



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

MAXWELINNE GONÇALVES PEDRA-FIXE

**ANÁLISE DO PERFIL INFECTIVO PARA HPV 16 E EXPRESSÃO DE
P16 EM TUMORES DE PULMÃO**

Recife

2021

MAXWELINNE GONÇALVES PEDRA-FIXE

**ANÁLISE DO PERFIL INFECTIVO PARA HPV 16 E EXPRESSÃO DE
P16 EM TUMORES DE PULMÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Área de concentração: Morfotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Jacinto Costa Silva Neto

Coorientador: Pro. Dr. Giwellington Silva Albuquerque

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB4/1728

Pedra-Fixe, Maxwellinne Gonçalves

Análise do perfil infectivo HPV 16 e expressão de P 16 em tumores de pulmão /
Maxwelinne Gonçalves Pedra-Fixe. – 2021.

32 f. : il., fig., tab.

Orientador: Jacinto Costa Silva Neto

Coorientador: Giwellington Silva Albuquerque

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Recife,
2021.

Inclui referências e anexo.

1. Pulmões- câncer 2. Papilomavírus 3. Proteínas I. Silva Neto, Jacinto
Costa (orient). II. Albuquerque, Giwellington Silva (coorient.). III. Título.

616.99424

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-162

MAXWELINNE GONÇALVES PEDRA-FIXE

**“ANÁLISE DO PERFIL INFECTIVO PARA HPV 16 E EXPRESSÃO DE P16 EM
TUMORES 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: 29/11/2021.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Francisca Janaina Soares Rocha
(Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ivone Antônia de Souza
(Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Bárbara Simas Chagas
(Examinadora Externa)
Centro Universitário Brasileiro - UNIBRA

Dedico este trabalho aos meus pais, Jurandi e Glória, que são meu porto seguro, minha força e meu apoio todos os dias da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças até aqui para suportar todas as tempestades que ocorreram em minha vida.

Aos meus pais, Jurandi e Glória por todo apoio, toda a força e ensinamentos que me deram até hoje. Devo a eles tudo que tenho, tudo que sou e tudo que serei daqui pra frente.

Aos meus irmãos, Michelle e Maxwell, a minha querida tia Gleane pelo apoio durante essa dura jornada.

Ao meu namorado, amigo e companheiro Henrique pelo apoio nos momentos mais difíceis dessa pandemia.

Aos meus amigos e colegas Juliano Maoux e Elayne Intereminense, por todo suporte dentro e fora do laboratório. Sou abençoada por ter amigos como vocês.

A minha querida terapeuta Ana Virgínia que me ajudou e me incentivou a não desistir e superar minhas mais difíceis batalhas internas.

Ao meu orientador Jacinto Costa pelo apoio e ensinamentos nesta dura caminhada pelo mestrado. Meu muito obrigada.

A meu coorientador Giwellington Albuquerque, pelos ensinamentos fundamentais para entendimento da biologia molecular.

Ao apoio da equipe do laboratório LEMTE pela grande ajuda material, teórica e prática.

A banca examinadora pela disponibilidade, compreensão e atenção em contribuir com o fechamento deste ciclo.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco pelo apoio financeiro essencial para realização deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito, assim não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther KING, 1963)

RESUMO

O câncer de pulmão ocupa os primeiros lugares em número de mortes por câncer no mundo. Estudos têm demonstrado que entre as causas possíveis pode estar a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV). Entretanto, a prova de sua etiologia ainda é controversa. Conhece-se bem nos cânceres cervicais o papel do HPV e seus mecanismos oncogênicos que se baseiam na alteração do ciclo celular do hospedeiro. A interferência advém da ação das oncoproteínas virais E6 e E7, atuando sobre as proteínas p53 e pRb respectivamente. Um dos produtos desta interação é a superexpressão da proteína p16INK4a, em consequência da atividade das oncoproteínas do HPV. Neste estudo, foram analisadas 46 amostras de tumores de pulmão parafinadas provenientes da Santa Casa de Maceió, representativas de subtipos tumorais de pulmão, coletadas em cirurgias realizadas nos anos de 2017, 2018 e 2019. Foram realizadas PCRs com *primers* para GP5/6 e específico para E6-HPV16. Também foi realizada imunohistoquímica para p16 em amostras em lâminas silanizadas. As PCRs para GP5/6 obtiveram 95,3% de positividade para HPV (41 amostras). Já a PCR para E6/HPV16 apresentou 55% de positividade (22 amostras). As imunohistoquímicas para p16 mostraram 87,5% de positividade, não apresentando relação direta estatística com os resultados positivos para GP5/6. Os resultados demonstraram a necessidade de envio das amostras para sequenciamento genético, visando detectar os tipos de HPV encontrados nas amostras positivas para GP5/6. Com isso, espera-se com os resultados, contribuir no conhecimento da carcinogênese tumoral e possível envolvimento do HPV na etiologia dos mesmos.

