



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA  
CURSO DE MESTRADO

CECÍLIA EVELLYN DA SILVA

**ANÁLISE DA PRESENÇA DO *PAPILOMAVÍRUS HUMANO* E DA EXPRESSÃO  
IMUNOHISTOQUÍMICA DA P16INK4a EM AMOSTRAS DE TUMOR DE PULMÃO**

Recife  
2023

CECÍLIA EVELLYN DA SILVA

**ANÁLISE DA PRESENÇA DO *PAPILOMAVÍRUS HUMANO* E DA EXPRESSÃO  
IMUNOHISTOQUÍMICA DA P16INK4a EM AMOSTRAS DE TUMOR DE PULMÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Orientador (a): Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Coorientador (a): Prof. Dr. Giwellington Silva Albuquerque

Linha de Pesquisa: Morfologia e Métodos Clássicos e Avançados

Recife

2023

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Silva, Cecília Evellyn da.

Análise da presença do papilomavírus humano e da expressão imunohistoquímica da P16INK4a em amostras de tumor de pulmão. / Cecília Evellyn da Silva. – 2023.

64 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto.

Coorientador: Giwellington Silva Albuquerque.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, 2023.

Inclui referências.

1. Câncer de pulmão. 2. Oncoproteínas. 3. Papilomavírus humano. 4. P16INK4a. I. Silva Neto, Jacinto da Costa. (orient.). II. Albuquerque, Giwellington Silva. (Coorient.). III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-091

## **CECÍLIA EVELLYN DA SILVA**

### **"Análise da presença do *papilomavírus humano* e da expressão imunohistoquímica da p16INK4a em amostras de tumor de pulmão "**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 28/02/2023.

#### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto  
(Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório  
(Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Juliana Pinto de Medeiros  
(Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Carina Scanoni Maia  
(Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que me ajuda a seguir meu caminho, sempre me dando a força necessária para vencer os obstáculos.

Aos meus pais, Carmem e Edson, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, incentivando e me ajudando em tudo, que são o motivo da minha força, a quem por eles sou eternamente grata por tudo que sou. Amo-os com todo meu coração.

Aos meus irmãos Andyson e Thaysa, e seus respectivos cônjuges Emily e Gabriel, que torcem muito pelas minhas vitórias. Obrigada pelo incentivo, compreensão e todo apoio.

Aos meus pimpolhos lindos que a titia ama demais, Matteus e Ayla. Obrigada por aliviar os momentos difíceis e estressantes, e por encher as nossas vidas de tanto amor e alegria.

Ao meu orientador, Jacinto Costa, pelos ensinamentos e conhecimentos passados.

Ao meu coorientador, Giwellington Albuquerque pelo apoio e ensinamentos fundamentais nessa difícil caminhada do mestrado.

As minhas amigas, meu Sabadinho, por toda força, apoio e compreensão diante das ausências nos momentos de encontros. Vocês são as melhores!!

Ao meu querido amigo Arthur Cabral, pela força, pelos desabafos diante das complicações do mestrado e pelo incentivo para conclusão do mesmo.

Ao pessoal do Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares (LPCM), meus amigos de experimentos, os quais aprendi muito, e os quais compartilhamos muitos momentos de dúvidas, mas também momentos de alegria, e muito café.

Ao Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia e aos professores do mestrado, pela importantíssima contribuição na minha formação.

À Santa Casa da Misericórdia de Maceió – Alagoas, pelo fornecimento das amostras utilizadas para o desenvolvimento deste projeto.

À banca examinadora pela disponibilidade e por contribuir para o fechamento desse ciclo.

*“Nunca deixe ninguém tentar fazer de você algo que você não é.  
Lembre-se do que você quer ser, e sempre permaneça forte nisso.”*

Abigail Breslin

## RESUMO

O câncer de pulmão é uma das principais neoplasias em todo o mundo quando se trata de incidência, ocupando a primeira posição entre os homens e a terceira entre as mulheres. Sabe-se que um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão é o consumo e exposição passiva ao tabaco, no entanto, estudos vêm apontando associações entre a presença do Papilomavírus humano (HPV) e a carcinogênese pulmonar. O presente estudo avaliou a presença do HPV e expressão imunohistoquímica da proteína p16INK4a em tecido parafinado de tumor de pulmão oriundas de pacientes atendidos na Santa Casa da Misericórdia de Maceió – Alagoas, nos anos de 2020 e 2021. A análise da detecção foi feita em amostras de 33 pacientes através da técnica de PCR. Analisando todas as amostras, pode-se observar que em relação ao gênero, 72,7% dos casos eram mulheres. Com relação ao total de amostra, 45,5% dos casos foram de adenocarcinoma, 42,4% carcinoma de células escamosas e para outros tipos de carcinoma foram observados 12,1% dos casos. Sobre o tabagismo, foi observado que dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma, 60% não tinham o hábito de fumar. Já aqueles com carcinoma de células escamosas, pouco mais de 70% eram fumantes. Para os casos que se enquadraram em outros carcinomas, pode-se observar que 75% deles não tinha o tabagismo como hábito. Com relação a detecção do vírus, analisamos que todas as amostras se apresentaram negativas para o HPV. Em relação a expressão da p16INK4a por imunohistoquímica, houve positividade em 48,5% das amostras e 75% dos casos foram de pacientes mulheres. Além disso, 56,3% dos casos estavam relacionado ao carcinoma de células escamosas, 37,5% adenocarcinoma e apenas 6,2% a outros carcinomas. Se tratando do tabagismo, observamos que das amostras positivas, 56,2% dos pacientes mantinham o hábito de fumar, enquanto que 43,8% não tinham relação direta com o tabaco. O estudo se mostrou promissor norteando sobre que caminho seguir para uma melhor elucidação dessa associação, apesar dos resultados obtidos não se apresentarem conclusivos para a hipótese inicial. Sendo assim, faz-se necessário mais estudos sobre essa casuística, buscando evidenciar a detecção da atividade viral do HPV para assim esclarecer sua relação com a carcinogênese pulmonar.

**Palavras-chave:** Câncer pulmão; Oncoproteínas; *Papilomavirus humano*; p16INK4a.

## ABSTRACT

Lung cancer is one of the main neoplasms worldwide when it comes to incidence, occupying the first position among men and the third among women. It is known that one of the main risk factors for the development of lung cancer is consumption and passive exposure to tobacco, however, studies have shown associations between the presence of human papillomavirus (HPV) and lung carcinogenesis. The present study evaluated the presence of HPV and immunohistochemical expression of the p16INK4a protein in paraffin-embedded lung tumor tissue from patients treated at Santa Casa da Misericórdia de Maceió - Alagoas, in the years 2020 and 2021. The detection analysis was performed on samples of 33 patients using the PCR technique. Analyzing all the samples, it can be seen that in terms of gender, 72.7% of the cases were women. Regarding the total sample, 45.5% of the cases were adenocarcinoma, 42.4% squamous cell carcinoma and for other types of carcinoma 12.1% of the cases were observed. Regarding smoking, it was observed that of the patients diagnosed with adenocarcinoma, 60% did not smoke. As for those with squamous cell carcinoma, just over 70% were smokers. For the cases that fit other carcinomas, it can be seen that 75% of them did not smoke as a habit. Regarding virus detection, we analyzed that all samples were negative for HPV. Regarding the expression of p16INK4a by immunohistochemistry, there was positivity in 48.5% of the samples and 75% of the cases were from female patients. Furthermore, 56.3% of the cases were related to squamous cell carcinoma, 37.5% to adenocarcinoma and only 6.2% to other carcinomas. With regard to smoking, we observed that of the positive samples, 56.2% of the patients maintained the habit of smoking, while 43.8% had no direct relationship with tobacco. Despite the results obtained not being conclusive for the initial hypothesis, the study proved to be promising, guiding on which path to follow for a better elucidation of this association. Therefore, further studies on this series are needed, seeking to highlight the detection of the viral activity of HPV in order to clarify its relationship with pulmonary carcinogenesis.

**Keywords:** Human papillomavirus; Lung cancer; Oncoproteins; p16INK4a.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	À esquerda o ciclo simplificado de uma célula normal, e a direita o ciclo simplificado de uma célula cancerosa.	17
<b>Figura 2</b>	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.	19
<b>Figura 3</b>	Distribuição espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens (verde) e 100 mil mulheres (azul), estimadas para o ano de 2023, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da traqueia, dos brônquios e dos pulmões) no Brasil.	19
<b>Figura 4</b>	Representação esquemática do genoma do HPV.	22
<b>Figura 5</b>	Infecção por HPV e integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira.	25
<b>Figura 6</b>	Ciclo de vida do vírus.	26
<b>Figura 7</b>	Modelo de interação entre o tabaco e o HPV.	28
<b>Figura 8</b>	Relação entre as proteínas p16INK4a e pRb no controle do ciclo celular.	30
<b>Figura 9</b>	Eletroforese em gel de agarose a 2% do produto da PCR com primers para $\beta$ -globina.	44
<b>Figura 10</b>	Eletroforese em gel de agarose a 2% do produto da PCR com primers para $\beta$ -actina.	45
<b>Figura 11</b>	Eletroforese em gel de agarose a 2% do produto da PCR com primers para GP6/9 das amostras de 2020 e 2021.	46
<b>Figura 12</b>	(A) Amostra positiva para p16INK4a em tumor de pulmão, observa-se forte marcação de núcleo nas células. (B) Amostra negativa para p16INK4a em tumor de pulmão. (C) Amostra de câncer cervical sendo o controle positivo da p16INK4a. (D) Amostra tecido escamoso como controle negativo da p16INK4a.	47

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Amostra total evidenciando a porcentagem de casos entre mulheres e homens.	37
<b>Gráfico 2</b>	Relação da amostra total com o tipo de tumor e o gênero dos pacientes.	38
<b>Gráfico 3</b>	Relação da amostra total com o tipo de tumor e o tabagismo.	39
<b>Gráfico 4</b>	Relação do ano das amostras com o gênero dos pacientes.	40
<b>Gráfico 5</b>	Relação do ano das amostras com o tabagismo.	40
<b>Gráfico 6</b>	Relação dos tipos de tumores analisados com o ano das amostras.	41
<b>Gráfico 7</b>	Relação dos tipos de tumor de pulmão analisados com o gênero do paciente, no ano de 2020.	42
<b>Gráfico 8</b>	Relação dos tipos de tumor de pulmão analisados com o gênero do paciente, no ano de 2021.	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Relação entre as regiões do genoma do HPV, seus genes e suas respectivas funções.	22
-----------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AP-1</b>	Fator transcricional. Ativador de proteína-1
<b>BSA</b>	Soro Albumina Bovina
<b>CEC</b>	Carcinoma de Células Escamosas
<b>CDK</b>	Ciclina dependente de quinase
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>GLOBOCAN</b>	Global Cancer Observatory (OMS)
<b>HPV</b>	<i>Papilomavírus humano</i>
<b>HRP</b>	Horseradish Peroxidase
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>NCR</b>	Região não codificante
<b>NF-1</b>	Fator transcricional. Fator Nuclear 1
<b>NSCLC</b>	Carcinoma de pulmão de não-pequenas células
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana da Saúde
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato-salina
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da Polimerase
<b>p16</b>	Proteína supressora de tumor, dependente de ciclina
<b>p53</b>	Proteína supressora de tumor de massa 53 kDa,
<b>pRb</b>	Proteína Retinoblastoma
<b>SCLC</b>	Carcinoma de pulmão de pequenas células
<b>URR</b>	Região Regulatória HPV
<b>YY1</b>	Fator transcricional. Yin Yang 1

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REFERÊNCIAL TEÓRICO</b>	<b>17</b>
2.1.	Epidemiologia do Câncer	17
2.2	Câncer de Pulmão	18
2.3	O HPV e seu ciclo	21
2.4	HPV e o Câncer de pulmão	27
2.5	Gene p16INK4a	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>32</b>
4.1	Tipo do estudo	32
4.2	Aspectos éticos da pesquisa	32
4.3	Local de estudo e origem das amostras	32
4.4	Material de estudo	32
4.5	Critérios de inclusão	33
4.6	Critérios de exclusão	33
4.7	Técnicas laboratoriais	33
4.7.1	Extração dos ácidos nucleicos	33
4.7.2	Detecção do DNA do HPV	34
4.7.3	Imunohistoquímica para p16INK4a	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
5.1	Caracterização da amostra estudada	37
5.1.1	Análise da amostra total	37
5.2	Detecção viral	43
5.2.1	Avaliação da qualidade do DNA extraído	43
5.2.2	Detecção do HPV com o primer GP6/9	45
5.3	Reação de Imunohistoquímica para p16INK4a	46
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>52</b>

<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>61</b>
Anexo A - Parecer do Comitê de Ética	61

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é uma das principais neoplasias em todo o mundo quando se trata de incidência, ocupando a primeira posição entre os homens e a terceira entre as mulheres (OPAS/OMS, 2020). No que concerne a mortalidade é o primeiro entre os homens e o segundo entre as mulheres de acordo com estimativas mundiais de 2020, que apontou 2,12 milhões de casos novos, sendo 1,35 milhão em homens e 770 mil em mulheres (OPAS/OMS, 2020). No Brasil, para cada ano triênio 2023 – 2025, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou cerca de 18.020 e 14.540 novos casos de câncer de pulmão em homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2022).

Na análise histopatológica, o câncer de pulmão está categorizado em dois grandes grupos: câncer de pulmão de pequenas células (SCLC), frequente em 20% dos casos, e câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC), frequente em 70% a 80% dos casos. O NSCLC é subdividido em três tipos: carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de células grandes (WHO, 2012).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão são o consumo e exposição passiva ao tabaco – compreendendo cerca de 85% dos casos – além de fatores de herança genética, polimorfismos gênicos e exposição ocupacional a agentes químicos ou físicos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; INCA, 2022).

No entanto, estudos já reportaram associações entre a presença do *Papilomavirus humano* (HPV) e a carcinogênese pulmonar, acreditando ser também um fator risco no desenvolvimento do câncer de pulmão. Neste sentido, pesquisadores evidenciam possíveis mecanismos envolvendo as oncoproteínas E6 e E7 do HPV, essas proteínas são capazes de modular a disposição de genes de apoptose e supressão tumoral do hospedeiro conduzindo à imortalidade celular e carcinogênese, como a proteína p53 e proteína do retinoblastoma (pRb) (DUENSING, MÜNGER, 2003; GUO *et al.*, 2017; ZHAI *et al.*, 2015).

A princípio, o HPV está comumente associado a lesões pré-cancerígenas do colo do útero, porém, já foi documentado sua presença em outros tipos de cânceres, dentre eles: câncer na vulva, pênis, anal, perianal, pele, língua, laringe, entre outros (BUYRU *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2001; LORENZON *et al.*, 2010; MA *et al.* 2007; PÉREZ *et al.*, 2006; SHUKLA *et al.*, 2009; TONNA *et al.*, 2010). O DNA do HPV também foi

detectado em tecido tumoral pulmonar, como também em tecido sanguíneo, aspirado brônquico e ar exalado condensado de pacientes com câncer de pulmão (BRANICA *et al.*, 2010; CARPAGNANO *et al.*, 2011; CHIOU *et al.*, 2003).

Existem hoje mais de 200 tipos de HPV descritos, de acordo com o Centro de Referência Internacional do HPV (INTERNATIONAL HUMAN PAPILLOMAVIRUS REFERENCE CENTER, 2019). Em relação ao seu genoma, este comporta oito fases de leitura aberta e é separado em três regiões: região longa de controle (LCR), não codificante que realiza funções sobre a transcrição do DNA viral; a região precoce (Early), responsável pela codificação das proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7, conhecidas pela atuação na replicação viral, e a região tardia (Late) que tem como principal função codificar as proteínas de composição do capsídeo viral L1 e L2 (LETO *et al.*, 2011).

A capacidade em diferenciar estes genótipos proporcionou a detecção dos tipos de maior risco carcinogênico, chamados HPVs de alto risco (16, 18, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 68, 69, 70, 73, 82, 85 e 91), destacando três potencialmente oncogênicos (26, 53 e 66), bem como os de baixo risco, que foram encontrados em lesões benignas (verrugas) e com menor possibilidade de progressão para a malignidade (6, 11, 13, 27, 28, 29, 32, 40, 42, 43, 44, 54, 57, 61, 62, 64, 70, 71, 72, 74, 78, 81, 83, 84, 86, 87, 89 e CP6108) (BERNARD *et al.*, 2010; DE VILLIERS *et al.*, 2004; WHEELER *et al.*, 2014).

Alguns pesquisadores sugerem que a presença do HPV no câncer de pulmão seja simplesmente oportunista (COISSARD *et al.*, 2005), outros apresentam possíveis mecanismos utilizados pelas oncoproteínas E6 e E7 do HPV para induzir o desenvolvimento do câncer de pulmão (BUONOMO *et al.*, 2011; CHENG *et al.*, 2007; KLEIN *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2005; SUNG and LEE, 2013; TUNG *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2011).

Sendo assim, embora alguns estudos sugiram essa associação, não está claro sua etiologia, sendo necessário buscar indicadores de sua presença e possíveis fatores que colaborem para a carcinogênese tumoral. Portanto, o presente estudo visou obter maiores esclarecimentos sobre essa possível associação, em pacientes atendidos na Santa Casa da Misericórdia, Maceió - Alagoas, avaliando tanto a presença significativa do vírus como sua possível atividade no sítio pulmonar a fim de estabelecer outra perspectiva sobre a etiologia do câncer de pulmão. A elucidação

desta suposta associação tem grande valor para esclarecer oncogênese viral, diagnóstico, condutas terapêuticas e preventivas.

