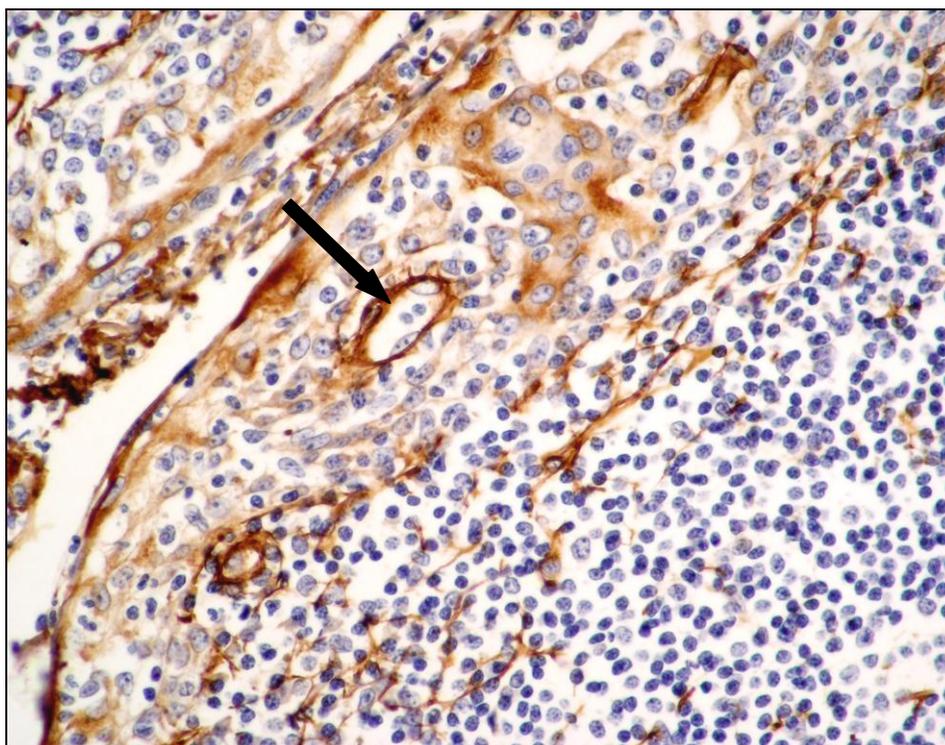


Figura 7: Tonsila Palatina Controle. Expressão de fibronectina na membrana basal das nas vênulas do endotélio alto, que estão em íntimo contato com o linfoepitélio (seta) (imuno-histoquímica- objetiva 40x).

Tabela 3: Depósito de fibronectina na matriz extracelular nas tonsilas controles

Subepitelial						Septos	Cápsula		
Epitélio superficial			Epitélio das criptas				0	+	++/+++
0	+	++/+++	0	+	++/+++	0	+	++/+++	
0%	25%	75%	62,50%	37,50%	0%	0%	6,20%	93,70%	
(0/16)	(4/16)	(12/16)	(10/16)	(6/16)	(0/16)	(0/16)	(1/16)	(15/16)	

4.1.1.2 Pólipos Linfóides

Nos pólipos linfóides, a fibronectina foi detectada na matriz extracelular do eixo fibroso central e abaixo do epitélio superficial em quantidade e padrão semelhantes ao das tonsilas controles (**tabela 4**). Entretanto, a deposição de fibronectina nos vasos apresentou alguns aspectos diferentes. O número de vasos expressando fibronectina, incluindo as vênulas de endotélio alto e aqueles do epitélio das criptas, era menor e com distribuição mais irregular. Neste tipo de pólipo, apesar de haver folículos linfóides, a maioria não apresentava a rede vascular delicada em um dos pólos e os vasos, dentro dos centros germinativos, eram mais irregulares e grosseiros (**figura 8**).

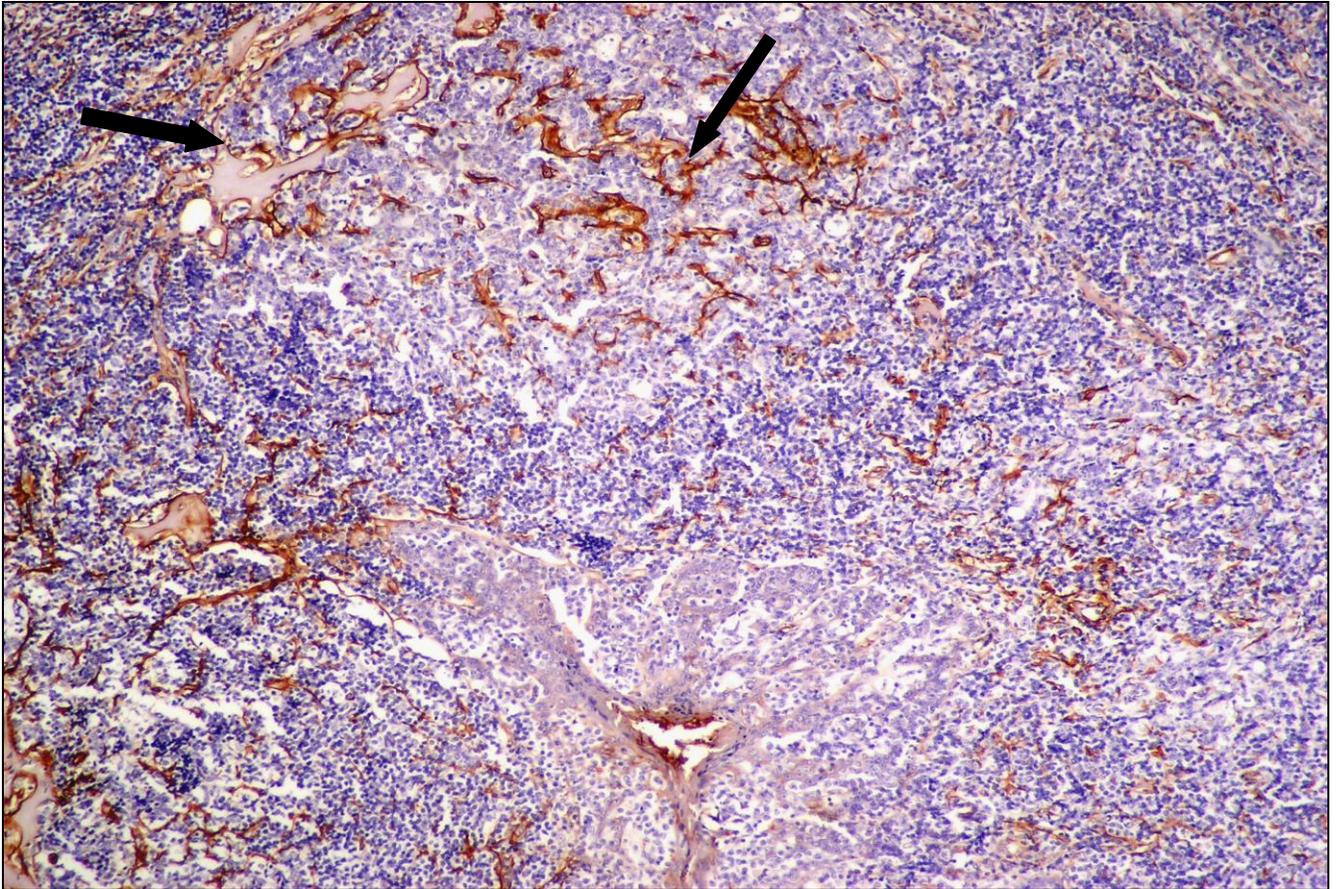


Figura 8: Pólipo Linfóide. Expressão de fibronectina na parede dos vasos no folículo linfóide, delimitado entre setas. Observar a distribuição irregular destes vasos, em comparação com aqueles do folículo linfóide da tonsila controle (**figura 5**) (imuno-histoquímica- objetiva 20X).

4.1.1.3 Pólipos Não Linfóides

Nos pólipos não linfóides, a deposição de fibronectina na matriz extracelular foi leve em todas as regiões da lesão. Os vasos, principalmente os sanguíneos, apresentavam fibronectina na parede, sendo que nos escassos folículos linfóides eram mais numerosos e dispostos de modo irregular (**figura 9**).

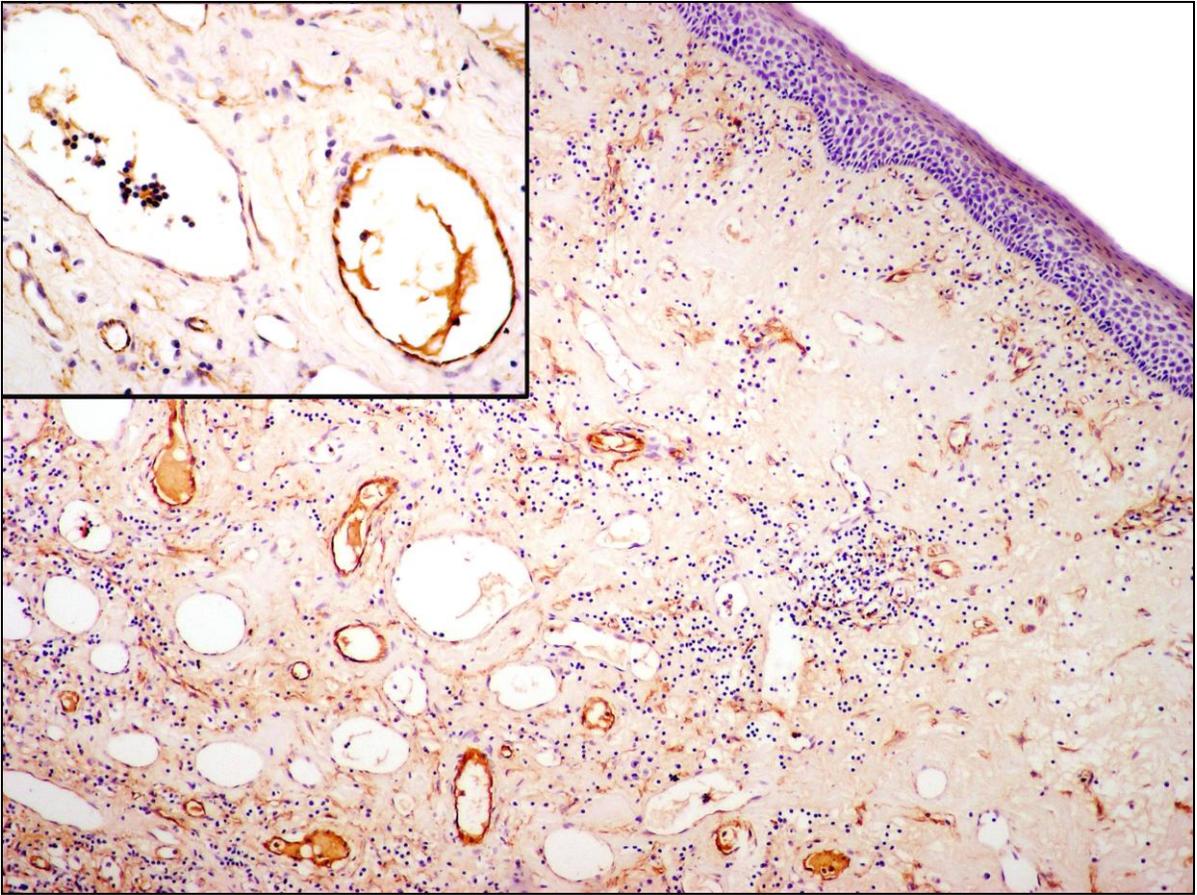


Figura 9: Pólipo Não Linfóide. Expressão de fibronectina na parede dos vasos. Em aumento maior (no canto superior direito) observar a expressão de fibronectina (marrom), na membrana basal do vaso sanguíneo à direita (imuno-histoquímica- objetiva 20X).

4.1.1.4 Lesões Polipóides Sem Denominação Específica

Estas lesões apresentaram aspecto variado, sendo que a maioria mostrou depósito leve de fibronectina na matriz extracelular (**figura 10**).

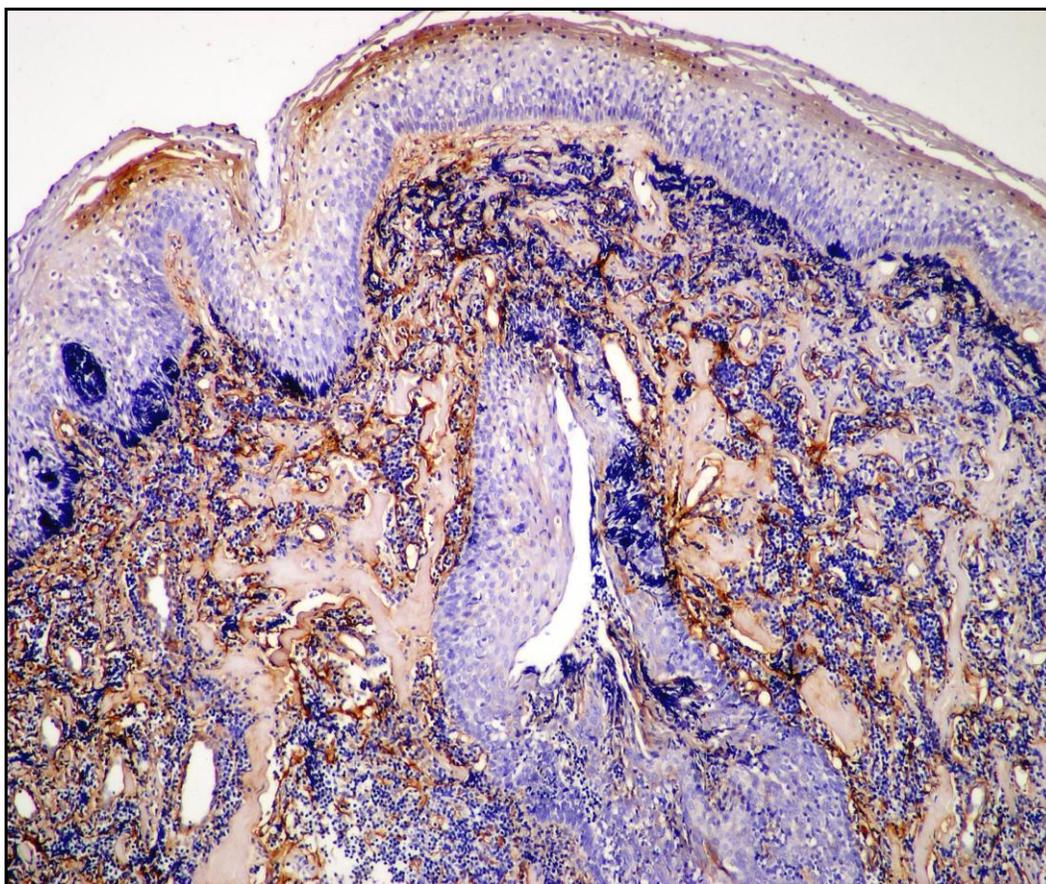


Figura 10: Lesão Polipóide Sem Denominação Específica. Observe a deposição leve de fibronectina (marrom) na matriz extracelular de lesão polipóide tonsilar (imunohistoquímica- objetiva 20X).

Tabela 4: Depósito de fibronectina na matriz extracelular dos pólipos

Categorias	Abaixo do epitélio superficial			Eixo do pólipo		
	0	+	++/+++	0	+	++/+++
Pólipos linfóides	16,6% (1/6)	16,6% (1/6)	66,6% (4/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	100% (6/6)
Pólipos não linfóides	0% (0/6)	10,0% (1/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	100,0%(6/6)	0% (0/6)
LPSDE	0% (0/4)	50% (2/4)	50% (2/4)	0,0% (0/3)	66,6% (2/3)	33,3% (1/3)

LPSDE- lesões polipóides sem denominação específica.

4.1.2 Tenascina

4.1.2.1 Tonsilas Controles

Nas tonsilas controles foram encontrados depósitos focais de tenascina na matriz extracelular localizada na região abaixo do epitélio superficial e das criptas, nos septos e na cápsula. Dentre estes locais, o depósito abaixo do epitélio superficial (**figura 11**) foi o mais freqüente e abundante (**tabela 5**) e geralmente estava situado na região próxima à entrada da cripta tonsilar. Nas criptas, a expressão de tenascina no tecido conjuntivo subepitelial estava freqüentemente associada à perda da reticulação do epitélio (**figura 12**). Nos septos e cápsula, a maioria dos depósitos era leve (**figura 13**). Além destas estruturas, em casos esparsos, foi notada expressão de tenascina na parede de algumas vênulas de endotélio alto e focalmente na escassa matriz extracelular do tecido linfóide não folicular.

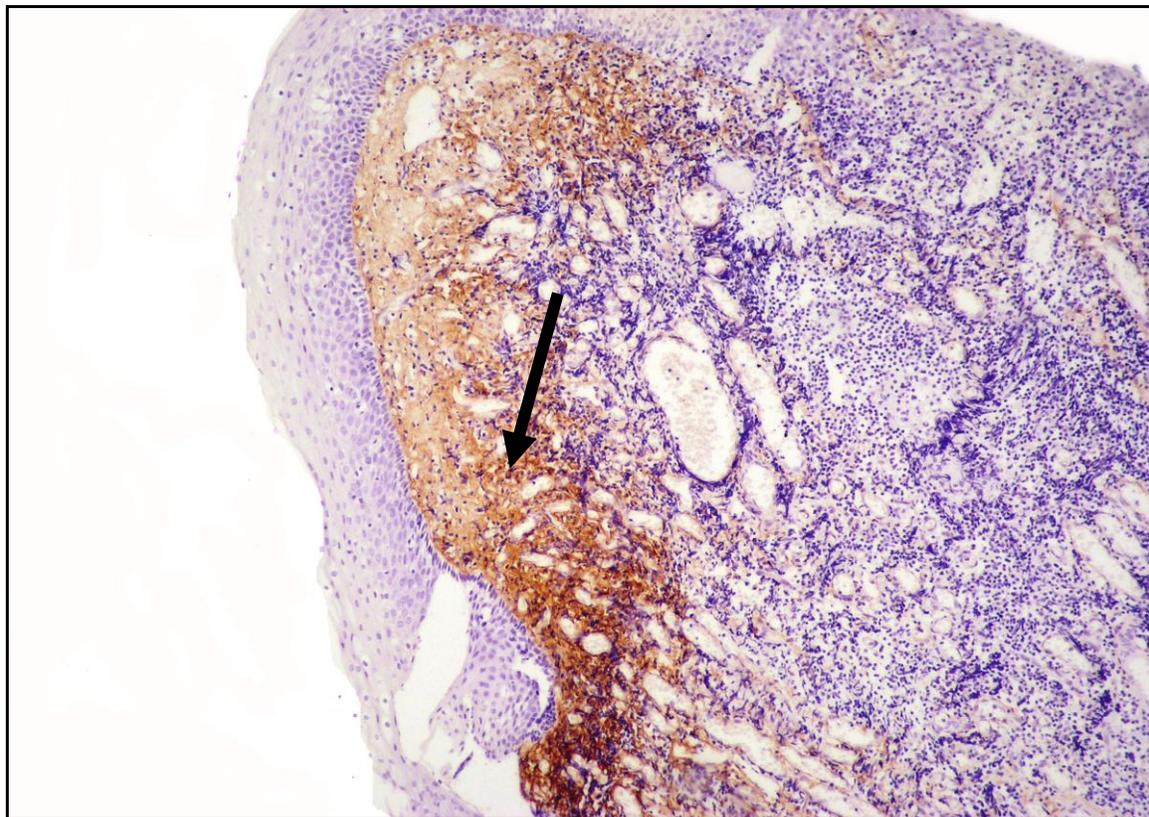


Figura 11: Tonsila Palatina Controle. Observe a expressão de tenascina (marrom) na matriz extracelular abaixo do epitélio superficial (seta) (imuno-histoquímica- objetiva 10X).

Tabela 5: Depósito de tenascina na matriz extracelular das tonsilas controles

Subepitelial			Epitélio das criptas			Septos			Cápsula		
Epitélio	superficial		0	+	++/+++	0	+	++/+++	0	+	++/+++
0	+	++/+++	0	+	++/+++	0	+	++/+++	0	+	++/+++
31,8% (7/22)	22,7% (5/22)	45,4% (10/22)	52,1% (12/23)	39,1% (9/23)	8,6% (2/23)	69,5% (16/23)	30,4% (7/23)	0% (0/23)	47,8% (11/23)	43,4% (10/23)	8,6% (2/23)

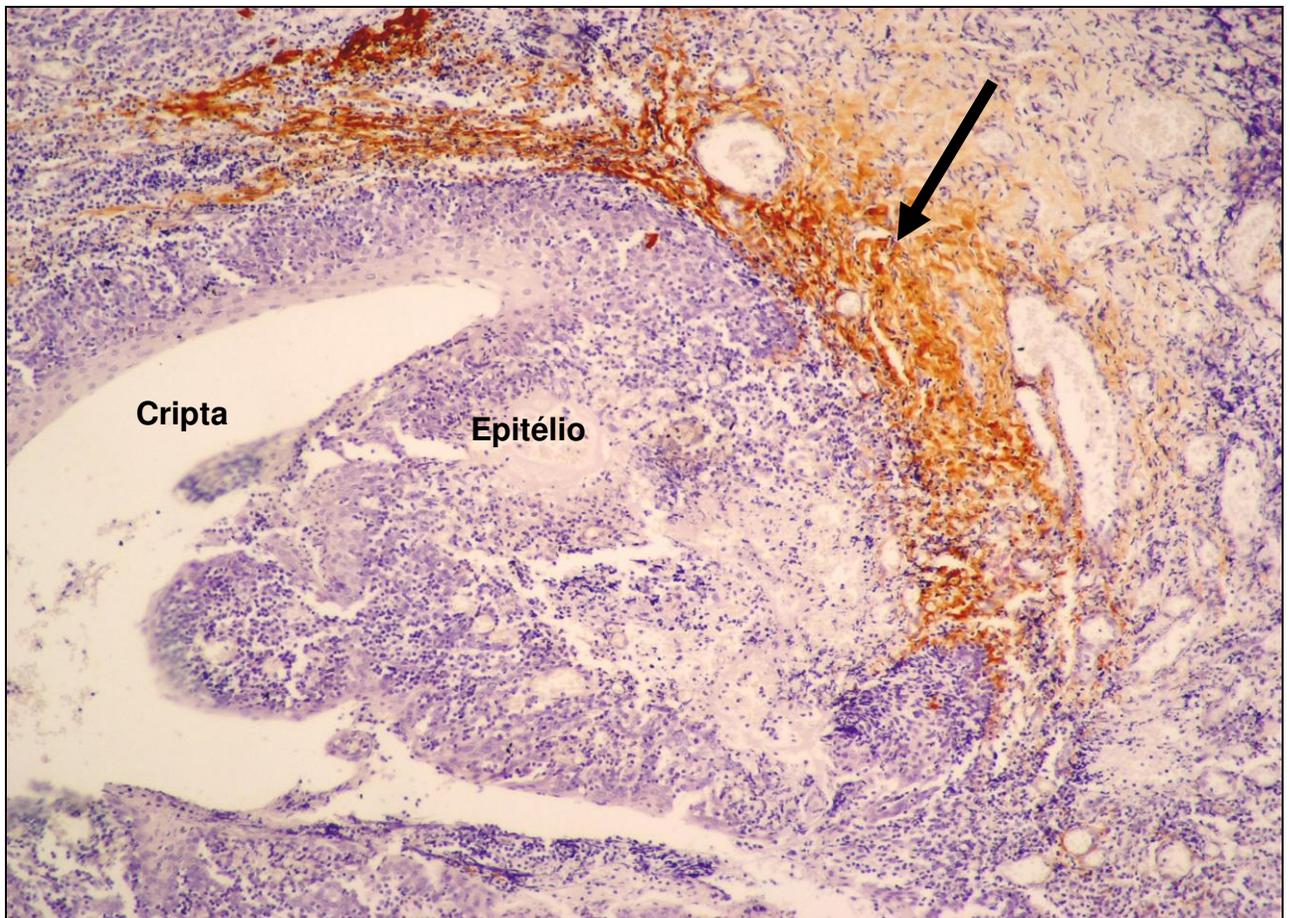


Figura 12: Tonsila Palatina Controle. Note a expressão de tenascina (marrom) na matriz extracelular abaixo do epitélio da cripta tonsilar (seta), que apresenta perda da reticulação (imuno-histoquímica-objetiva 20x).

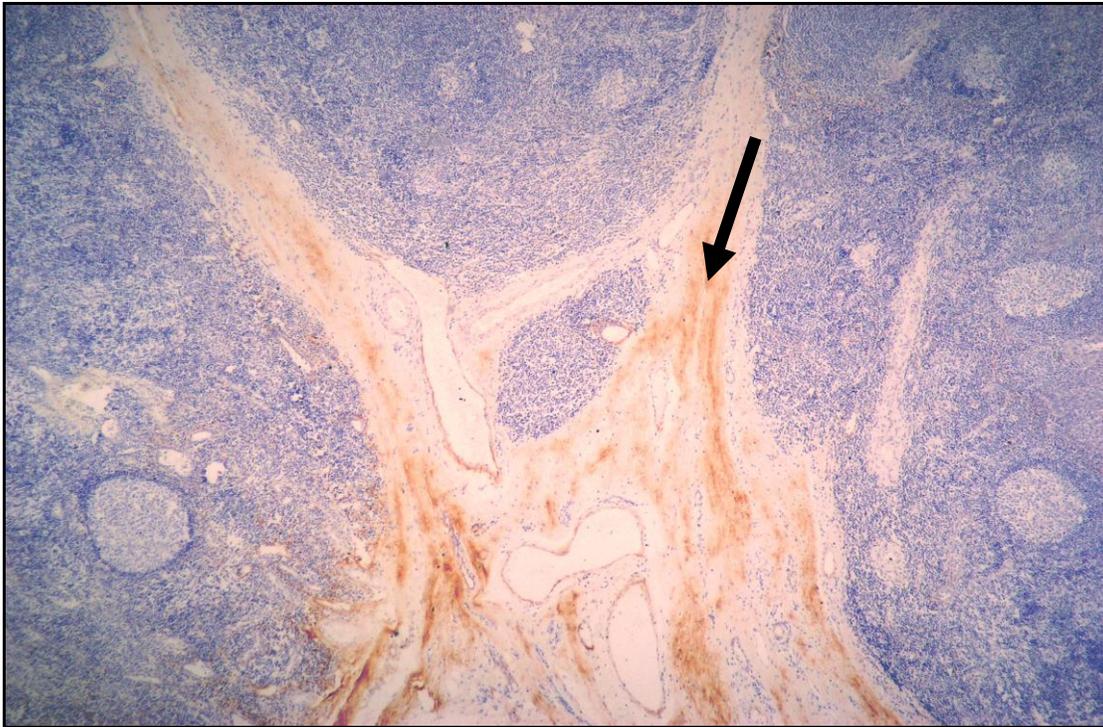


Figura 13: Tonsila Palatina Controle. Observe a expressão focal de tenascina (marrom) no septo tonsilar (seta). Comparar com a forte expressão de fibronectina no conjuntivo da cápsula tonsilar (**figura 3**) (imuno-histoquímica- objetiva 10X).

4.1.2.2 Pólipos Linfóides

Nestes pólipos o padrão de expressão da tenascina foi semelhante ao das tonsilas controles, sendo encontrada, principalmente, formando focos abaixo do epitélio superficial e em trechos no eixo conjuntivo da lesão (**tabela 6**) (**figuras 14 e 15**).