Palavras-chave: papilomavírus humano; câncer de pulmão; oncoproteínas.

ABSTRACT

Lung cancer ranks first in the number of cancer deaths in the world. Studies have shown that among the possible causes is the Human Papillomavirus (HPV). However, the evidence for its etiology is still controversial. The role of HPV and its oncogenic mechanisms, which are based on the alteration of the host's cell cycle, is well known in cervical cancers. The interference comes from the action of viral oncoproteins E6 and E7, acting on proteins p53 and pRb. One of the products of this interaction is the overexpression of the p16INK4a protein, as a result of the activity of HPV oncoproteins. In this study, 46 samples of paraffined lung tumors from Santa Casa de Maceió, representative of lung tumor subtypes, collected in surgeries performed in 2017, 2018 and 2019 were analyzed. PCRs were performed with primers for GP5/6 and specific for E6-HPV16. Immunohistochemistry for p16 was also performed on silanized slide samples. PCRs for GP5/6 obtained 95.3% positivity for HPV (41 samples). On the other hand, PCR for E6/HPV16 showed 55% positivity (22 samples). Immunohistochemistry for p16 showed 87.5% positivity, with no direct statistical relationship with positive results for GP5/6. The results demonstrated the need to send samples for gene sequencing, aiming to detect the HPV types found in GP5/6 positive samples. Thus, the results are expected to contribute to the knowledge of tumor carcinogenesis and the possible involvement of HPV in their etiology.

Keywords: human papillomavirus; lung câncer; oncoproteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Genoma de HPV. Genoma de DNA circular de dupla-fita, mostrando a localização dos genes	16
Figura 2 –	Coleta de material por corte de bloco de parafina	18
Figura 3 –	Processo de extração de DNA Viral	20
Figura 4 –	Gel de PCR para GP5/6, amostras de 2018. Onde C-(1) é o controle negativo da PCR e C-(2) é o controle negativo da Nested-PCR. O C+ é o controle positivo usando DNA HPV18+ de cultura HELA CEL.	21
Figura 5 –	Gel de PCR para E6/HPV16, amostras de 2018. Onde C-(1) é o controle negativo da PCR e C-(2) é o controle negativo da Nested-PCR. O C+ é o controle positivo usando DNA HPV18+ de cultura HELA CEL.	22
Figuras 6 e 7 –	Processamento da Imunohistoquímica.	23
Figuras 8 e 9 –	Amostra positiva(esquerda) para p16INK4a em tumor de pulmão e amostra negativa(direita), respectivamente. Na amostra positiva observa-se forte marcação de núcleo nas células.	24
Figuras 10 e 11-	Amostra de câncer cervical como controle positivo(esquerda) para p16INK4a e amostra de controle negativo escamoso(direita).	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação do perfil demográfico	24
Tabela 2 – Resultados dos testes	25
Tabela 3 – Resultados dos testes segundo o sexo	26
Tabela 4 – Resultados dos testes segundo a faixa etária	27
Tabela 5 – Avaliação da associação entre os PCR-GP5/6com PCR-E6/HPV-16 e IHQ-p16	27 e 28
Tabela 6 – Avaliação da associação entre PCR-E6/HPV-16 e IHQ-p16	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Soro Albumina Bovina
CDK	Ciclina Dependente de Quinase
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CPNPC	Carcinoma de pulmão de não-pequenas células
CPPC	Carcinoma de pulmão de pequenas células
E1, E2, E4, E5, E6 e E7	Proteína Viral Precoce do HPV
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory (OMS)
HPV	Papilomavírus humano
HRP	Horseradish Peroxidase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L1 e L2	Proteína tardias do HPV codificante do capsídeo viral 1 e 2
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato-salina
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
p16INK4a	Proteína inibidora de quinase 4 dependente de ciclina
p53	Proteína de massa de 53 kda, supressora de tumor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1	O CÂNCER DE PULMÃO.....	15
2.2	O HPV.....	15
3	OBJETIVOS.....	16
3.1	OBJETIVO GERAL.....	16
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4	METODOLOGIA.....	16
4.1	TIPO DE ESTUDO.....	16
4.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	16
4.3	AMOSTRAGEM.....	16
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	17
4.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	17
4.6	COLETA DE AMOSTRAS.....	17
4.7	PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS.....	18
4.7.1	Extração do DNA Viral.....	18
4.7.2	Deteção de DNA do HPV.....	19
4.7.3	Genotipagem do HPV por <i>primers</i> específicos.....	20
4.7.4	Imunohistoquímica para p16INK4a.....	21
4.7.5	Métodos estatísticos.....	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
	REFERÊNCIAS.....	30
	ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM	
	PESQUISA.....	32