## 2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 2.1. Epidemiologia do Câncer

O câncer é uma doença de natureza crônica que possui ampla repercussão econômica e social, sendo responsável por milhões de óbitos a cada ano, representando a segunda maior causa de morte no mundo (DALLOUL *et al.* 2018). É caracterizada por um crescimento desordenado de células que, ao se dividirem de forma acelerada e incontrolável, tornam essa doença um dos problemas de saúde pública mais complexos que o sistema de saúde brasileiro enfrenta (FARIA *et al.* 2020). As células alteradas passam então a se comportarem de forma anormal, com constante multiplicação celular, o que exige uma alta carga metabólica para se manterem (AZEVEDO, 2014). (Figura 1)

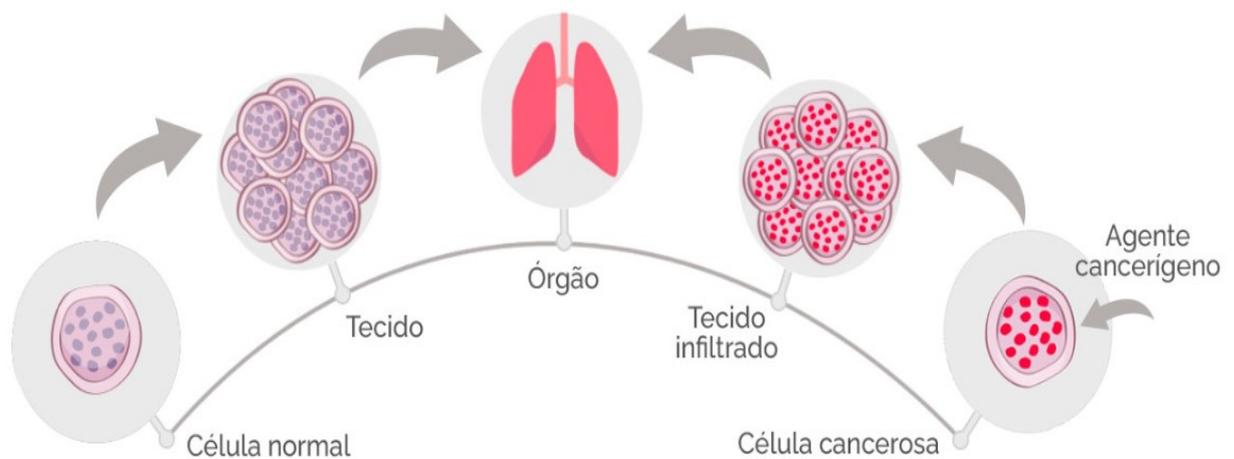


Figura 1. A esquerda o ciclo simplificado de uma célula normal, e a direita o ciclo simplificado de uma célula cancerosa. Fonte: INCA, 2022.

Em geral, o câncer é caracterizado por um grupo de doenças com características clínicas e biológicas diversas e que têm em comum o crescimento desordenado de células, que tendem a causar tumores e invadir tecidos e órgãos (ARAÚJO *et al.* 2018; THULER, 2005).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que a mortalidade por câncer nas Américas aumente para 2,1 milhões até 2030. Sendo a segunda causa de óbitos no Brasil, o câncer é uma questão de saúde pública,

principalmente levando em consideração seu percentual de prevenção: Cerca de um terço dos novos casos, no mundo, poderiam ser evitados (INCA, 2022). A OMS considera que 30% a 50% dos casos de câncer poderiam ser evitados trabalhando os principais fatores de risco, como tabagismo, abuso de álcool, dieta inadequada e inatividade física, o que faz da prevenção um componente essencial de todos os planos de controle da doença (OPAS/OMS, 2020).

A prevenção do câncer refere-se a um conjunto de medidas tomadas para reduzir ou evitar a exposição a fatores que aumentam a possibilidade de um indivíduo desenvolver uma determinada doença ou sofrer um determinado agravo, comumente chamados de fatores de risco (THULER, 2005). Segundo o INCA, cerca de 80% dos casos estão relacionados ao meio ambiente, no qual encontramos um grande número desses fatores.

Os fatores de risco podem ser encontrados no ambiente físico, ser herdados ou representar hábitos ou costumes próprios de um determinado ambiente social e cultural e estão diretamente relacionados com o estilo de vida adotado (PACHECO-PÉREZ *et al.* 2019). Dessa forma, determinados tipos de câncer podem surgir devido a associação de fatores de risco hereditários e ambientais como é o caso do câncer de pulmão.

## **2.2. Câncer de Pulmão**

Considerado um dos principais problemas de saúde pública em todo mundo, o câncer de pulmão constitui um dos dez tipos de câncer com maior incidência de mortalidade relacionada a câncer no mundo (FERLAY *et al.*, 2019). Segundo um levantamento realizado pela GLOBOCAN/OMS 2020, no ano de 2019, foram registradas 1.794.144 mortes por câncer de pulmão, no mundo. E ainda de acordo com a projeção do mesmo estudo, se nada for feito, esse número pode alcançar 3,01 milhões em 2040, um aumento de 66,7 % no número de mortes. No Brasil, a doença foi responsável por 28.620 mortes em 2020, sendo uma das principais causas de mortes evitáveis, desde o fim do século XX (INCA, 2022).

No Brasil, para cada ano do triênio 2023 – 2025, o INCA estimou cerca de 32.560 novos casos, sendo 18.020 em homens e 14.540 em mulheres, com risco estimado de 17,06 para cada 100 mil homens e 13,15 para cada 100 mil mulheres. (INCA, 2022). (Figura 2 e 3)

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e Reto	21.970	9,2%			Cólon e Reto	23.660	9,7%
<b>Traqueia, Brônquio e Pulmão</b>	<b>18.020</b>	<b>7,5%</b>	Homens	Mulheres	<b>Traqueia, Brônquio e Pulmão</b>	<b>14.540</b>	<b>6,0%</b>
Estômago	13.340	5,6%			Colo do útero	17.010	7,0%
Cavidade Oral	10.900	4,6%			Glândula Tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma\*.

\* Números arredondados para múltiplos de 10. Fonte: INCA, 2022.

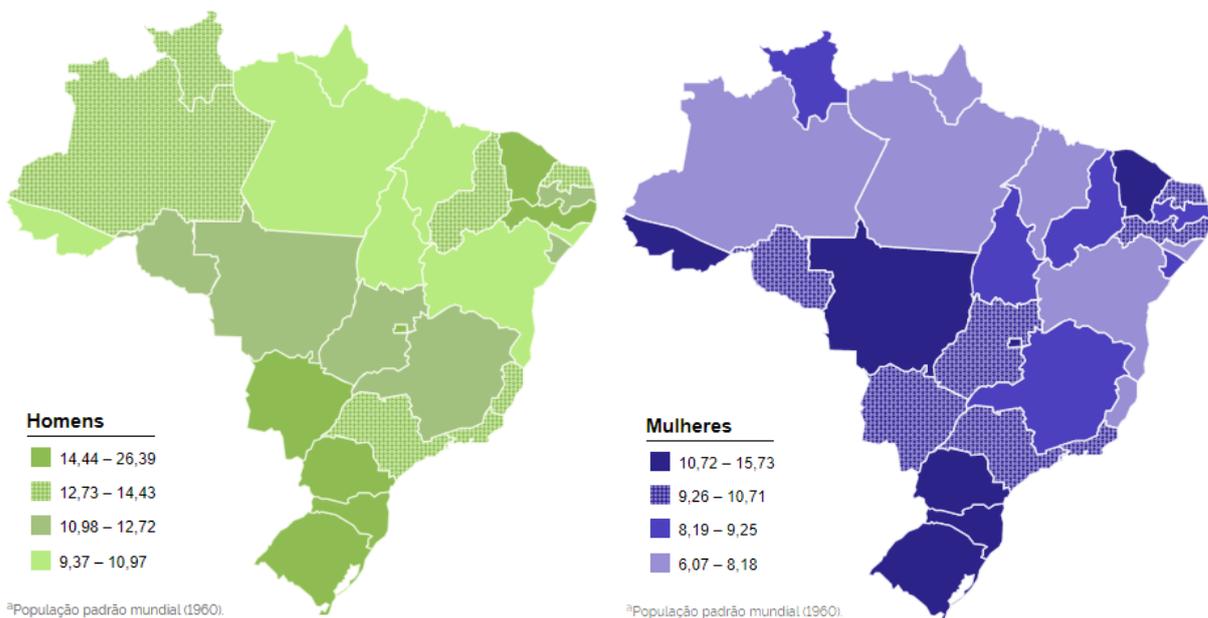


Figura 3. Distribuição espacial das taxas ajustadas<sup>a</sup> de incidência por 100 mil homens (verde) e 100 mil mulheres (azul), estimadas para o ano de 2023, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da traqueia, dos brônquios e dos pulmões) no Brasil. Fonte: INCA, 2022

O câncer de pulmão ocorre principalmente em pessoas de maior faixa etária. A maioria das pessoas com diagnóstico de câncer de pulmão tem 65 anos ou mais; um número muito pequeno de pessoas diagnosticadas tem menos de 45 anos. O câncer

de pulmão é a principal causa de morte por câncer entre homens e mulheres, representando quase 25% de todas as mortes por câncer. A cada ano, mais pessoas morrem de câncer de pulmão do que de câncer de cólon, mama e próstata juntos. Do lado positivo, o número de novos casos e o número de mortes de câncer de pulmão continua diminuindo, em parte porque as pessoas estão parando o consumo do tabaco e também devido aos avanços na detecção e tratamento precoces (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023).

Na análise histopatológica, o câncer de pulmão está categorizado em dois grandes grupos: câncer de pulmão de pequenas células (SCLC), frequente em 20% dos casos, e câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC), frequente em 70 a 80% dos casos. O NSCLC é subdividido em três tipos: carcinoma de células escamosas (44% ocorre em homens e 25% em mulheres), adenocarcinoma (aproximadamente 28% em homens e 42% em mulheres) e carcinoma de células grandes (cerca de 9%) (WHO, 2012).

Quanto aos sintomas, pacientes com câncer de pulmão apresentam tosse, fadiga, dispneia e hemoptises. Por serem sintomas comuns a outras doenças, tais manifestações dificultam o diagnóstico do câncer de pulmão nos estágios iniciais I e II (HENSING *et al.*, 2014; HOLLEN *et al.*, 1995). O diagnóstico precoce desse tipo de câncer é possível em apenas parte dos casos pois a maioria dos pacientes só apresenta sinais e sintomas em fases mais avançadas da doença (INCA, 2022).

Sendo assim, a maior parte dos pacientes recebe o diagnóstico quando a doença se apresenta nos estágios mais adiantados, em torno de 30% no estágio III e 40% no estágio IV (estágio de metástase), o que reduz a taxa de sobrevivência para 16% (HOWLADER *et al.*, 2011). Nos últimos anos, o diagnóstico tem sido feito cada vez mais com base molecular – como amplificação de ácido nucleico, hibridização *in situ* baseada no DNA do HPV –, evidenciando em estudos específicos as diferentes famílias de genes e o evento mutagênico envolvido, assim caracterizando cada tipo histológico com suas alterações moleculares peculiares (INCA, 2022).

Sabe-se que os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão é o consumo e exposição passiva ao tabaco – compreendendo cerca de 85% dos casos diagnosticados – além de fatores de herança genética, polimorfismos gênicos e exposição ocupacional a agentes químicos ou físicos (asbesto, sílica, urânio, cromo e radônio) e altas doses de suplementos de betacaroteno em fumantes e ex-fumantes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; INCA, 2022).

Contudo, entre 15% e 50% dos casos de câncer de pulmão são diagnosticados em pacientes não fumantes (KAWAGUCHI *et al.*, 2010; TOROK *et al.*, 2011; YANG, 2011). Câncer de pulmão em não fumantes é considerado uma doença com características clínicas, moleculares e genéticas específicas e distintas daquela causada pelo cigarro, pois, tais tumores têm uma maior proporção de alterações genômicas do que aqueles desenvolvidos em fumantes (YANO *et al.*, 2008).

Estudos reportam associações entre a presença do HPV e a carcinogênese pulmonar, evidenciando possíveis mecanismos envolvendo as oncoproteínas E6 e E7 do HPV, que são proteínas capazes de modular a disposição de genes de apoptose e supressão tumoral do hospedeiro conduzindo à imortalidade celular e carcinogênese (DUENSING, MÜNGER, 2003; GUO *et al.*, 2017; ZHAI *et al.*, 2015).

### 2.3. O HPV e seu ciclo

Pertencente à família *Papillomaviridae*, o HPV é um vírus pequeno, com diâmetro variando de 50 a 60µm, de estrutura icosaédrica (polígono de 20 faces triangulares, 12 vértices e 30 arestas, com 3 eixos de simetria), não envelopado e DNA circular em fita dupla com aproximadamente 8 mil pares de base que se encontra associado a proteínas semelhantes a histonas, envoltos por 72 capsômeros constituídos por proteínas estruturais (DE FREITAS *et al.*, 2012; LETO *et al.*, 2011).

O genoma do HPV contém oito ou nove estruturas de leitura aberta (ORF, do inglês, *Open Reading Frames*) organizado em três regiões básicas: uma região longa de controle ou regulatória (LCR, do inglês, *Long Control Region*) com sítios de ligação de fator de transcrição e controle da expressão gênica onde variações nessa região podem influenciar a progressão do câncer e resultar na perda da capacidade de ligação dos fatores transcricionais E2, YY1, NF-1, AP1. Uma região inicial ou precoce (do inglês, *Early*) que codifica seis genes, E1, E2, E4, E5, E6 e E7, expressos logo após a infecção quando ocorre a indução e síntese de DNA, e estão envolvidos em funções como replicação viral e transformação celular; e uma região tardia (do inglês, *Late*) que codifica as proteínas do capsídeo L1 e L2 sendo, por isso, expressas em estágios posteriores (BURK *et al.*, 2013; SCHWARTZ, 2013; SMITH *et al.*, 2011). (Figura 4 e tabela 1)

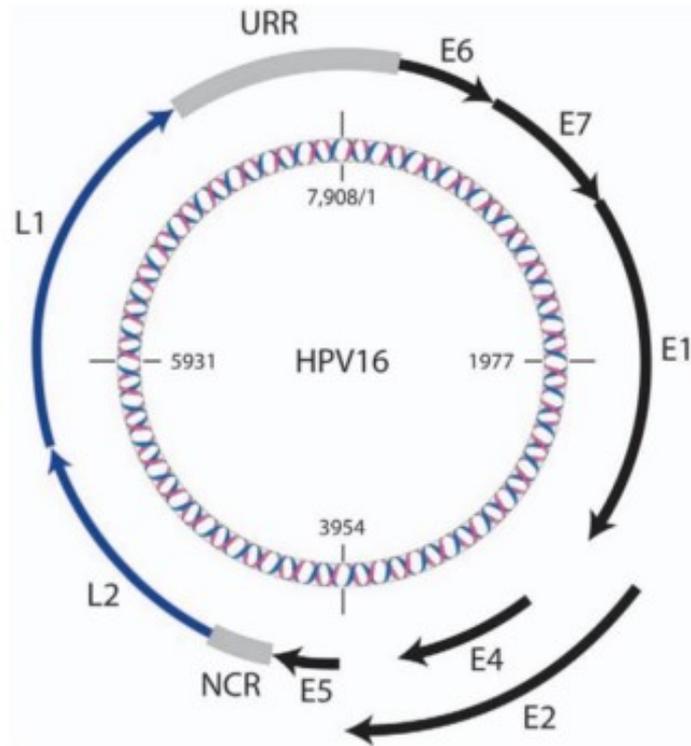


Figura 4. Representação esquemática do genoma do HPV com aproximadamente 8 kb de tamanho contendo genes não estruturais de expressão precoce (E), genes estruturais de expressão tardia (L) e regiões não traduzidas: URR entre os genes L1 e E6 e NCR entre os genes E5 e L2. Fonte: SMITH *et al.*, 2011.

Tabela 1. Relação entre as regiões do genoma do HPV, seus genes e suas respectivas funções.

Expressão Gênica	Genes	Função
<b>LCR (Long Control Region)</b>	Não codificante	Regula a transcrição e replicação viral.
<b>Early (Precoce)</b>	E1 E2 E4 E5, E6 e E7	Replicação do DNA viral; Controle de transcrição e replicação; Maturação do vírus e alteração da matriz intracelular; Estímulo de proliferação e replicação celular
<b>Late (Tardia)</b>	L1 L2	Codifica proteína principal do capsídeo; Codifica proteína secundária do capsídeo

Fonte: A autora. (2023)

O gene E1 codifica uma helicase de DNA necessária para a replicação e amplificação do genoma viral. Já o E2 tem funções na transcrição viral, replicação e partição do genoma (pode se ligar a locais no genoma viral e celular), estas dependem de sua interação com produtos de genes celulares e das condições necessárias para beneficiar o vírus. O E2 pode regular a transcrição do gene E6 e E7 desempenhando um papel crítico na condução de entrada no ciclo celular, permitindo a amplificação do genoma viral nas camadas intermediárias do epitélio e inibindo alguns aspectos da imunidade inata (DE FREITAS *et al.*, 2012; DOORBAR *et al.*, 2015).

Entretanto, a perda da região E2, por mutação ou integração viral, inativa a repressão de E6 e E7, levando a um processo de malignidade. Na replicação viral, E2 participa da fase inicial levando a helicase E1 à origem de replicação, a qual contém sítios de ligação para E1, E2 e uma região rica em A/T. Assim, E2 colabora com E1 na replicação do genoma viral. (DOORBAR *et al.*, 2015; GOODWIN *et al.*, 2000).