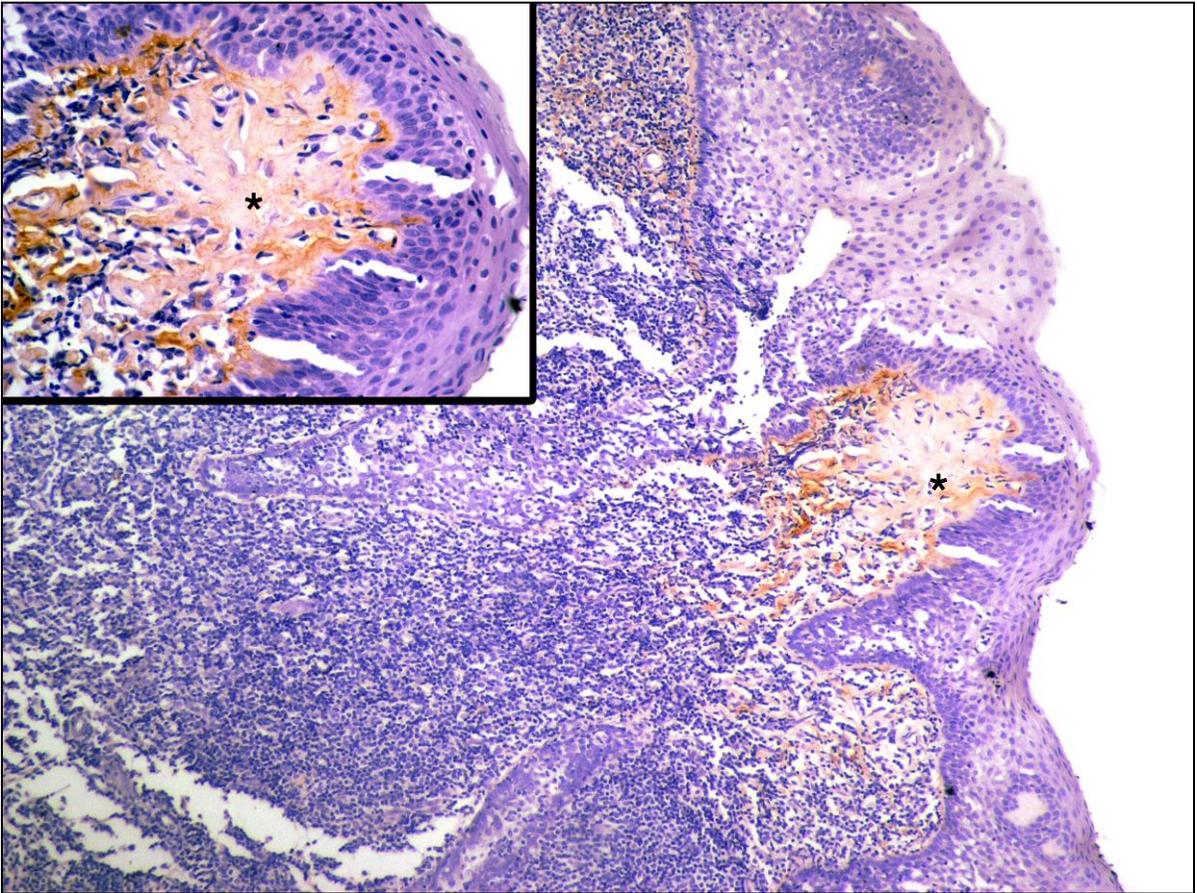


Figura 14: Pólipo Linfóide. Observe a expressão focal de tenascina (marrom) na matriz extracelular, abaixo do epitélio superficial (asterisco) (imuno-histoquímica- objetiva 20X). Note maiores detalhes da expressão, na imagem acima e à esquerda (asterisco) (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

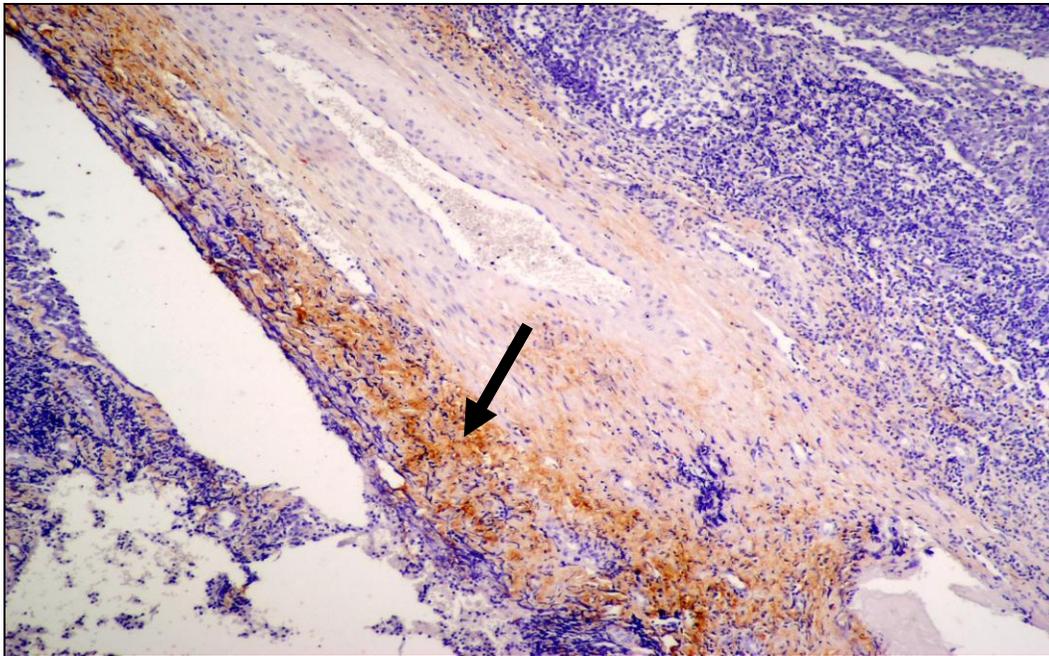


Figura 15: Pólipo Linfóide. Note a expressão focal de tenascina (marrom) no eixo conjuntivo do pólipo linfóide (seta) (imuno-histoquímica- objetiva 20X).

Tabela 6: Depósito de tenascina na matriz extracelular nos pólipos

Categorias	Abaixo do epitélio superficial			Eixo do pólipo		
	0	+	++/+++	0	+	++/+++
Pólipos linfóides	33,3% (2/6)	16,6% (1/6)	50% (3/6)	66,6% (4/6)	16,6% (1/6)	16,6% (1/6)
Pólipos não linfóides	14,2% (1/7)	42,8% (3/7)	42,8% (3/7)	100%	0%	0%
LPSDE	50% (2/4)	50% (2/4)	0% (0)	33,30%	33,30%	33,30%

LPSDE- lesões polipóides sem denominação específica.

4.1.2.3 Pólipos Não Linfóides

A expressão de tenascina na matriz extracelular destes pólipos foi encontrada exclusivamente como depósitos focais leves ou moderados abaixo do epitélio superficial (**figura16**) (**tabela 6**) e em alguns vasos (**figura 17**).

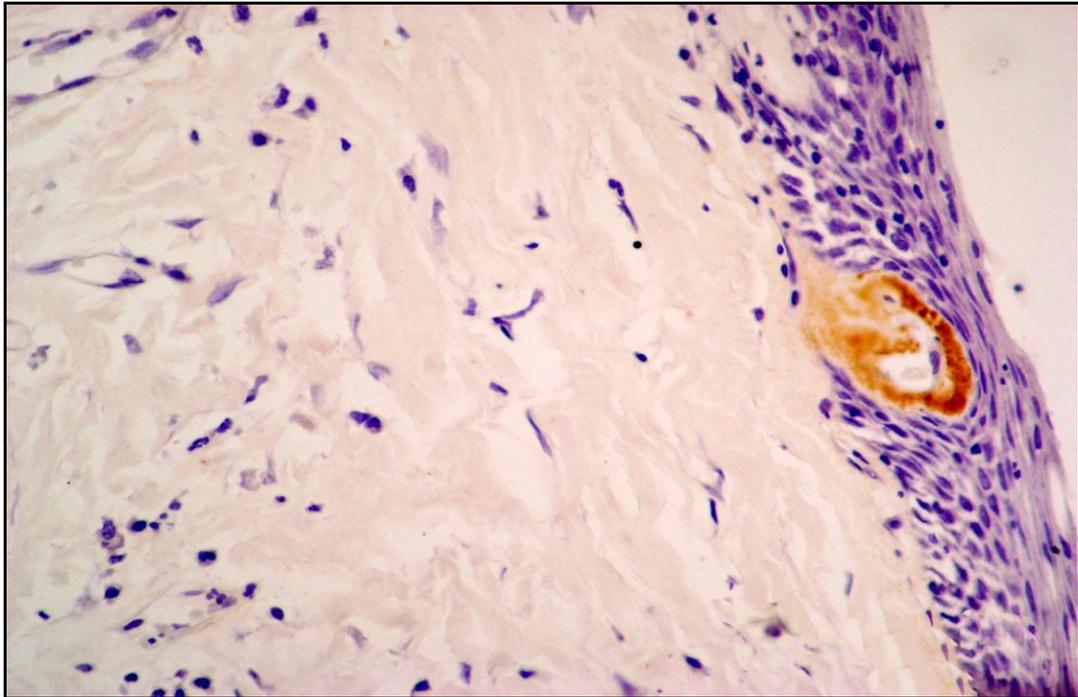


Figura 16: Pólipo Não Linfóide. Observe a expressão focal de tenascina (marrom) abaixo do epitélio superficial (seta) (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

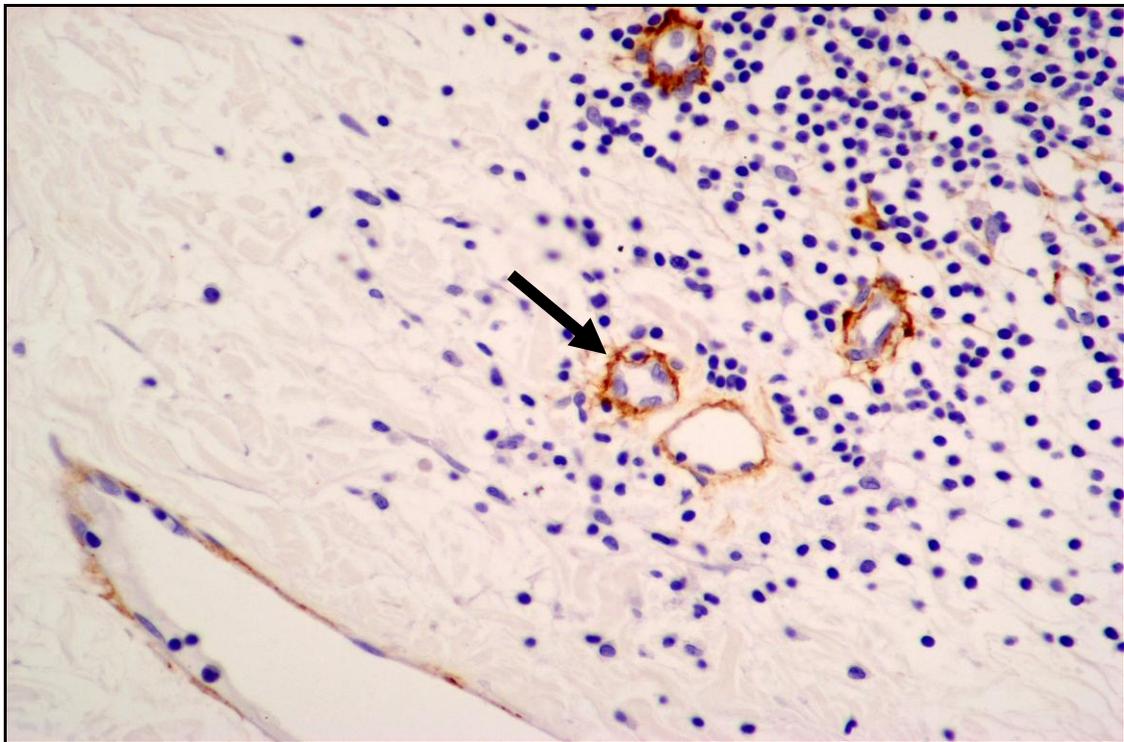


Figura 17: Pólipo Não Linfóide. Note a expressão de tenascina (marrom) na parede de alguns vasos (setas) (imuno-histoquímica- objetiva 20X).

4.1.2.4 Lesões Polipóides Sem Denominação Específica

Nestas lesões a tenascina formava depósitos na matriz extracelular abaixo do epitélio superficial e no eixo do pólipo, sendo que, neste último local, a deposição da proteína foi intensa e difusa em um dos casos (**tabela 6**) (**figura 18**).

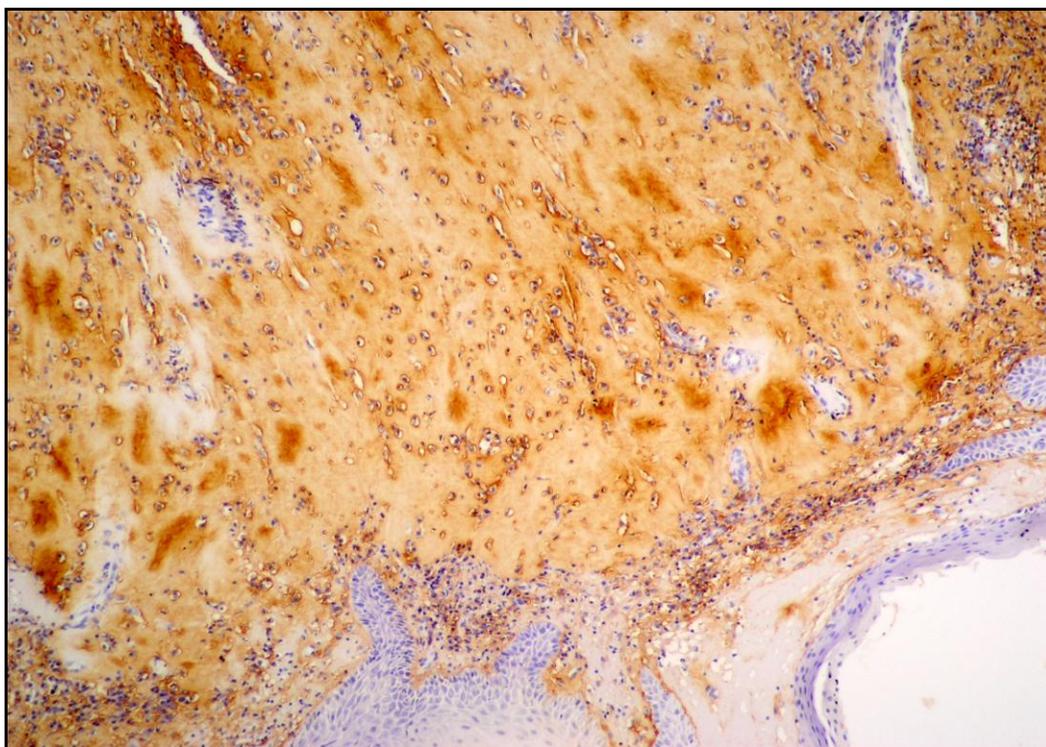


Figura 18: Lesão Polipóide Sem Denominação Específica. Note a intensa deposição difusa de tenascina (marrom) na matriz extracelular (imuno-histoquímica- objetiva 20X).

4.1.3 Colágeno I

4.1.3.1 Tonsilas Controles

Os principais locais com expressão de colágeno I foram a cápsula e os septos tonsilares, sendo que nestas regiões as fibras estavam ordenadas, dispostas em feixes (**figura 19**). Na área abaixo do epitélio da superfície e das criptas também

foram observados depósitos de colágeno I, os quais geralmente tinham aspecto irregular e eram mais discretos na região das criptas. Colágeno I também foi observado circundando as vênulas de endotélio alto e nos vasos no interior do epitélio das criptas (**figura 20**).

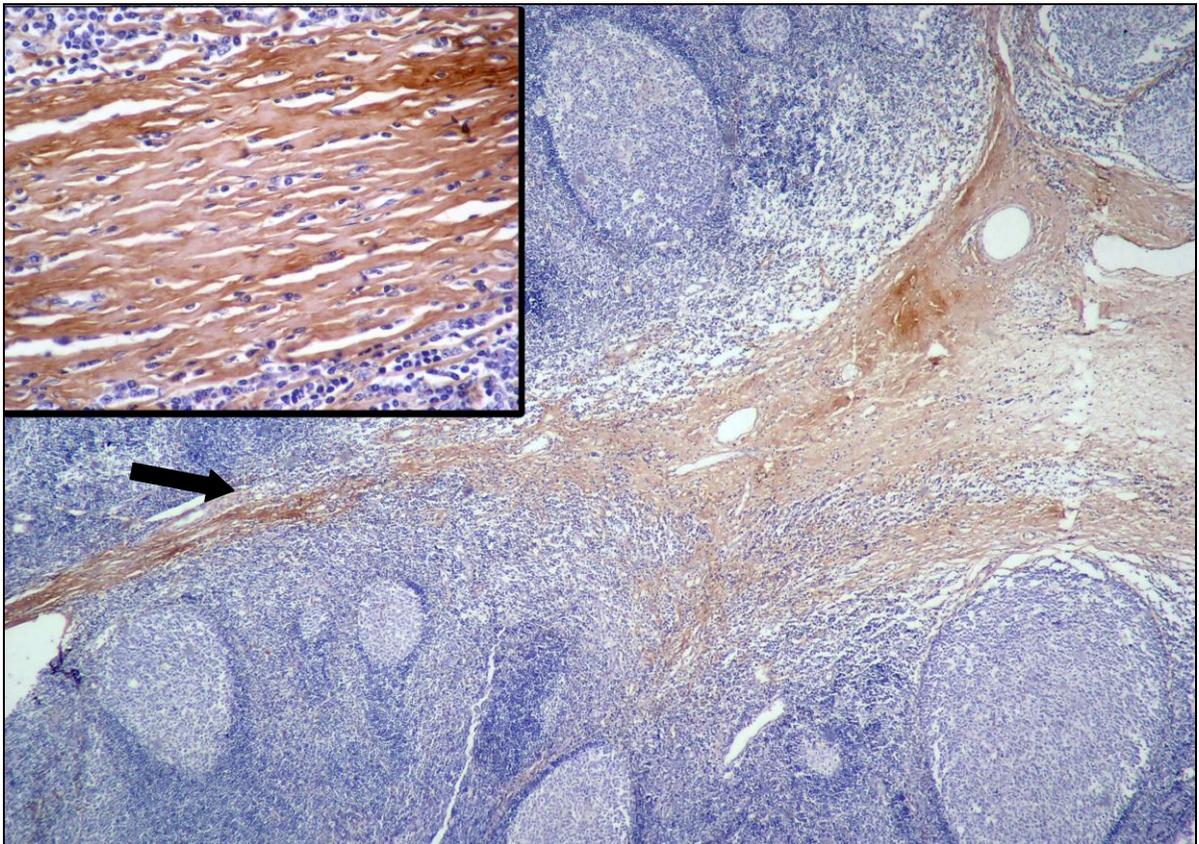


Figura 19: Tonsila Palatina Controle. Note a expressão de colágeno I (marrom) nos septos tonsilares, sendo que as fibras estão ordenadas, formando bandas (imuno-histoquímica- objetiva 10X). Em aumento maior (canto superior esquerdo) observar o aspecto ordenado das fibras colágeno I positivas (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

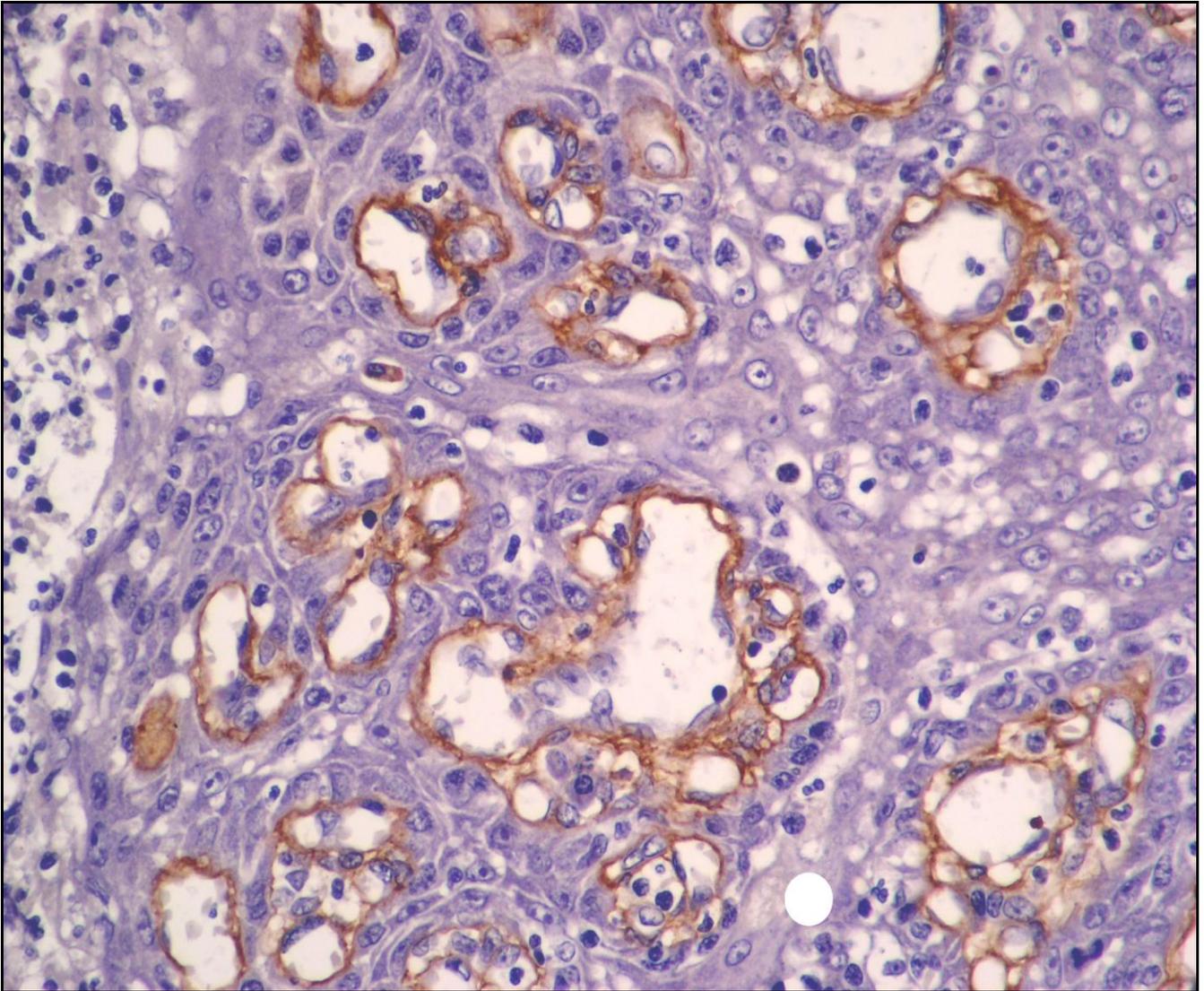


Figura 20: Tonsila Palatina Controle. Expressão de colágeno I (marrom) na membrana basal das vênulas de endotélio alto, localizadas no epitélio da cripta tonsilar (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

4.1.3.2 Pólipos Linfóides

Nestes pólipos, o colágeno I estava freqüentemente depositado abaixo do epitélio da superfície (formando agrupamentos irregulares) e no eixo conjuntivo (dispostos em feixes), porém neste último, geralmente em intensidade menor do que nos septos conjuntivos das tonsilas (**figura 21**). Nestas lesões, o número de vênulas de endotélio alto e de vasos no epitélio das criptas expressando colágeno I

era menor do que aquele observado nas tonsilas controles.

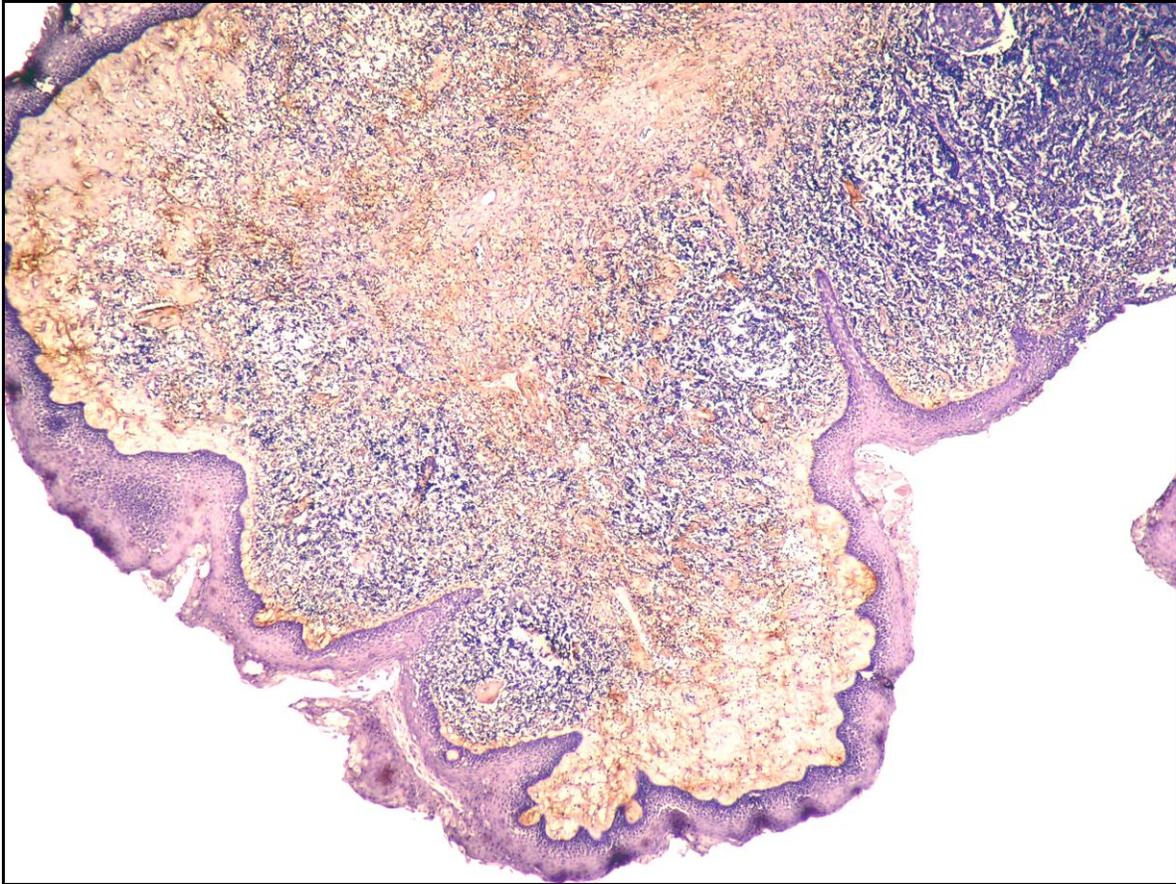


Figura 21: Pólipo Linfóide. Note a expressão menor de colágeno I (marrom) na matriz extracelular, em relação às tonsilas controles. As fibras positivas para colágeno I estão dispostas de modo desordenado, sem formar bandas (comparar com **figura 19**) (imuno-histoquímica-objetiva 10X).

4.1.3.3 Pólipos Não Linfóides

A maioria destes pólipos apresentava expressão leve ou ausente de colágeno I, sendo que quando presente, o aspecto era de depósito irregular (**figura 22**). Alguns vasos expressavam colágeno I na parede (**figura 22- setas**).

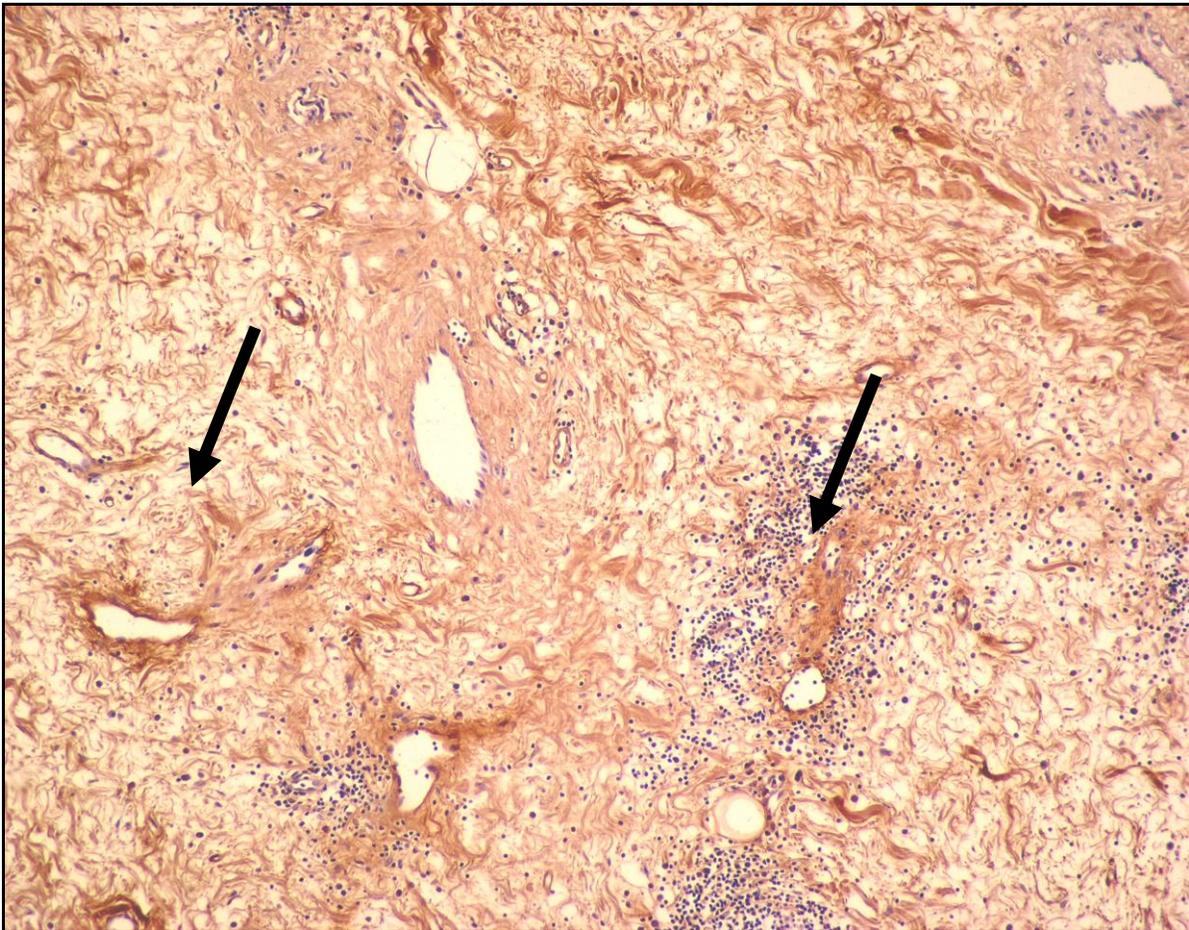


Figura 22: Pólipo Não Linfóide. Observar o arranjo irregular das fibras colágeno I positivas (marrom) na matriz extracelular, entre os vasos (imuno-histoquímica- objetiva 20X).