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão ocupa atualmente o segundo lugar mundial em incidência, com mais de 2 milhões de casos, nas estimativas de neoplasias malignas em ambos os sexos, perdendo apenas para o câncer de mama (GLOBOCAN, 2020). Em mortalidade ocupa o topo da lista da OMS, tornando-se uma preocupação mundial, tendo em vista seu baixo índice de diagnóstico precoce. De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer, no Brasil o câncer de pulmão ocupa a terceira posição em incidência em homens e a quarta posição em mulheres (INCA, 2020). A maioria das causas de tumores malignos de pulmão são amplamente conhecidas, como tabagismo, fatores genéticos e ambientais (MINNA, 2008).

O Papilomavírus humano (HPV) é um grupo de vírus de DNA, não envelopado, que infecta células epiteliais, altamente transmissível sexualmente, sendo frequente na região ano-genital. Mais de 200 tipos de HPV já foram isolados, sendo classificados em HPV de alto risco e de baixo risco (MUÑOZ et al., 2003). Os tipos de HPV de alto risco 16 e 18 são os mais frequentemente isolados em biópsias de tecidos de colo uterino com lesões pré-invasivas e invasivas (ZUR HAUSEN, 2002).

O DNA do HPV de alto risco tipos 16 e 18, por exemplo, promove no genoma do hospedeiro infectado a superexpressão das oncoproteínas virais E6 e E7, ou seja, os genes virais se integram ao genoma humano. A E6 possui funções que contribuem para a oncogênese, promovendo a imortalização celular através da modulação da proteína p53, cujo papel está em resguardar a integridade do genoma celular, induzindo a parada do ciclo celular e encaminhamento da célula para a apoptose. A expressão da proteína E6 em células infectadas pode ser verificada através de reação imunocitoquímica, que quando associada a outros marcadores (oncoproteína E6, e p16^{INK4a}), constata-se a atividade viral do HPV (CHENG et al., 2007).

A proteína p16^{INK4a} está relacionada ao controle do ciclo celular, inativando sua progressão, por meio da inibição do complexo ciclina D/CDK4 e 6. A mutação ou deleção do gene p16 pode afetar o balanço entre a proteína p16^{INK4a} e ciclina D, resultando em crescimento celular anormal (FISK et al., 2004). Carcinomas associados ao HPV são caracterizados por uma hiperexpressão do marcador p16^{INK4a} (SANTOS et al., 2004). Neste trabalho foi realizada a análise do perfil

infectivo para HPV16, bem como a expressão de p16 em amostras de tumores de pulmão com a finalidade de contribuir para o conhecimento da carcinogênese tumoral e possível envolvimento do HPV na etiologia do câncer de pulmão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