Sendo a sequência de nucleotídeos do gene L1 o local utilizado para diferir os tipos de HPV a partir das diferenças encontradas entre os nucleotídeos, considera-se um novo tipo de HPV quando o seu genoma apresenta variações maiores que 10% nos genes L1, E6 e E7 e quando se comparam com qualquer tipo de HPV previamente conhecido. Dessemelhanças entre 2% e 10% representam novos subtipos e variações menores que 2% constituem variantes de tipos. (BRAVO *et al.*, 2010; CAMARA *et al.*, 2003; LETO *et al.*, 2011)

A carga viral e o tipo viral são os principais cofatores para a progressão da infecção para lesões intraepiteliais cervicais e o câncer (DE SANJOSÉ *et al.*, 2018). Estudos classificaram como de alto risco oncológico 22 genótipos por estarem associados com lesões de alto grau e câncer de colo do útero (16, 18, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 68, 69, 70, 73, 82, 85 e 91), três potencialmente oncogênicos (26, 53 e 66) e 27 genótipos como baixo risco oncológico por estarem associados a lesões benignas, verrugas genitais e com menor possibilidade de progressão para a malignidade (6, 11, 13, 27, 28, 29, 32, 40, 42, 43, 44, 54, 57, 61, 62, 64, 70, 71, 72, 74, 78, 81, 83, 84, 86, 87, 89 e CP6108) (BERNARD *et al.*, 2010; DE VILLIERS *et al.*, 2004; WHEELER *et al.*, 2014).

O HPV apresenta tropismo por células epiteliais do tecido escamoso (epiteliotrópico), podendo infectar a pele, mucosas ou a camada de tecido que reveste órgãos internos, e a sua replicação ocorre no núcleo dessas células, mas para isso necessita de lesão de continuidade para penetrá-los e se alojar na camada basal,

onde se localiza e, no momento propício, inicia sua proliferação. Atualmente, sabe-se que 15% dos tumores malignos humanos têm associação com infecções virais (DE FREITAS *et al.*, 2012).

O potencial oncogênico do HPV é dependente do comportamento do genoma viral na célula hospedeira. Assim, os tipos de HPV considerados de baixo risco oncogênico mantêm seu DNA em forma circular e epissomal, enquanto os de alto risco oncogênico integram seu DNA ao genoma da célula hospedeira (FERRAZ *et al.*, 2012).

O DNA na forma epissomal é responsável apenas pela replicação viral. No ciclo normal de infecção por HPV, há um baixo número de cópias do DNA viral na forma epissomal e baixo nível de expressão de E6, E7, E1 e E2, suficientes apenas para a manutenção do genoma viral. A expressão dos genes do HPV é regulada e dependente da diferenciação das células infectadas e sua migração no epitélio. Para as partículas virais serem produzidas, ocorre a amplificação do genoma do HPV e montagem das partículas nas camadas médias e superiores do epitélio (DE FREITAS *et al.*, 2012; FERRAZ *et al.*, 2012; GURGEL *et al.*, 2013).

Os genes L1 e L2 codificam proteínas do capsídeo viral e são expressos nos grupos de células com maior expressão de E4, responsável por alterar o citoesqueleto, maturação e replicação viral. A montagem dos vírus e o empacotamento ocorrem na camada superficial do epitélio e a formação e liberação de partículas virais completas ocorrem na superfície do epitélio sem que haja lise celular (DE FREITAS *et al.*, 2012; FERRAZ *et al.*, 2012; GURGEL *et al.*, 2013).

No entanto, o desenvolvimento de neoplasias está associado à perda da regulação do ciclo celular, que é extremamente dependente da diferenciação dos queratinócitos. Para manutenção das células em ciclo, as proteínas virais E6 e E7 são expressas em taxas muito baixas, inibidas pela proteína viral E2 (ZUR HAUSEN, 2002).

Quando, em situação adversa à sua história natural, ocorre uma quebra do genoma viral nas regiões codificantes E1 e E2, desregulando e conseqüentemente havendo uma superexpressão dos genes E6 e E7, estes, codificam proteínas que irão atuar degradando proteínas celulares responsáveis por levar a célula a apoptose e genes supressores de tumor, induzindo as células infectadas a um estímulo excessivo de proliferação, o que resulta em instabilidade cromossômica, aneuploidia e modificações no DNA da célula infectada. Na seqüência, o DNA viral integra-se ao

DNA celular, iniciando a transformação neoplásica (DE FREITAS *et al.*, 2012; ZUR HAUSEN, 2002).

Isto é frequentemente observado em infecções persistentes por HPV de alto risco oncogênico, onde é observada a integração do genoma viral ao da célula hospedeira, em vez de manter o DNA na forma epissomal (DE FREITAS *et al.*, 2012; FERRAZ *et al.*, 2012; GURGEL *et al.*, 2013). (Figura 5 e 6)

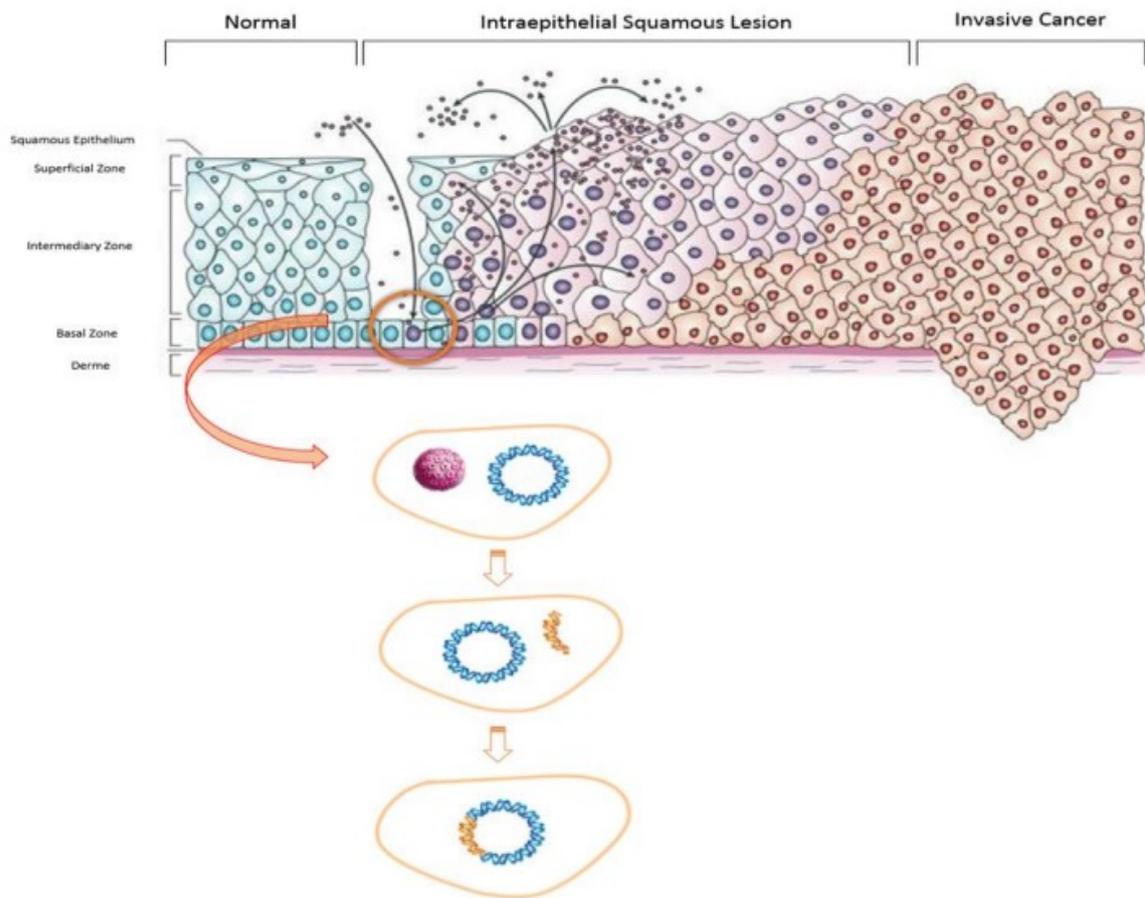


Figura 5. Infecção por HPV e integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira. Fonte: Adaptado de WOODMAN *et al.*, 2007

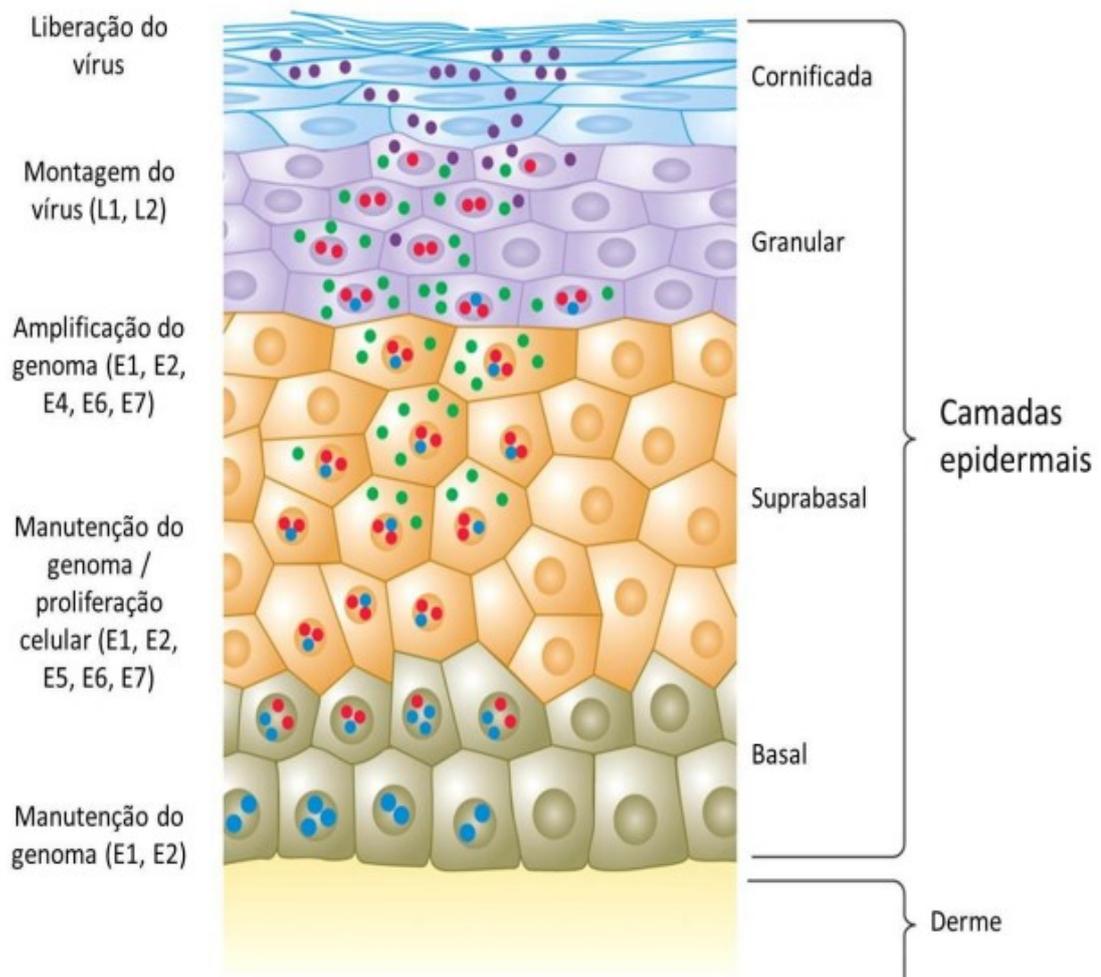


Figura 6. Ciclo de vida do vírus. As diferentes camadas do epitélio estão indicadas à direita. Os eventos que ocorrem após a entrada do vírus nas células basais estão indicados à esquerda. Expressão dos genes E1 e E2 (em azul); E5, E6 e E7 (em vermelho), E4 (em verde) e L1 e L2 (em preto). Adaptado de LAZARCZYK *et al.*, 2009.

Existem hoje mais de 200 tipos de HPV descritos, de acordo com o Centro de Referência Internacional do HPV (INTERNATIONAL HUMAN PAPILLOMAVIRUS REFERENCE CENTER, 2019). São altamente transmissíveis sexualmente, estando mais relacionado com alterações cervicais que podem levar ao surgimento do câncer de colo uterino, entretanto, artigos da literatura especializada vêm mostrando a presença do DNA do HPV em amostras de tecido de carcinomas do esôfago, estômago, pulmão, mama e colorretal (BUYRU *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2001; LORENZON *et al.*, 2010; MA *et al.* 2007; PÉREZ *et al.*, 2006; SHUKLA *et al.*, 2009; TONNA *et al.*, 2010).

O HPV foi detectado em até 37,5% dos adenocarcinomas gástricos, e em 27,8% dos CEC esofágicos, havendo diferença em áreas de alta e de baixa prevalência para esse tumor maligno (65 e 6%, respectivamente). (MA *et al.* 2007; SHUYAMA *et al.*, 2007; TORNESELLO *et al.*, 2009)

O HPV associado ao carcinoma da mama tem sido descrito em 24,5% dos casos, ocorrendo em 32,4% das asiáticas e em 12,9% das mulheres na Europa, geralmente, naquelas com neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau. (LI *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2001) Se tratando de câncer de pulmão, o HPV foi detectado em 51,4% dos CEC e em 16,2% dos adenocarcinomas, sendo que o risco de CEC pulmonar é 3,5 vezes maior em doentes contaminados pelo HPV, embora, outros neguem essa associação (IWAKAWA *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2009).

Porém, encontrar o DNA do HPV na lesão não significa relação de causa e efeito. É necessária à sua integração no genoma do hospedeiro, bem como que haja expressão das oncoproteínas virais (MANZIONE *et al.*, 2010). O potencial oncogênico do HPV de alto risco depende da superexpressão das oncoproteínas E6 e E7 bem como as alterações em pelo menos um dos quatro reguladores-chave do ciclo celular (p16INK4a, p53, CDK4 e pRb) sugerindo que o mesmo possa desempenhar um papel na carcinogênese pulmonar. (MOLDEN *et al.*, 2006).

## **2.4 HPV e Câncer de pulmão**

Alguns estudos apoiam a associação entre infecção por HPV e câncer de pulmão, sugerindo como segundo fator de risco mais importante na carcinogênese pulmonar, mas a relação ainda é discutível. O HPV foi constatado na Ásia, América, Austrália e Europa, na maior parte dos casos, seu DNA foi detectado no tecido tumoral pulmonar, mas também em tecido sanguíneo, em aspirado brônquico e ar exalado condensado de pacientes com câncer de pulmão (BRANICA *et al.*, 2010; CARPAGNANO *et al.*, 2011; CHIOU *et al.*, 2003; KLEIN *et al.*, 2009).

A perda do controle normal do ciclo celular é essencial para que haja transformação neoplásica. Mutações no gene do receptor do fator de crescimento epidermóide (EGFR) podem ser provocadas pela oncoproteína E6, que contribui para a elevação da formação de agentes causadores de danos no DNA, causando estresse oxidativo na célula elevando a taxa de mutação e resultando em transformação oncogênica (BEHREND *et al.*, 2003; TUNG *et al.*, 2013).

O mecanismo molecular do tabaco na carcinogênese ainda não está totalmente elucidado. Porém, sabe-se que o benzopireno, hidrocarboneto aromático e policíclico, é um agente carcinogênico tendo como um de seus mecanismos a ativação do receptor EGFR, bem como a proliferação celular. Também sendo capaz de aumentar o número de vírions, que são partículas isoladas do vírus na sua forma infecciosa, e o genoma do HPV. Além disso, o tabaco induz a atividade do promotor p97 de HPV com a região LCR intacta induzindo a expressão das oncoproteínas E6 e E7, elas, por sua vez, sensibilizam as células do pulmão ao dano oxidativo do DNA causado pelo tabaco e também auxiliam o mesmo para ativação do promotor p97. (ALAM *et al.* 2010; KOMETANI *et al.*, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2012; PEÑA *et al.*, 2015). (Figura 7)

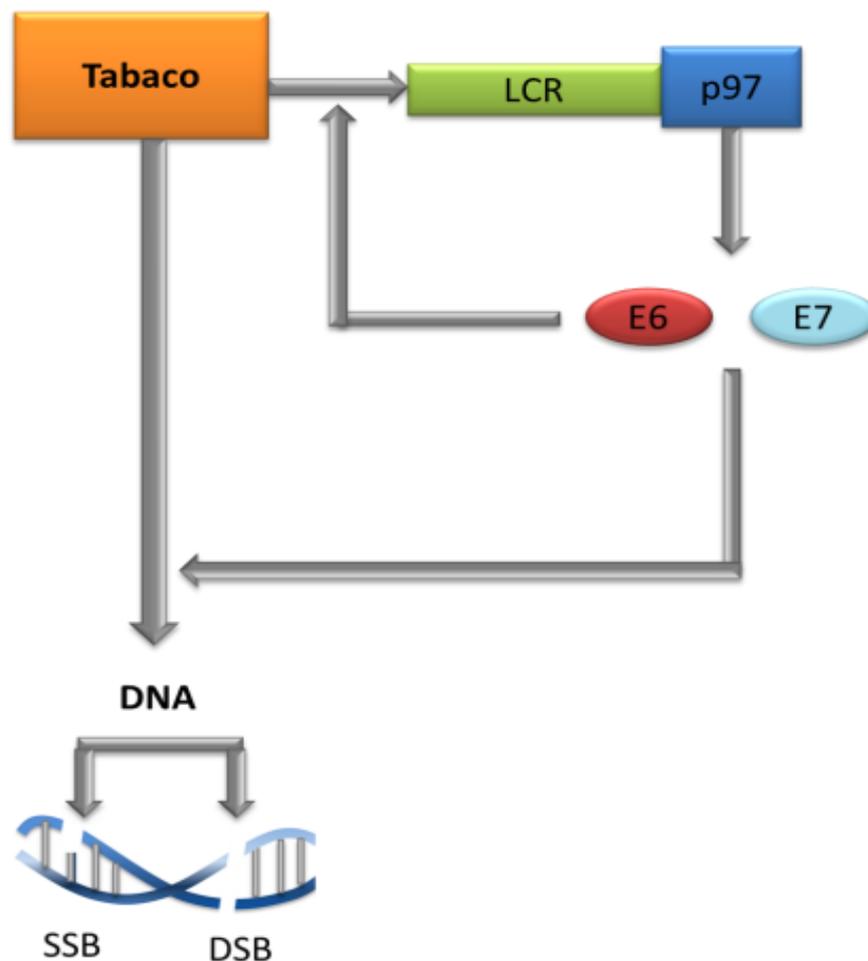


Figura 7. Modelo de interação entre o tabaco e o HPV. DSB – double strand break (Quebra de fita dupla). SSB – Single Strand Break (Quebra de fita simples). Adaptado de PEÑA *et al.*, 2015.