4.1.3.4 Lesões Polipóides Sem Denominação Específica

Nestas, o colágeno I era ausente ou discreto, tanto no eixo da lesão como abaixo do epitélio.

4.1.4 Colágeno III

4.1.4.1 Tonsilas controles

Nas tonsilas controles, os septos e a cápsula tonsilar continham abundante quantidade de colágeno III formando feixes longos e ordenados (**tabela 7) (figuras 23 e 24)**. Na matriz extracelular abaixo do epitélio superficial e das criptas havia áreas com expressão de colágeno III, sendo na primeira mais freqüente e extensa, enquanto que nas criptas geralmente estava restrita aos trechos com perda da reticulação. Em alguns casos foi observada pequena quantidade de fibras colágeno III positivas na matriz extracelular do tecido linfóide não folicular.

Tabela 7: Depósito de colágeno III na matriz extracelular das tonsilas palatinas controles

Abaixo do epitélio						Septos			Cápsula		
S			C								
0	+	++/+++	0	+	++/+++	0	+	++/+++	0	+	++/+++
42%	42,8%	52,3%	43,4%	47,8%	8,6%	0%	4,3%	91,3%	0%	0%	100%
(1/21)	9/21	(11/21)	(10/23)	(11/23)	(2/3)	(0/23)	(1/23)	(22/23)	(0)	(0)	(22/22)

Se= Superfície do epitélio

C= Criptas

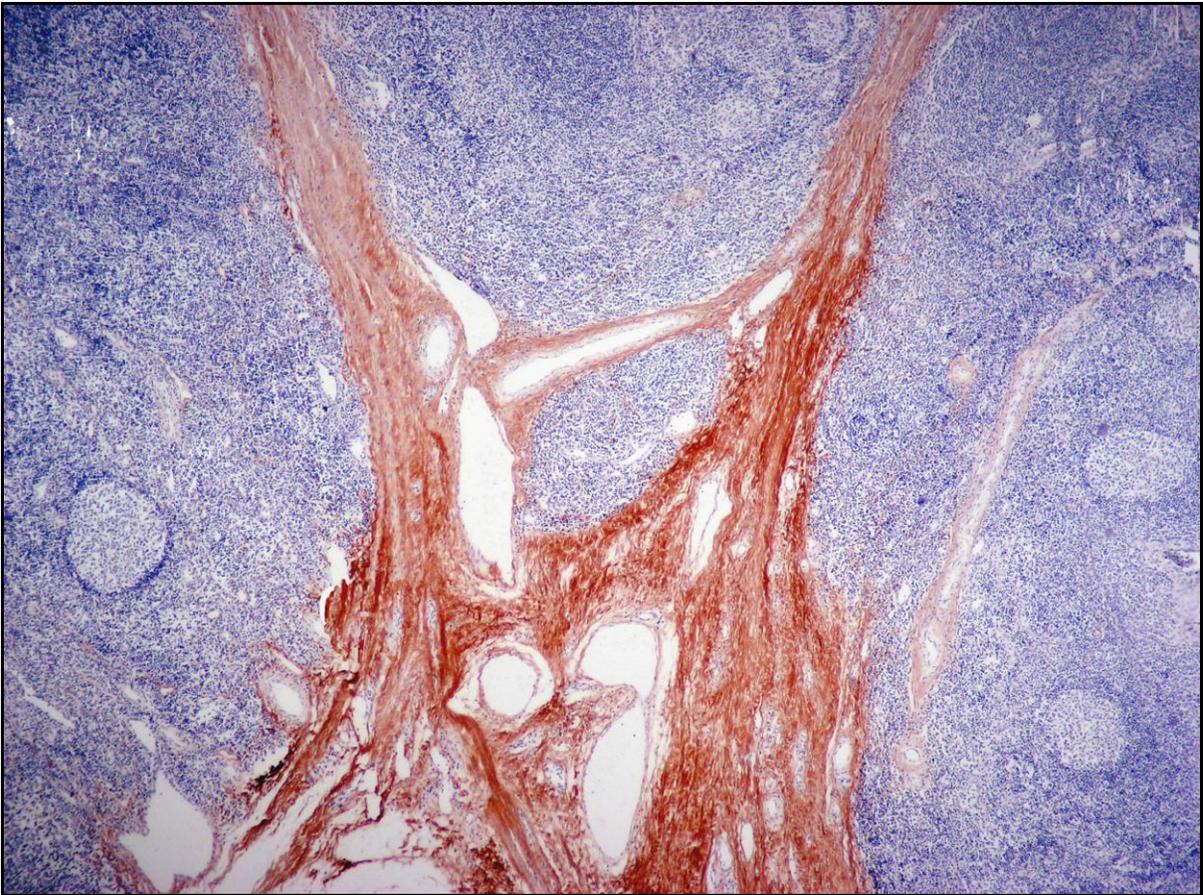


Figura 23: Tonsila Palatina Controle. Observe a expressão de colágeno III (marrom) no tecido conjuntivo no septo tonsilar (imuno-histoquímica- objetiva 20X). Veja maiores detalhes na **figura 24**

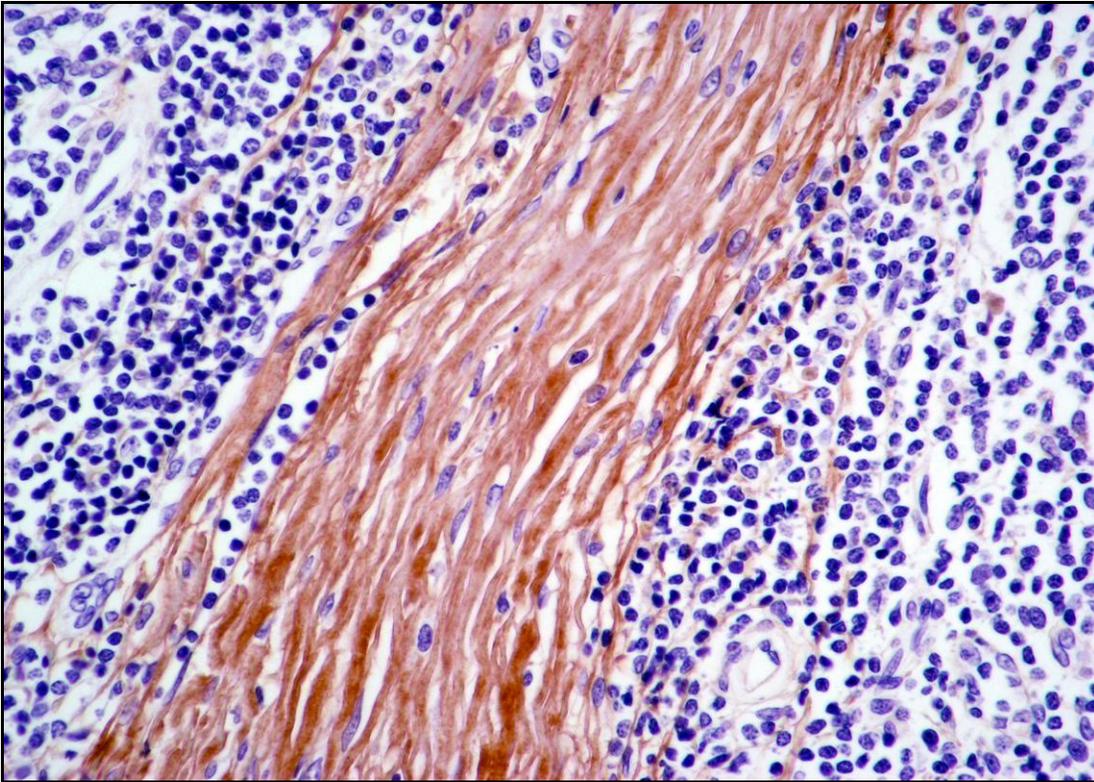


Figura 24: Tonsila Palatina Controle. Observe a expressão de colágeno III (marrom) no tecido conjuntivo no septo tonsilar. Observar o arranjo ordenado das fibras, formando bandas (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

4.1.4.2 Pólipos Linfóides

Semelhante às tonsilas controles, os pólipos linfóides continham fibras colágeno III positivas na matriz extracelular abaixo do epitélio e no eixo da lesão, onde formavam feixes, porém em quantidade geralmente menor que as das tonsilas controles (**tabela 8**) (**figura 2**).

Tabela 8: Depósito de colágeno III na matriz extracelular dos pólipos

Categorias	Abaixo do epitélio da cripta			Eixo do pólipo		
	0	+	++/+++	0	+	++/+++
Pólipos linfóides	20% (1/5)	50% (2/5)	50% (2/5)	0%	60% (3/5)	40% (2/5)
Pólipos não linfóides	0%	33,3% (2/6)	66,6% (4/6)	0%	33,3% (2/6)	66,6% (4/6)
LPSDE	0%	60% (3/5)	40% (2/5)	0%	33,3% (1/3)	66,6% (2/3)

LPSDE- lesões polipóides sem denominação específica.

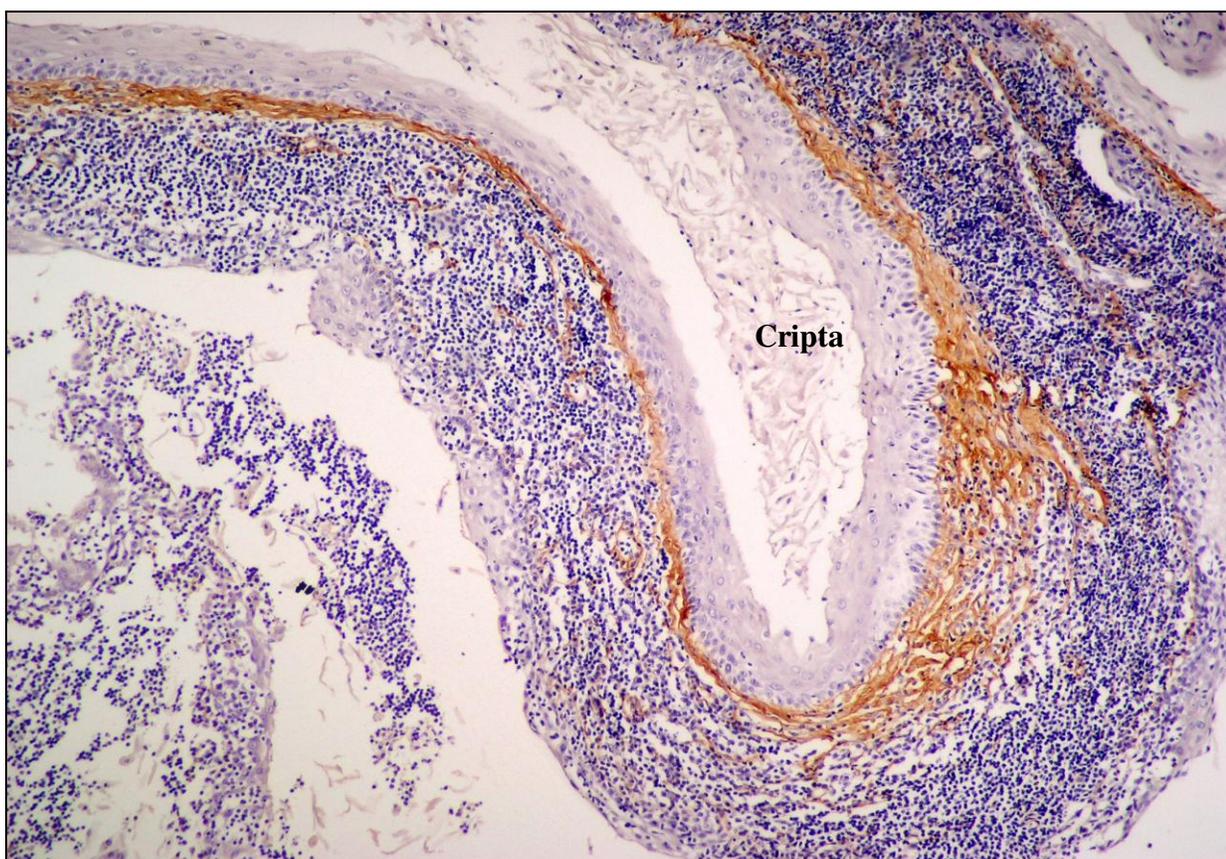


Figura 25: Pólipo Linfóide. Observe a expressão de colágeno III (marrom) na matriz extracelular abaixo do epitélio da cripta, que apresenta perda da reticulação (imuno-histoquímica- objetiva 20X).

4.1.4.3 Pólipos Não Linfóides

Nestas lesões, as fibras colágeno III estavam dispostas de modo desordenado e em menor quantidade em comparação com o septo e a cápsula das tonsilas controles (**tabela 8**), (**figura 26**).

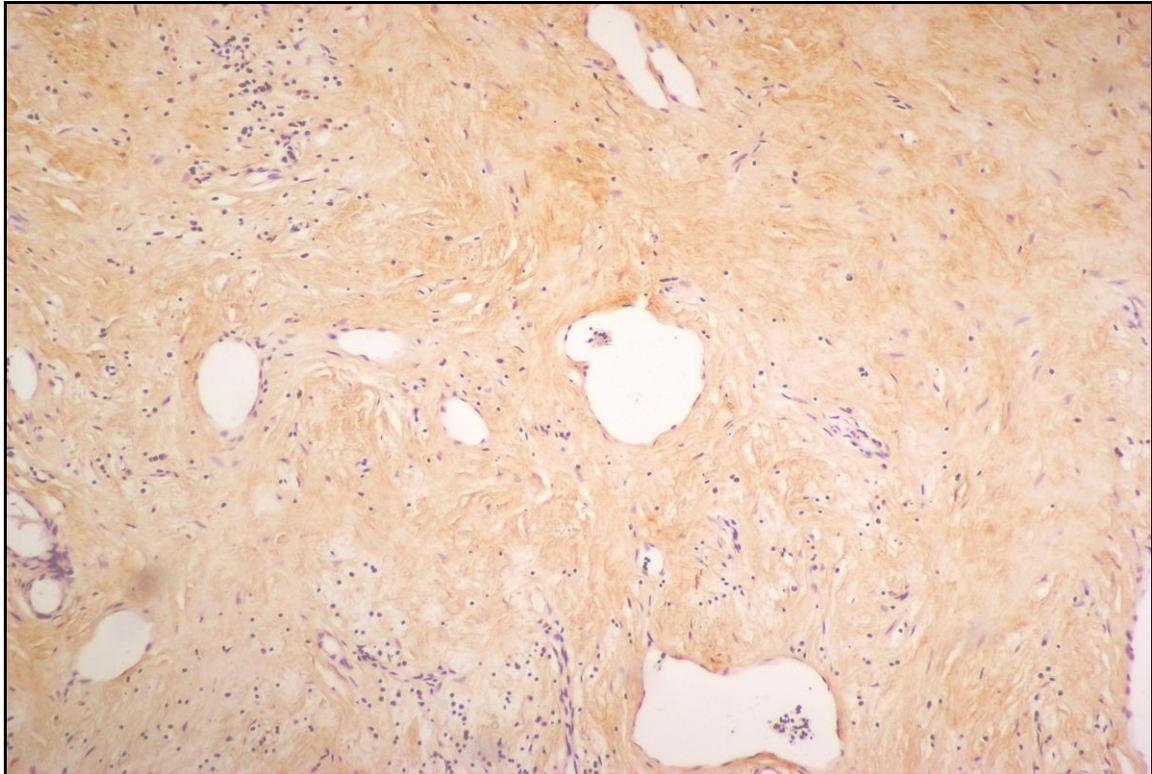


Figura 26: Pólipo Não Linfóide. Note a menor expressão de colágeno III (marrom) na matriz extracelular do pólipo não linfóide (imuno-histoquímica- objetivo 20X). Comparar com a **figura 23** da tonsila controle.

4.1.4.4 Lesões Polipóides Sem Denominação Específica

Todas apresentavam expressão de colágeno III em quantidades variáveis, sendo que em uma delas a matriz extracelular era intensamente corada, porém de modo homogêneo, sem formação de fibras.

4.1.5 Colágeno IV

4.1.5.1 Tonsilas Controles

Nestas tonsilas, colágeno IV foi detectado principalmente na parede dos vasos de todas as regiões, isto é: septos, cápsula, tecido linfóide e no epitélio das criptas (**figuras 27 e 28**). Na matriz extracelular do tecido conjuntivo dos septos e cápsula a expressão do colágeno IV era predominantemente de intensidade leve e não foi observada na região abaixo do epitélio da superfície e das criptas (**tabela 9**).

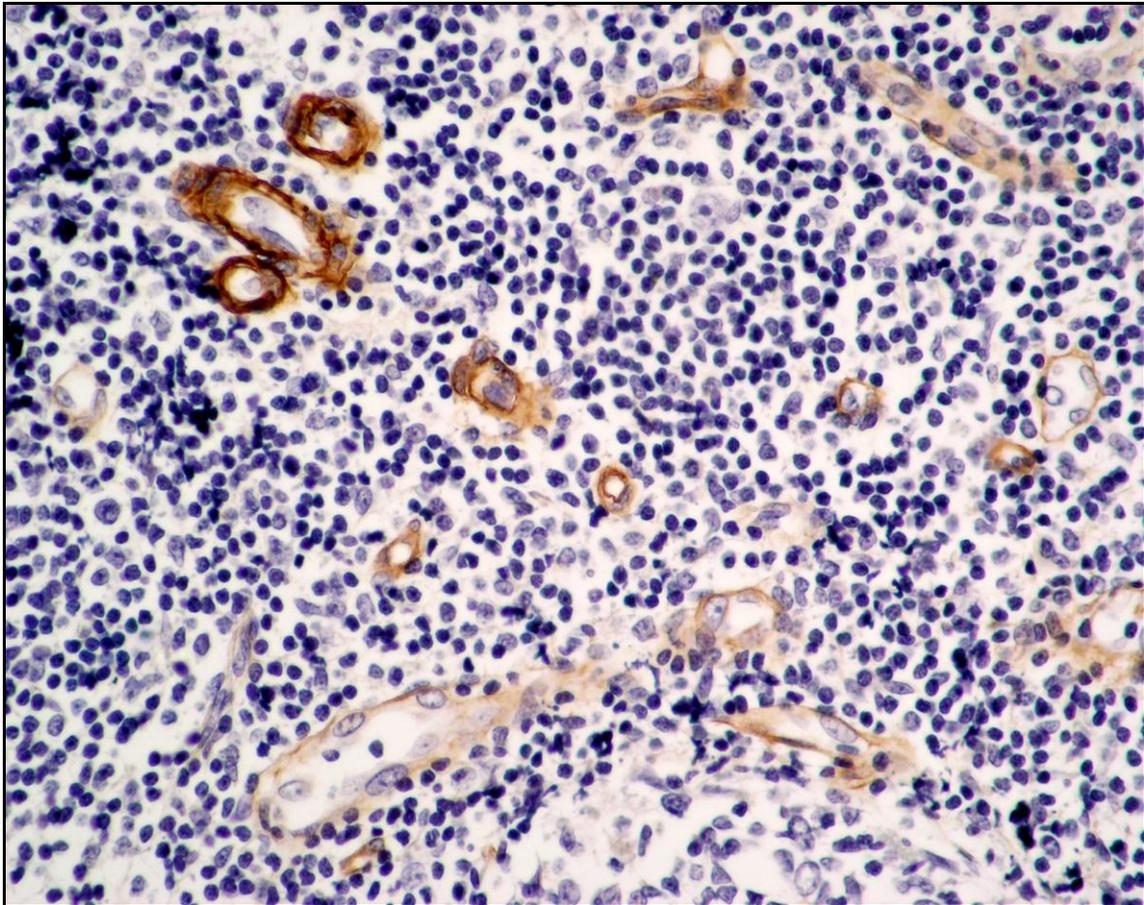


Figura 27: Tonsila Palatina Controle. Observe a expressão de colágeno IV na parede dos vasos (marrom), no tecido linfóide tonsilar (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

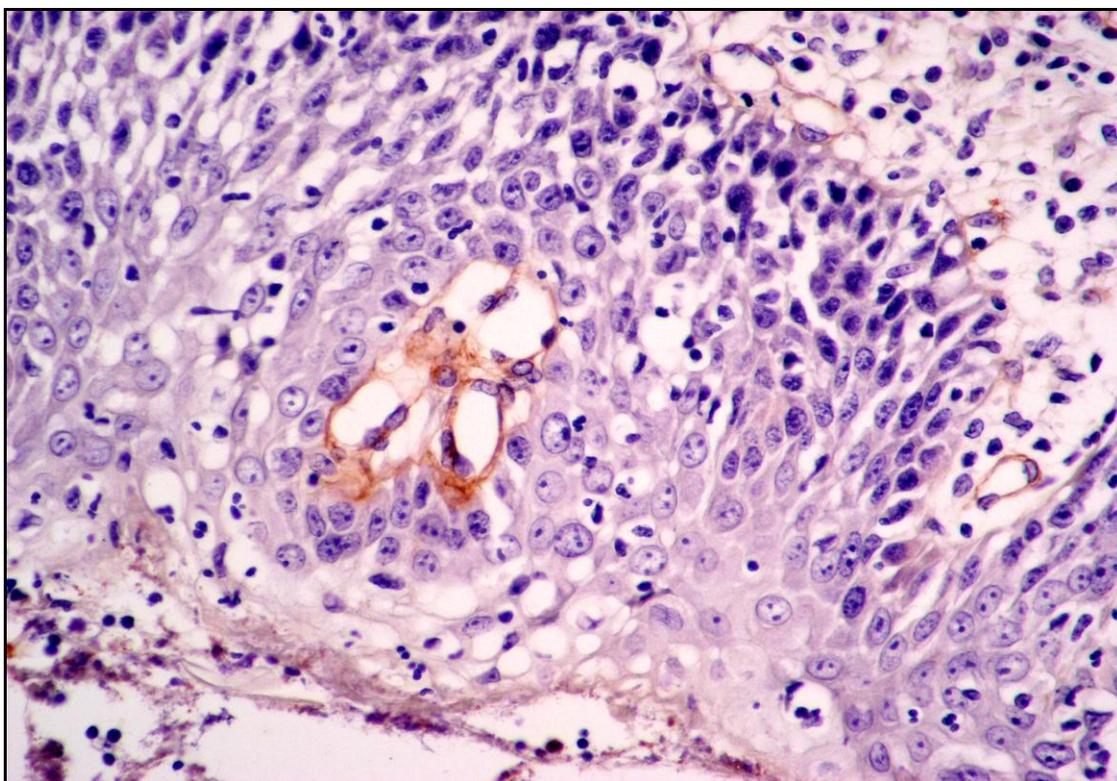


Figura 28: Tonsila Palatina Controle. Note a expressão de colágeno IV (marrom) na membrana basal das vênulas de endotélio alto, no epitélio da cripta tonsilar (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

Tabela 9: Depósito de colágeno IV na matriz extracelular nas tonsilas controles

Abaixo do epitélio			Septos						Cápsula		
S			C								
0	+	++/+++	0	+	++/+++	0	+	++/+++	0	+	++/+++
77,27% (17/22)	13,63% (3/22)	9,10% (2/22)	77,27% (17/22)	18,18 (4/22)	4,55% (1/22)	9,10% (2/22)	59,09% (13/22)	31,81% (7/22)	4,55% (1/22)	45,45% (10/22)	50% (11/22)

Se= Superfície do epitélio

C=Criptas

4.1.5.2 Pólipos Linfóides

Nestas lesões, à semelhança das tonsilas controles, o colágeno IV foi observado no eixo conjuntivo central e, em maior intensidade, na parede dos vasos (tabela 10) (figura 29).

Tabela 10 : Depósito de colágeno IV na matriz extracelular dos pólipos

Categorias	Abaixo do epitélio superficial			Eixo do pólipo		
	0	+	++/+++	0	+	++/+++
Pólipos linfóides	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	40% (2/5)	40% (2/5)
Pólipos não linfóides	0,00%	0,00%	0,00%	14,3% (1/7)	28,5% (5/7)	57,2% (4/7)
LPSDE	0,00%	0,00%	0,00%	50% (2/4)	25% (1/4)	25% (1/4)

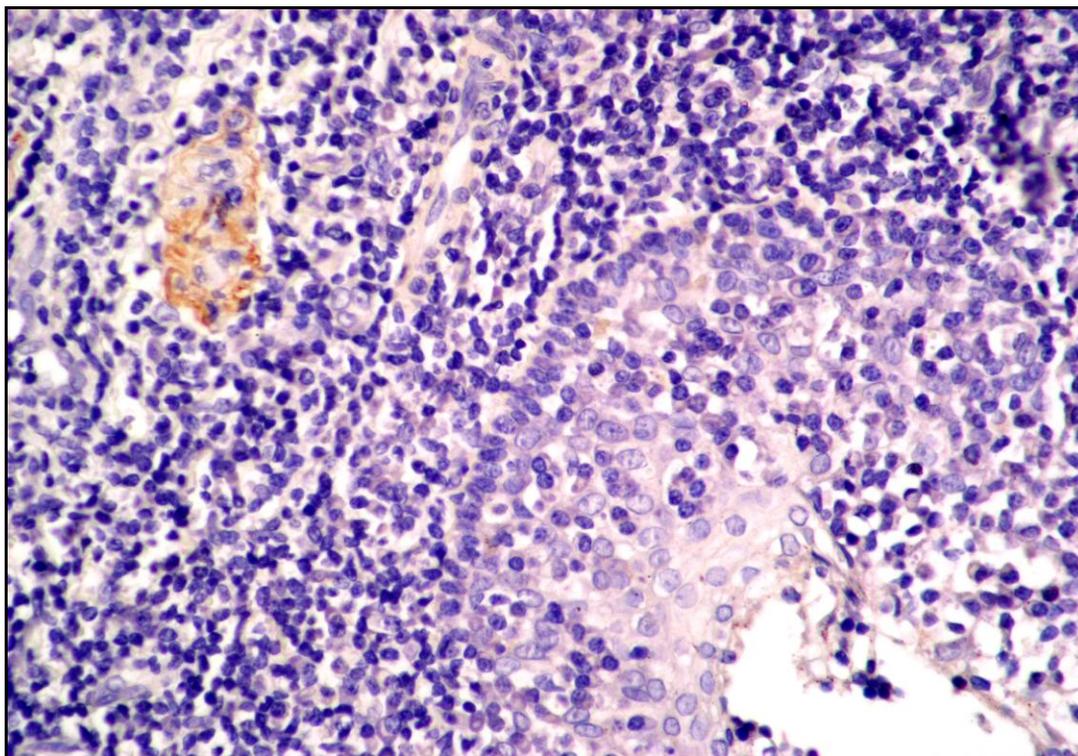


Figura 29: Pólipo Linfóide. Note a expressão de colágeno IV (marrom) na parede do vaso, de permeio ao tecido linfóide (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

4.1.5.3 Pólipos Não Linfóides

Nestes pólipos, além da expressão de colágeno IV na parede dos vasos, na matriz extracelular foram observadas áreas irregulares com expressão mais acentuada (**figura 30**) distinta do restante, na qual era de intensidade leve.