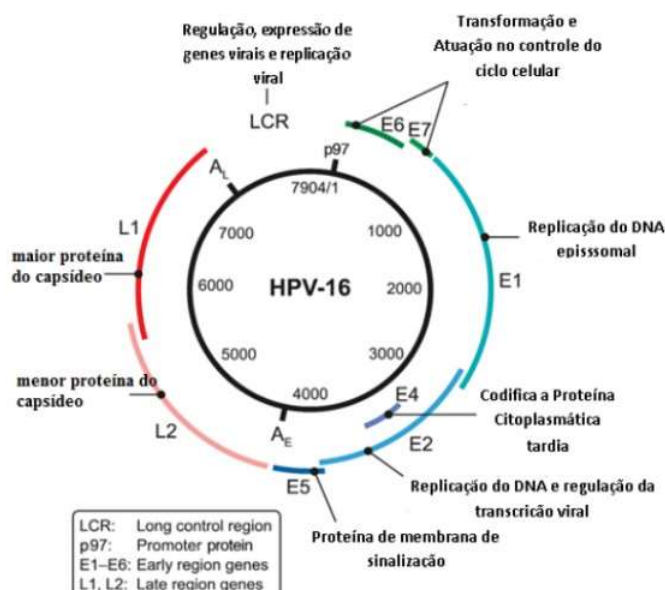
2.1 O CÂNCER DE PULMÃO

O termo câncer de pulmão é utilizado para designar neoplasias malignas que se originam nas vias aéreas ou no parênquima pulmonar (ROSKOSKI, 2017). A classificação do câncer de pulmão pela OMS é feita de acordo com as características histológicas, sendo dividida em duas grandes categorias: carcinoma de pulmão de pequenas células (CPPC), que acomete aproximadamente 18% dos pacientes; e carcinoma de pulmão de não-pequenas células (CPNPC) que ocorre em cerca de 80% dos doentes (SOUZA et al., 2016). O CPNPC pode ser dividido em três subtipos histológicos principais: adenocarcinoma; carcinoma de células escamosas; carcinoma de células grandes (HUANG et al., 2014).

2.2 O HPV

O Papilomavírus humano é um vírus com diâmetro de aproximadamente 55nm, estrutura icosaédrica não envelopada, com material genético formado por uma dupla fita de DNA com aproximadamente 8000 pares de bases que está dividido em uma região codificante, composto por oito fases de leitura aberta (ORF, do inglês, *Open Reading Frames*) que codificam as proteínas precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7, do inglês, *Early*) e as proteínas tardias (L1 e L2, do inglês, *Late*), e outra região não codificante chamada LCR (do inglês, *Long Control Region*), responsável pelo controle da replicação do DNA viral e da transcrição dos genes virais (ZUR HAUSEN, 1999). (Figura 1) Existem classificados atualmente cerca de 200 tipos de HPV, classificados em alto risco e baixo risco (REZAZADEH et al, 2009). Dentre os mais conhecidos como de alto risco carcinogênico estão o 16 e o 18 (HOOTS et al., 2009). Os de baixo risco estão envolvidos na formação de verrugas anogenitais, enquanto os de alto risco estão envolvidos na carcinogênese cervical, anogenital e oral (ZUR-HAUSEN, 2002; MUNGER et al., 2004; PARISI et al., 2011).

Figura 1 - Genoma de HPV. Genoma de DNA circular de dupla-fita, mostrando a localização dos genes.



Estudos mostram que a superexpressão de algumas proteínas, como a p16INK4a, pode ser utilizada para estimar a evolução e extensão da lesão. A proteína p16INK4a, inibidora de quinase 4, é uma reguladora da divisão celular, superexpressa pela presença da oncoproteína E7 do HPV. Sua expressão é observada em núcleos e citoplasmas de células displásicas do epitélio escamoso, assim como em carcinomas (MISSAOUI et al., 2010).

Conhecidamente envolvido na carcinogênese cervical, o envolvimento do HPV em neoplasias pulmonares ainda não é bem esclarecido (Freitas et al., 2016). Estudos demonstraram que a presença do HPV em líquido pleural de pacientes com câncer de pulmão já foi detectada em estudos realizados na Ásia, Europa e América do Norte, sendo que poucos no Brasil. Os estudos realizados com líquido pleural reforçam a tese da disseminação hematogênica do HPV em casos de câncer primário de colo de útero, pênis e anogenital (REZAZADEH et al., 2009; RONG FAN et al., 2015; GAMEZ et al., 2009; PARISI, S. G, et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar o HPV em amostras de tumores pulmonares de pacientes de ambos os sexos, provenientes da Santa Casa de Maceió, dos anos de 2017, 2018 e 2019, e estudar a correlação entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento desses tumores.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar amostras clínicas oriundas de tumores pulmonares de acordo com os aspectos clínico-laboratoriais;
- Detectar pela técnica da PCR convencional a presença do DNA de HPV em material tumoral de pacientes com câncer de pulmão;
- Avaliar a expressão de p16INK4a nos subtipos tumorais de pulmão por imunohistoquímica.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