As oncoproteínas E6 e E7 parecem ser capazes de modular a proliferação e o comportamento tumoral das células expostas à fumaça do tabaco no epitélio brônquico. A formação do complexo entre E7 e pRb, constitui uma importante parte da transformação celular, ativando a transcrição dos genes de proliferação celular e inativando os genes supressores de tumor, como o p16INK4a, hipermetilando seu promotor através da remodelação da cromatina (BERGERON *et al.*, 2010).

## 2.5 Gene p16INK4a

A progressão do ciclo celular a partir da fase G1 é regulada por ciclinas, através da formação de complexos com proteínas quinase ciclina-dependentes (CDK). Esses complexos ciclina-CDK têm a função de regular a fosforilação de proteínas relacionadas à progressão do ciclo celular. O gene P16INK4a codifica a proteína p16INK4a a qual regula negativamente a progressão do ciclo celular, superexpressa pela presença da oncoproteína E7 do HPV, atuando como inibidor de CDK 4/6 e, desta forma, bloqueando a fosforilação da pRb. A mutação ou deleção do gene p16INK4a pode afetar o balanço entre a proteína p16INK4a e ciclina D, resultando em crescimento celular anormal (FERRAZ *et al.*, 2012; OGUEJIOFOR *et al.*, 2013; PANNONE *et al.*, 2012).

A pRb, por sua vez, exerce efeitos antiproliferativos por meio do controle da transição entre as fases G1 e S do ciclo celular. Em sua forma ativa, hipofosforilada, pRb está ligada ao fator de transcrição E2F, bloqueando sua ação e mantendo a célula na fase G1 (FERRAZ *et al.*, 2012; OGUEJIOFOR *et al.*, 2013; PANNONE *et al.*, 2012). Quando inativada, pela oncoproteína E7 do HPV, a pRb estimula a liberação do fator de transcrição E2F induzindo a célula a sair da fase G1 e entrar na fase S do ciclo celular, causando a perda do feedback negativo entre pRb e o gene CDKN2A, este segue com a produção e acúmulo da p16INK4a no núcleo e citoplasma da célula (BERGERON *et al.*, 2010).

A oncoproteína viral E7 também é capaz de ligar-se a p21 e p27, as quais também atuam como CDKIs, o que contribui para o descontrole do ciclo celular em diferentes pontos de checagem (FERRAZ *et al.*, 2012; OGUEJIOFOR *et al.*, 2013; PANNONE *et al.*, 2012). (Figura 8)

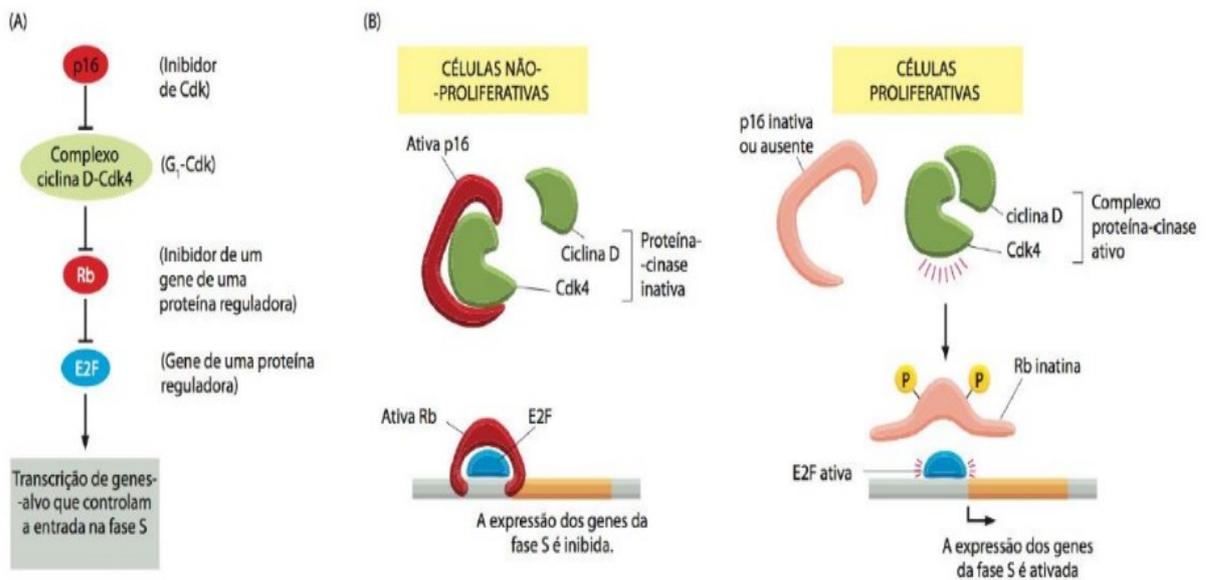


Figura 8. Relação entre as proteínas p16INK4a e pRb no controle do ciclo celular. (A) Esquema simplificado; (B) Ação de p16INK4a e pRb em células não proliferativas e proliferativas. Fonte: Adaptado de ALBERTS *et al.* (2006).

Carcinomas associados ao HPV são caracterizados por uma superexpressão do marcador p16INK4a (SANTOS *et al.*, 2004). Sua expressão é observada em núcleos e citoplasmas de células displásicas do epitélio escamoso, assim como em carcinomas (MISSAOUI *et al.*, 2010).

Desta forma, compreendendo os mecanismos de modificação do ciclo celular promovidos pelo HPV, tem sido proposto utilizar p16INK4a como um indicador da participação viral na carcinogênese dos tumores de origem epitelial. No entanto, até o momento não há um consenso estabelecido para esta aplicação e alguns estudos têm mostrado não existir uma correlação absoluta entre a presença do HPV e o acúmulo de p16INK4a (WENDT, 2013; ZARAVINOS, 2014).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a presença do Papilomavírus humano (HPV) e a superexpressão imunohistoquímica da p16INK4a em amostras de tecido parafinado representativo de tumor de pulmão oriundas de pacientes atendidos na Santa Casa da Misericórdia de Maceió – Alagoas, nos anos de 2020 a 2021.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar as amostras clínicas proveniente de tumores pulmonares conforme classificação histopatológica, gênero do paciente e ano;
- Detectar pela técnica de PCR o DNA de HPV nas amostras de tecido parafinado de pacientes com tumor de pulmão;
- Avaliar a prevalência do HPV nas amostras estudadas relacionando-as com os tipos de tumor de pulmão e ano da coleta.
- Analisar a expressão imunohistoquímica da p16INK4a das amostras estudadas.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Tipo do estudo**

Trata-se de um estudo realizado através do método observacional, analítico transversal.

### **4.2. Aspectos éticos da pesquisa**

O presente trabalho foi aprovado sob o CAAE nº 79884317.4.0000.5011 ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – UNCISAL, nº do parecer 2.729.138, e obedeceu integralmente aos princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

A identidade dos participantes permanecerá mantida em sigilo absoluto e o projeto não interferiu nos procedimentos de rotina do serviço.

### **4.3. Local de estudo e origem das amostras**

O estudo foi realizado tendo como base a análise dos prontuários médicos e o diagnóstico histopatológico positivo para tumor de pulmão de pacientes que foram submetidos a cirurgia oncológica provenientes da Santa Casa da Misericórdia, Maceió – Alagoas.

O processamento e avaliação laboratorial foi realizado no Laboratório de Pesquisa Citológicas e Moleculares (LPCM) e no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) do Centro de Biociências (CB) da UFPE onde possui uma equipe de profissionais e estrutura para realização dos experimentos com recursos subsidiados pelo Edital CNPq Universal 2018, processo 434520-2018-7.

### **4.4. Material de estudo**

No presente estudo foram resgatados 36 blocos histológico de amostras de tecido parafinado representativo de tumor de pulmão de pacientes atendidos na Santa Casa da Misericórdia, Maceió – Alagoas, no período de 2020 e 2021.

#### 4.5. Critérios de inclusão

- Prontuários médicos devidamente preenchidos;
- Amostras de biópsia parafinadas e preservadas;
- Relatório Anatomopatológico completo;

#### 4.6. Critérios de exclusão

- Amostras parafinadas que se apresentaram escassas e/ou danificadas;
- Amostras que não continham identificação adequada.

#### 4.7. Técnicas laboratoriais

##### 4.7.1. Extração dos ácidos nucleicos

Inicialmente foi realizado a desparafinação das amostras através do protocolo “*in house*”. Nos tubos contendo os cortes foi adicionado 1ml de xilol, homogeneizado no vórtex por 10 segundos e em seguida centrifugado na velocidade máxima (13.000 rpm) por 2 minutos, em temperatura ambiente. Esse processo se repetiu 2 vezes, descartando o sobrenadante após a centrifugação, para que fosse retirado toda a parafina. Após essa etapa, foi feito a lavagem do pellet, onde foi adicionado 1ml de etanol (96-100%) homogeneizado no vórtex por 10 segundos e centrifugado na velocidade máxima por 2 minutos. Em seguida, foi removido todo o resíduo de etanol cuidadosamente para não remover o pellet, e com o tubo aberto, foi colocado na estufa, a 37°C, para que todo etanol fosse evaporado.

Para extração do DNA foi utilizado o kit Qiagen (Isolation of genomic DNA from FFPE tissue sections). O sedimento celular foi ressuspendido adicionando 180µl do Buffer ATL, e em seguida 20µl de proteinase K, homogeneizado no vórtex. Após esse processo, as amostras foram incubadas na estufa por 1 hora a 56°C, e em seguidas levadas para o termo bloco onde ficaram por mais 1 hora a 90°C.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas brevemente em velocidade máxima por 1 minuto. Em seguida, foi acrescentado 200µl de Buffer AL à amostra, misturado no vórtex, e adicionado 200µl de etanol 96-100% e misturado novamente, e logo após centrifugado brevemente por 1 minuto. Cuidadosamente, foi transferido o

lisado para a coluna (2ml) e centrifugado a 8.000rpm por 1 minuto, descartando o tubo coletor, colocando outro em seguida. Foi adicionado a coluna 500µl do Buffer AW1, centrifugado a 8.00rpm por 1 minuto e descartado o tubo coletor. Logo após, foi adicionado a coluna 500µl do Buffer AW2, centrifugado na mesma velocidade por 1 minuto e descartado o tubo coletor. Em seguida, foi colocado um novo tubo coletor, centrifugado em velocidade máxima por 3 minutos, e descartado.

Após esse processo de purificação, a coluna foi colocada no tubo de 1,5ml (onde ficará armazenado o DNA) para ser feita a eluição onde adicionou-se 50µl de Buffer ATE no centro da membrana da coluna, incubado por 5 minutos em temperatura ambiente e em seguida centrifugado na velocidade máxima por 1 minuto. Esse processo foi repetido 2 vezes, para obtermos 2 eluições.

Após a extração, as amostras passaram por controle de qualidade em quantificação de DNA através de medição pelo equipamento NanoDrop™ Lite Spectrophotometer. Das 36 amostras selecionadas, 33 foram validadas para a fase de detecção de DNA do HPV, tendo sua concentração acima de 50µg e razão entre 1,80 a 1,99.

#### 4.7.2. Detecção do DNA do HPV

Para a detecção do DNA do HPV, foi utilizada a técnica de PCR convencional utilizando os iniciadores (primers) GP5/GP6, Forward: 5'-TTTGTTACTGTGGTAAG e Reverse: 5'-GAAAATAAACTGTAAATCA, amplificando um fragmento de aproximadamente 156pb da região L1 do genoma do HPV. Essa associação revela mais de 23 tipos de HPVs oncogênicos e não oncogênicos (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995).

A reação foi realizada utilizando um preparo para PCR (Mix) seguindo as normas do fabricante, contendo em cada tubo da amostra 2µl de 5x FIREPOL® Master Mix Ready to Load (Solis BioDyne Data Sheet – 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.3µl de cada primer (10pmol/µl), 4µl de DNA e H<sub>2</sub>O DNase Free completando um volume de 10µl. As condições de termociclagem foram realizadas de acordo com o protocolo do laboratório de estudos moleculares e terapia experimental – UPFE/CB, com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto com posterior extensão final a 72°C por 5 minutos.

A integridade do DNA foi confirmada por PCR amplificando um fragmento do gene da  $\beta$ -Globina usando os primers Beta1/Beta2 (BALDEZ *et al.*, 2009): 5'-ACACAACCTGTGTTCACTA-3' e 5'-GGTGAACGTGGATGAAGTTG-3' com as mesmas condições de PCR. Para as amostras que não amplificaram, foi realizado uma PCR amplificando um fragmento de 171 pares de bases do gene da  $\beta$ -Actina usando os primers: 5'- ATCCAACCGACTGCTGTCA -3' e 5'-AGCAAGCAGGAGTCAGATGAGT-3'.

Todas as amostras foram amplificadas na presença de controles positivo (plasmídeo do HPV-16 clonado) e negativo (água DNase Free). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de Agarose na concentração de 2%, por 30 minutos a 100volts e corados com brometo de etídio.

#### 4.7.3 Imunohistoquímica para p16

A imunohistoquímica para detecção da expressão da p16INK4a foi realizada em lâminas silanizadas contendo cortes histológicos de 4 $\mu$ m das amostras analisadas. Além disso, foram utilizados controles negativos e positivos, este de amostras conhecidas de tumores cervicais previamente identificados. O método utilizado foi conjugado HRP, do kit ImmPRESS® Excel Amplified Polymer Staining Kit, Anti-Mouse IgG, Peroxidase - Cat. No.: 7602, da marca Vector Laboratories. O anticorpo utilizado foi Anti-CDKN2A/p16INK4a(JC8) sc-56330, Santa Cruz Biotechnology, code: G-175-405; na diluição 1:50.

As lâminas foram desparafinizadas, seguindo protocolo estabelecido pelo fabricante e submetidas a 4 horas na estufa a 60°, depois passaram por 3 banhos de xilol por 10 minutos cada; após o xilol, as lâminas foram mergulhadas em álcool graduado (100% I, 100% II, 100%III, 90%, 80% e 70%) por 5 minutos cada. Após desparafinização, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos e PBS por 5 minutos. A recuperação antigênica foi feita em panela de pressão eletrônica, com as lâminas incubadas em citrato pH 6,0 – 0,01M. Após chegarem à temperatura ambiente, o bloqueio da peroxidase endógena era feito com BLOXALL (kit ImPRESS® - VECTOR Lab.) por 10 minutos.

As lâminas, em seguida, foram lavadas com PBS por 5 minutos, e incubadas com soro de cavalo a 2,5% por 20 minutos. Após remoção do excesso do soro, as lâminas eram incubadas em câmara escura overnight com o anticorpo anti-mouse

p16INK4a (JC8) sc-56330, Santa Cruz Biotechnology, na titulação de 1:50. No dia seguinte, após lavagem com PBS por 5 minutos, as amostras foram incubadas por 15 minutos com o anticorpo amplificador, depois lavadas novamente com PBS, incubadas com o reagente de visualização HRP (ImPRESS Polymer Reagent) por 30 minutos.

Após isso, foram efetuadas 2 lavagens com PBS, e incubadas por 5 minutos com a solução cromógena DAB do kit (o tempo foi padronizado conforme pilotos realizados anteriormente). Após seguir rigorosamente o tempo de exposição ao cromógeno, as lâminas foram rapidamente lavadas em PBS, 2 vezes, por 5 minutos cada. Depois, seguiram para lavagem com água limpa e foi efetuada a contra coloração por 1 minuto e 30 segundos com Hematoxilina diluída em 1:2 com água destilada. Por fim, com as lâminas secas, foram montadas com lamínula e Entellan® (Merk).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da amostra estudada

#### 5.1.1 Análise da amostra total

Foram analisadas 36 amostras parafinadas de tumor de pulmão de pacientes atendidos na Santa Casa da Misericórdia, em Maceió-AL no período de 2020 a 2021, escolhidas aleatoriamente baseadas no histopatológico positivo. Dessas amostras, 33 foram incluídas nesse estudo, com base nos critérios descritos na metodologia e nas análises de quantificação de DNA.

Analisando todas as amostras dos pacientes participantes desse estudo, pode-se observar que em relação ao gênero, 72,7% dos casos são mulheres, compreendendo 24 casos, enquanto homens foram 27,3%, o equivalente a 9 casos. (Gráfico 1)

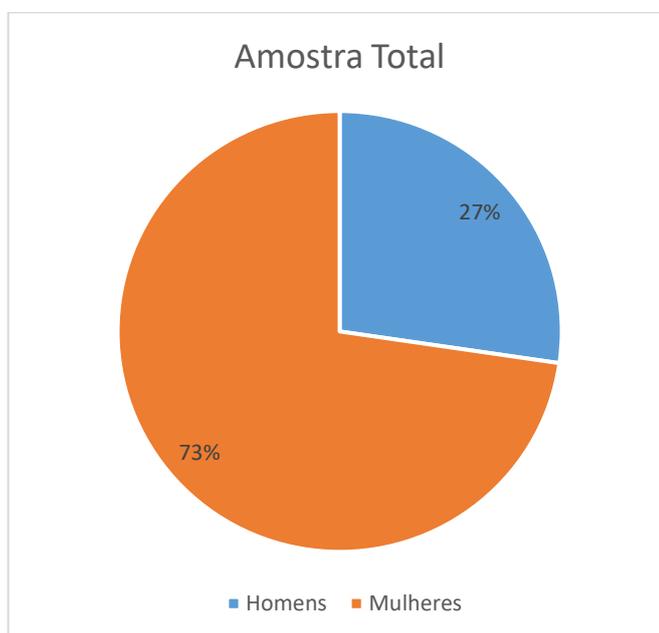


Gráfico 1. Amostra total evidenciando a porcentagem de casos entre mulheres e homens.