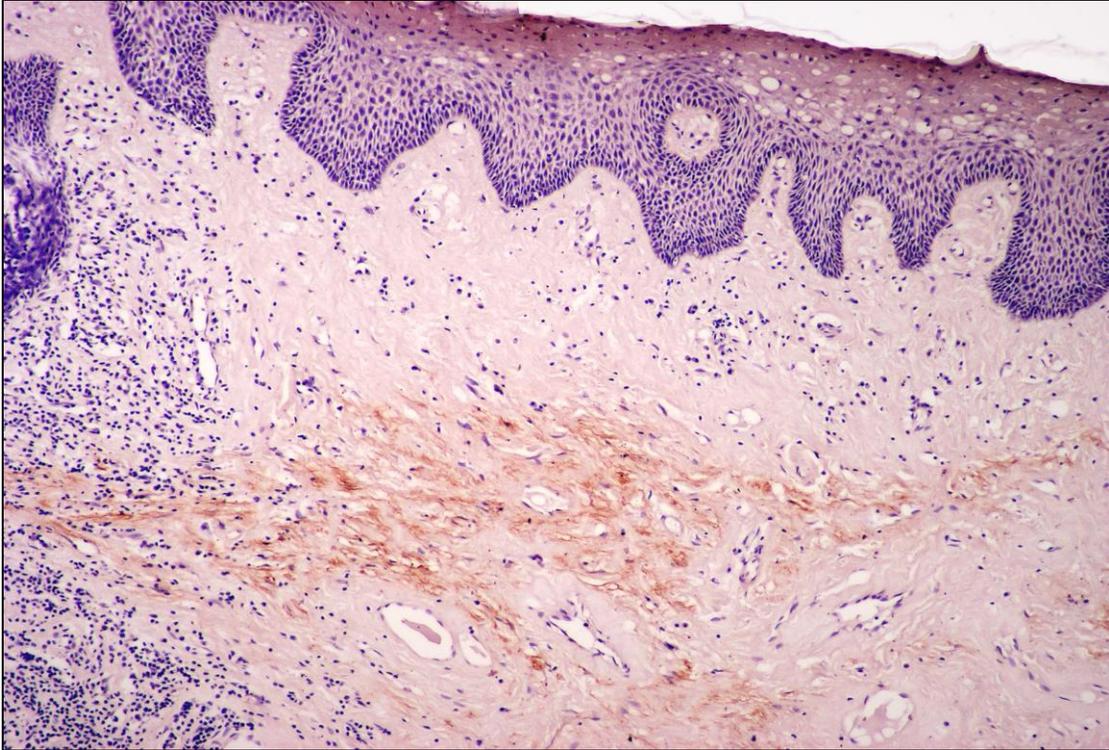


Figura 30: Pólipo Não Linfóide. Observe a expressão acentuada e focal de colágeno IV (marrom) na matriz extracelular (imuno-histoquímica- objetiva 20X).

4.1.5.4 Lesões Polipóides Sem Denominação Específica

Nestas, à semelhança dos outros pólipos, o colágeno IV estava presente principalmente na parede dos vasos.

4.2 COMPOSIÇÃO CELULAR DO ESTROMA

4.2.1 Tonsilas Controles

Todas as tonsilas controles apresentavam padrões semelhantes, tanto em termos de quantia como arranjo arquitetural, em relação às células vimentina positivas (fibroblastos) e α -AML positivas (miofibroblastos). As células vimentina positivas estavam presentes em quantia moderada e dispostas em feixes na cápsula e nos septos tonsilares. Os miofibroblastos α -AML positivos foram detectados nos mesmos locais, porém sempre em quantidade menor, comparativamente às células vimentina positivas (**figuras 31 e 32**).

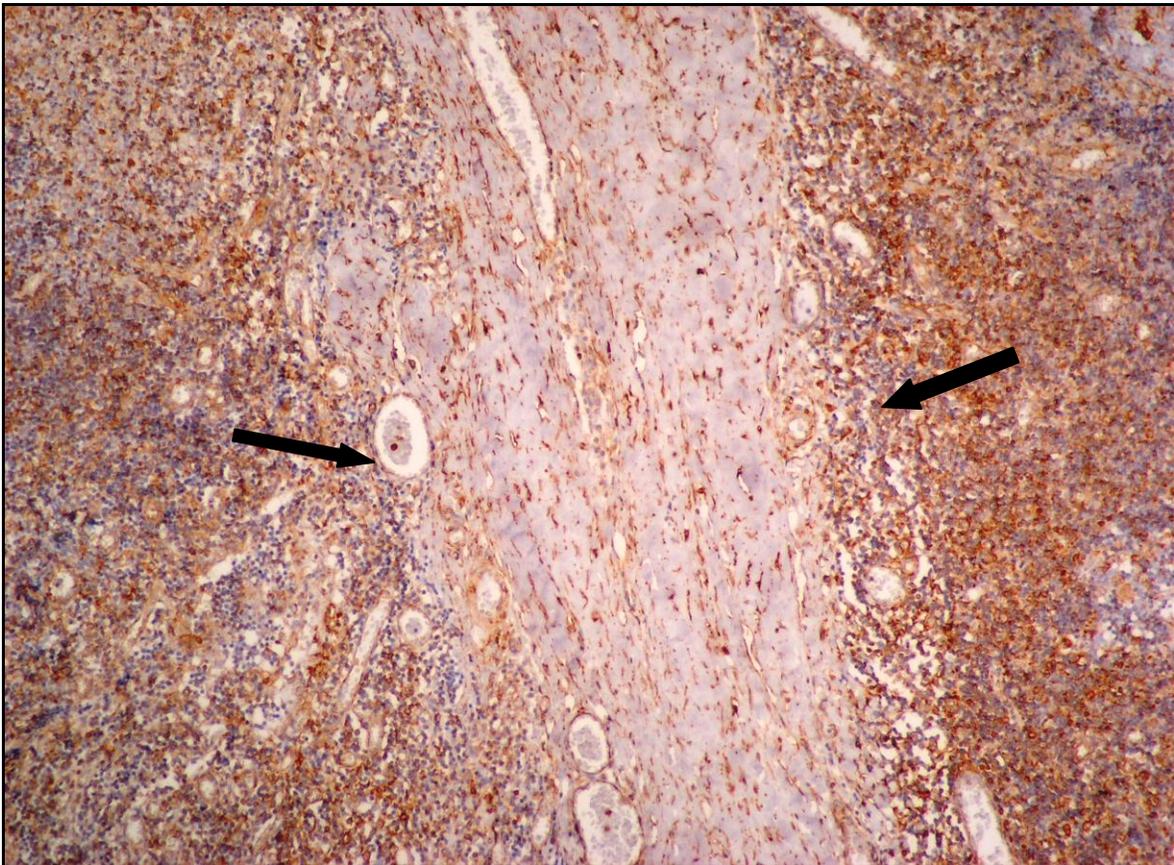


Figura 31: Tonsila Palatina Controle. Observar as células estromais vimentina positivas no septo tonsilar (entre setas) (imuno-histoquímica- objetiva 20X).

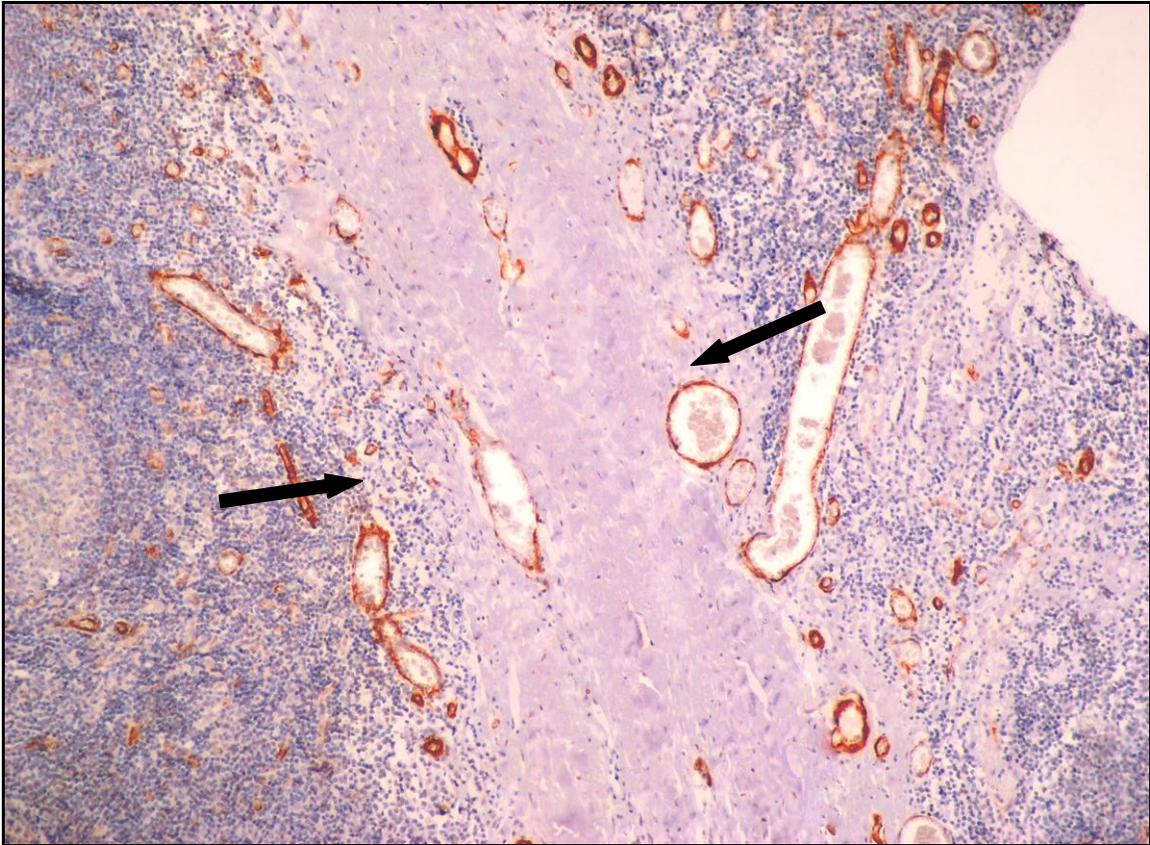


Figura 32: Tonsila Palatina Controle. Observar a quase ausência de miofibroblastos α -AML positivos no septo tonsilar (entre setas). Notar que a musculatura da parede dos vasos é, também, positiva para α -AML (imuno-histoquímica- objetiva 20X).

4.2.2 Pólipos Linfóides

Neste tipo de pólipo, o componente celular estromal apresentava disposição arquitetural similar à da tonsila controle, ou seja, formava feixes na região do eixo conjuntivo central semelhantes àqueles dos septos tonsilares. Entretanto, em contraste aos septos, os eixos dos pólipos freqüentemente continham quantidades semelhantes de fibroblastos e miofibroblastos (**figuras 33 e 34**).

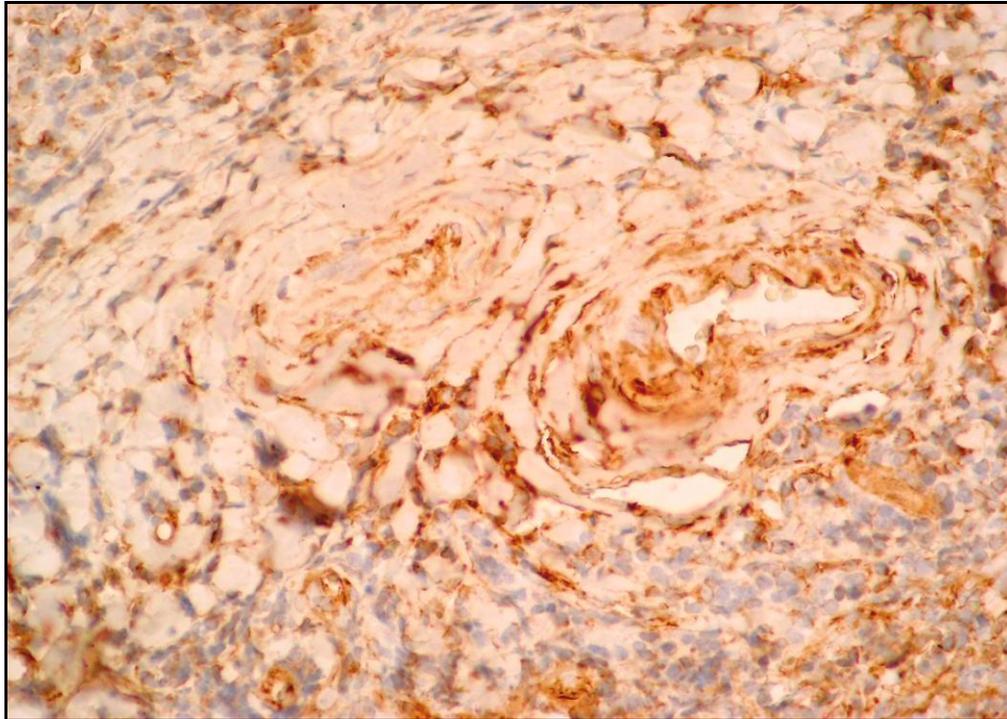


Figura 33: Pólipo Linfóide. Note a expressão de vimentina (marrom) no eixo do pólipo linfóide, realçando as células estromais (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

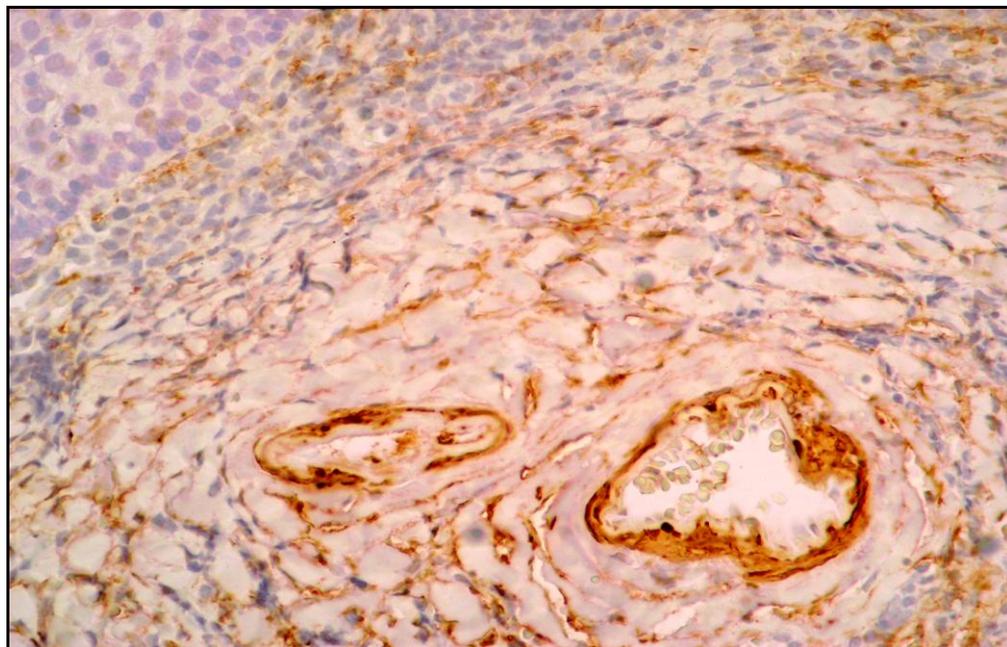


Figura 34: Pólipo Linfóide. Note a expressão de α -AML na parede dos vasos e nos miofibroblastos, no eixo do pólipo linfóide. Observar que a quantia de células é semelhante a da **figura 33** (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

4.2.3 Pólipos Não Linfóides

Estes pólipos se distinguem dos demais pelo desarranjo arquitetural das células do estroma, as quais não formavam feixes (**figuras 35 e 36**) como nos septos tonsilares e no eixo conjuntivo dos pólipos linfóides. Nestas lesões, a principal célula estromal era o fibroblasto vimentina positivo, sendo que na maioria deles havia pequena quantidade de miofibroblastos.

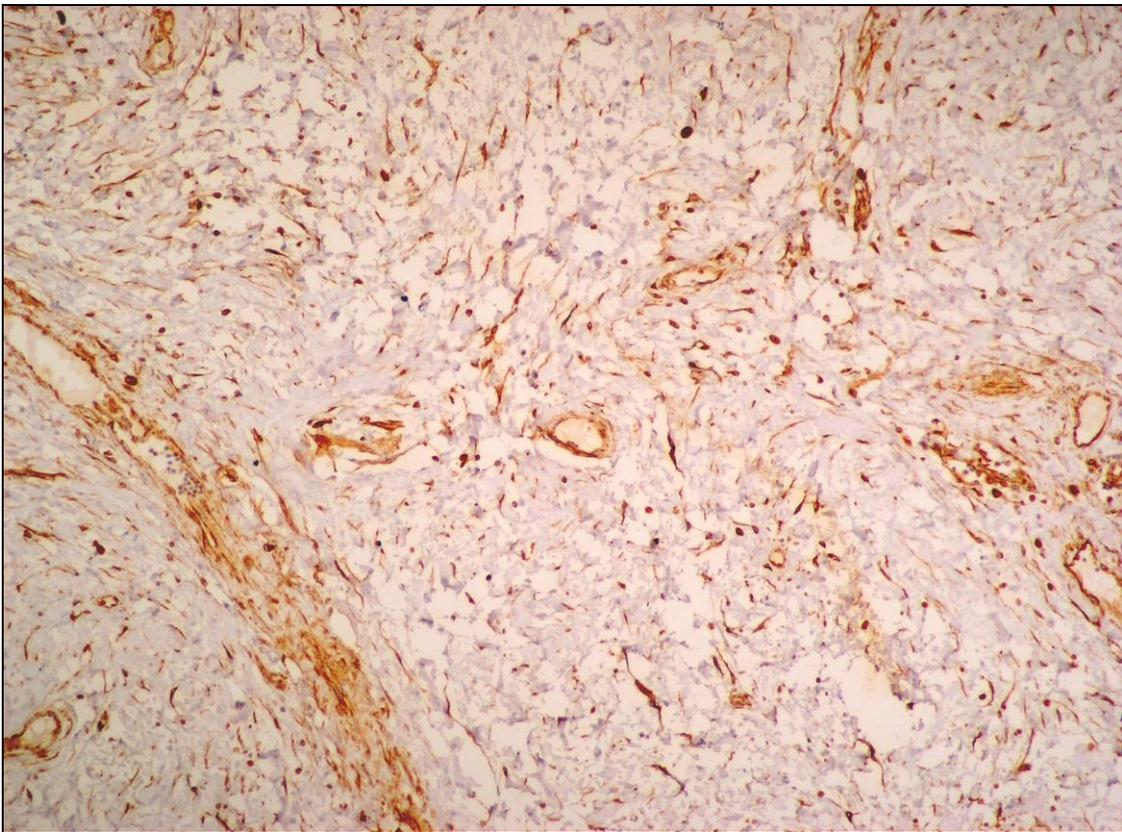


Figura 35: Pólipo Não Linfóide. Note a expressão de vimentina (marrom) nas células estromais e na parede dos vasos. As células estromais estão dispostas irregularmente (imuno-histoquímica- objetiva 20X).

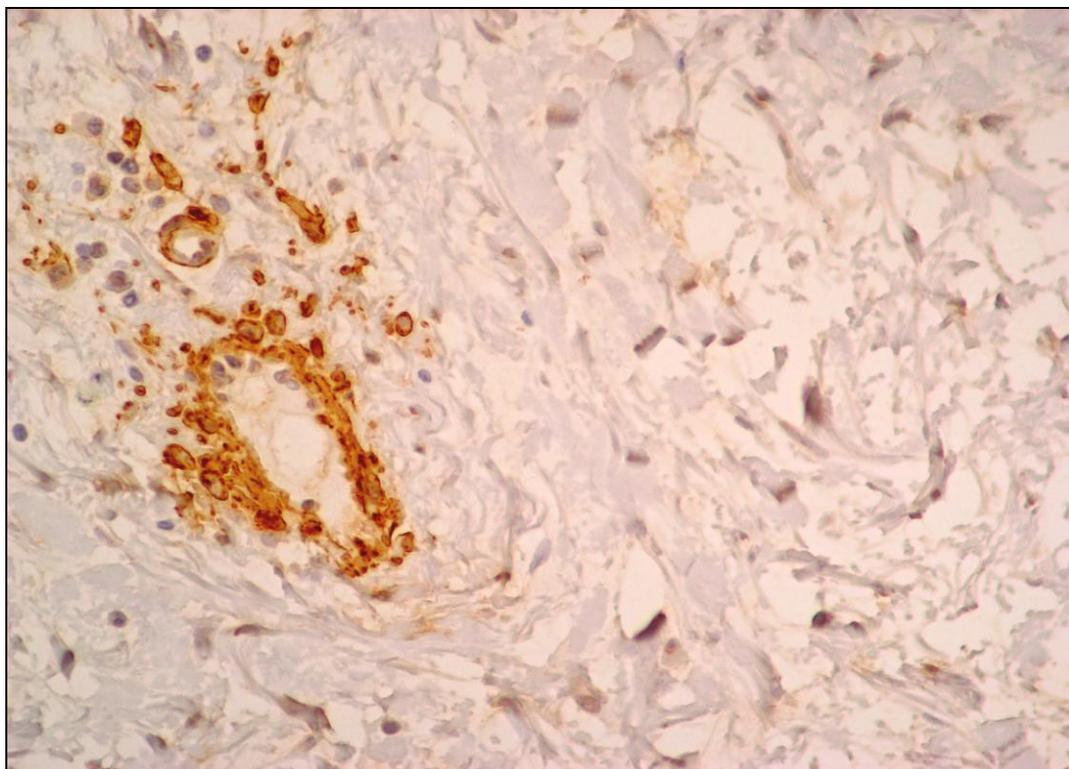


Figura 36: Pólipo Não Linfóide. Observe que o anticorpo α -AML é positivo, quase que exclusivamente, nas células musculares do vaso (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

4.2.4 Lesões Polipóides Sem Denominação Específica

Nestas lesões a quantidade e a disposição dos fibroblastos e miofibroblastos eram variáveis, sendo que em dois deles era semelhante à da tonsila controle e no outro, o arranjo irregular assemelhava-se ao dos pólipos não linfóides.

4.3 ESTRUTURA VASCULAR SANGUÍNEA (VASOS CD34 POSITIVOS E VASOS CD105 POSITIVOS) E LINFÁTICA (VASOS D2-40 POSITIVOS).

4.3.1 Tonsilas Controles

Nas tonsilas palatinas, tanto os vasos sanguíneos como linfáticos, apresentaram padrões diferentes nas regiões dos septos e no tecido linfóide. Na região septal, local por onde percorrem os vasos que entram e saem do tecido

linfóide (área funcional da tonsila), os vasos sanguíneos e linfáticos ocupavam uma área maior do que aqueles da área linfóide (**tabelas 11 e 12**), isto é, tendiam a ser mais dilatados. Em relação aos vasos CD105 positivos, todos apresentavam características morfológicas das vênulas de endotélio alto, as quais estavam localizadas no tecido linfóide interfolicular e no epitélio das criptas (linfoepitélio) (**figura 37**).

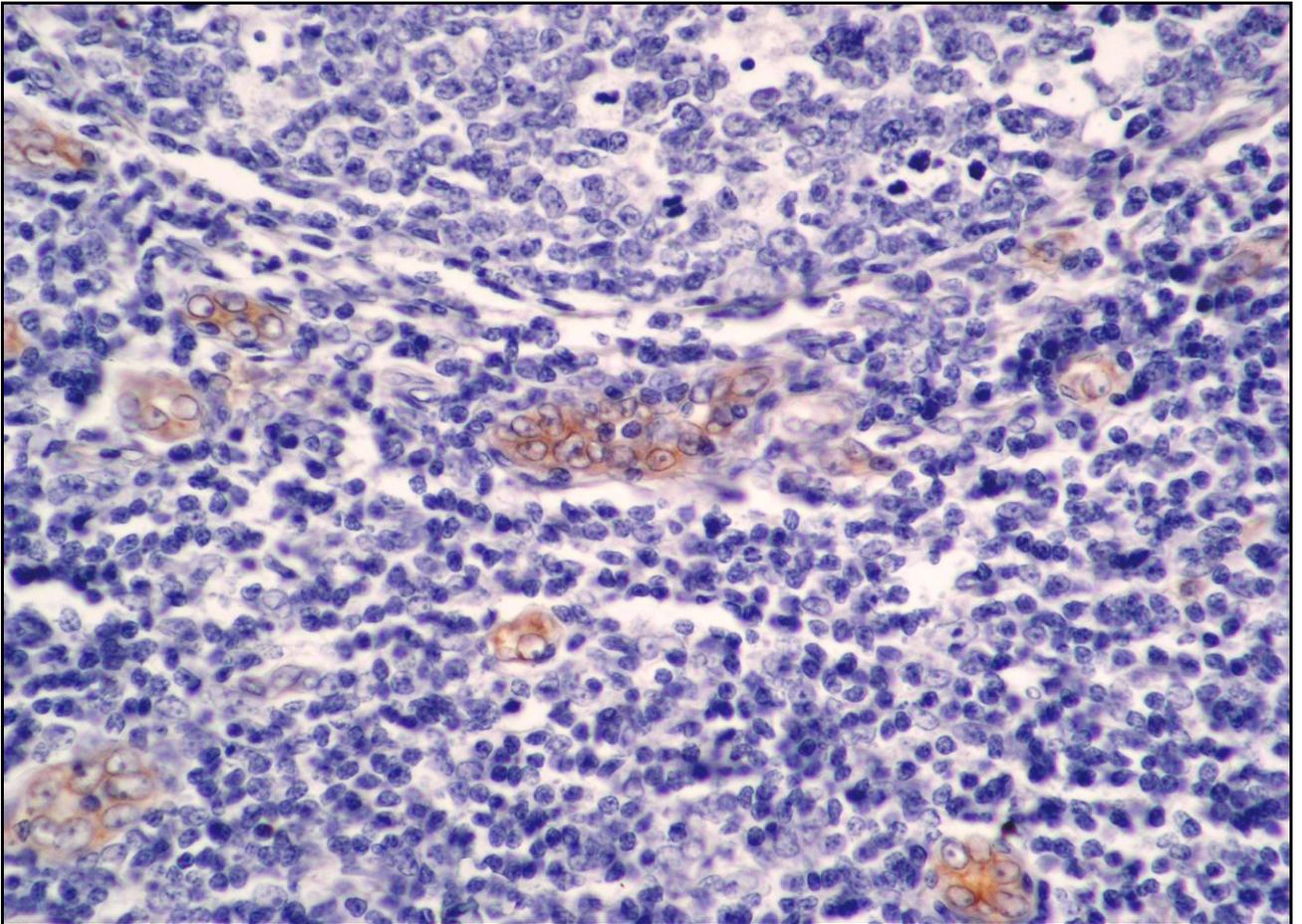


Figura 37: Tonsila Palatina Controle. Note as vênulas de endotélio alto CD105 positivas, no tecido linfóide tonsilar (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

Tabela 11: Dados estatísticos descritivos das variáveis número de vasos sanguíneos (CD34) e porcentagem da área marcada, por grupo nos pólipos e na região linfóide, das tonsilas palatinas

Grupo	Variável	n	Desvio				
			Média	Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Pólipos							
1- Pólipos Linfóides	Número	7	8.38	3.54	4.17	7.17	14.00
	Área	7	4.70	2.12	2.47	4.05	7.77
2- Pólipos Não Linfóides	Número	7	6.10	2.92	3.67	4.50	11.70
	Área	7	9.22	8.55	2.72	5.20	26.56
3- Lesões Polipóides Sem Denominação Específica	Número	5	5.20	2.93	1.67	5.00	8.83
	Área	5	4.87	7.23	0.82	2.03	17.77
Tonsilas normais							
Região							
Área Linfóide	Número	26	10.15	5.07	2.00	10.00	23.67
	Área	26	6.75	6.02	1.20	4.75	26.53

Número de vasos CD34 positivos – **p=0,0312** - diferença significativa apenas quando comparadas à área linfóide da tonsila com as lesões polipóides; Área dos vasos CD34 positivos - **p=0,2341**.

Tabela 12: Dados estatísticos descritivos das variáveis número de vasos linfáticos (D2-40) e porcentagem da área marcada, por grupo nos pólipos e na região linfóide, das tonsilas palatinas

Grupo	Variável	n	Desvio				
			Média	Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Pólipos							
1- Pólipos Linfóides	Número	7	5.24	1.25	3.0	5.33	6.67
	Área	7	7.65	4.19	3.18	6.92	15.30
2- Pólipos Não Linfóides	Número	7	3.71	0.37	3.17	3.67	4.17
	Área	7	11.60	9.19	2.32	9.30	28.55
3- Lesões Polipóides Sem Denominação Específica	Número	5	3.67	1.69	2.17	3.33	6.50
	Área	5	13.47	9.50	1.87	14.55	27.15
Tonsilas normais							
Região							
Área Linfóide	Número	25	5.17	2.44	0.00	5.33	10.00
	Área	25	3.03	1.76	0.00	2.83	6.37

Número de vasos D2-40 positivos - **p=0,1500**; Área dos vasos D2-40 positivos - **p=0,0003**- diferença significativa quando comparadas à área linfóide com os pólipos linfóides e não linfóides e com as lesões polipóides.