O estudo foi classificado como transversal retrospectivo observacional.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi apresentado sob o CAAE nº: 79884317.4.0000.5011. (Anexo) ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNICISAL), Maceió/AL obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

4.3 AMOSTRAGEM

Foram coletadas 46 amostras de blocos de tecidos pulmonares parafinados de pacientes de ambos os sexos que foram submetidos exames histopatológicos de rotina de janeiro de 2017 a dezembro de 2019, nos serviços de Patologia do Hospital Santa Casa de Misericórdia, com resultados positivos para neoplasia maligna de pulmão

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Amostras de tumores malignos, adenocarcinoma e carcinoma escamoso, conforme classificação de carcinoma de pulmão de não-pequenas células (CPNPC).

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Amostras de tumores benignos, correspondentes a tumores fibrosos, processo inflamatório crônico por tuberculose e outras doenças não formadoras de neoplasias malignas.

4.6 COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletadas 46 amostras prospectadas através do banco de dados do hospital participante da pesquisa. Os blocos de parafina foram separados e cortados em micrótomo manual, conforme protocolo do kit de extração QIAMP DNA FFPE Tissue, da marca Qiagen.

Após seleção dos blocos, os mesmos foram cortados no total de 10 cortes de 4 micômetros de espessura, armazenadas em tubos tipo ependorf de 2mL.(Figura 2) Também foram cortadas amostras em lâminas silanizadas para realização de imunohistoquímica. As amostras foram transportadas em caixa refrigerada até o laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares, no Laboratório Central do Centro de Biociências da UFPE.

Figura 2 – Coleta de material por corte de bloco de parafina.



Fonte: A autora (2021).

4.7 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

4.7.1 Extração do DNA Viral

Os tubos contendo amostra parafinada passaram por processo de desparafinização, adicionando 1 mL de xilol, realizado vortexagem e centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos. O processo com xilol foi repetido para retirar o máximo de parafina possível. Após retirada do sobrenadante, a amostra era lavada com álcool absoluto, adicionando 1 mL deste, vortexando e centrifugando à 13.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante era removido e a amostra era colocada para secar em estufa a 37°C por 10 minutos ou até evaporar todo o álcool. Após evaporação do álcool, era adicionado 180 µL do reagente ATL e 20µL de proteinase K, ambos do kit de extração Qiagen (Figura 3). Em seguida, o tubo era incubado a 56°C por 1 hora. Terminado esse passo, o tubo era incubado em termobloco a 90°C por 1 hora. Saindo do termobloco, as amostras eram centrifugadas a 13.000 rpm por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se 200µL do buffer AL(kit Qiagen), era feita vortexagem e depois adicionava-se 200µL de álcool absoluto. Após vortexar, o tubo era centrifugado à 13.000 rpm por 1 minuto.

Após centrifugação, o lisado era transferido para o tubo coletor contendo a coluna de extração de DNA(Figura 3) do kit de extração, centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto e descartado o tubo coletor. Colocava-se um novo tubo na coluna, adicionava-se 500µL do buffer AW1 do kit, centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto e descartado o tubo coletor. Um novo tubo coletor era colocado na coluna, adicionado o buffer AW2, centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto e o tubo coletor era novamente descartado. À coluna novamente era adicionado um novo tubo coletor, sem adicionar nenhum reagente, era centrifugada a 13.000 rpm por 3 minutos. Terminada esta fase, a coluna é colocada em um tubo tipo ependorf de 1,5mL, identificado como “1ª eluição”, colocou-se 50µL do reagente ATE, incubou-se por 5 minutos e foi centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto. Após essa primeira centrifugação, o tubo da 1ª eluição era reservado, a coluna transferida para um outro tubo de 1,5mL, e repetindo o processo, obtinha-se uma 2ª eluição. Finalizando a extração, as amostras eram quantificadas no Espectrofotômetro visível NanoDrop™ Lite, da Thermo Scientific. Após quantificação, a amostra era armazenada em freezer a -20°C.