Com relação aos tipos de tumores analisados, foram separados 3 grupos: Adenocarcinoma; Carcinoma de Células Escamosas e Outros Carcinomas – nos quais se enquadram o carcinoma carcinoide, neuroendócrino de grandes células e as

metástases. Com relação ao total de amostra, 45,5% (15) dos casos foram de adenocarcinoma, sendo 86,7% (13) pacientes mulheres e 13,3% (2) pacientes homens. Com relação ao carcinoma de células escamosas, o total foi de 42,4% (14) de casos, sendo 57,1% (8) pacientes mulheres e 42,9% (6) pacientes homens. Para outros tipos de carcinoma foram observados 12,1% (4) dos casos, sendo este 75% (3) pacientes mulheres e 25% (1) pacientes homens. (Gráfico 2)

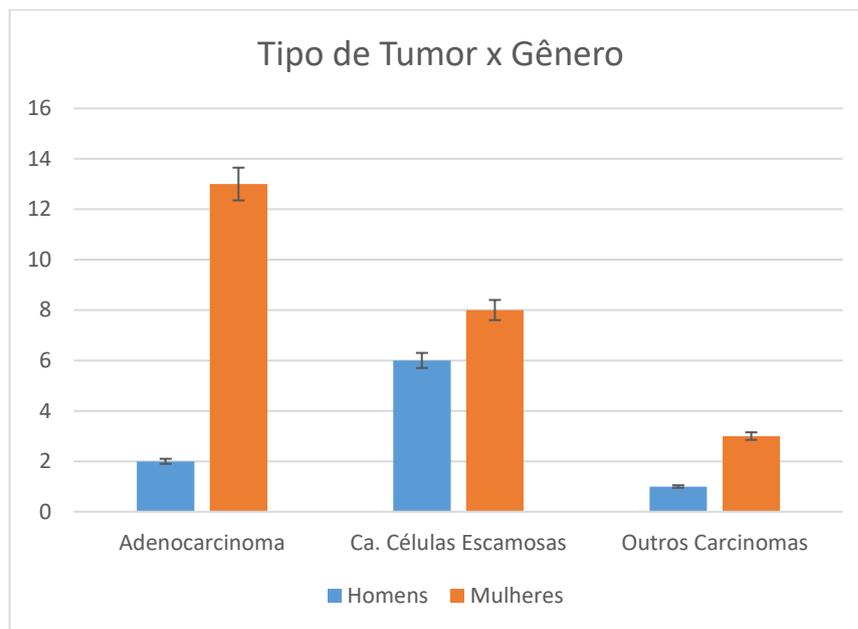


Gráfico 2. Relação da amostra total com o tipo de tumor e o gênero dos pacientes.

Com relação ao tabagismo dos pacientes das amostras analisadas, pode-se relacionar com os grupos de tumores separados e observou-se que os pacientes diagnosticados com adenocarcinoma pulmonar, 60% (9) não tinham o hábito de fumar. Já os pacientes com carcinoma de células escamosas, pouco mais de 70% (10) dos pacientes eram fumantes. Para os casos que se enquadraram na categoria outros carcinomas, pode-se observar que 75% (3) dos casos não tinha o tabagismo como fator de risco. (Gráfico 3)

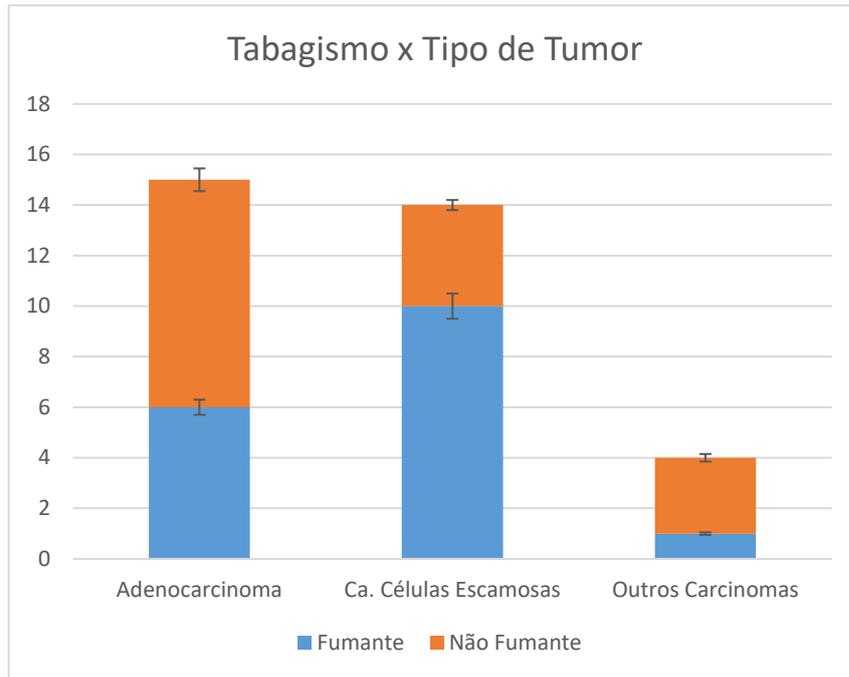


Gráfico 3. Relação da amostra total com o tipo de tumor e o tabagismo.

Analisando os anos das amostras selecionadas para o estudo, podemos visualizar no gráfico 4 que em 2020 obtivemos mais amostras com relação a 2021. Quanto ao gênero, pode-se observar que em 2020, das 18 amostras selecionadas, 77,8% (14) eram pacientes mulheres e 22,2% (4) homens. Já em 2021, de um total de 15 amostras, 66,7% (10) dos casos eram mulheres enquanto 33,3% (5) eram homens. (Gráfico 4)

Com relação ao tabagismo, pode-se observar que em 2020 55,5% (10) das amostras analisadas eram de pacientes que possuíam o hábito de fumar, já em 2021, apenas 46,6% (7) eram fumantes. (Gráfico 5)

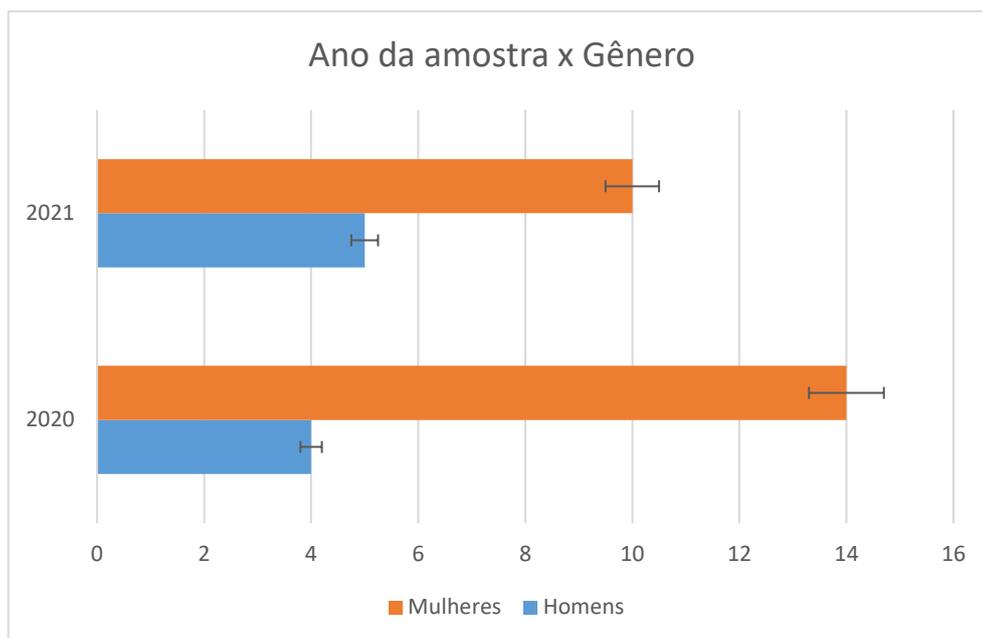


Gráfico 4. Relação do ano das amostras com o gênero dos pacientes.

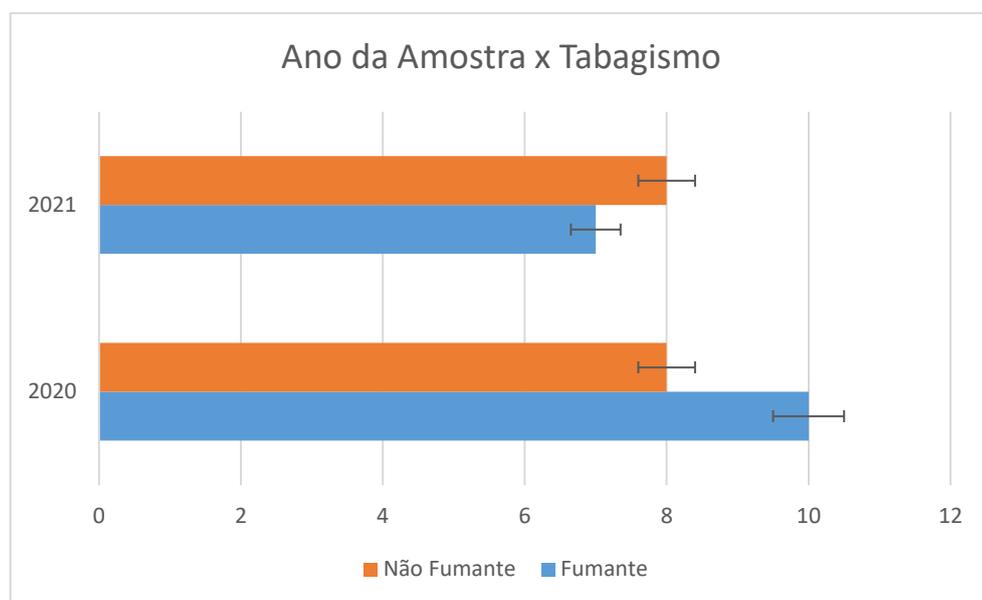


Gráfico 5. Relação do ano das amostras com o tabagismo.

Analisando as amostras ano a ano, podemos verificar que no ano de 2020 tivemos mais casos de carcinoma de células escamosas em relação ao ano de 2021, compreendendo 55,6% (10) dos casos totais desse ano, seguido de 33,3% (6) de casos de adenocarcinoma e 11,1% (2) casos relacionados a outros carcinomas. Já ano de 2021, observamos um maior número de casos de adenocarcinoma quando relacionado com o ano anterior analisado, sendo este 60% (9) dos casos totais desse

ano, seguido por 26,7% (4) de casos de carcinoma de células escamosas e 13,3% (2) de casos relacionados a outros carcinomas. (Gráfico 6)

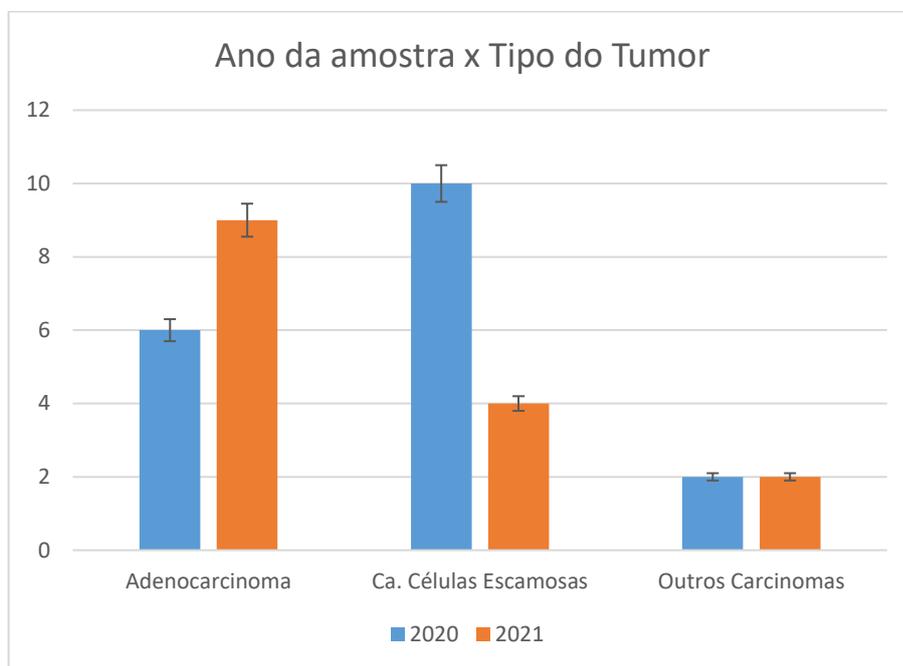


Gráfico 6. Relação dos tipos de tumores analisados com o ano das amostras.

Quando analisamos os tipos de tumores com relação ao gênero dos pacientes selecionados, podemos observar que em 2020 dos casos de carcinoma de células escamosas, 60% (6) foram de pacientes mulheres, enquanto que 40% (4) de homens. Se tratando do adenocarcinoma, 100% (6) dos casos desse ano foram mulheres. E por fim, apenas 2 casos relativos a outros carcinomas, compreendendo pacientes do sexo feminino. (Gráfico 7)

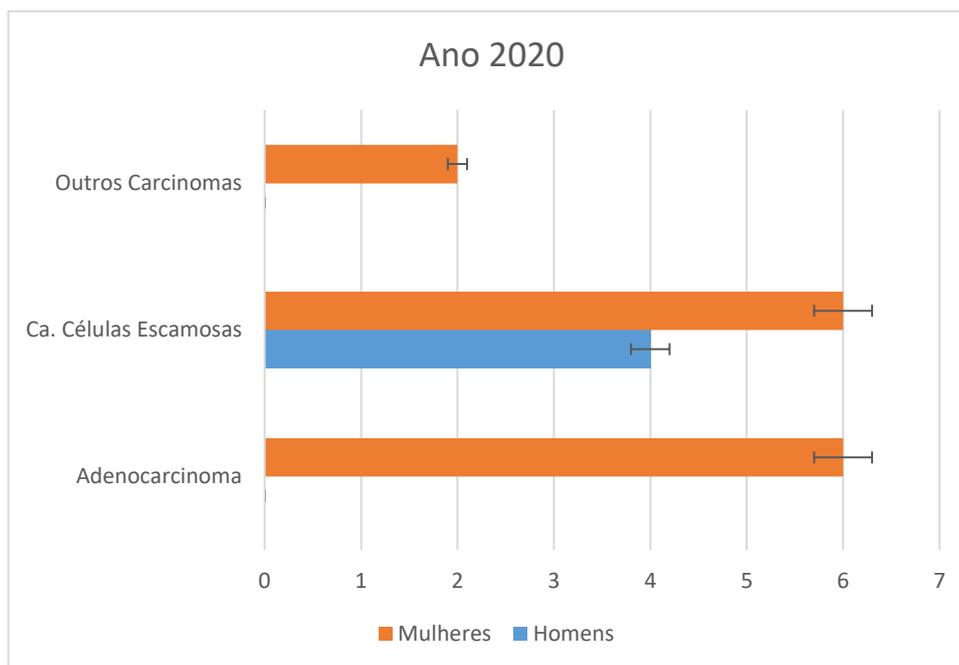


Gráfico 7. Relação dos tipos de tumor de pulmão analisados com o gênero do paciente, no ano de 2020.

No ano de 2021, pode-se observar que dentre os números de casos de adenocarcinoma dos anos analisados, este foi o que teve o maior número de casos, compreendendo 77,8% (7) pacientes mulheres e apenas 22,2% (2) homens. Em contrapartida, nos casos de carcinoma de células escamosas e os relacionados a outros carcinomas, ficou dividido, 50% dos casos em pacientes homens e 50% em mulheres. (Gráfico 8)

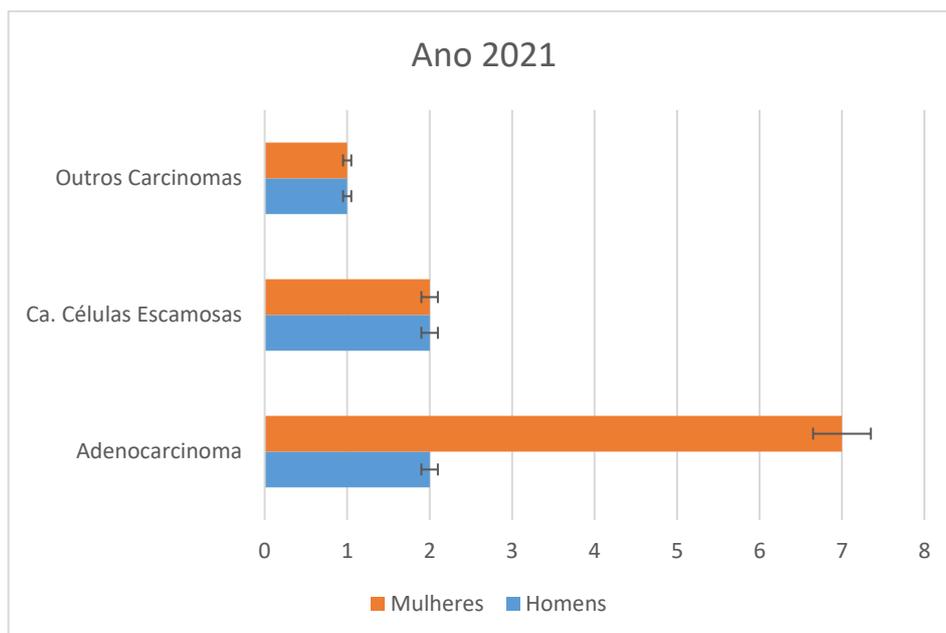


Gráfico 8. Relação dos tipos de tumor de pulmão analisados com o gênero do paciente, no ano de 2021.