4.3.2 Pólipos Linfóides

Nestas lesões, os vasos (linfáticos e sanguíneos) localizados no eixo conjuntivo central do pólipo e na região linfóide tinham semelhanças quanto à orientação espacial, respectivamente, com aqueles do septo e do tecido linfóide das tonsilas controles. Entretanto, nestes pólipos, cujo componente linfóide correspondia a mais de 80% de sua constituição, os vasos linfáticos eram significativamente mais dilatados quando comparados com aqueles da área linfóide das tonsilas controles ($p=0,0003$) (**gráficos 3 e 4**). Em contraste, os vasos sanguíneos tendiam a ocupar uma área menor, porém a diferença não foi estatisticamente significativa (**gráficos 1 e 2**). Em relação aos vasos CD105

positivos, estes foram detectados apenas na área linfóide do pólipo, estando, portanto, ausentes no eixo conjuntivo central e todos apresentavam morfologia de vênula de endotélio alto (**figura 38**).

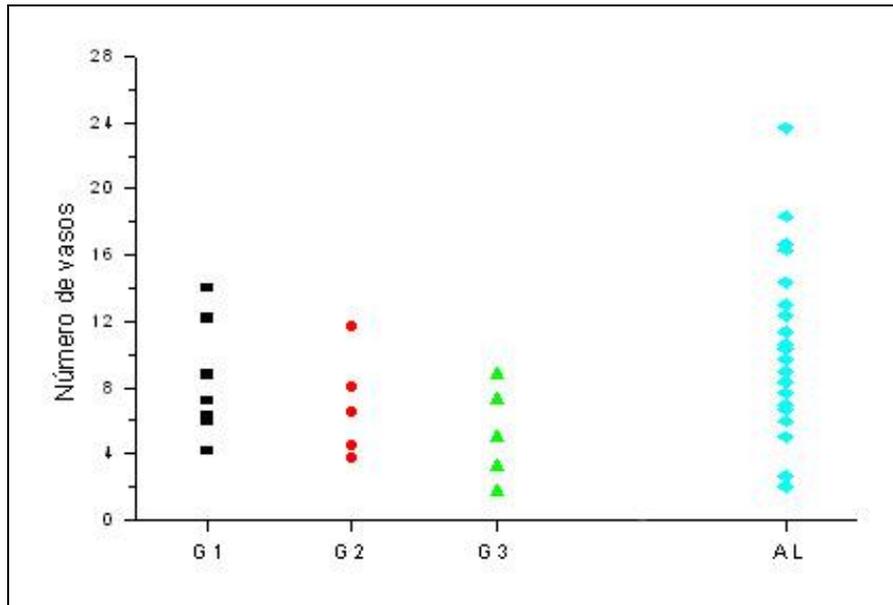


Gráfico 1: Dispersão da variável número de vasos, por grupo (CD34)

Legenda: G1= pólipos linfóides; G2= pólipos não linfóides; G3= outras lesões polipóides;

AL= área linfóide das tonsilas controles

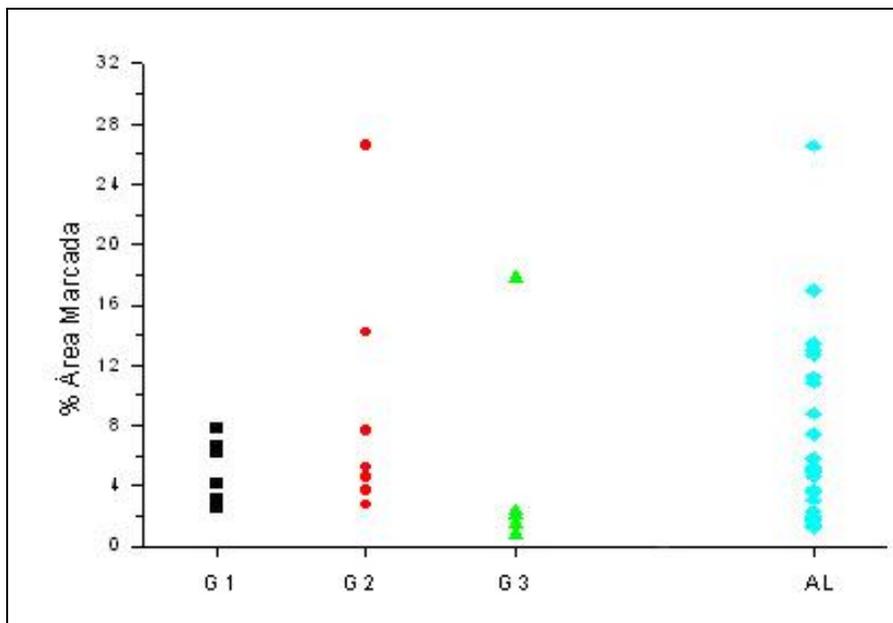


Gráfico 2: Dispersão da variável porcentagem de área marcada, por grupo (CD34)

Legenda: G1= pólipos linfóides; G2= pólipos não linfóides; G3= outras lesões polipóides;

AL= área linfóide das tonsilas controles

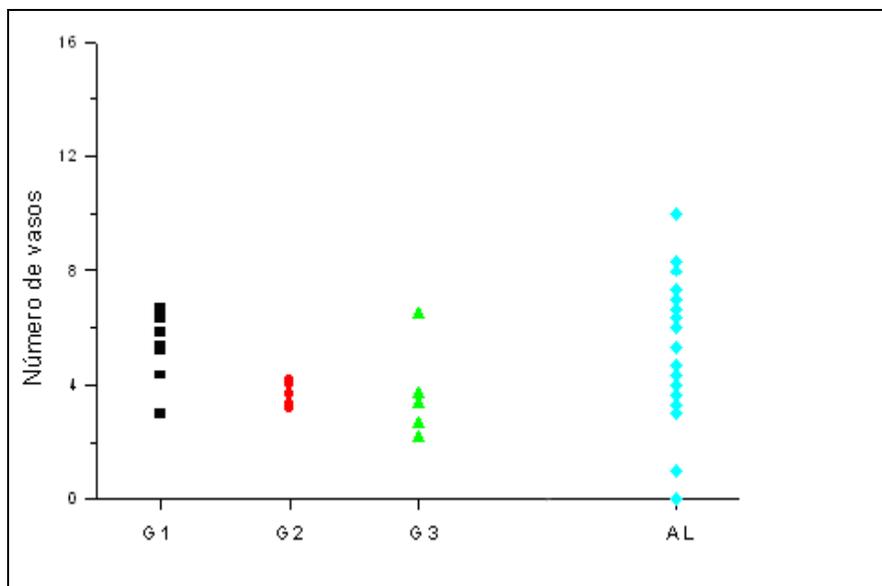


Gráfico 3: Dispersão da variável número de vasos, por grupo (D2-40)

Legenda: G1= pólipos linfóides; G2= pólipos não linfóides; G3= outras lesões polipóides; AL= área linfóide das tonsilas controles

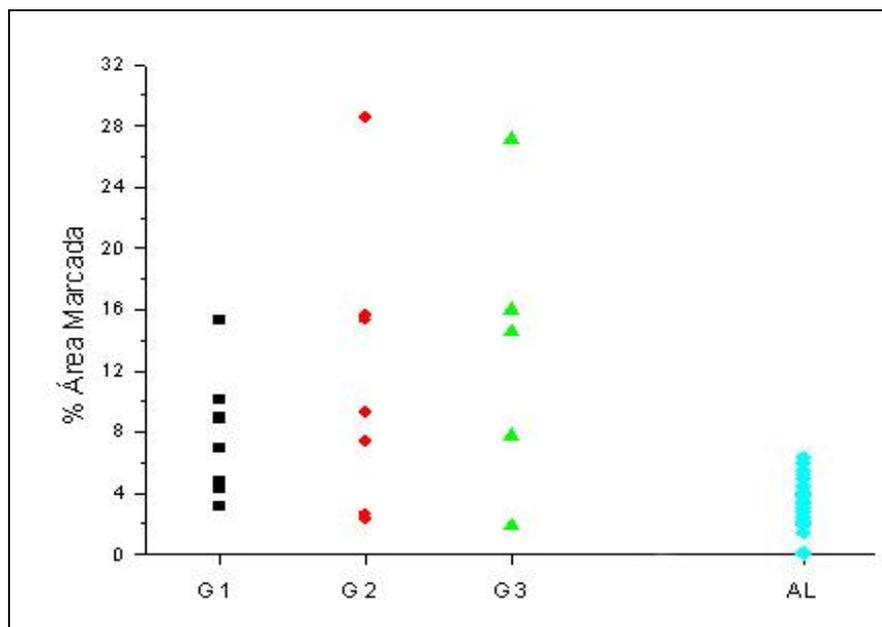


Gráfico 4: Dispersão da variável porcentagem de área marcada, por grupo (D2-40)

Legenda: G1= pólipos linfóides; G2= pólipos não linfóides; G3= outras lesões polipóides; AL= área linfóide das tonsilas controles

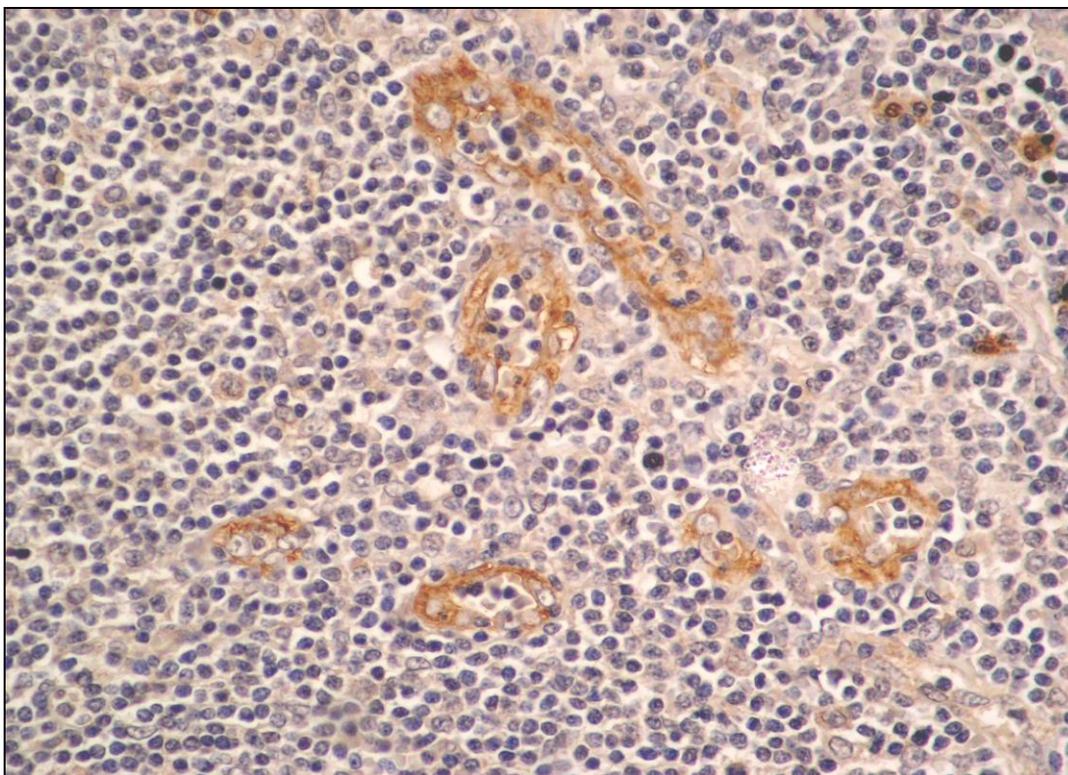


Figura 38: Pólipo Linfóide. Observe as vênulas de vênulas de endotélio alto CD105 positivas (marrom), de permeio ao tecido linfóide (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

4.3.3 Pólipos Não Linfóides

Nestes pólipos, tanto vasos sanguíneos quanto linfáticos estavam dispostos de modo irregular no estroma da lesão. Comparativamente com as tonsilas controles, em termos de número de vasos, os pólipos não linfóides apresentavam uma quantia menor de estruturas linfáticas e sanguíneas, porém a diferença não foi estatisticamente significativa. Entretanto, em termos de área, ambos os tipos de vasos eram mais dilatados, particularmente os linfáticos que ocupavam área significativamente maior do que as estruturas correspondentes localizadas no tecido linfóide das tonsilas controles (**gráficos 1 e 2**). Nos pólipos não linfóides foram encontrados raros vasos CD105 positivos. Todos tinham morfologia de vênula de endotélio alto e estavam localizados de permeio a agregados linfóides (**figura 39**). Apenas neste tipo de pólipo foram encontrados raros vasos linfáticos, com raras células endoteliais Ki-67 positivas (**figura 40**).

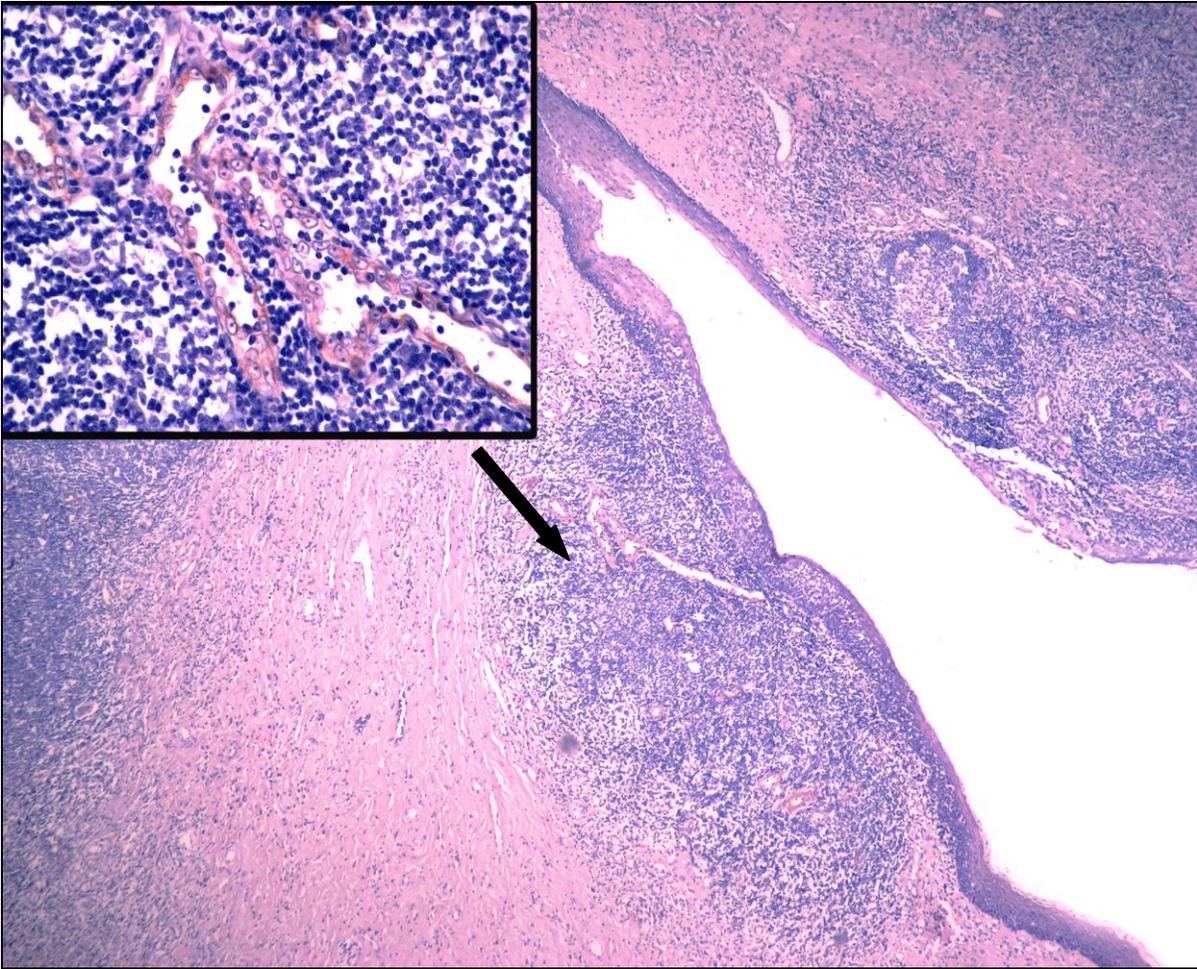


Figura 39: Pólipo Não Linfóide. Note, na figura maior, que apenas nos escassos nódulos linfóides, foram observadas vênulas de endotélio alto CD105 positivas (marrom) (seta) (imuno-histoquímica-objetiva 10X). Observe no canto superior direito, a vênula apontada pela seta, em aumento maior (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

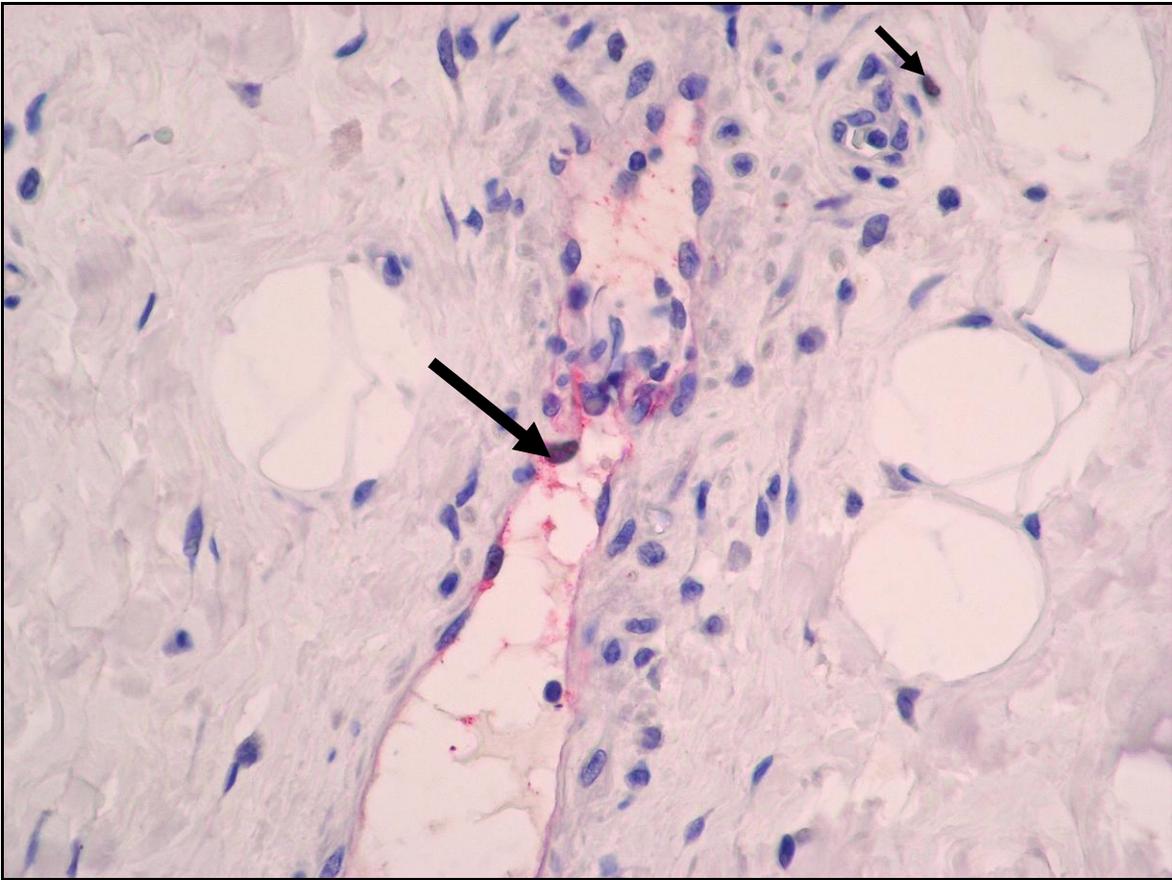


Figura 40: Pólipo Não linfóide. Dupla marcação Ki-67/D2-40. Observar uma única célula endotelial Ki-67 positiva (marcação nuclear- seta maior) em vaso linfático corado pelo anticorpo D2-40 e outra no estroma adjacente (seta menor) (imuno-histoquímica- objetiva 40X).

4.3.4 Lesões Polipóides Sem Denominação Específica

Nestas lesões, o número de vasos linfáticos e sanguíneos era menor que aquele da área linfóide e septal da tonsila, porém os linfáticos tendiam a ocupar uma área maior (mais dilatados) e a diferença foi significativa quando comparados com os vasos linfáticos do tecido linfóide tonsilar ($p=0,0003$). Nestas lesões, os vasos CD105 positivos tinham morfologia de vênula de endotélio alto e só foram detectados de permeio ao tecido linfóide.

5. *DISCUSSÃO* —||

Os pólipos tonsilares são lesões que fazem projeção exofítica na superfície da tonsila e necessitam de exame histopatológico para serem distinguidos de outras lesões benignas e malignas deste tecido. Entretanto, por serem raras e apresentarem um amplo espectro morfológico, estas lesões tem recebido diversas denominações na literatura: angioma, fibroma telangectásico, fibrolipoma, fibroadenolipoma, angiofibrolipoma, linfangioma, pólipo fibrolipomatoso linfangectásico e pólipo linfangiomatoso (19). A maioria destes nomes reflete a importância dos componentes estromal e vascular na constituição dos pólipos tonsilares, porém, na literatura, estas estruturas ainda não foram adequadamente estudadas, particularmente em relação aos vasos, pois apenas recentemente foram comercializados anticorpos específicos para endotélio linfático e outros que distinguem vasos neoformados de maduros (51, 53, 54, 55).

5.1 Estrutura Vascular dos Pólipos

5.1.1 Vasos Linfáticos

Em relação aos vasos (sanguíneos e linfáticos), o nosso estudo mostrou que as **principais estruturas alteradas** nos pólipos tonsilares são os **vasos linfáticos**, os quais se apresentavam dilatados, ocupando uma área maior do que aqueles dos septos tonsilares, local onde estão os linfáticos mais calibrosos das tonsilas palatinas. Esta dilatação foi observada nos dois tipos de pólipos (linfóides e não linfóides), porém particularmente acentuada nos não linfóides, nos quais a arquitetura espacial dos vasos linfáticos era anômala em comparação com aquela da tonsila controle.

O tecido tonsilar normal, à semelhança da maioria dos tecidos, são vascularizados por artérias e veias regionais, porém diferentemente de outros órgãos linfóides, as tonsilas contem apenas linfáticos eferentes que se originam nos nódulos linfóides e drenam a linfa destes nódulos para os linfonodos regionais (28).

Conseqüentemente, a presença de **linfáticos** (dilatados ou não) numa **área sem tecido linfóide**, como nos pólipos não linfóides, apóia a origem hamartomatosa da lesão, isto é, uma malformação semelhante a tumor, constituída por proliferação desorganizada de tecidos próprios da região na qual nascem. Os nossos resultados, também, indicam que os vasos linfáticos não estavam em fase ativa de proliferação, como seria esperado para uma lesão hamartomatosa, visto que, raros deles apresentavam células endoteliais positivas para Ki-67. Interessantemente, os pólipos linfóides, que são constituídos predominantemente por tecido linfóide, também exibiam área vascular linfática significativamente maior do que aquela do tecido linfóide das tonsilas controles. Este resultado reforça, que mesmo essas lesões, que se aproximam morfológicamente do tecido tonsilar normal, apresentam anomalia na estrutura linfática. Portanto, a denominação mais adequada para os pólipos tonsilares seria pólipos linfangectásicos.

5.1.2 Vasos Sanguíneos e as Vênulas de Endotélio Alto

Os vasos sanguíneos foram detectados pelos marcadores CD34 e CD105. O **CD34** é uma glicoproteína transmembrana de cadeia simples, com aproximadamente 116 kDa, sendo expressa em células imaturas hematopoiéticas, células progenitoras endoteliais, células endoteliais de capilares, fibroblastos embrionários e raras células da glia (55). As funções do CD34 são desconhecidas, mas recentes evidências favorecem a participação na adesão celular e na inibição da hematopoiese (56). O CD34 é expresso amplamente no endotélio vascular e é largamente usado como marcador panendotelial (54).

O **CD105**, por sua vez, é considerado um marcador de neoangiogênese. A proposição que CD105 pode estar associado com neoangiogênese advém da observação que esta proteína está super-regulada no endotélio de vários tecidos tumorais em relação ao tecido normal (57, 58, 59). É uma proteína transmembrana homodimérica de 180 kDa, que além do endotélio, está expressa em diversos tipos celulares. Nas células endoteliais, somente uma pequena proporção de CD105

interage com o TGF β 1, sendo que a função da grande maioria do CD105 é desconhecida. O promotor CD105 é predominantemente ativo em células endoteliais em proliferação e essa atividade é induzida pela hipóxia **(53)**.

Interessantemente, tanto CD34 como CD105 também são expressos nas vênulas de endotélio alto **(32, 51)**. Estas são vênulas pós-capilares especializadas no extravasamento de linfócitos do sangue para os tecidos e, portanto, são estruturalmente adaptadas para permitir e suportar um alto tráfico. Elas são encontradas em todos os órgãos linfóides secundários, incluindo tonsilas, linfonodos, placas de Payer (exceto o baço), e em tecidos não linfóides cronicamente inflamados. Nas vênulas de endotélio alto, o CD34 apresenta modificações estruturais em relação à molécula observada no endotélio dos outros vasos sanguíneos. Neste tipo de vênulas, o CD34 contém agrupamentos densos de carboidratos sulfatados, que fazem com que esta glicoproteína tenha participação importante no “homing” dos linfócitos, por funcionar como ligante para o receptor de linfócitos selectina-L **(60)**.

A endoglina (CD105) está entre os numerosos genes que são preferencialmente expressos no endotélio das vênulas de endotélio alto **(61)** e, possivelmente, desempenha algum papel na adesão e transmigração dos linfócitos.

No nosso estudo, em contraste aos vasos linfáticos, os vasos sanguíneos detectados pelo CD34 não mostraram alteração significativa em termos de número e área quando comparados com as tonsilas controles, indicando que a principal modificação vascular nos pólipos é linfática.

Em nossos casos, não encontramos vasos CD105 positivos, que sugerissem neoformação vascular em nenhum tipo de pólipo ou tonsila controle. Este anticorpo só foi detectado na superfície endotelial de vasos que tinham morfologia de vênulas de endotélio alto. Estas vênulas, além de positivas para CD105, também o eram para CD34. Nos pólipos tonsilares, encontramos estas

vênulas de endotélio alto CD105 positivas somente onde havia nódulos linfóides, sendo, portanto, mais raras nos pólipos não linfóides.

Estes achados mostram que a rede vascular dos pólipos é complexa, pois contém estruturas altamente específicas como as vênulas de endotélio alto, que aparentemente preservam as funções necessárias para a passagem de linfócitos da circulação para o tecido adjacente. A emigração dos linfócitos é um processo em múltiplas etapas, que requer importantes modificações estruturais e moleculares das vênulas de endotélio alto, quando comparadas ao endotélio plano dos outros vasos. O endotélio alto caracteriza-se por: a) complexo de Golgi proeminente, poli-ribossomos e retículo endoplasmático rugoso abundantes, b) estruturas vesiculares delimitadas por membranas e numerosos corpos multivesiculares e de Weibel-Palade. Em conjunto, essas feições estruturais indicam intensa atividade biosintética e secretória **(62, 63)**. Além disso, as junções celulares entre as células endoteliais são descontínuas, provavelmente para facilitar a passagem de linfócitos **(63)**.

O endotélio das vênulas de endotélio alto contém ligantes (contra-receptores) para o receptor de linfócitos selectina-L. Estes ligantes apresentam características únicas às vênulas de endotélio alto, que é a sulfatação (salientado anteriormente quanto à sulfatação do CD34 das vênulas de endotélio alto) **(60)**. Os oligossacarídeos sulfatados específicos das veias de endotélio alto são reconhecidos pela selectina-L dos linfócitos e pelo anticorpo MECA-79 **(64)**. Além disso, a superfície luminal do endotélio das vênulas de endotélio alto é recoberta por glicocálice proeminente **(62)**. Este, certamente, facilita a retenção de moléculas secretadas pela vênula, entre elas proteínas da matriz extracelular (laminina e fibronectina). As moléculas retidas no glicocálice possivelmente desempenham papel acessório na parada dos linfócitos nas vênulas de endotélio alto.