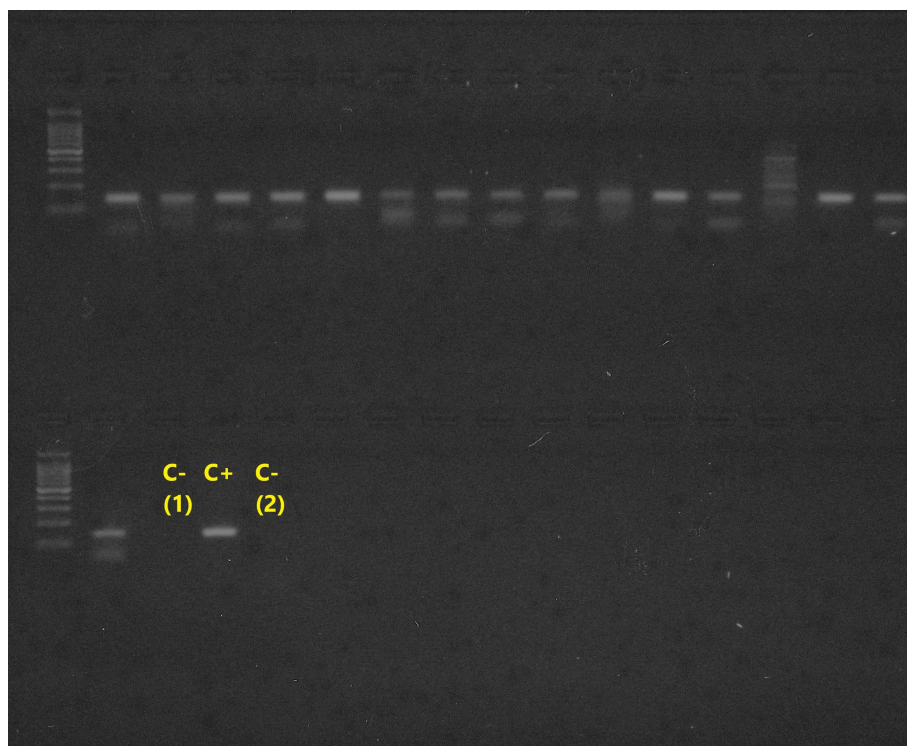
Figura 3 – Processo de extração de DNA Viral



Fonte: A Autora(2021) / Google.