## 5.2 Detecção viral

### 5.2.1 Avaliação da qualidade do DNA extraído

As amostras de DNA extraídas foram avaliadas quanto a sua qualidade. Sendo assim, foi realizada reação de PCR para a amplificação do gene  $\beta$ -globina das amostras dos anos de 2020 e 2021. (Figura 9)

Para as amostras que não amplificaram, foi realizado outra PCR para a amplificação do gene  $\beta$ -actina, considerando o tamanho do fragmento de DNA obtido nas extrações e a qualidade da amostra, visto que são parafinadas. (Figura 10)

Observou-se que quanto mais recente era a amostra, quando comparado ao ano da coleta, mais qualidade ela teve no momento da extração de DNA e conseqüentemente mais marcações positivas podem ser visualizadas no gel de eletroforese.

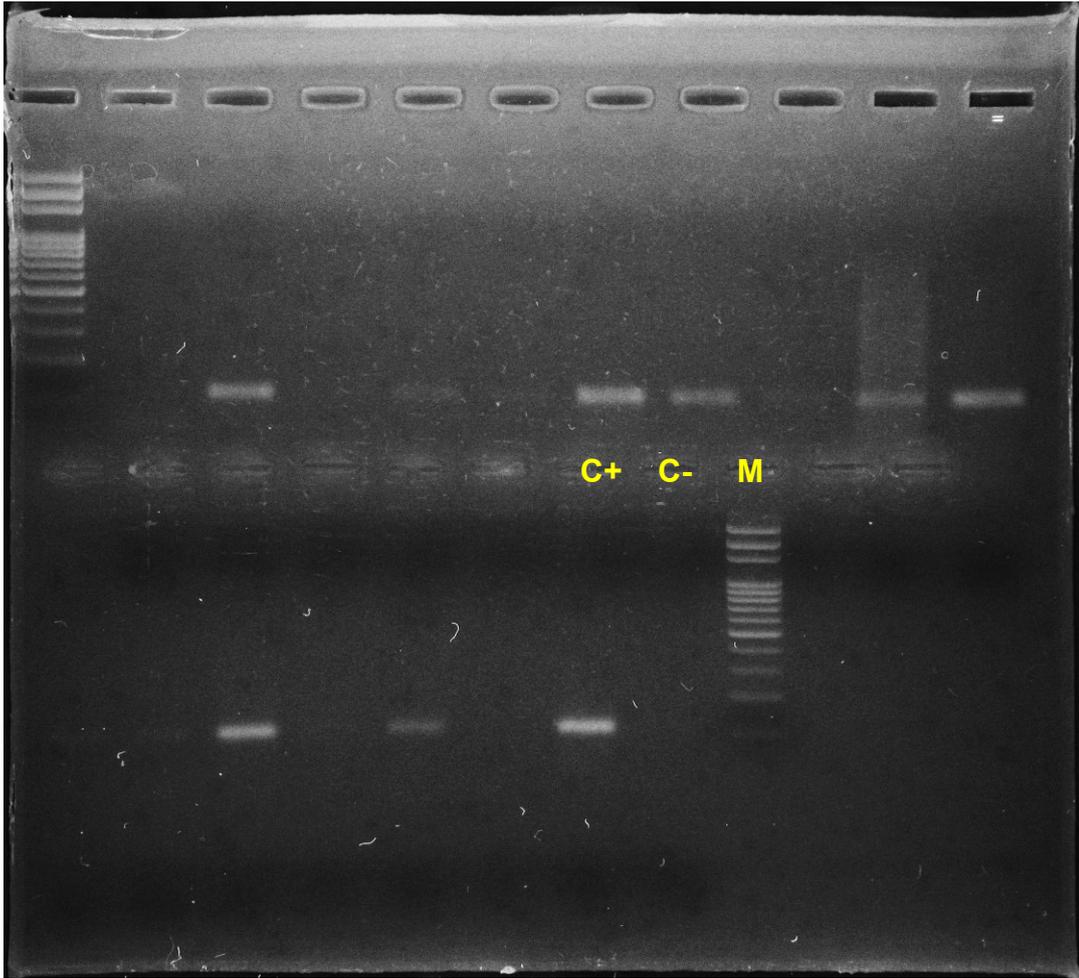


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 2% do produto da PCR com primers para  $\beta$ -globina. Controle positivo (C+). Controle negativo (C-). Marcador de 100 pares de base (M). Fonte: A autora. (2023)

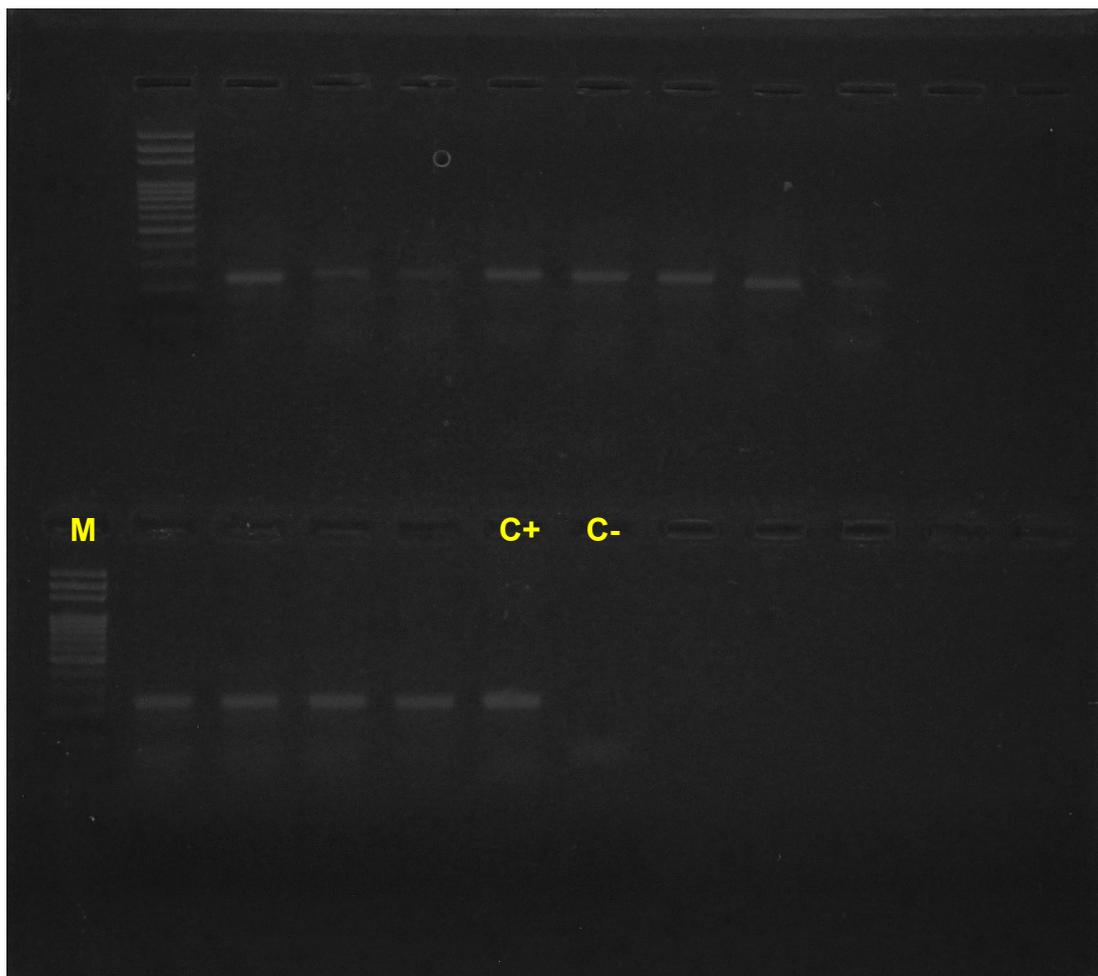


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 2% do produto da PCR com primers para  $\beta$ -actina. Controle positivo (C+). Controle negativo (C-). Marcador de 100 pares de base (M).  
Fonte: A autora. (2023)

### 5.2.2 Detecção do HPV com o primer GP6/9

A detecção do DNA do HPV se deu através da técnica de PCR utilizando primers GP5/GP6, amplificando um fragmento de aproximadamente 156pb da região L1 do genoma do HPV. O produto desta reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%.

A figura 11 corresponde a análise do produto da PCR das amostras do ano de 2020 e 2021. Nela, podemos verificar que todas as amostras se mostraram negativas para o HPV. As amostras que estavam com a banda da eletroforese inespecífica, foram também consideradas como negativas. Devido aos resultados negativos, não foi realizado a genotipagem das amostras com primers específicos para E6 e E7 HPV 16/18.

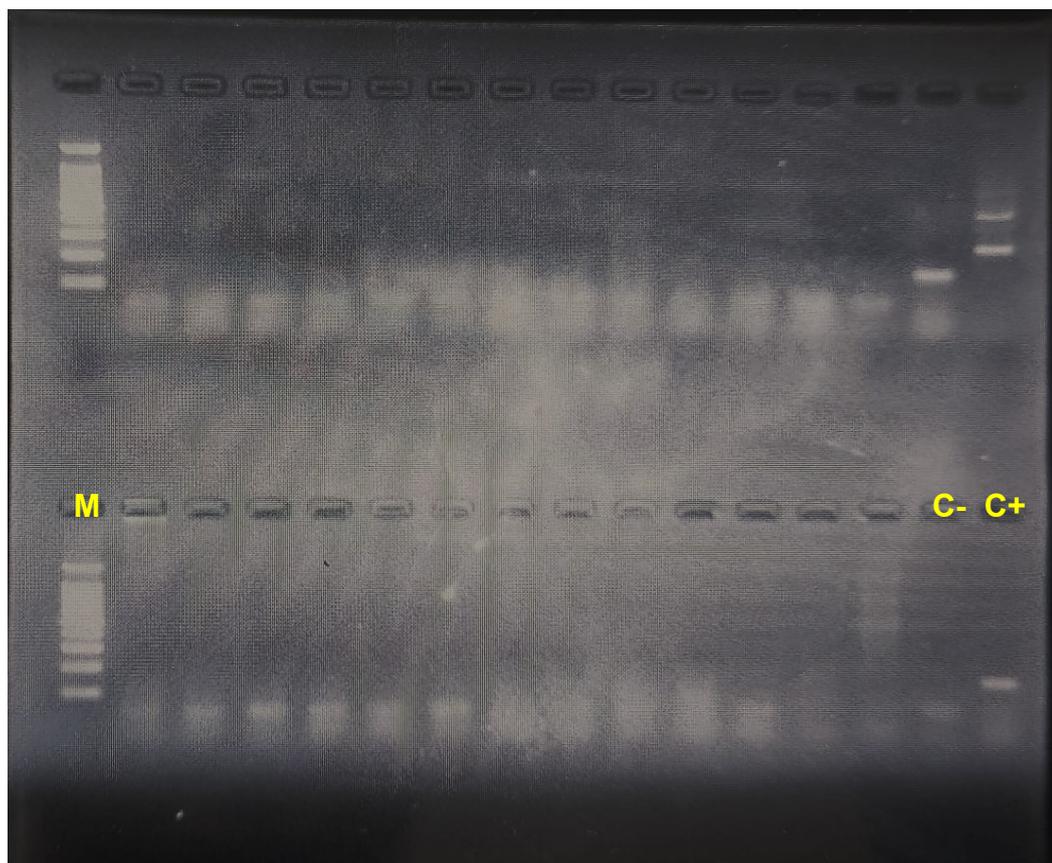


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 2% do produto da PCR com primers para GP6/9 das amostras de 2020 e 2021. Controle positivo (C+). Controle negativo (C-). Marcador de 100 pares de base (M). Fonte: A autora. (2023).

### 5.3 Reação de Imunohistoquímica para p16INK4a

Com relação a expressão da proteína p16INK4a por imunohistoquímica, dos 33 casos analisados, 51,5% (17) não foram reativos. Já as amostras positivas foram 48,5% (16) e suas reatividades foram categorizadas como moderada e fraca. Além disso, o controle positivo teve uma acentuada marcação, o que validou a reação. (Figura 10)

Relacionando as amostras positivas para p16INK4a e o gênero dos pacientes, observou-se que 75% (12) dos casos foram de pacientes mulheres. Já com relação ao tipo de tumor, 56,3% (9) dos casos está relacionado ao carcinoma de células escamosas, enquanto que 37,5% (6) são de adenocarcinoma e apenas 6,2% (1) relacionados a outros carcinomas. Se tratando do tabagismo, observamos que das

amostras positivas, 56,2% (9) dos pacientes mantinham o hábito de fumar, enquanto que 43,8% (7) não tinham relação direta com o tabaco.

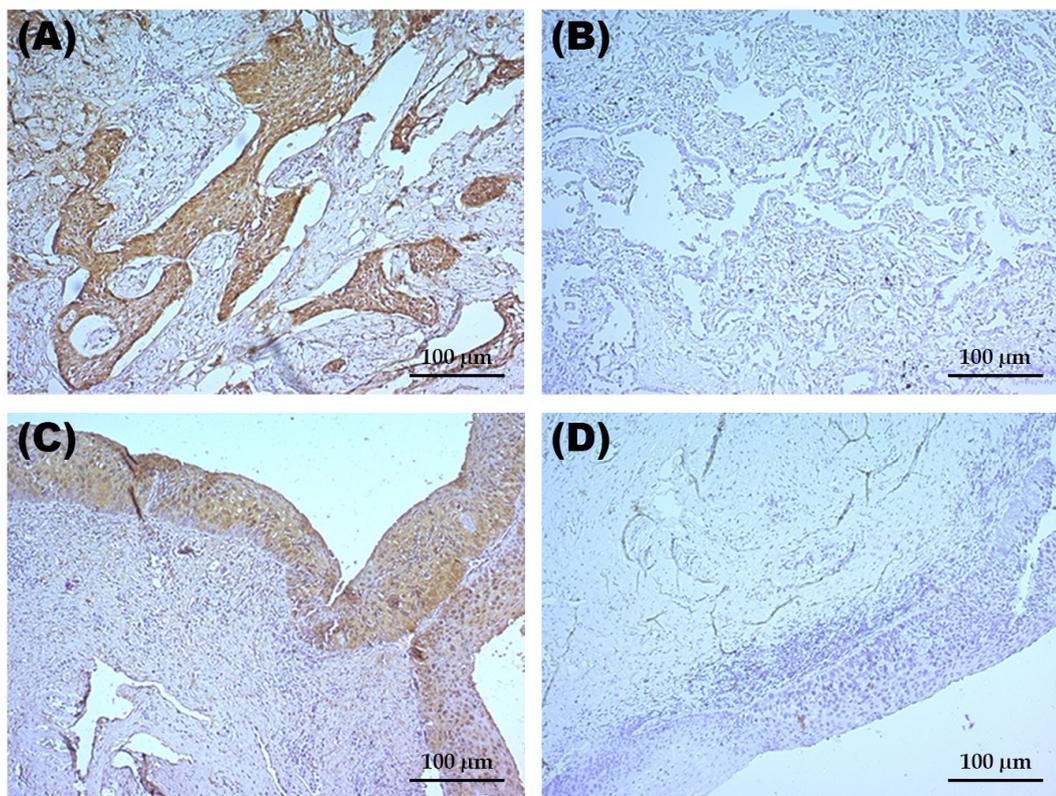


Figura 12. (A) Amostra positiva para p16INK4a em tumor de pulmão, observa-se forte marcação de núcleo nas células. (B) Amostra negativa para p16INK4a em tumor de pulmão. (C) Amostra de câncer cervical sendo o controle positivo da p16INK4a. (D) Amostra tecido escamoso como controle negativo da p16INK4a. Fonte: A autora (2023).

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a possível relação do HPV em tumores de pulmão e a expressão da proteína p16INK4a pela técnica de imunohistoquímica, utilizando amostras proveniente de pacientes atendidos na Santa Casa da Misericórdia, em Maceió, Alagoas. A infecção por HPV é um importante fator patogênico e está associada a diversos tipos de lesões benignas e cancerígenas, sendo elas genitais ou em outros tecidos, entre eles, o câncer de pulmão (PARKIN *et al.*, 2005; KLEIN *et al.*, 2009).

Os dados do presente estudo não forneceram evidências para uma possível relação entre câncer de pulmão e infecção por HPV. Tal resultado pode estar associado a diversos fatores, como o tamanho do primer utilizado, técnica utilizada, degradação do DNA das amostras, o tipo da amostra e/ou protocolos baseados em pesquisas com material cervical, já que não existem estudos suficientes evidenciando a relação do câncer de pulmão com o HPV.

Com relação às técnicas para detecção do DNA viral, estudos evidenciam que a técnica de PCR, tem boa confiabilidade para ambos os tipos de amostra, parafinadas ou a fresco, possuindo uma alta sensibilidade para detecção do HPV, sendo mais sensível que a técnica de captura híbrida (MEHRA *et al.*, 2013; SARCHIANAKI *et al.*, 2014; SYRJÄNEM *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014). No entanto, a PCR apresenta dificuldades na obtenção de amplicons em grandes quantidades quando se utiliza tecidos parafinados, pois nestes o DNA pode estar fragmentado e sofrer modificações, enquanto que a amostras de tecido fresco congelado, o DNA sofre menos degradação (RODRIGUES *et al.*, 2009; YANAGAWA *et al.*, 2013), o que pode justificar a não detecção do DNA do HPV nas amostras analisadas no estudo.

O potencial oncogênico do HPV de alto risco depende da expressão das oncoproteínas E6 e E7, podendo ser analisadas tanto pela técnica de PCR quanto pela imunohistoquímica. Somente a detecção do DNA do HPV não afirma que o vírus está auxiliando na carcinogênese tumoral, é preciso analisar também sua atividade viral detectando as principais oncoproteínas. Caso, as mesmas não forem detectadas, o HPV pode estar presente no tecido apenas de forma episomal, não corroborando assim com a modulação dos genes supressores de tumor nem com a carcinogênese como um todo.