A emigração dos linfócitos é um processo muito específico e eficiente, pois os linfócitos circulantes discriminam entre o endotélio das vênulas de endotélio

alto e o dos tecidos não linfóides. O linfócito circulante inicia o contato através da selectina-L que reconhece seus ligantes no endotélio alto, levando à sua aderência e rolamento na vênula. Os próximos passos são ativação da adesão e adesão firme ao endotélio e, finalmente, migração transendotelial. Outro ponto importante é que várias evidências indicam que todas as feições especializadas das vênulas de endotélio alto estão sob controle do microambiente local. Embora, os fatores e células envolvidos na indução e manutenção do fenótipo especializado das vênulas de endotélio alto ainda não estão completamente esclarecidos, os seguintes parecem participar desse processo: citocinas produzidas localmente, proteínas da matriz extracelular que circunda as vênulas e as células dendríticas interdigitantes (60).

Esses aspectos que denotam o grau de especialização das vênulas de endotélio alto e a multiplicidade e complexidade dos fatores envolvidos no seu desenvolvimento e manutenção levam-nos a acreditar que tais estruturas nos pólipos não são hamartomatosas (proliferação desorganizada de tecidos da região). Possivelmente o tecido linfóide e, conseqüentemente, as vênulas de endotélio alto, que permitem a formação desse tecido, são hiperplásicos ou residuais da tonsila onde nasceu o pólipo. Corrobora com essa hipótese, o fato que os hamartomas de linfonodos também não contem tecido linfóide, sendo formado principalmente por dos adiposo, muscular liso e vasos sanguíneos (65).

5.2 A Matriz Extracelular dos Pólipos

A matriz extracelular é uma rede de macromoléculas que circunda as células, sendo considerada um componente substancial do ambiente celular (42). Como salientado anteriormente, os componentes da matriz extracelular são classificados em fluidos e fibrosos. Os fluidos compreendem as glicosaminoglicanas e proteoglicanas e os fibrosos são subdivididos em: a) proteínas adesivas (laminina, tenascina e fibronectina) e b) proteínas estruturais (colágeno) (45). **As fibras colágenas** formam o componente mais abundante da matriz extracelular em muitos

tecidos e são as maiores proteínas fibrosas da matriz extracelular. Até o momento, cerca de 20 tipos de colágeno já foram reconhecidos, sendo que um grupo de 30 ou mais genes codificam seus polipeptídeos. Os principais colágenos são os tipos I, II e III, os quais formam uma rede de fibras no interstício dos tecidos, ligando as células aos componentes estruturais e umas às outras **(24)**. O colágeno tipo IV é o maior componente das membranas basais. Os fibroblastos sintetizam grande parte dos componentes da matriz extracelular, assim como as enzimas envolvidas na sua degradação, tais como metaloproteinases e outras proteases.

Nas nossas tonsilas controles, os colágenos tipos I e III foram componentes importantes da matriz extracelular da cápsula e septos conjuntivos onde formavam feixes ordenados, sendo que colágeno tipo I também estava presente na parede das vênulas de endotélio alto. Em contraste, nas regiões abaixo do epitélio da superfície e das criptas, a expressão destes colágenos era focal e com arranjo irregular, não raro associada à alteração estrutural, tal como perda do aspecto reticulado do epitélio das criptas, sugerindo que, nestes locais, a expressão de colágeno I e III poderia estar relacionada a processo reparativo.

Nos pólipos, a expressão de colágeno I e III foi geralmente de intensidade menor que aquela dos septos. Nas lesões onde a tonsila foi removida junto com o pólipo, o pedículo deste tinha continuidade com o septo tonsilar e comparando ambas as regiões, na área do pólipo era nítida a menor intensidade destes colágenos, particularmente no tipo não linfóide. Neste pólipo, as fibras colágenas (geralmente presentes em quantidade pequena) estavam dispostas de modo irregular, enquanto que no pólipo linfóide o arranjo mais ordenado imitava o do septo tonsilar. Estes achados (alteração em quantidade e arranjo arquitetural dos colágenos I e III) reforçam a hipótese que a porção não linfóide do pólipo tonsilar trata-se de hamartoma isto é, proliferação tumoral desordenada de tecidos próprios da região.

As glicoproteínas (fibronectina e tenascina) são responsáveis pela

adesão da matriz celular, isto é, desempenham fundamental importância nas conexões inter celulares, entre célula e matriz e entre matriz e matriz, na facilitação da movimentação e estímulos para a proliferação **(44)**.

A **fibronectina** (uma glicoproteína fibrosa de 440 kDa, constituída por duas subunidades polipeptídicas) encontra-se no plasma (onde tem função de opsonina), na superfície celular (onde tem o papel de molécula de adesão) e como fibrilas da matriz **(45)**. Fibroblastos e células endoteliais são os maiores produtores de fibronectina, mas muitos outros tipos celulares, incluindo algumas células epiteliais a sintetizam em níveis menores. A organização e manutenção das fibrilas de colágenos tipos I e III na matriz extracelular dependem da presença de uma matriz organizada de fibronectina **(66, 67)**.

A **tenascina** (uma glicoproteína hexamérica da matriz extracelular com múltiplas isoformas) tem distribuição limitada nos componentes mesenquimais de vários órgãos de embriões em vertebrados **(68)**, mas reaparece no adulto em tumores malignos, durante a inflamação e no reparo tecidual **(69)**. Por exemplo, a tenascina C é importante para o desenvolvimento do coração durante a embriogênese, estando envolvida na diferenciação de cardiomiócitos e coronárias, porém não é detectada no miocárdio adulto normal. Entretanto, quando ocorre lesão miocárdica, a tenascina C é re-expressa e pode regular o comportamento celular durante o remodelamento de tecidos por: a) modular a adesão do cardiomiócito ao tecido conjuntivo, b) aumentar a migração e diferenciação do miofibroblastos e c) induzir as metaloproteinases **(70)**. A tenascina é produzida por miofibroblastos e fibroblastos estromais e por células tumorais malignas **(71)**.

Nas tonsilas controles, as expressões de fibronectina e tenascina foram acentuadamente diferentes, particularmente em relação à quantidade. A fibronectina foi detectada em duas formas morfológicas, que possivelmente são tradutoras de suas diferentes funções. Na primeira participava de modo importante, junto com colágeno I e III, do arcabouço fibrilar da cápsula e septos tonsilares e na

segunda da constituição da parede dos vasos em todas as regiões da tonsila. Nesta última posição, a fibronectina está possivelmente desempenhando o papel de molécula de adesão, particularmente nos vasos que compõe a rede de delicados capilares nas regiões foliculares, interfoliculares e no epitélio das criptas.

A tenascina, ao contrário da fibronectina, não foi detectada como constituinte fibrilar importante da matriz extracelular da tonsila, pois sempre esteve presente em quantidade pequena e focal nos septos e na cápsula. Entretanto, esta proteína possivelmente tem papel no reparo deste tecido, visto que, à semelhança dos colágenos I e III, formava depósitos no tecido conjuntivo abaixo do epitélio das criptas nos locais com perda da reticulação, que representam áreas modificadas por inflamação (72). Processo semelhante é descrito no coração, onde a tenascina C é sempre observada em focos de inflamação, nas vizinhanças de cardiomiócitos alterados (70). O nível de expressão de tenascina C reflete a extensão da inflamação (70). Quanto aos indutores de expressão de tenascina nas áreas alteradas, tem-se demonstrado que, de um modo geral, citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e estresse mecânico são fatores importantes (70).

Nos pólipos tonsilares, a localização vascular da fibronectina foi importante para evidenciar a anormalidade estrutural deles, particularmente nos pólipos linfóides, que tem aparência morfológica muito semelhante à da tonsila. Nestes, assim como nos outros pólipos, os vasos dos folículos linfóides destoavam da arquitetura altamente organizada encontrada nas tonsilas controles, pois estavam dispostos de modo irregular. É provável que esta alteração arquitetural vascular reflita alteração de competência imunológica no tecido linfóide dos pólipos. Além disso, a deposição alterada de fibronectina na matriz fibrilar dos pólipos, que seguiu o padrão dos colágenos I e III (alteração em quantidade e arranjo arquitetural), reforça, ainda mais, a hipótese que a porção não linfóide do pólipo tonsilar trata-se de hamartoma.

Em relação à tenascina, o depósito desta proteína nos pólipos, tanto

linfóides como não linfóides, possivelmente está associado a processo de reparo tecidual, pois foi encontrado como focos irregulares na matriz extracelular abaixo do epitélio superficial. Estas áreas, pela localização, podem ter sido facilmente lesadas mecanicamente, visto que os pólipos fazem protuberância na superfície da orofaringe, por onde passam os alimentos durante a deglutição. Como salientado anteriormente, o estresse mecânico é um dos fatores indutores importantes da re-expressão de tenascina em tecidos adultos **(41)**.

Os miofibroblastos compartilham características com fibroblastos e células musculares lisas. Em relação a esta última, os miofibroblastos expressam proteínas específicas de músculo liso e tem um aparato contrátil bem desenvolvido. Interessantemente, em remodelamento de tecido cardíaco, tem sido reportada uma relação espacial / temporal entre miofibroblastos e expressão de tenascina **(70)**. A deposição de tenascina precede o aparecimento de miofibroblastos e estes estão localizados nas áreas onde as moléculas de tenascina estão depositadas, indicando, portanto, que a tenascina regula o recrutamento de miofibroblastos.

Nos nossos casos, os pólipos tonsilares, em comparação às tonsilas controles, apresentavam alteração, ora quanto à proporção de células vimentina+ / 1A4+ (como nos pólipos linfóides) ora quanto à disposição arquitetural (como nos pólipos não linfóides). Esta alteração, compreendendo tanto quantidade como organização dos componentes estromais celulares dos pólipos em relação às tonsilas controles, reforça a natureza hamartomatosa da lesão. Além disso, a ausência de relação espacial entre a presença de miofibroblastos e a expressão de tenascina sugere que, nos pólipos tonsilares, estas células não estavam relacionadas a processo de reparo e, possivelmente, representavam uma proliferação anômala de células indígenas da região. Durante o reparo de tecidos, os fibroblastos localizados nas periferias das áreas lesadas transformam-se em miofibroblastos, os quais produzem procolágenos e outras proteínas da matriz extracelular **(72)**. Entretanto, nos pólipos tonsilares ainda são necessários outros estudos para esclarecer as possíveis inter-relações entre o fibroblasto e

miofibroblasto.

6. CONCLUSÕES —||

As **principais estruturas alteradas** nos pólipos tonsilares são os **vasos linfáticos e a matriz extracelular**.

A arquitetura alterada dos linfáticos, que apresentam área significativamente aumentada e o padrão desorganizado e modificado da matriz extracelular, que contem quantidades menores de fibronectina e colágenos I e III sugerem que esses dois componentes dos pólipos tonsilares são de origem hamartomatosa.

A estreita relação entre as vênulas de endotélio alto e o tecido linfóide nos pólipos tonsilares (em localização e quantidade) sugerem que estas estruturas mantêm a função altamente especializada de extravasamento de linfócitos e, portanto, são possivelmente componentes não hamartomatosos da lesão.

A ausência ou escassez de expressão de tenascina-C nos pólipos tonsilares, geralmente restrita às áreas subepiteliais, sugere que o processo de remodelação nos pólipos não é importante e está restrito a locais que são mais sujeitos a traumatismo.

Nos pólipos tonsilares, o número de vasos sanguíneos e linfáticos e a área vascular sanguínea não diferem significativamente daqueles da tonsila controle, assim como não há neoformação vascular, exceto por escassa proliferação endotelial linfática.

7.REFERÊNCIAS —||

1. Pilch BZ. The nasopharynx and waldeyer's rings. In: Pilch BZ. Head and Neck Surgical Pathology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 159-94.
2. Hara HJ. Benign tumors of the tonsil - With special reference to fibroma. Archives of Otolaryngology. 1933 Jul; 18(1): 62-9.
3. Evans WH, Odom RE. Polyp of the tonsil: report of a case. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1939; 48 (2): 495-98.
4. Hanckel RW. Bilateral polyp of the faucial tonsils: report of a case, with review of the literature. Arch Otolaryngol 1943; 37: 563.
5. McKibben BG, Bozanic MS, Florez C. Benign Fibroma of the tonsil, report of one case. A M A Arch Otolaryngol 1958; 67 (1): 83-4.
6. Harrison GI, Johnson LA. Lymphangioma of the tonsil: report of a case with critical review of the literature. Ann Otol Rhinol Laryngol 1960; 69: 961-68.
7. Lake CF, Zimmerman AL, Parkhill EM. An unusual polypoid tumor of the tonsil. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1962 Dec; 71: 1005-8.
8. Visvanathan PG. A Pedunculated tonsillar lymphangioma. J Laryngol Otolaryngol 1971; 85: 93-6.
9. Gerber MP, Cotelingam JD. Case report: benign polyp of the palatine tonsil. Mil Med. 1982 Feb; 147(2): 150-3.
10. Vardhan H, Sardana DS. Hamartoma of the tonsil. Ear Nose Throat J. 1985 Mar; 64(3): 142-4.
11. Lupovitch A, Salama D, Batmanghelichi O. Benign hamartomatous polyp of the palatine tonsil. J Laryngol Otol. 1993 Nov; 107(11): 1073-5.
12. Hiraide F, Inouye T, Tanaka E. Lymphangiectatic fibrous polyp of the palatine tonsil. A report of three cases. J Laryngol Otol. 1985 Apr; 99(4): 403-9.
13. Al Samarrae SM, Amr SS, Hyams VJ. Polypoid lymphangioma of the tonsil: report of two cases and review of the literature. J Laryngol Otol. 1985 Aug; 99 (8) : 819-23.
14. Heffner DK. Pathology of the tonsils and adenoids. Otolaryngologic Clinics of North America. 1987 May; 20(2): 279-86.
15. Kasznica J, Kasznica A. Tonsillar polypoid lymphangioma in a small child. N J Med. 1991 Oct; 88(10): 729-31.
16. Shara KA, al-Muhana AA, al-Shennawy M. Hamartomatous tonsillar polyp. 1991; J Laryngol Otol 1991; 105: 1089-90.
17. Nayak DR, Murthy PS, Gopalakrishna RK, Padhee A. Fibroma of the tonsil. J Indian Med Assoc. 1993 Apr; 91(4): 108.

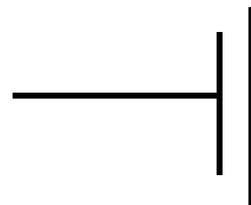
18. Roth M. Lymphangiomas of the palatine tonsil. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996 Jul;115(1):172-3.
19. Kardon DE, Wenig BM, Heffner DK, Thompson LD. Tonsillar lymphangiomas: a clinicopathologic series of 26 cases. *Mod Pathol.* 2000 Oct;13(10):1128-33
20. Sah SP, Bahadur KC, Rani S. Lymphangiectatic fibrolipomatous polyp of the palatine tonsil. *Indian J Pathol Microbiol.* 2000 Oct;43(4):449-51.
21. Hockstein NG, Carpentieri D, Shah UK. Pathology Quiz Case 2. Tonsillar lymphangioma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128: 1210-2.
22. Barreto I, Juliano P, Chagas C, Altemani A. Lymphoid polyps of the palatine tonsil. *Int J Surg Pathol.* 2007 Apr;15(2):155-9.
23. Chen HH, Lovell MA, Chan KH. Bilateral lymphangiomas of the palatine tonsils. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010 Jan;74(1):87-8.
24. Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laurent GJ. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Biol.* 1997; 29(1):5-17.
25. Chiquet-Ehrismann R. Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Jun;36(6):986-90.
26. Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 2000;218(2):235-59.
27. Nave H, Gebert A, Pabst R. Morphology and immunology of the human palatine tonsil. *Anat Embryol.* 2001;204:367-73.
28. Goeringer GC, Vidic B. The Embryogenesis and Anatomy of Waldeyer's Ring. *Otolaryngol Clin North Am* 1987; 20 (2): 207-17.
29. Van Kempen MJP, Rijkers GT, Van Cauwenberge PB. The Immune Response in Adenoids and Tonsils. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122: 8-19.
30. Perry ME. The specialised structure of crypt epithelium in the human palatine tonsil and its functional significance. *J Ant* 1994; 185 (Pt 1): 111-27.
31. Perry M, Whyte A. Immunology of the tonsils. *Immunol Today* 1998; 19 (9): 414-21.
32. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology.* 5th Ed. Philadelphia Ed. Saunders; 2003.p.1-562.
33. Dias EP, Alfaro SEN, De Piro SCA. Lymphoid papillary hyperplasia: Report of a case. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics.* 2003;95(1):77-9.

34. Enomotto T, Matsui K, Enomotto T, Tabata T. Papillary hypertrophy of the palatine tonsils. *Ann Otol.* 1980; 89: 132-4.
35. Carrillo-Farga J, Abbudneme F, Deutsch E. Lymphoid papillary hyperplasia of the palatine tonsils. *American Journal of Surgical Pathology.* 1983;7(6):579-82.
36. Menzel H. Lymphangioms der linken Tonsille. *Monatsschrift Der Ohrenheil* 1919; 53:509.
37. New GB, Childrey JH. Tumors of the tonsil and pharynx (three hundred and fifty-seven cases): I. Benign tumors (sixty-three cases). *Arch Otolaryngol.* 1931; 14: 596-609.
38. Ash J, Raum M. Tonsills. In: Ash J, Raum M, editors. *An Atlas of Otolaryngic Pathology.* Washington, DC: American Registry of Pathology; 1956.p.286-98.
39. Hyams VJ. Differential-diagnosis of neoplasia of palatine tonsil. *Clinical Otolaryngology.* 1978;3(2):117-26.
40. Pyun KS, Friedman SI. Papillary lymphoid polyp of the palatine tonsil. *Ear Nose and Throat J.* 1985; 64: 55-8.
41. Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP. Connective tissues: signalling by tenascins. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2004;36(6):1085-9.
42. Ioachim E, Charchanti A, Briasoulis E, Karavasilis V, Tsanou H, Arvanitis DL, et al. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *European Journal of Cancer.* 2002;38(18):2362-70.
43. Pereira ALA, Veras SSL, Silveira EJD, Seabra FRG, Pinto LP, Souza LB, et al. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteínas em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. The role of matrix extracellular proteins and metalloproteinases in head and neck carcinomas: an updated review. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2005;71(1):81-6.
44. Andrade ZA, Grimaud Jean-Alexis. Tecido Conjuntivo- Reparo, Regeneração e cicatrização. In: Franco M, Montenegro MR, Brito T, Bacchi CE, Almeida PC. *Patologia Processos Gerais* 5.ed.São Paulo: Atheneu, 2010.p.159-74.
45. Hib E, Hib J. *Bases da Biologia Celular e Molecular.* 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.p.95-105.
46. Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol.* 2003 Jul;200(4):488-99.
47. Dalkowski A, Schuppan D, Orfanos CE, Zouboulis CC. Increased expression of tenascin C by keloids in vivo and in vitro. *Br J Dermatol.* 1999 Jul;141(1):50-6.

48. Hagios C, Brown-Luedi M, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-Y, a component of distinctive connective tissues, supports muscle cell growth. *Exp Cell Res.* 1999 Dec 15;253(2):607-17.
49. Pereira FEL. Degenerações Morte Celular Alterações do interstício. In Filho Brasileiro Geraldo. *Bogliolo Patologia.* 7.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan;2006.p.43-82.
50. Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2001 Jan-Mar;15(1):1-13.
51. Dagdeviren A, Muftuoglu SF, Cakar AN, Ors U. Endoglin (CD 105) expression in human lymphoid organs and placenta. *Ann Anat.* 1998 Oct;180(5):461-9.
52. Soares AB, de Araujo VC, Juliano PB, Altemani A. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in recurrent pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med.* 2009 Sep;38(8):623-9.
53. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 2003 Jun;17(9):984-92.
54. Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Mod Pathol.* 2005 Nov;18(11):1490-7.
55. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood.* 1996 Jan 1;87(1):1-13.
56. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial-cells. *Blood.* 1990;75(12):2417-26.
57. Wang JM, Kumar S, Pye D, van Agthoven AJ, Krupinski J, Hunter RD. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. *Int J Cancer.* 1993 May 28;54(3):363-70.
58. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res.* 1995 Dec;1(12):1623-34.
59. Kumar P, Wang J, Bernabeu C. CD 105 and angiogenesis. *J Pathol.* 1996 Apr;178(4):363-6.
60. Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today.* 1995 Sep;16(9):449-57.
61. Izawa D, Tanaka T, Saito K, Ogihara H, Usui T, Kawamoto S, et al. Expression profile of active genes in mouse lymph node high endothelial cells. *Int Immunol.* 1999 Dec;11(12):1989-98.

62. Anderson ND, Anderson AO, Wyllie RG. Specialized structure and metabolic activities of high endothelial venules in rat lymphatic tissues. *Immunology*. 1976 Sep;31(3):455-73.
63. Freemont A, Jones C. Light microscopic, histochemical and ultrastructural studies of human lymph node paracortical venules. *J Anat*. 1983 Mar;136(Pt 2):349-62.
64. Michie SA, Streeter PR, Bolt PA, Butcher EC, Picker LJ. The human peripheral lymph node vascular addressin. An inducible endothelial antigen involved in lymphocyte homing. *Am J Pathol*. 1993 Dec;143(6):1688-98.
65. Dargent JL, Lespagnard L, Verdebout JM, Bourgeois P, Munck D. Glomeruloid microvascular proliferation in angiomyomatous hamartoma of the lymph node. *Virchows Arch*. 2004 Sep;445(3):320-2.
66. Sottile J, Hocking DC. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell*. 2002 Oct;13(10):3546-59.
67. Velling T, Risteli J, Wennerberg K, Mosher DF, Johansson S. Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1. *J Biol Chem*. 2002 Oct 4;277(40):37377-81.
68. Mackie E, Halfter W, Liverani D. Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol*. 1988 Dec;107(6 Pt 2):2757-67.
69. Ruegg CR, Chiquet-Ehrismann R, Alkan SS. Tenascin, an extracellular matrix protein, exerts immunomodulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Oct;86(19):7437-41.
70. Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Nishikawa T, Ishiyama S, Shimojo T, Ohta Y et al. Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. *Lab Invest* 2001 Jul; 81(7):1015-24.
71. Gulubova M, Vlaykova T. Immunohistochemical assessment of fibronectin and tenascin and their integrin receptors alpha5beta1 and alpha9beta1 in gastric and colorectal cancers with lymph node and liver metastases. *Acta Histochem*. 2006;108(1):25-35.
72. Richtsmeier W, Shikhani A. The physiology and immunology of the pharyngeal lymphoid tissue. *Otolaryngol Clin North Am*. 1987 May;20(2):219-28.
73. Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Jul;289(1):G2-7.

8. APÊNDICE



APÊNDICE 1 – Imagem da Lesão Polipóide Sem Denominação Específica.

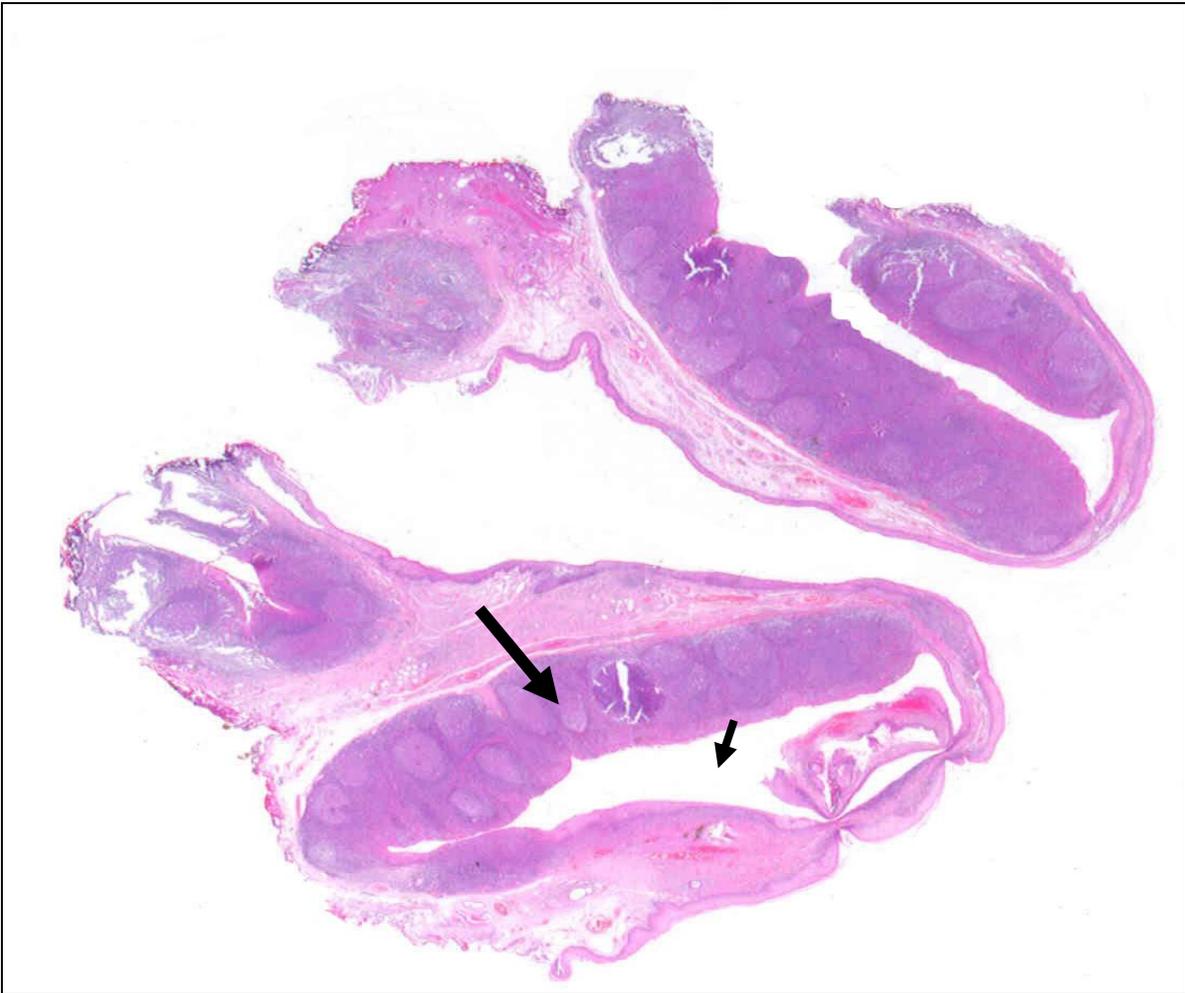


Figura 1: Lesão Polipóide sem denominação específica. Note a presença de tecido linfóide hiperplásico (**seta longa**) circundando uma cripta (**seta curta**) e ausência de eixo central (HE- imagem de lâmina digitalizada).

APÊNDICE 2 – Imagem do Pólipo Linfóide

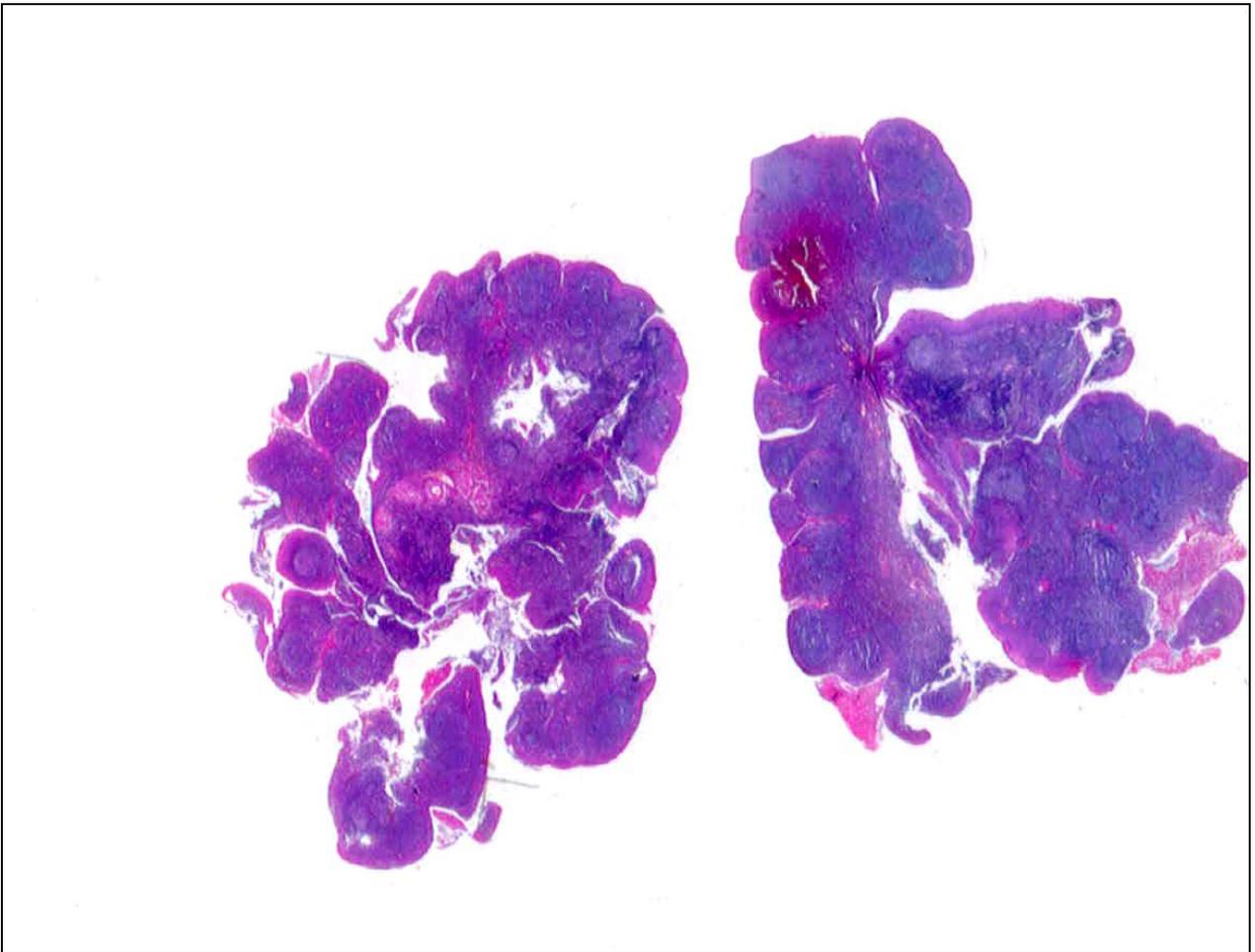


Figura 2: Pólipo Linfóide. Note que o tecido linfóide corresponde a mais do que 80% da lesão (HE- imagem de lâmina digitalizada).

APÊNDICE 3 – Imagem do Pólipo Não Linfóide

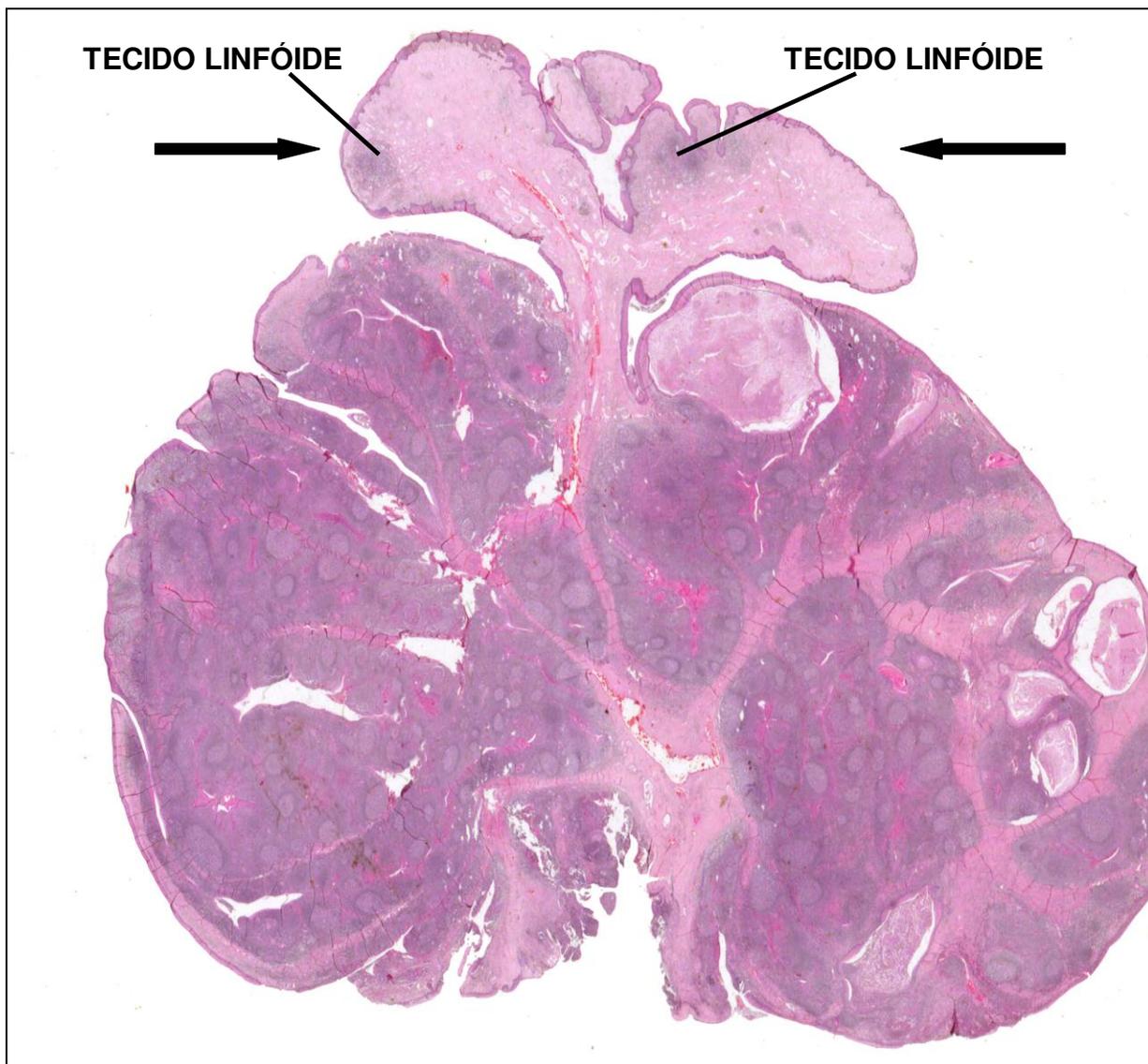


Figura 3: Pólipo Não Linfóide. Note que o tecido linfóide do pólipo (entre setas) corresponde a menos que 80% da lesão (HE- imagem de lâmina digitalizada).

APÊNDICE 4 - Informações das Lesões Tonsilares Utilizadas no Estudo.

Tabela 1: Dados demográficos, clínicos e morfológicos dos Pólipos Tonsilares e Lesões Polipóides Sem Denominação Específica

Caso	Idade	Gênero	História Clínica	Medidas dos Pólipos e Lesões Polipóides	Categoria Microscópica
71597	28 anos	M	Lesão vegetante, de aspecto papilomatoso, em pólo superior da amígdala direita	0,8 x 0,5 cm	Pólipo Linfóide
1541/93	20 anos	F	Lesão que atrapalha a deglutição há 40 dias, de crescimento abrupto	2,0 cm	Pólipo Linfóide
3486	14 anos	F	Amígdala esquerda hipertrófica	1,0 x 0,6 cm	Pólipo Linfóide
71393	17anos	M	Lesão vegetante no pólo superior da tonsila esquerda	1,2 x 0,5 cm	Pólipo Linfóide
12425	27anos	M	Disfagia há 4 meses e "caroço" na amígdala	1,5 cm	Pólipo Linfóide
6347	56 anos	M	"Caroço" na garganta há 4 meses. Disfagia e rouquidão há 2 meses	4,0 cm	Pólipo Linfóide
47771	9 anos	M	Tumor pediculado em tonsila palatina	1,0 x 0,8 x 0,2 cm	Pólipo Linfóide
12310	25 anos	F	Tonsila palatina esquerda	2,4 x 1,5 cm	Pólipo Não Linfóide
46309	53 anos	M	Síndrome de apnéia do sono	0,6 x 0,4 cm	Pólipo Não Linfóide
695/98	37anos	M	Roncos, disfagia, dispnéia	1,0 cm	Pólipo Não Linfóide
46045	25 anos	F	Nódulo de amígdala	0,6 x 0,3 cm	Pólipo Não Linfóide
60609	31 anos	M	Cisto de amígdala direita	1,5 x 0,6 cm	Pólipo Não Linfóide
10403066	22 anos	M	Tumor pediculado de amígdala direito	3,0 x 2,0 x 1,6 cm	Pólipo Não Linfóide
10177	42 anos	F	Tumor pediculado em amígdala esquerda	1,0 cm	Pólipo Não Linfóide
4449/96	52 anos	M	NI	0,6 cm	LPSDE
35029	52 anos	M	Lesão pediculada no pilar anterior amigdaliano direito	0,5 X 0,4 x 0,1 cm	LPSDE
48730-2	23 anos	F	Lesão vegetante em amígdala esquerda	0,5 X 0,2 cm	LPSDE
9793/98	81 anos	M	Disfonia há 3 meses	1,0 cm	LPSDE
45601	22 anos	M	Lesão amígdaliana há 1 ano e meio	0,6 X 0,2 cm	LPSDE

M- masculino; F-feminino;LPSDE- Lesão Polipóide Sem Denominação Específica; NI- não informado.

APÊNDICE 5 - Informações das Tonsilas Palatinas Controles Utilizadas no Estudo.

Tabela 2: Dados demográficos e histopatológicos das tonsilas controles

Número do caso	Gênero do paciente	Idade do paciente	Diagnóstico
B10285/95	M	21 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B10519/94	M	43 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B10542/01	F	24 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B10639/96	M	27 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B12966/93	M	10 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B13374/93	F	8 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B11182/99	F	55 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B2698/97	M	29 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B3672/02	M	10 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B3937/96	F	25 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B4114/96	M	35 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B4120/95	F	55 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B4696/94	F	20 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B5866/96	M	16 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B6431/02	F	22 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B623/96	M	25 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B10090/93	M	7 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B4027/96	F	29 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B5406/96	F	20 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B10087/93	F	15 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B3688/02	M	20 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B5509/94	M	36 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B8371/02	F	43 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B10355/93	M	16 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B856/98	M	24 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE
B11628/93	M	17 ANOS	HIPERPLASIA LINFÓIDE, SOE

M- masculino; **F-** feminino; **SOE-** sem outras especificações

APÊNDICE 6 – Avaliação da Densidade Microvascular e da Área Microvascular pelo D2-40, na Área Linfóide da Tonsila Controle.

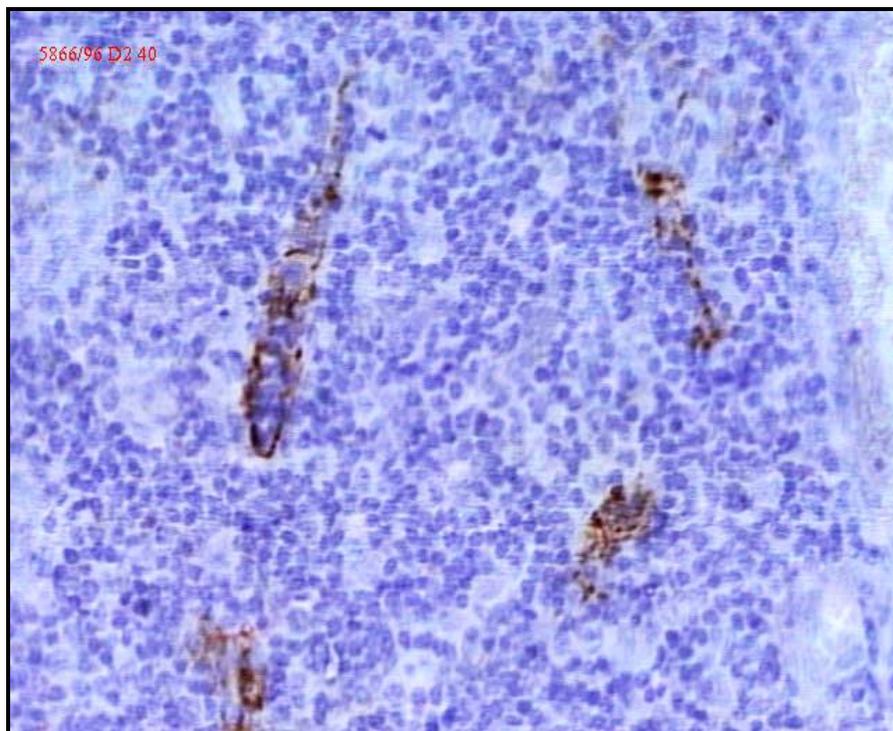


Figura 4: Tonsila Palatina Controle. Note a positividade (marrom) para D2-40, no endotélio vascular (imunoistoquímica- objetiva 40X).

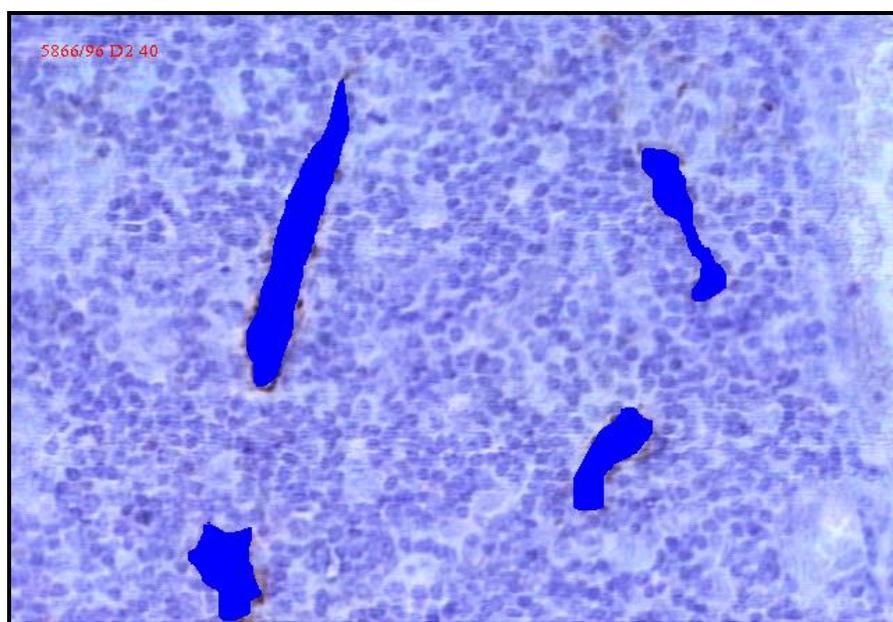


Figura 5: Tonsila Palatina Controle. Note a segmentação manual das áreas vasculares marcadas para D2-40 (da figura acima), através do software Imagelab (versão 2.4) (imunoistoquímica- objetiva 40X).

APÊNDICE 7 – Quadro com Dados Obtidos no Programa Imagelab, Referente às Figuras 4 e 5 do Apêndice.

Quadro 1: Alguns dados fornecidos pelo *software* Imagelab, relacionados às **figuras 4 e 5** do apêndice

Data	Dia: 30/ 7/105 Hora: 14: 0:19					
Imagem	Estrutura(C:\ATONSI~1\5866~1.96D\5.JPG)					
	Largura:	Altura:				%de regiões: 4,1%
	640	472				em relação a área total da imagem
Pixel						Densidade
Unidade:	Largura:	Altura:				<i>R</i> 9463,481
px	0,160800	0,084000				<i>G</i> 8947,043
						das áreas
						<i>B</i> 10182,576
						marcadas
						<i>Média</i> 9531,033
Dados Estatísticos	MORFOMETRIA			ABSORÇÃO DE COR		
	Área	Perímetro	Fator de forma	R	G	B
Número:	4	4	0	4	4	4
Soma:	168,885	146,612	0,000	1598236,500	1511018,016	1719680,500
Média:	42,221	36,653	#DIV/0!	399559,125	377754,504	429920,125
Desvio Padrão:	22,270	13,215	#DIV/0!	202917,358	195079,954	236220,089
Valor Máximo	75,526	55,521	0,000	701925,000	668304,188	781412,375
Valor Mínimo	29,108	27,461	0,000	276311,438	256485,641	277747,094
Significância 5%	21,824	12,950	#DIV/0!	198854,953	191174,453	231490,963
Significância 1%	28,682	17,019	#DIV/0!	261340,310	251246,398	304231,396

APÊNDICE 8 - Avaliação da Densidade Microvascular e da Área Microvascular pelo D2-40, no Pólipo Não Linfóide.

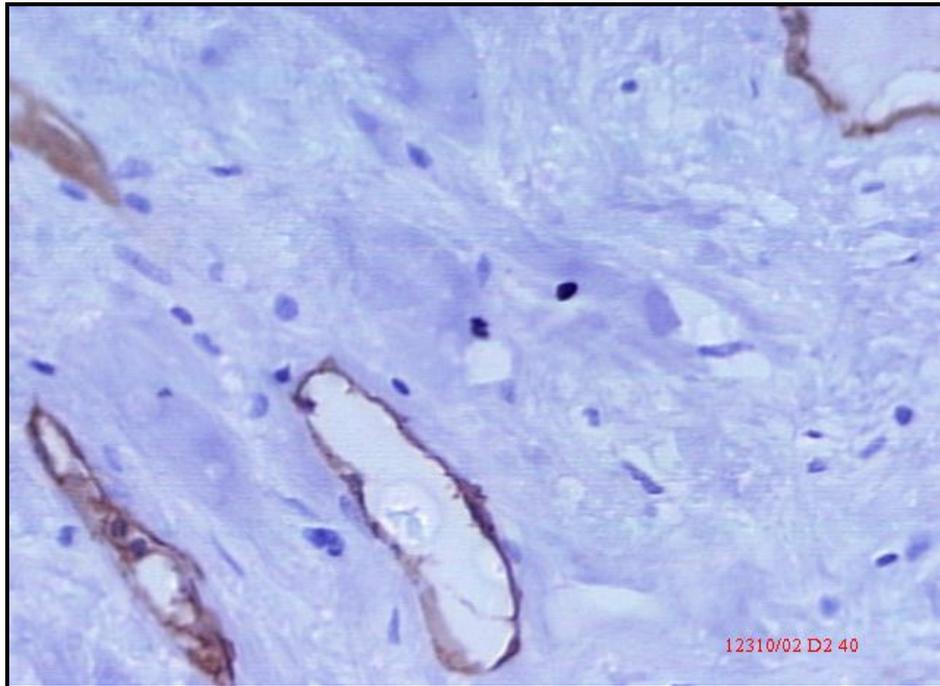


Figura 6: Pólipo Não Linfóide. Note a positividade (marrom) para D2-40, no endotélio vascular linfático (imunistoquímica- objetiva 40X).

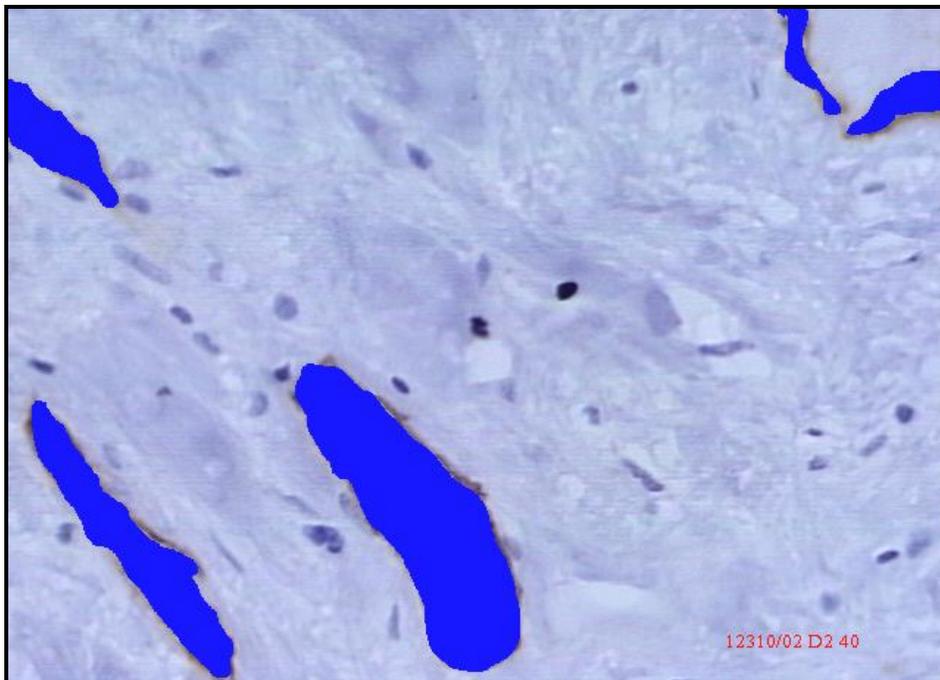


Figura 7: Pólipo Não Linfóide. Note a segmentação manual das áreas vasculares marcadas para D2-40 (da figura acima), através do *software* Imagelab (versão 2.4) (imunistoquímica- objetiva 40X).

APÊNDICE 9 - Quadro com Dados Obtidos no Programa Imagelab, Referente às Figuras 6 e 7 do Apêndice.

Quadro 2: Alguns dados fornecidos pelo *software* Imagelab, relacionados às **figuras 6 e 7**, do apêndice

Data	Dia: 12/ 5/105 Hora: 9: 2:13					
Imagem	C:\A_ICLÉ~1\CONTAG~1\PÓLIPO~2\12310.JPG					
	Largura:	Altura:	%de regiões:		8,6%	
	640	472	em relação a		área total da imagem	
Pixel						
Unidade:	Largura:	Altura:	Densidade	R	9691,482	
mm	0,160800	0,084000	óptica média	G	9473,056	
			das áreas	B	10451,874	
			marcadas	Média	9872,137	
Dados Estatísticos						
	MORFOMETRIA			ABSORÇÃO DE COR		
	Área	Perímetro	Fator de forma	R	G	B
Número:	5	5	0	5	5	5
Soma:	348,874	218,965	0,000	3381104,500	3304901,578	3646385,672
Média:	69,775	43,793	#DIV/0!	676220,900	660980,316	729277,134
Desvio Padrão:	72,583	21,994	#DIV/0!	767958,363	780908,196	893359,806
Valor Máximo	189,179	71,150	0,000	1979855,750	2004423,125	2274402,000
Valor Mínimo	13,499	25,045	0,000	103932,313	95525,781	99457,563
Significância 5%	63,621	19,278	#DIV/0!	673131,447	684482,244	783048,415
Significância 1%	83,612	25,336	#DIV/0!	884646,714	899564,225	1029102,430

APÊNDICE 10 - PARECER DO COMITE DE ÉTICA E PESQUISA.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 28/06/06.
(PARECER PROJETO 493/2003)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “PÓLIPOS TONSILARES COM COMPONENTES FIBROSO, LINFÓIDE E LINFANGIOMATOSO - ESTUDO HISTOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E IMUNOHISTOQUÍMICO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Icléia Siqueira Barreto

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui o projeto de pesquisa intitulado “**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA COMPOSIÇÃO ESTROMATO-VASCULAR DOS PÓLIPOS TONSILARES**”, com a finalidade de tese de doutorado da aluna Icléia Siqueira Barreto, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de junho de 2006.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3788-8936
FAX (019) 3788-7187
cep@fcm.unicamp.br

APÊNDICE 11 – Artigo Científico Submetido.

**Immunohistochemical study of stromal and vascular components
of tonsillar polyps: high endothelial venules as participants of the
polyp's lymphoid tissue.**

Icléia Barreto¹, Ana Flávia Costa¹, Marília Trierveiler Martins², Cristiane
Furuse³, Vera Cavalcanti de Araújo³, Albina Altemani¹

¹Department of Pathology, Medical Science Faculty, University of Campinas (UNICAMP),
Campinas, Brazil.

²Department of Oral Pathology, School of Dentistry, University of São Paulo (USP), São
Paulo, Brazil.

³Department of Oral Pathology, São Leopoldo Mandic Institute and Research Center,
Campinas, Brazil.

Corresponding author: Albina Altemani, Departamento de Anatomia
Patológica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Rua Tessália Vieira
de Camargo 126, ZIP Code 13084-971 Campinas, SP, Brazil

Phone/Fax number: 55-19-3289 3897

E-mail: aaltemani@uol.com.br

Running Title: Tonsillar polyp: stromal and vascular components

Key words: Tonsillar polyps, immunohistochemistry, stromal component; vascular
component.

SUMMARY

Tonsillar polyps are nonneoplastic lesions usually composed of variable amounts of lymphoid, vascular and connective tissues. All are generally assumed to be hamartomatous proliferations but the profile of vascular and connective components has yet to be explored. The vascular system of the tonsils is complex and includes highly specialized structures (i.e. high endothelial venules-HEVs) involved in lymphocyte homing into lymphoid tissues.

In 14 tonsillar polyps and 26 control tonsils an immunohistochemical study was performed using CD34 (blood vessels and HEVs), CD105 (HEVs), D2-40 (lymphatic vessels), Ki-67, collagens I and III, fibronectin and tenascin-C. The polyps showed increased total lymphatic area, whereas the number of blood vessels and lymphatics and the blood vascular area did not differ significantly from those of control tonsils. Rare Ki-67+ endothelial cells were found. In the polyps we detected, possibly for the first time, HEVs amid lymphoid tissue, and that the amount of the latter correlated positively with HEV density. The polyps also presented lesser amounts of fibronectin and collagens I and III than in normal tonsils, which were distributed in a disorganized fashion. Tenascin-C expression was uncommon in the polyps and control tonsils.

Tonsillar polyps are composed of disorganized connective tissue and lymphatic channels which can be considered hamartomatous proliferations. However, the lymphoid component is possibly reactive due to its relationship with the HEVs. The highly differentiated phenotype of the HEVs and their complex biology are not in agreement with what would be expected for a component of hamartomatous nature.

INTRODUCTION

Tonsillar polyps are uncommon nonneoplastic lesions, which may clinically be mistaken for malignant neoplasms (Kardon et al., 2000). They are composed of variable amounts of different tissues, and in the literature, these lesions have been variously referred to as lymphoid, lymphangiomatous, lymphangiectatic fibrous or only fibrous polyps (Kardon et al., 2000; Pilch, 2007; Barreto et al., 2007; Wenig, 2008). Recently, we have shown that lymphoid polyps are clinically comparable to the reported ones with non-lymphoid tissue predominance, i.e. those composed mainly of connective tissue and/ or dilated lymphatic vessels (Kardon et al., 2000; Barreto et al., 2007). Both types are unilateral and affect mainly young individuals. Apparently they are not preceded by a predisposing factor and are successfully treated by complete excision.

Regarding the pathogenesis of tonsillar polyps, two hypotheses have been proposed: a) hamartomatous overgrowth of tonsillar tissues (the most accepted origin) and b) chronic inflammatory hyperplasia resulting in irreversible obstruction of the lymphatics vessels and lymphangiectasia (Hiraide et al., 1985; Heffner, 1987; Kardon et al., 2000; Pilch, 2007; Barreto et al., 2007). However, to date both hypotheses have been based either on histological observations only or on immunohistochemical findings, in which the vascular component of the polyps was not fully explored. The vascular system of the tonsils is complex and includes highly specialized structures involved in lymphocyte homing into lymphoid tissues, such as the high endothelial venules (HEV) (Perry and Whyte, 1998; Van Kempen et al., 2000). Therefore, whether the immunoprofile of the vascular component of the tonsillar polyps presents a parallel with that of the tonsils is a question yet to be verified. Furthermore, despite connective tissue being a prominent component of the tonsillar polyps, no data are available on its composition. The connective tissue is comprised of a large

number of elements with varying structural and cell regulatory functions (Mutsaers et al., 1997). Some are ubiquitously distributed whereas others, such as tenascin and myofibroblasts, are mainly associated with tissue remodeling (Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003; Midwood et al., 2004; Desmoulière et al., 2005). Remodeling of the extracellular matrix would be worth investigating due to its potential involvement in the formation of tonsillar polyps.

In order to broaden our understanding of the pathogenesis of tonsillar polyps, in a series of lesions containing variable amounts of different tissues we: a) performed a morphometric study of the vascular component using antibodies specific for blood and lymphatic vessels, and b) verified the location and abundance of a set of molecules of the extracellular matrix. In addition, we compared the findings with those in control tonsils (without polyps) and, in six cases, we studied the polyp along with the parent tonsil.

MATERIAL AND METHODS

The present study was approved by the Committee of Ethics of the University of Campinas, Brazil and was performed in 14 tonsillar polyps and 26 palatine tonsils removed for non-neoplastic reasons (control tonsils). The cases, which were diagnosed between 1983 and 2008, were retrieved from the files of the Department of Pathology of the University of Campinas. Demographic and clinical information was collected from review of the patients' medical records. The group of tonsillar polyps included 9 men and 5 women, average age 29 (9 - 53 years), average size of the lesion 1.5 cm (range 0.6 to 4.0 cm) and all were described as polypoid masses arising from the surface of the tonsil. The control tonsils were from patients between 08 and 55 years of age (mean 25.3 years). All polyps were reviewed by two pathologists (AA and IB) using 5µm sections obtained from formalin-fixed paraffin

embedded samples and routinely stained with hematoxylin-eosin.