Apesar de pesquisadores sugerirem que a presença do HPV no câncer de pulmão seja simplesmente oportunista (COISSARD *et al.*, 2005), se a infecção pelo HPV fosse encontrada, os genótipos de alto risco com potencial oncogênico também seriam identificados. Com relação aos genótipos de alto risco mais comuns, estudos relatam que, em câncer de pulmão, o HPV 16 foi o mais frequente com uma prevalência duas vezes maior em comparação com o HPV 18, estando presente em mais de 90% dos casos em todo mundo (JEMAL *et al.*, 2013; KLEIN *et al.*, 2009; PARKIN *et al.*, 2005). ZHAI *et al.*, 2015 observaram prevalência de HPV 16/18 maior em carcinoma de células escamosas (45,18%) do que em adenocarcinoma (22,78%). YU *et al.*, 2009 encontraram que HPV 16/18 apresentou prevalência de 43,1% em carcinoma de células escamosas.

Esses achados também suportam a hipótese de que as infecções por HPV com potencial oncogênico de alto risco aumentam significativamente o risco de câncer de pulmão e oferecem novas possibilidades, no futuro, na prevenção do câncer de pulmão por meio de vacinas profiláticas para as infecções cancerígenas por HPV-16/18 (TOTA *et al.*, 2020).

Além do tipo 16 e 18, foram encontrados também os tipos 31, 33, 6 e 11. Os tipos de baixo risco para lesões cervicais, 6 e 11 foram encontrados associados a carcinomas de células escamosas e também em todos os outros subtipos dos cânceres de pulmão de células não-pequenas. Também foram encontrados, os tipos 26 e 45 em carcinoma de pulmão de células não-pequenas e de pequenas células, e o tipo 35 no carcinoma de pulmão de células não pequenas (KLEIN *et al.*, 2009; SRINIVASAN *et al.*, 2009).

Em HPV, estudos mostraram que a variação no potencial oncogênico, persistência e progressão da infecção estão relacionadas com as variantes de L1, E6, E7, LCR (CHARGAS *et al.*, 2011; GURGEL *et al.*, 2013), pois tais alterações genéticas interferem desde a forma como as oncoproteínas interagem com as proteínas celulares, reconhecimento do sistema imunológico como também com a alteração na expressão dos oncogenes virais (GURGEL *et al.*, 2013).

Um estudo realizado na Bulgária referiu a possível associação entre HPV e câncer de pulmão, porém, a associação entre o status de HPV16/18 e o diagnóstico histopatológico não foi encontrada (SHIKOVA *et al.*, 2017). Em contra partida, foram encontrados alguns artigos que relataram possíveis mecanismos, como modulação da disposição de genes de apoptose e supressão tumoral do hospedeiro, utilizados

pelas oncoproteínas E6 e E7 do HPV para induzir o desenvolvimento do câncer de pulmão (BUONOMO *et al.*, 2011; CHENG *et al.*, 2007; KLEIN *et al.*, 2009; SUNG W.W., LEE W., 2013; LIU *et al.*, 2005; TUNG *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2011).

Quanto à rota de transmissão do HPV detectado na carcinogênese pulmonar, algumas hipóteses podem ser levantadas. Atividade sexual oral pode ser uma possível via de acesso de HPV para as células de pulmão. Uma hipótese a ser estudada é de que o vírus entra através da cavidade oral e se propaga entre as células até atingir o pulmão. Estudos em câncer da cavidade orofaringe tem observado que o comportamento sexual foi um fator de risco significativo para a infecção do HPV e os pacientes que relataram contato oral-anal apresentaram um risco de maior de desenvolver a doença (MA *et al.* 2007; SMITH *et al.*, 2004; SHUYAMA *et al.*, 2007; TORNESELLO *et al.*, 2009).

Por outro lado, uma via possível é a hematogênica. Estudos detectaram diferentes tipos de HPV (6, 11, 16 e 18) em células mononucleares de sangue periférico (BODAGHI *et al.*, 2005), no plasma (DONG *et al.*, 2002), no soro (LIU *et al.*, 2001), além de ser encontrado no sangue arterial do cordão umbilical (ROMBALDI *et al.*, 2008). Analisando o sangue de doadores para transfusão, BODAGUI *et al.*, 2005 detectaram HPV 16 em 15,8% do sangue periférico de doadores saudáveis.

O DNA de HPV tem sido também detectado no sangue de pessoas com câncer de pulmão. CHIOU *et al.*, 2003, observaram que pacientes com carcinoma de pulmão de células não pequenas, apresentaram uma alta prevalência de HPV na corrente sanguínea. Além disso, eles observaram que células do sangue periférico transportavam DNA de HPV em seus núcleos. Esses dados abrem uma nova perspectiva no tocante à origem da infecção, podendo o sangue ser um reservatório do DNA viral contribuindo para a disseminação do vírus.

Outros estudos têm detectado o HPV em cânceres de mama (WANG *et al.*, 2014), colorretal (LEE *et al.*, 2001), pele (IANNACONE *et al.*, 2013), dentre outros. Contudo, o HPV, encontra-se muito bem estabelecido e adaptado às células cervicais de seu hospedeiro. Porém, o que leva este vírus infectar outras regiões, como o pulmão, que distam do seu sítio comum de infecção e que meios são utilizados pelo vírus como rota para atingir tais regiões, são alguns questionamentos que surgem e que precisam ser esclarecidos.

Com relação a reação imunohistoquímica para p16INK4a, a mesma não apresentou resultados significantes. Embora estudiosos evidenciem uma relação

positiva entre sua expressão, o câncer de pulmão e seu prognóstico (PEZZUDO *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2019), apenas o teste para p16INK4a não se mostrou um bom parâmetro associativo entre a presença ou não do HPV no tecido analisado e a expressão da p16INK4a nas amostras estudadas, podendo ser associada a pesquisa de p53, pRb e as oncoproteínas E6 e E7 do HPV.

Apesar de estar associada à presença do HPV em neoplasias cervicais e a expressão do gene E6, a p16INK4a está expressa em neoplasias malignas em outros tecidos (MUNGER *et al.*, 2004). Um estudo realizado por ZHOU *et al.*, 2019, sugeriu que a p16INK4a pode ser um biomarcador potencial em adenocarcinomas pulmonares primários, devido a sua alta reatividade na reação de imunohistoquímica. Porém, segundo CAI e HAN 2015, não encontraram nenhuma associação entre a expressão da p16INK4a com o grau das lesões, tal estudo corrobora com os dados encontrados no presente trabalho. Com isso, não foi possível neste estudo estabelecer a associação direta da expressão da p16INK4a, o HPV e a carcinogênese nos tumores de pulmão analisados.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A detecção do DNA do HPV se mostrou extremamente dificultosa devido ao caráter da amostra (material parafinado), acredita-se que a degradação do material prejudicou na amplificação e detecção do DNA do HPV. Observamos também que uso da PCR convencional para GP5/6 pode não ser o melhor método para detecção de DNA do HPV, sendo necessárias análises com primers aprimorados, seguidos de sequenciamento visando identificar tipos específicos para HPV, além de outras técnicas como PCR em tempo real e hibridização *in situ*.

O estudo se mostrou promissor norteando sobre que caminho seguir para uma melhor elucidação da associação do HPV com o câncer de pulmão, apesar dos resultados obtidos não se apresentarem conclusivos para a hipótese inicial. Diante disso, faz-se necessário mais estudos sobre essa associação buscando evidenciar a detecção da atividade viral do HPV para assim esclarecer a relação do vírus com a carcinogênese pulmonar.

## REFERÊNCIAS

ALAM S, BOWSER BS, CONWAY MJ, ISRAR M, RYNDOCK EJ, XI LF, MEYERS C. **Downregulation of Cdc2/CDK1 kinase activity induces the synthesis of noninfectious human papillomavirus type 31b virions in organotypic tissues exposed to benzo[a]pyrene.** J Virol. v. 84, p. 4630–4645, 2010.

**AMERICAN CANCER SOCIETY – Cancer Facts & Figures 2019.** Disponível em <<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html>> Acesso em 20 ago 2020.

**AMERICAN CANCER SOCIETY - Key Statistics for Lung Cancer, 2023.**

Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about/key-statistics.html>> Acesso em 15 jan 2023

ARAÚJO L. H. *et al.* **Câncer de Pulmão no Brasil.** J Bras Pneumol. v. 44, n. 1, p. 55-64, 2018.

AZEVEDO G., GIRIANELI V., GAMARRA C. **Disparities in cervical and breast cancer mortality in Brazil.** Rev. Saúde Pública v.48, n. 3. 2014

BALDEZ DA SILVA MF, CHAGAS BS, GUIMARAES V, KATZ LMC, *et al.* **HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil.** Genet Mol Res. v. 8, n. 4, p. 1437-1443, 2009.

BEHREND L, HENDERSON G, ZWACKA RM. **Reactive oxygen species in oncogenic transformation.** Biochem Soc Trans. v. 31, n. 6, p. 1441-1444, 2003.

BERGERON C, ORDI J, SCHMIDT D, TRUNK MJ, KELLER T, RIDDER R . **Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia.** Am J Clin Pathol. v.133, n. 3, p. 395-406, 2010.

BERNARD, H. U. *et al.* **Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments.** Virology, v. 401, n. 1, p. 70-79, 2010.

BODAGHI S, WOOD LV, ROBY G, RYDER C, STEINBERG SM and ZHENG ZM. **Could human papillomaviruses be spread through blood?** J Clin Microbiol. v. 43, n. 11, p. 5428-5434, 2005.

BRANICA B. V. *et al.* **Detection of Human Papillomaviruses Type 16, 18 and 33 in Bronchial Aspirates of Lung Carcinoma Patients by Polymerase Chain Reaction: A Study of 84 Cases in Croatia.** Coll Antropol. v. 34, n. 1, p. 159-162, 2010.

BRAVO IG, DE SANJOSÉ S AND GOTTSCHLING, M. **The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses.** Trends Microbiol. v. 18, n.10, p. 432-438, 2010.

BUONOMO T, CARRARESI L, ROSSINI M, MARTINELLI R. **Involvement of aryl hydrocarbon receptor signaling in the development of small cell lung cancer induced by HPV E6/E7 oncoproteins.** J transl med. v.9. n 2, p 1-11, 2011.

BURK, RD, HARARI A, CHEN Z. **Human papillomavirus genome variants.** Virology. v. 445, n. 1-2, p. 232-243, 2013.

BUYRU N, TEZOL A, DALAY N. **Coexistence of K-ras mutations and HPV infection in colon cancer.** BMC Cancer.v.6, p. 115, 2006.

CAI, S.; HAN, K. **Research on expression and importance of p53, p16 and VEGFC in cervical cancer.** J Gynecol Obstet Biol Reprod. v.44, n. 7, p. 639-645, 2015.

CAMARA, G.N.N.L.; CRUZ M.R.; VERAS, V.S.; MARTINS, C.R.F. **O papilomavírus humanos - HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico.** Universidade Ciências da Saúde. v.1, p.149-158. 2003.

CARPAGNANO G. E. *et al.* **HPV in exhaled breath condensate of lung cancer patients.** Br J Cancer. v. 105, p. 1183- 1190, 2011.

CHAGAS, B. S. *et al.* **New variants of E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus type 31 identified in Northeastern Brazil.** Gynecologic Oncology, v. 123, n. 2, p. 284–288, 2011.

CHENG Y.W. *et al.* **Human Papillomavirus 16/18 E6 Oncoprotein Is Expressed in Lung Cancer and Related with p53 Inactivation.** Cancer Res. v. 67, p. 10686-10693, 2007.

CHIOU H. L. *et al.* **The presence of Human Papillomavirus Type 16/18 DNA in Blood Circulation May Act as a Risk Marker of Lung Cancer in Taiwan.** Cancer. v. 97, n. 6, p. 1558-1563, 2003.

COISSARD C. J. *et al.* **Prevalence of human papillomaviruses in lung carcinomas: a study of 218 cases.** Mod Pathol v. 18, p. 1606-1609, 2005.

DALLOUL, H. M. M.; EL-NWAIRY, K. A.; SHORAF A, A. Z.; ABU SAMAHA, A. S. **Synthesis and antimicrobial activities evaluation of some new thiadiazinone and thiadiazepinone derivatives bearing sulfonamide moiety.** Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, v. 193, n. 5, p. 288–293, 2018

DE FREITAS, A. C. *et al.* **Susceptibility to cervical cancer: An overview.** Gynecologic Oncology. v. 126, n. 2, p. 304–311, 2012.

DE RODA HUSMAN AM, WALBOOMERS JM, VAN DEN BRULE AJ, MEIJER CJ, AND SNIJDERS PJ. **The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR.** J Gen Virol v. 76, n. 4, p. 1057-1062, 1995.

DE SANJOSÉ, S.; BROTONS, M.; PAVÓN, M. A. **The natural history of human papillomavirus infection.** Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, v. 47, p. 2-13, 2018.

DE VILLIERS, E. M. *et al.* **Classification of papillomaviruses.** *Virology*, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DONG SM, PAI SI, RHA SH, HILDESHEIM A, KURMAN RJ, *et al.* **Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* v. 11, n.1, p. 3-6, 2002.

DOORBAR J, EGAWA N, GRIFFIN H, KRANJEC C and MURAKAMI I. **Human papillomavirus molecular biology and disease association.** *Rev Med Virol.* v. 25, n. S1, p. 2-23, 2015.

DUENSING, S.; MÜNGER, K. **Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins.** *Progress in Cell Cycle Research*, v. 5, p. 383-391, 2005.

FARIA, Livia Silva de Paula *et al.* **Perfil epidemiológico do câncer de próstata no brasil: retrato de uma década.** *REVISTA UNINGÁ, [S.I.]*, v. 57, n. 4, p. 76-84, 2020

FERLAY J *et al.* **Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods.** *Int J Cancer.* v.144, n. 8, p. 1941-1953, 2019

FERRAZ, L. D. C. *et al.* **Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos.** *Journal of the Health Sciences Institute*, v. 30, n. 2, p. 107–111, 2012.

GOODWIN EC, YANG E, LEE CJ, LEE HW, DIMAIO D AND HWANG ES. **Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* v. 97, p. 10978–10983, 2000.

GUO, L *et al.* **Human papillomavirus infection as a prognostic marker for lung adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis.** *Oncotarget.* v. 8, p. 34507-34515, 2017.

GURGEL, A. P. A. D. *et al.* **Prevalence and genetic variability in capsid L1 gene of rare human papillomaviruses (HPV) found in cervical lesions of women from North-East Brazil.** *BioMed research international.* v. 2013, p. 546354, 2013.

HENSING T, CHAWLA A, BATRA R AND SALGIA R. **A personalized treatment for lung cancer: molecular pathways, targeted therapies, and genomic characterization.** In *Systems Analysis of Human Multigene Disorders.* Springer New York. p. 85-117, 2014

HOLLEN PJ, GRALLA RJ, KRIS MG, COX C, *et al.* **Measurement of Quality of life in Patients with Lung Cancer in Multicenter Trials of New Therapies.** *Cancer.* v. 73, n. 8, p.2087-2098, 1995.

HOWLADER N, NOONE AM, KRAPCHO M, NEYMAN N, *et al.* **SEER cancer statistics review, 1975–2008.** Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2011.

IANNACONE MR, GHEIT T, WATERBOER T, GIULIANO AR, MESSINA JL, *et al.* **Case– control study of cutaneous human papillomavirus infection in basal cell carcinoma of the skin.** J Invest Dermatol. v. 133, n. 6, p. 1512-1520, 2013.

**Instituto Nacional de Câncer. Brasil – Estimativa de novos casos.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/estado-capital/brasil>>. Acesso em: 15 jan 2023.

**Internacional Human Papilomavirus Reference Center, 2019.** Disponível em: <<https://www.hpvcenter.se/>>. Acesso em: 25 nov 2020.

IWAKAWA R, KOHNO T, ENARI M, KIYONO T, YOKOTA J. **Prevalence of human papillomavirus 16/18/33 infection and p53 mutation in lung adenocarcinoma.** Cancer Sci. v. 101, n. 8, p. 1891-1896, 2010.

JEMAL, A. *et al.* **Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2009, Featuring the Burden and Trends in Human Papillomavirus (HPV)–Associated Cancers and HPV Vaccination Coverage Levels.** Journal of the National Cancer Institute, p. 491, 2013.

KAWAGUCHI T, TAKADA M, KUBO A, MATSUMURA A, *et al.* **Performance status and smoking status are independent favorable prognostic factors for survival in non-small cell lung cancer: a comprehensive analysis of 26,957 patients with NSCLC.** J Thorac Oncol. v. 5, n. 5, p.620-630, 2010.

KLEIN F., KOTB W. F. A., PETERSEN I. **Incidence of human papilloma virus in lung cancer.** Lung Cancer. v.65 n. 1, p. 13-18, 2009.

KOMETANI T, YOSHINO I, MIURA N, OKAZAKI H, OHBA T, TAKENAKA T, *et. al.* **Benzo [a] pyrene promotes proliferation of human lung cancer cells by accelerating the epidermal growth factor receptor signaling pathway.** Cancer lett. v. 278, n. 1, p. 27-33, 2009.

LAZARCZYK M, CASSONNET P, PONS C, JACOB Y AND FAVRE M. **The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections.** Microbiol Mol Biol Ver. v. 73, n. 2, p.348-370, 2009.

LEE YM, LEU SY, CHIANG H, FUNG CP AND LIU WT. **Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer.** J Microbiol Immunol Infect. v. 34, n. 2, p. 87-91, 2001.

LETO MGP., *et al.* **Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations.** An Bras Dermatol. v. 86 n. 2, p. 306-317, 2011.

LI N, BI X, ZHANG Y, ZHAO P, ZHENG T, DAI M. **Human papillomavirus infection and sporadic breast carcinoma risk: a meta-analysis.** Breast Cancer Res Treat. 2010.

LIU X. *et al.* **The E6AP ubiquitin ligase is required for transactivation of the hTERT promoter by the human papillomavirus E6 oncoprotein.** J Biol Chem v.280, n.11, p. 10807-10816, 2005.