Immunohistochemistry

One paraffin block from each case was chosen for the immunohistochemical study. The following antibodies (Table 1) were used: CD34 for blood vessels and HEVs (Perry et al, 1992; Fox and Harris, 2004), CD105 for HEVs (Dağdeviren et al., 1998), D2-40 for lymphatic vessels (Evangelou et al., 2005), Ki-67 for proliferating endothelial cells, α -smooth-muscle actin (α -SMA) for myofibroblasts (Tomasek et al., 2002), and collagens I and III, fibronectin and tenascin-C for proteins of the extracellular matrix.

Single-staining for CD34, CD105, D2-40, α -SMA, collagens I and III, fibronectin and tenascin-C were carried out using the EnVision System (DAKO, Denmark). Briefly, 5 μ m sections from each paraffin block were deparaffinized, hydrated and endogenous peroxidase activity was quenched by immersion of the slides in 3% hydrogen peroxide. The antigen retrieval (AR) was achieved by boiling them in a steamer immersed in citrate buffer (pH: 6.0) except for CD105. For this antibody AR was performed using 0.4% pepsin for 30 minutes (Table 1). Only the sections for CD 105 were incubated at 37° C with protein block serum free (code x0909, Dako, SA, Denmark) for 30 minutes. Subsequently, for all antibodies the sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody and afterwards with the EnVision polymer HRP and Envision+ (code K1491, DAKO, SA, Denmark) for 1h at 37°C. Sections were stained for 5min at 37°C with 3.3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) and counter-stained with hematoxylin. Negative controls were run by omitting primary antibodies.

Double-labelling immunohistochemical staining (EnVision doublestain, code K1395, Dakopatts S/A, Denmark) was performed for Ki67/ D2-40. Briefly, anti-Ki67 was applied after antigen retrieval using Tris-EDTA buffer (pH: 8.9) and incubated overnight at 4°C; detection was achieved using the EnVision polymer HRP and DAB to visualize the binding of the first antibody. The sections were then incubated with a second antibody against D2-40 at 4°C overnight. EnVision polymer linked to alkaline phosphatase and fast red as a substrate chromogen system were used to complete the second immunostaining.

Microvessel Density (MVD) and Microvessel Area (MVA) Assessments for CD34 and for D2-40

The most vascularized areas at low power magnification (hotspots) within each polyp and control tonsil (interfollicular lymphoid tissue) were chosen for quantitative analysis. In the hotspots areas, three digital images per case were obtained using a CCD camera adapted to an Olympus CX30 microscope (X40 objective, 0.44 mm field diameter) and analyzed with Imagelab analysis software (version 2.4), which allows manual segmentation of target areas (vessels). MVD for CD 34 as well as for D2-40 was considered the mean number of microvessels. MVA was the area occupied by microvessels per unit area of the polyp or of the interfollicular lymphoid tissue of the control tonsil, i.e. that correspondent to one field using the X40 objective - 0.152 mm². Lymphatic endothelial proliferation was assessed by counting the number of Ki-67 positive lymphatic endothelial cells per lymphatic vessel.

Statistical Analysis

Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test were used for comparison of the variables between the different groups as appropriate. Data were presented as mean + SD, and the results with $p < 0.05$ were considered significant. All the statistical procedures were performed using the statistical analysis was performed with SPSS software for Windows,

version 12.0 (SPSS® Inc. Illinois, USA).

RESULTS

The tonsillar polyps were classified according to the amount of the lymphoid component, $<$ or \geq 80% of the lesion, in non-lymphoid and lymphoid types, respectively (Barreto et al, 2007). Both types of polyps were covered by squamous epithelium and contained varying amounts of connective tissue and vessels (Fig 1). In the non-lymphoid polyps, the few lymphoid nodules were usually located in the periphery of the lesion and some of them contained small germinal centers. Adipose tissue was found only in this type of polyp (usually in small quantity). The lymphoid polyps showed frequent follicles with germinal centers of variable size, short crypts lined by lymphoepithelium and small amount of connective tissue and vessels, which were located in the central portion of the lesion.

Vascular component

The table 2 shows MVD and MVA for CD34 and D2-40 in the tonsillar polyps and control tonsils. In lymphoid and non-lymphoid polyps, the number of blood vessels and lymphatics and the blood vascular area did not differ significantly from those of control tonsils whereas the lymphatic vascular area was significantly increased. In only one case (a non-lymphoid polyp) dual immunohistochemistry using D2-40 and the cell proliferation marker Ki-67 revealed the existence of rare proliferating lymphatic endothelial cells.

In the control tonsils, CD34 and CD105 positive vessels with morphological appearance of HEVs were numerous and located in interfollicular and lymphoepithelial areas (Fig 2A and B). In the tonsillar polyps, HEVs were always related to the lymphoid tissue. They were frequent in the lymphoid polyps (Fig. 2C, D), although less numerous than in the control tonsils, and rare in the non-lymphoid ones (Fig. 2 E, F).

Expressions of fibronectin, collagens I and III and tenascin

Fibronectin: in the control tonsils, this protein was found in large amount in the connective tissue of the septa and capsule (Fig. 3A) and in the vascular walls, particularly in the blood vessels, including capillaries and HEVs. In the septa and capsule, fibronectin fibrils were arranged in an organized fashion, i.e., in bundles. Some small foci were also found underneath the epithelium covering the tonsillar surface or crypts. In these two regions, the foci were encountered mainly in areas with loss of the lymphoepithelium pattern. In the polyps, no expression of fibronectin or low amounts of the protein was found, particularly in the non-lymphoid ones (Fig 3B, C). The fibronectin fibrils were arranged in a disorganized fashion in all lesions and this alteration was more evident in the non-lymphoid polyps.

Tenascin: only discrete foci of this protein were found in the control tonsils as well as in the polyps. Tenascin positive foci were usually located underneath the squamous epithelium that covered the polyps or underneath the altered crypt epithelium, i.e. without the lymphoepithelial characteristics (Fig. 3D, E, F). In some cases, the reticular fibers of the lymphoid tissue of the tonsils expressed tenascin in small areas.

Collagens I and III: these proteins were found in larger amounts in the control tonsils (Fig. 4A, B) than in the polyps (Fig. 4B, C, E, F) and presented patterns of distribution and organization similar to that of fibronectin. In the control tonsils, collagen I and III fibers were arranged in bundles in the septa and capsule whereas in the polyps they were distributed in a disorganized fashion.

Myofibroblasts: few α -SMA positive cells were found in the septa of the control tonsils and in the connective tissue of the polyps.

DISCUSSION

The tonsils are lymphoepithelial organs capable of a variety of complex immunological functions which are initiated in specialized compartments, namely crypt epithelium (lymphoepithelium), lymphoid follicles and extrafollicular region (Perry and Whyte, 1998). In the blood vascular system of the tonsils, HEVs are the structures that control lymphocyte recruitment from the blood (Perry and Whyte, 1998). A cascade of adhesive interactions between circulating lymphocytes and the specialized endothelial cells of the HEVs mediate lymphocyte homing in both interfollicular and lymphoepithelial areas (Van Kempen et al., 2000). Besides CD34 and ICAM-1 (expressed on the HEV endothelium and involved in the lymphocyte trafficking), CD105 also presents a distinctly stronger staining pattern in these structures (Perry et al., 1992; Perry and Whyte, 1998; Dağdeviren et al., 1998). Regarding the lymphatic system, in contrast to lymph nodes which depend on antigenic delivery through afferent lymphatics, the tonsils possess only efferent lymphatics (Perry and Whyte, 1998; Van Kempen et al., 2000).

In the current series, we showed that, regardless of the morphological appearance of the tonsillar polyps, lymphatic vascular area but not the number of lymph vessels was increased in the majority of lesions when compared with control tonsils. Therefore, tonsillar lymphangectatic polyp can be considered the most adequate term for these lesions, even for those referred to as lymphoid polyps (>80% composed of lymphoid tissue) (Barreto et al, 2007). Furthermore, our results suggest that the lymphoid tissue of the polyps is possibly reactive due to its relationship with the HEVs, which seem to have their functions preserved and, consequently, supporting the lymphocyte recruitment into the lesion.

It is believed that postcapillary venules differentiate from primitive capillaries in

response to steady, slow blood flow and low pressure and that the local environment plays a critical role to maintain all of the specialized features of the HEVs (Thurston et al., 2000; Lacorre et al., 2004). A great body of evidence suggests that cytokines produced locally, extracellular matrix proteins surrounding the high endothelial cells and interdigitating dendritic cells are involved in the induction and maintenance of the specialized HEV phenotype (Girard and Springer, 1995). By definition, hamartomas are disorganized proliferations of tissues indigenous to the area in which they arise (Stricker and Kumar, 2010). Therefore, the highly differentiated phenotype of the HEVs and their complex biology are not in agreement with what would be expected for a component of hamartomatous nature. Furthermore, our previous findings in lymphoid polyps showing that the lymphoid component of the polyps maintains an architectural pattern and cellular composition similar to those of the palatine tonsil (Barreto et al, 2007), reinforce our current assumption that this tissue represents reactive proliferation.

The dilated appearance of the lymphatic channels along with the fact that tonsils possess only efferent lymph vessels led us to verify the hypothesis whether inflammatory hyperplasia with obstruction of lymphatic channels could be a contributing factor for the polyp formation (Hiraide et al., 1985). Nevertheless, no evidence of lymphatic obstruction was found in the polyps or in the tonsils removed along with the lesion. In addition, myofibroblasts and tenascin-C were not detected in significant quantities as it would be expected of a tissue that had underwent remodeling associated to inflammatory hyperplasia (Desmoulière et al., 2005; Chiquet-Ehrismann, 2004). The small foci of tenascin-C expression found in the polyps as well as in the tonsils were located in areas in which it is expected some degree of tissue remodeling due to traumatism (underneath the squamous epithelium which covers the polyps) or ordinary infection of the tonsils (underneath the

damaged crypt epithelium). Taken together these findings suggest that the dilated channels in the tonsillar polyps are results of disorganized overgrowth of lymphatic vessels rather than consequence of a chronic obstruction to the lymphatic flow.

In the current study, we also compared the expression of proteins of the extracellular matrix between tonsillar polyps and palatine tonsils. Collagens I and III and fibronectin participate in tissue architecture and are ubiquitously distributed (Mutsaers et al., 1997). In terms of function, the deposition of extracellular matrix fibronectin fibrils is important in regulating the organization and maintenance of type I and III collagen fibrils (Sottile and Hocking, 2002). In the tonsils, we found deposition of these three proteins in large amounts and arranged in an organized fashion in the tonsillar septa and capsule. In the tonsillar polyps, fibronectin and collagens I and III presented a disorganized pattern of distribution reinforcing the hamartomatous nature of this component. Furthermore, despite the fact that in the literature some tonsillar polyps have been termed fibrous polyps (Nayak et al., 1993; Sah et al., 2000), in our series the expression of fibrillar proteins in the polyps, such as collagens I and III and fibronectin, was markedly low. This finding was observed even in the lesions composed predominantly of connective tissue or in those that formed a continuum with the tonsillar septum. Taken together our results suggest that the connective tissue of the polyps presents modifications of the extracellular matrix regarding organization as well as composition. The extracellular matrix is an important substrate for tissues morphogenesis, imparting instructive signals for cell proliferation, migration and differentiation (Mutsaers et al., 1997; Jones and Jones, 2000; Sottile and Hocking, 2002). Therefore, it would be reasonable to hypothesize that alteration of the matrix extracellular may be an important event in the pathogenesis of the tonsillar polyps.

In conclusion, the tonsillar polyps are lymphangiectatic lesions where the lymphoid

tissue is reactive and closely associated with the hamartomatous proliferation of the connective tissue and lymphatic channels.

ACKNOWLEDGMENT

This work was funded by FAPESP- grant number 04/13759-6

Competing interests: None.

Ethics approval: The present study was approved by the Committee of Ethics of the University of Campinas, Brazil.

REFERENCES

- Barreto I, Juliano P, Chagas C, Altemani A. (2007). Lymphoid polyps of the palatine tonsil. *Int J Surg pathol.* 15: 155-9.
- Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. (2003). Tenascins: Regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol.* 200: 488-99.
- Chiquet-Ehrismann R. (2004). Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 986-90.
- Dağdeviren A, Müftüoğlu SF, Cakar AN, Ors U. (1998). Endoglin (CD 105) expression in human lymphoid organs and placenta. *Ann Anat.* 180(5):461-9.
- Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. (2005). Tissue repair, contraction, and myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 13(1):7-12.
- Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. (2005). Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Mod Pathol.* 18:1490-1497.
- Fox SB & Harris AL. (2004). Histological quantitation of tumour angiogenesis. *APMIS.* 112: 413-430.
- Girard JP, Springer TA. (1995). High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today.* 16: 449-457.
- Heffner DK. (1987). Pathology of the tonsils and adenoids. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 20 (2): 279-86.
- Hiraide F, Inouye T, Tanaka E. (1985). Lymphangiectatic fibrous polyp of the palatine tonsil: a report of three cases. *J Laryngol Otol.* 99: 403-9.
- Jones FS, Jones PL. 2000. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn.* 218:235-59.
- Kardon D E, Wenig BM, Heffner DK, Thompson LD.(2000). Tonsillar lymphangiomatous polyps: a clinicopathologic series of 26 cases. *Mod Pathol.* 13: 1128-33.
- Lacorre DA, Baekkevold ES, Garrido I, Brandtzaeg P, Haraldsen G, Amalric F, Girard JP. (2004). Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. *Blood.* 103: 4164-72.

- Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. (2004). Tissue repair and dynamics of extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 1031-37.
- Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laurent GJ. (1997). Mechanisms of tissue repair: wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Biol.* 29: 5-17.
- Nayak DR, Murthy PS, Gopalakrishna RK, Padhee A. (1993). Fibroma of the tonsil. *J Indian Med Assoc.* 91: 108.
- Perry, ME, Brown, KA, von Gaudecker, B. (1992). Ultrastructural identification and distribution of the adhesion molecules ICAM-1 and LFA-1 in the vascular and extravascular compartments of the human palatine tonsil. *Cell Tissue Res.* 268:317-26.
- Perry M, Whyte A. (1998). Immunology of the tonsils. *Immunol Today.* 19: 414-21.
- Pilch BZ. (2007). The nasopharynx and Waldeyer's ring. In Pilch BZ. *Head and Neck Surgical Pathology.* Lippincott Williams & Wilkins. (eds). Philadelphia. pp 159-94.
- Sah SP, Bahadur KC, Rani S. (2000). Lymphangiectatic fibrolipomatous polyp of the palatine tonsil. *Indian J Pathol Microbiol.* 43: 449-51.
- Sottile J, Hocking DC. (2002). Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell.* 13: 3546-59.
- Stricker TP, Kumar V. (2010). Neoplasia. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Robbins and Cotran. (eds). *Pathologic Basis of Disease.* 8th Professional Edition. China: Saunders Elsevier; 2010. p. 259-330.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 349-63.
- Thurston G, Baluk P, McDonald DM. (2000). Determinants of endothelial cell phenotype in venules. *Microcirculation.* 7:67-80.
- Van Kempen MJP, Rijkers GT, Van Cauwenberge PB. (2000). The Immune Response in Adenoids and Tonsils. *Int Arch Allergy Immunol.* 122: 8-19.
- Wenig BM. (2008). Oral cavity, nasopharynx and oropharynx. In: *Atlas of Head and Neck pathology,* 2nd ed. Wenig BM, Heffess CS. (eds). Saunders Elsevier Press: China. pp 163-401.

LEGENDS

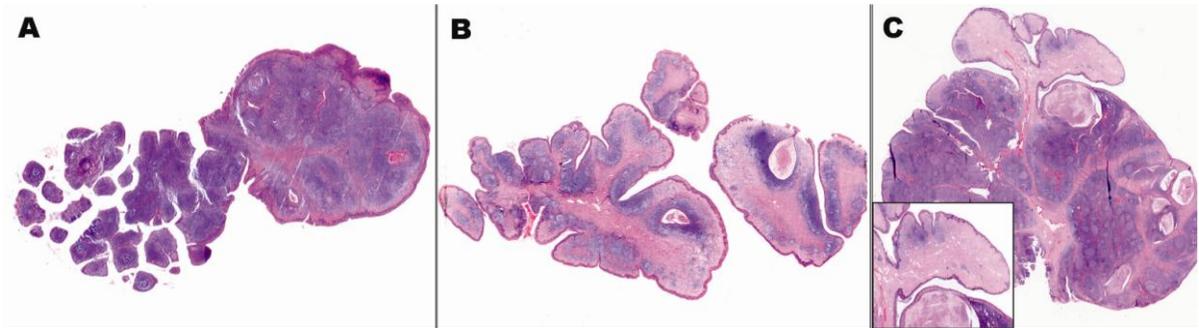


Figure 1: Lymphoid (A) and non-lymphoid (B, C) polyps. Note the non-lymphoid polyp along with the parent tonsil (C) (hematoxylin & eosin, original magnification X5, X3, X3, respectively).

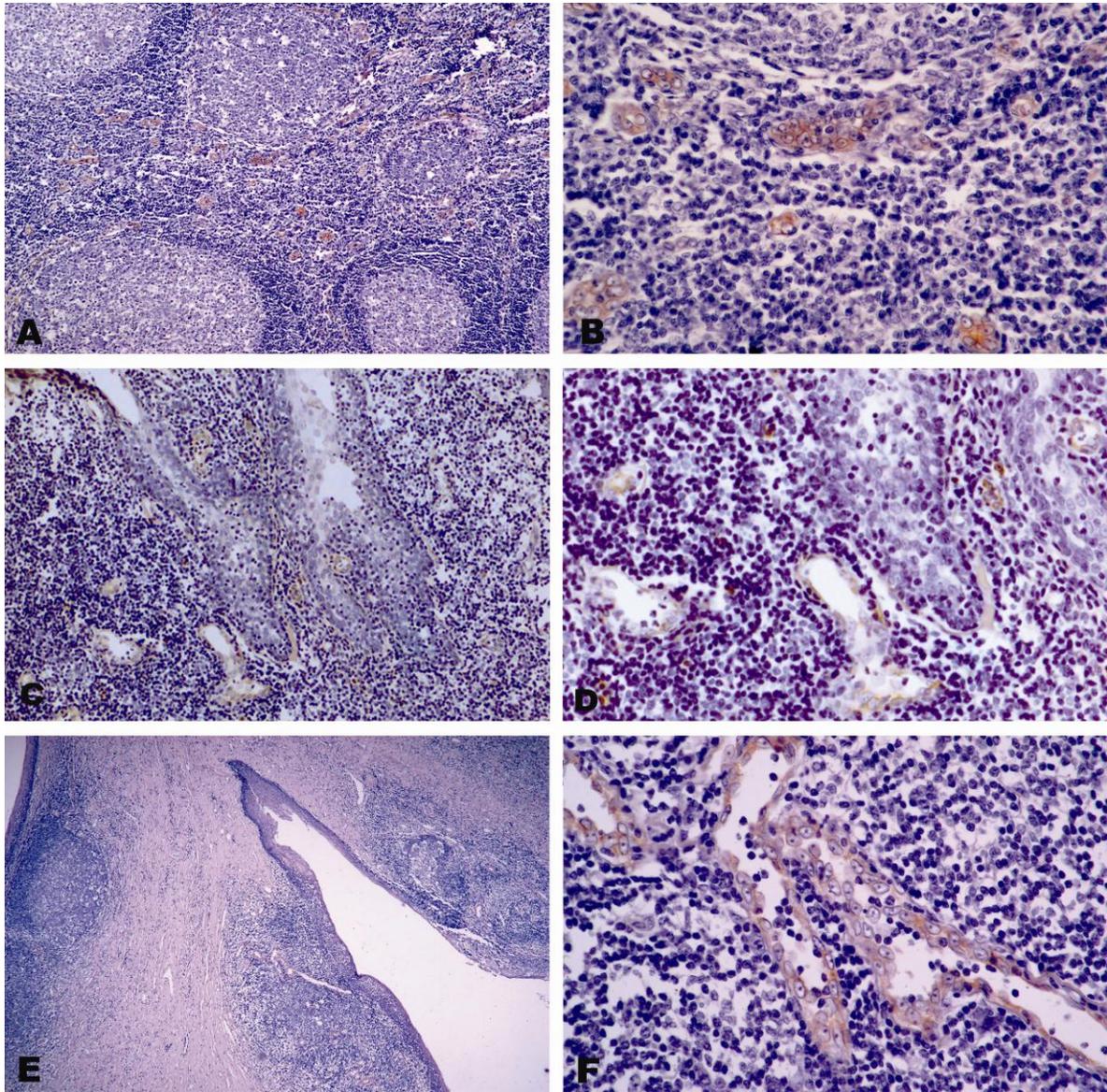


Figure 2: CD105 positive HEVs amid lymphoid tissue in tonsil (A, B) and lymphoid (C, D) and non-lymphoid (E, F) polyps (immunohistochemistry, original magnification A and E X100, C X200, B, D, F X400).

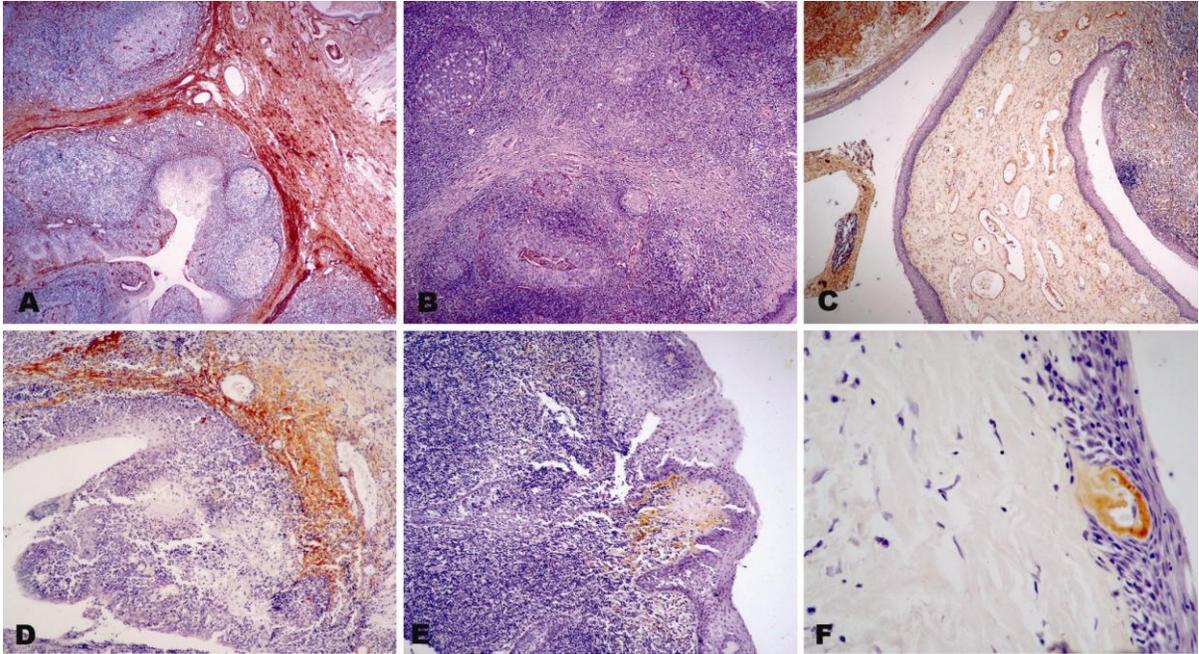


Figure 3: Expressions of fibronectin (A, B, C) and tenascin-C (D, E, F) in tonsils (A, D) and lymphoid (B, E) and non-lymphoid polyps (C, F). Note low or no expression of these proteins in the polyps (immunohistochemistry, original magnification A, B, C, D, E X100, F X400).

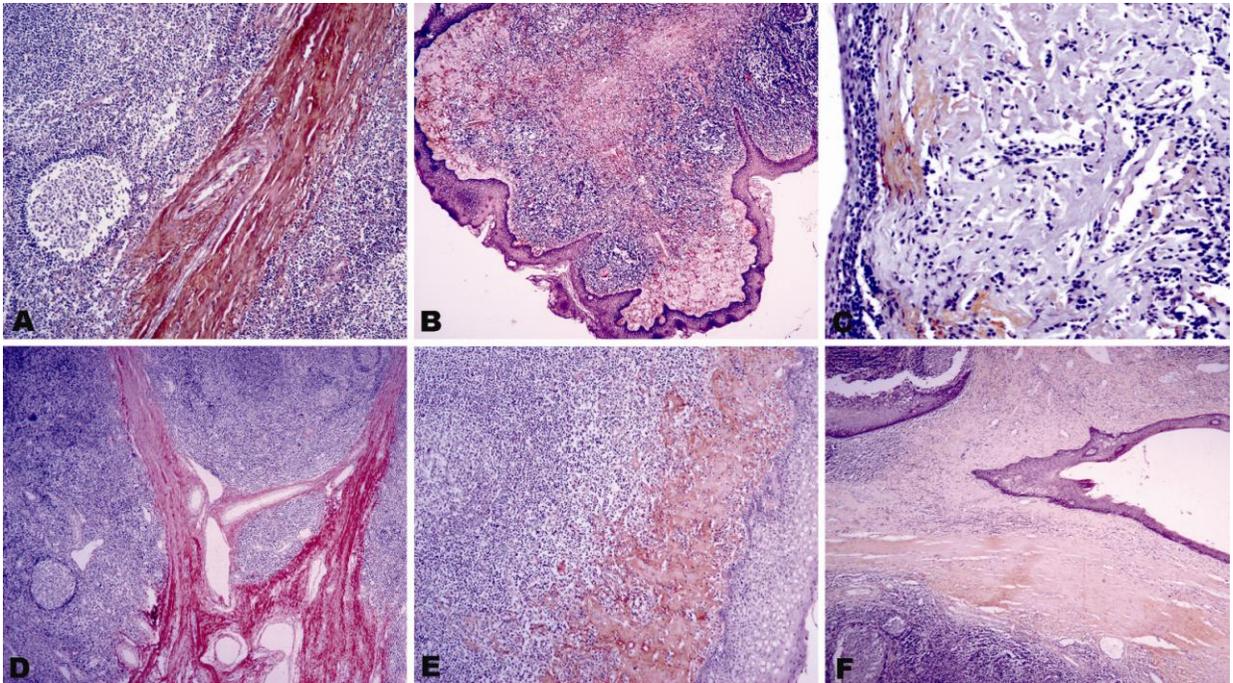


Figure 4: Expressions of collagens I (A, B, C) and III (D, E, F) in tonsils (A, D) and lymphoid (B, E) and non-lymphoid polyps (C, F). Note low or no expression of these proteins in the polyps (immunohistochemistry, original magnification A, B, D X100, E and F X200, C X400).

Table 1. Details of the antibodies used for immunohistochemistry

Specificity	Clone	Isotype	Dilution	Source	Buffer
CD34	QBEnd	IgG1	1:50	DAKO*	Citrate
CD105	SN6h	IgG	1:10	DAKO*	Pepsin
D2-40	D2-40	IgG1	1:200	DAKO*	Tris-EDTA
Ki-67	MIB-1	IgG1	1:150	DAKO*	Tris-EDTA
α -SMA	1A4	IgG2	1:200	DAKO*	Citrate
Collagen I	Polyclonal	IgG	1:75	Biogenesis [€]	Pepsin
Collagen III	4B11.1	IgG1	1:300	Chemicon ^{&}	Pepsin
Tenascin-C	T2H5	IgG1	1:300	NeoMarkers [#]	Pepsin
Fibronectin	Polyclonal	IgG	1:1700	DAKO*	Pepsin

* Dako Corporation Glostrup, Dinamarca.; [€] Biogenesis, Poole, UK; & Chemicon,

Millipore Corporate,USA; [#] NeoMarkers, Thermo Scientific, USA.

Table 2. MVD and MVA in tonsillar polyps and control tonsils.

Group	MVD		MVA	
	(mean ± SD)		(mean ± SD)	
	CD34	D240	CD34	D240
Lymphoid polyps	8.38±3.54	5,24±1.25	4.70±2.12	7.65±4.19*
Non-lymphoid polyps	6.10±2.92	3.71±0.37	9.22±8.55	11.6±9.19#
Control tonsils				
(lymphoid area)	10.15±5.07	5.17±2.44	6.75±6.02	3.03±1.76
p (Kruskal-Wallis test)	p=0.083	p=0.057	p=0.554	p=0,001

* Mann-Whitney test , p=0.002; # Mann-Whitney test, p= 0.004