LIU Y, KLIMBERG VS, ANDREWS NR, HICKS CR, PENG H, CHIRIVA-INTERNATI M, *et al.* **Human papillomavirus DNA is present in a subset of unselected breast cancers.** J Hum Virol. v. 4, n. 6, p. 329-334, 2001.

LORENZON L, FERRI M, PILOZZI E, TORRISI MR, ZIPARO V, FRENCH D. **Human papillomavirus and colorectal cancer: evidences and pitfalls of published literature.** Int J Colorectal Dis. 2010.

MA TY, LIU WK, CHU YL, JIANG XY, AN Y, ZHANG MP, *et al.* **Detection of human papillomavirus type 16 DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens of gastric carcinoma.** Eur J Gastroenterol Hepatol. v. 19, n. 12, p. 1090-1096, 2007.

MANZIONE C., NADAL S. **Human papillomavirus and its association with colorectal carcinoma.** Rev bras. colo-proctol. v. 30, n. 4, 2010.

MEHRA R, *et al.* **A pilot study of the association and prevalence of the human papillomavirus (HPV) in non-small cell lung cancer (NSCLC).** Cancer Res. v. 73, n. 8 Supplement, p. 4785- 4785, 2013.

MISSAOUI N, *et al.* **p16INK4a overexpression in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix in Tunisian women.** Pathol Res Pract. 2010.

MOLDEN T, KRAUS I, KARLSEN F, SKOMEDAL H AND HAGMAR B **Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age.** Gynecol Oncol. v. 100, n. 1, p. 95-100, 2006.

MUNGER, K. *et al.* **Mechanisms of human papillomavirus- induced oncogenesis.** J Virol. v. 78, p. 11451–11460, 2004.

MUÑOZ JP, GONZÁLEZ C, PARRA B, CORVALÁN AH, TORNESELLO ML, EIZURU Y, AGUAYO F. **Functional interaction between human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins and cigarette smoke components in lung epithelial cells.** PloS one v. 7, n. 5, p. 38178, 2012.

**Organização Pan-Americana de Saúde / Organização Mundial de Saúde – Câncer.** Disponível em: < <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>> Acesso em: 15 jan de 2023.

OGUEJIOFOR, K. K. *et al.* **The prognostic significance of the biomarker p16 in oropharyngeal squamous cell carcinoma.** Clinical oncology, v. 25, n. 11, p. 630–8, 2013.

PACHECO-PÉREZ *et al.* **Fatores ambientais e conscientização sobre o câncer colorretal em pessoas com risco familiar.** Rev Lat Am Enfermagem. v. 27, 2019

PANNONE, G. *et al.* **Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization.** *Infectious agents and cancer*, v. 7, n. 1, p. 4, 2012.

PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J, PISANI P. **Global cancer statistics, 2002.** *CA Cancer J Clin.* v. 55, p. 74-108, 2005.

PEÑA N, CARRILLO D, MUÑOZ JP, CHNAIDERMAN J, URZÚA U, *et. al.* **Tobacco Smoke Activates Human Papillomavirus 16 p97 Promoter and Cooperates with High-Risk E6/E7 for Oxidative DNA Damage in Lung Cells.** *PloS one.* v. 10, n. 4, p. 0123029, 2015.

PÉREZ LO, ABBA MC, DULOUT FN, GOLIJOW CD. **Evaluation of p53 codon 72 polymorphism in adenocarcinomas of the colon and rectum in La Plata, Argentina.** *World J Gastroenterol.* v. 12, n. 9, p. 1426-1429, 2006.

PEZZUTO A, D'ASCANIO M, RICCI A, *et. al.* **Expression and role of p16 and GLUT1 in malignant diseases and lung câncer: A review.** *Thoracic Cancer.* p. 3060-3070, 2020.

ROMBALDI RL, SERAFINI EP, MANDELLI J, ZIMMERMANN E and LOSQUIAVO KP. **Transplacental transmission of human papillomavirus.** *Virol J.* v. 5, p.106, 2008.

RODRIGUES, A.D. *et al.* **Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* v. 45, n. 6, dez 2009

SANTOS, M. *et al.* **Immunohistochemical staining for p16 and p53 in premalignant and malignant epithelial lesions of the vulva.** *Int J Gynecol Pathol.* v. 23, n. 3, p. 206-214, 2004.

SARCHIANAKI E, *et al.* **Detection and genotype analysis of human papillomavirus in non-small cell lung cancer patients.** *Tumor Biology.* v. 35, n. 4, p. 3203-3209, 2014.

SCHWARTZ, S. **Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation.** *Virology, Special Issue: The Papillomavirus Episteme.* v. 445, n. 1–2, p. 187–196, 2013.

SHIKOVA, E., *et al.* **Human papillomavirus prevalence in lung carcinomas in Bulgaria.** *Microbiol Immunol.* v. 61, p. 427-432, 2017.

SHUKLA S, BHARTI AC, MAHATA S, HUSSAIN S, KUMAR R, HEDAU S, *et.al.* **Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites.** *Indian J Med Res.* v. 130, n. 3, p.222-33, 2009.

SHUYAMA K, CASTILLO A, AGUAYO F, SUN Q, KHAN N, KORIYAMA C *et al.* **Human papillomavirus in high- and low-risk areas of oesophageal squamous cell carcinoma in China.** *Br J Cancer.* v. 96, n. 10, p.1554-1559, 2007.

SMITH EM, RITCHIE JM, SUMMERSGILL KF, KLUSSMANN JP, LEE JH, *et. al.* **Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers.** *Int J Cancer.* v. 108, p. 766 – 772, 2004.

SMITH B, CHEN Z, REIMERS L, VAN DOORSLAER K, SCHIFFMAN M, DESALLE R, HERRERO R, *et. al.* **Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies.** *Plos one.* v. 6, n. 6, p. e21375, 2011.

SRINIVASAN M, TAIOLI E, RAGIN CC. **Human papillomavirus type 16 and 18 in primary lung cancers—a meta-analysis.** *Carcinogenesis.* v. 30, p. 1722-1728, 2009.

SUNG W.W., LEE W. **The role of interleukin-10 in the progression of human papillomavirus-associated lung carcinoma.** *Oncolmmunology.* v. 2, n. 9, p. e25854, 2013.

SYRJÄNEN K. **Detection of human Papillomavirus in lung cancer: Systematic Review and Meta-analysis.** *Anticancer Research.* v. 32, p.3235-3250, 2012.

THULER LCS, MENDONÇA GA. **Estadiamento inicial dos casos de câncer de mama e colo do útero em mulheres brasileiras.** *Rev bras ginecol obstet.* v. 27, n. 11, p. 656-60, 2005

TONNA J, PALEFSKY JM, RABBAN J, CAMPOS GM, THEODORE P, LADABAUM U. **Esophageal verrucous carcinoma arising from hyperkeratotic plaques associated with human papilloma virus type 51.** *Dis Esophagus.* v. 23, n. 5, p. E17-20, 2010.

TORNESELLO ML, MONACO R, NAPPI O, BUONAGURO L, BUONAGURO FM. **Detection of mucosal and cutaneous human papillomaviruses in oesophagitis, squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the oesophagus.** *J Clin Virol.* v. 45, n. 1, p. 28-33, 2009.

TOROK S, HEGEDUS B, LASZLO V, HODA MA, *et. al.* **Lung cancer in never smokers.** *Future Oncol.* v. 7, n. 10, p.1195-1211, 2011.

TUNG M.C. *et. al.* **Association of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations With Human Papillomavirus 16=18 E6 Oncoprotein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer.** *Cancer* v. 119, n. 18, p. 3367-3376, 2013.

WANG T, *et al.* **Detection and analysis of human papillomavirus (HPV) DNA in breast cancer patients by an effective method of HPV capture.** *PloS one.* v. 9, n. 3, 2014.

WENDT, M. *et al.* **Presence of human papillomaviruses and p16 expression in hypopharyngeal cancer.** *Head & Neck Oncology,* p. 1–6, 2013.

WHEELER, C.M.; HUNT, W.C.; CUZICK, J.; LANGSFELD, E.; ROBERTSON, M.; CASTLE, P.E. **The influence of type-specific human papillomavirus infections on the detection of cervical pre cancer and cancer: A population-based study of**

**opportunistic cervical screening in the United States.** International Journal of Cancer Inc. on behalf of UICC Int. J. Cancer: v. 135, p. 624–634, 2014.

**WHO (2012) Lung Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.** Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx?cancer=lung](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=lung)>. Acesso em 25 abril 2020.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. **The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues.** Nature reviews cancer, v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007.

WU D.W. *et al.* **Reduced p21WAF1/CIP1 via Alteration of p53-DDX3 Pathway Is Associated with Poor Relapse-Free Survival in Early-Stage Human Papillomavirus–Associated Lung Cancer.** Clinical Cancer Res v. 17, p. 1895-1905, 2011.

YANAGAWA N, *et al.* **Human papilloma virus genome is rare in North American non-small cell lung carcinoma patients.** Lung Cancer. v. 79 n. 3, p. 215-220, 2013.

YANG P. **Lung cancer in never smokers.** Semin Respir Crit Care Med. v. 32, n. 1, p.10. 2011

YANO T, MIURA N, TAKENAKA T, HARO A, OKAZAKI H, *et al.* **Never-smoking nonsmall cell lung cancer as a separate entity: clinicopathologic feature and survival.** Cancer. v. 113, p. 1012-1018, 2008.

YU Y, YANG A, HU S, YAN H. **Correlation of HPV-16/18 infection of human papillomavirus with lung squamous cell carcinomas in Western China.** Oncol Rep. v. 21, n. 6, p.1627-32, 2009.

ZARAVINOS, A. **An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas.** Oncotarget. v. 5, n. 12, p. 3956–69, 2014.

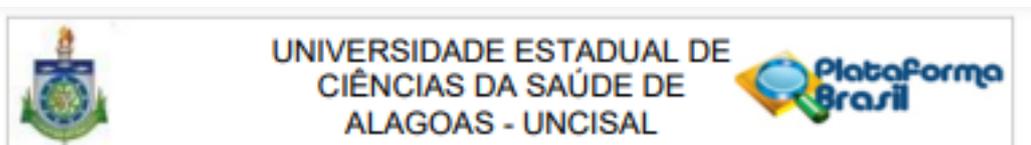
ZHAI, K. *et al.* **HPV and lung cancer risk: a meta-analysis.** J Clin Virol. v. 63, p. 84-90, 2015.

ZHOU Y, HOTI N, AO M, *et al.* **Expression of p16 and p53 in non-small-cell lung cancer: clinicopathological correlation and potential prognostic impact.** Biomark. Med. v. 13, n. 9, p. 761-771, 2019.

ZUR HAUSEN H. **Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.** Nat Rev Cancer. v. 2, n.5, p. 342–50. 2002

## ANEXOS

### Anexo A - Parecer do Comitê de Ética



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** ETIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO NA CARCINOGENESE PULMONAR

**Pesquisador:** Carlos Daniel Passos Lobo

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 79884317.4.0000.5011

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CIENCIAS DA SAUDE DE ALAGOAS -

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

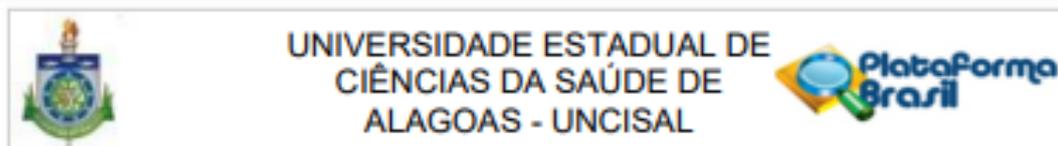
**Número do Parecer:** 2.729.138

##### Apresentação do Projeto:

O câncer de pulmão é o mais comum de todos os tumores malignos, apresentando aumento de 2% por ano na sua incidência mundial. Na região nordeste, o câncer de pulmão em homens é o segundo mais frequente e para as mulheres ocupa a quarta posição. Em Alagoas, as estimativas são de 110 novos casos para homens e 100 para mulheres(1).

Embora muitos estudos sugiram que o HPV possa agir na carcinogênese pulmonar, a relação do HPV com esta doença não é totalmente compreendida. Assim, com o objetivo para obter maiores esclarecimentos sobre esta relação etiológica, o presente projeto propõe estudos de genotipagem e hibridização in situ para detecção in locudo tipo de HPV e sua correlação com os diferentes tipos de tumor. Com a finalidade de avaliar não só a presença do vírus no tumores, mas também se o mesmo encontra-se em atividade, as amostras de tumores de pulmão parafinadas serão analisadas quanto à presença das oncoproteínas virais E6 e E7 por meio da técnica de imunohistoquímica. Os estudos propostos no presente projeto permitirão compreender melhor os mecanismos da carcinogênese pulmonar associa a infecção pelo diferentes tipos de HPV. Além disso, os resultados obtidos de genotipagem juntamente com a detecção das oncoproteínas E6 e E7, fornecerão uma imagem mais clara e um melhor entendimento da doença, além de permitir o desenvolvimento de medidas de prevenção, bem como tratamentos mais específicos e efetivos para o câncer pulmonar.

**Endereço:** Rua Jorge de Lima, 113  
**Bairro:** PRADO **CEP:** 57.010-300  
**UF:** AL **Município:** MACEIO  
**Telefone:** (82)3315-8787 **Fax:** (82)3315-8787 **E-mail:** comitedesticauncisal@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.729.138

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

##### **GERAL**

- Estudar a nível molecular a correlação entre a infecção pelo HPV e sua etiologia no desenvolvimento de tumores pulmonares.

##### **ESPECÍFICOS**

- Caracterizar amostras clínicas oriundas de tumores pulmonares de acordo com os aspectos clínico-biológicos;
- Detectar pela técnica da PCR e hibridização in situ a presença do DNA de HPV em material tumoral de pacientes com câncer de pulmão;
- Identificar os tipos de HPV presentes em material tumoral de pacientes com câncer de pulmão por meio de estudos de genotipagem com os genes codificadores das proteínas virais E6 e E7.
- Detectar a presença das proteínas E6 e E7 no tecido tumoral por Imunohistoquímica.

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

##### **Riscos**

Esta pesquisa não oferece risco aos sujeitos da pesquisa pois usaremos apenas os parte dos blocos parafinado. No entanto, o risco da quebra da confidencialidade é possível porém será as informações clínicas dos pacientes omitindo dados que os identifique, além do banco de dados ser arquivados sobre senha e os formulários em armários com chave ficando apenas sobre a posse do pesquisador. Estas medidas visão evitar a quebra da confidencialidade ficando os pesquisadores com a garantia do sigilo das informações que forem obtidas durante a pesquisa.

##### **Benefícios**

Algumas pesquisas como a nossa não oferece benefícios direto aos sujeitos, no entanto o nosso estudo elucidará associação entre o HPV com o carcinoma pulmonar, de modo, que melhor dimensionara a importância da prevenção e profilaxia do HPV bem como do seu diagnóstico e tratamento precoce, dentro do sistema único de saúde ( SUS). Nosso intuito é poder contribuir com o desenvolvimento de novas estratégias profiláticas com a vacinação em massa da população vulnerável e terapêuticas para o câncer de pulmão com a utilização de antirretrovirais . Para tanto o resultado final da pesquisa será encaminhado as autoridades sanitárias nas três esferas da federação bem como comunicado ao meio científico.

<b>Endereço:</b> Rua Jorge de Lima, 113	<b>CEP:</b> 57.010-300
<b>Bairro:</b> PRADO	
<b>UF:</b> AL	<b>Município:</b> MACEIO
<b>Telefone:</b> (82)3315-6787	<b>Fax:</b> (82)3315-6787 <b>E-mail:</b> comitedeeticauncisal@gmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
ALAGOAS - UNCISAL



Continuação do Parecer: 2.729.138

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O presente estudo se encontra de acordo com a Resolução 466/12.

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

sem pendências.

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

Adequação do título para : identificação da presença do Papilomavírus em tumores de Pulmão.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Nesta oportunidade, lembramos que o pesquisador tem o dever de durante a execução do experimento, manter o CEP informado através do envio a cada seis meses, de relatório consubstanciado acerca da pesquisa, seu desenvolvimento, bem como qualquer alteração, problema ou interrupção da mesma.

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES_BASICAS_116208_8_E1.pdf	19/06/2018 14:27:04		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Instrumentocoleta.pdf	13/11/2017 18:34:46	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacaoscmm.pdf	13/11/2017 18:29:38	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	13/11/2017 18:29:07	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	10/11/2017 11:27:38	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaonucleo.pdf	10/11/2017 11:20:59	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao4.pdf	10/11/2017 11:17:23	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao3.pdf	10/11/2017 11:17:07	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito
Declaração de Instituição e	autorizacao2.pdf	10/11/2017 11:13:28	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito

Endereço: Rua Jorge de Lima, 113

Bairro: PRADO

CEP: 57.010-300

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3315-6787

Fax: (82)3315-6787

E-mail: comitedeticuncisal@gmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
ALAGOAS - UNCISAL



Continuação do Parecer: 2.729.138

Infraestrutura	autorizacao2.pdf	10/11/2017 11:13:28	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao1.pdf	10/11/2017 11:13:12	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao.pdf	10/11/2017 11:12:56	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termorespesq.pdf	10/11/2017 11:11:56	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	declinotcle.pdf	10/11/2017 11:11:24	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	10/11/2017 11:10:47	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	10/11/2017 11:07:39	Carlos Daniel Passos Lobo	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MACEIO, 21 de Junho de 2018

---

Assinado por:  
Ana Lúcia de Gusmão Freire  
(Coordenador)

Endereço: Rua Jorge de Lima, 113  
Bairro: PRADO CEP: 57.010-300  
UF: AL Município: MACEIO  
Telefone: (82)3315-8787 Fax: (82)3315-8787 E-mail: comitedeticaruncisal@gmail.com