4.7.2 Detecção de DNA do HPV

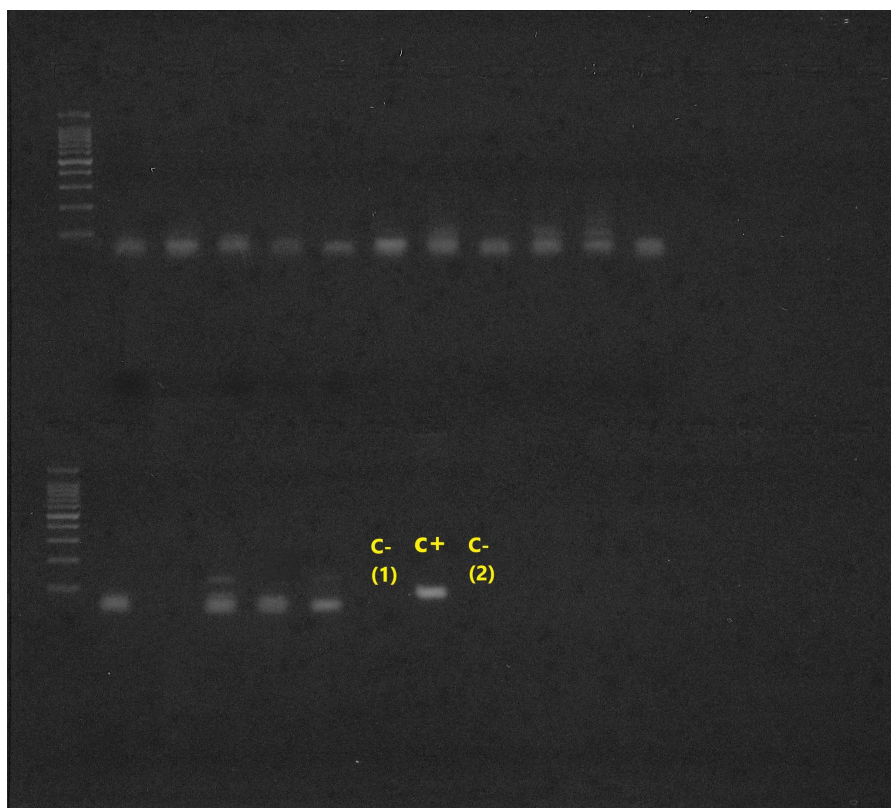
A detecção de DNA viral foi realizada utilizando os iniciadores (*primers*) GP5/GP6 (Roda Husman *et al.*,1995): 5'-TTTGTACTGTGGTAGATAC -3' e 5'-GAAAAATAAACTGTAAATCA -3', gerando fragmentos de aproximadamente 140pb. Posteriormente, foram realizadas Nested-PCRs utilizando os mesmos *primers*, visando aumentar a quantidade de cópias do DNA viral. As condições de termociclagem para os *primers* GP5/6 foram as seguintes: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C; e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídio a 10%. Como controle da eficiência da extração do DNA e da reação de PCR foi amplificado um fragmento de 171 pares de bases do gene da β -Actina usando os *primers*: 5'- ATCCAACCGACTGCTGTCA -3' e 5'-AGCAAGCAGGAGTCAGATGAGT-3'. Todas as amostras foram amplificadas na presença de controles positivo (HELA CELL HPV18) e negativo (água milli-Q). Os produtos da PCR obtidos foram analisados em gel de agarose na concentração de 2% corados com brometo de etídio



4.7.3 Genotipagem do HPV por primers específicos

A tipificação do DNA do HPV foi realizada por amplificação de DNA através de reação de PCR convencional, utilizando oligonucleotídeos que amplificam fragmentos de 81pb, específicos para a região E6-HPV16: 5'-GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC-3' e 5'-TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC-3', em um volume final de 20µl, contendo 4µl de Master Mix (5x FIREPoI™ Master Mix, Solis BioDyne), 0,6µl de cada *primer* (10 pM/µl), 3,4µl de água sem nuclease (Nuclease-Free Water, Promega) e 4µl de DNA (50 ng/µl) de cada amostra. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e extensão final a 72°C durante 5 minutos. Foi realizada uma Nested-PCR visando ampliar o número de cópias. Todas as amostras foram amplificadas na presença de controles positivo e negativo (água milli-Q). Os produtos da PCR obtidos foram analisados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídio

Figura 5 - Gel de PCR para E6/HPV16, amostras de 2018. Onde C-(1) é o controle negativo da PCR e C-(2) é o controle negativo da Nested-PCR. O C+ é o controle positivo usando DNA HPV18+ de cultura HELA CEL.



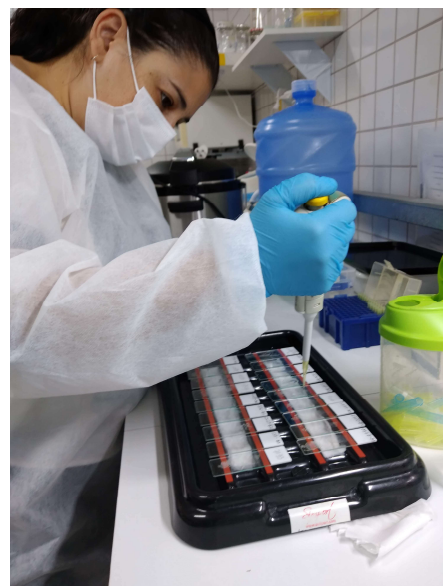
Fonte: A Autora(2021).

4.7.4 Imunohistoquímica para p16INK4a

A imunohistoquímica para detecção da expressão de p16INK4a foi feita em cortes de 4µm, e lâminas silanizadas, do mesmo material coletado para extração de DNA do HPV. 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 1:100. As lâminas foram desparafinizadas, seguindo protocolo estabelecido pelo fabricante. Foram 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 eram 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

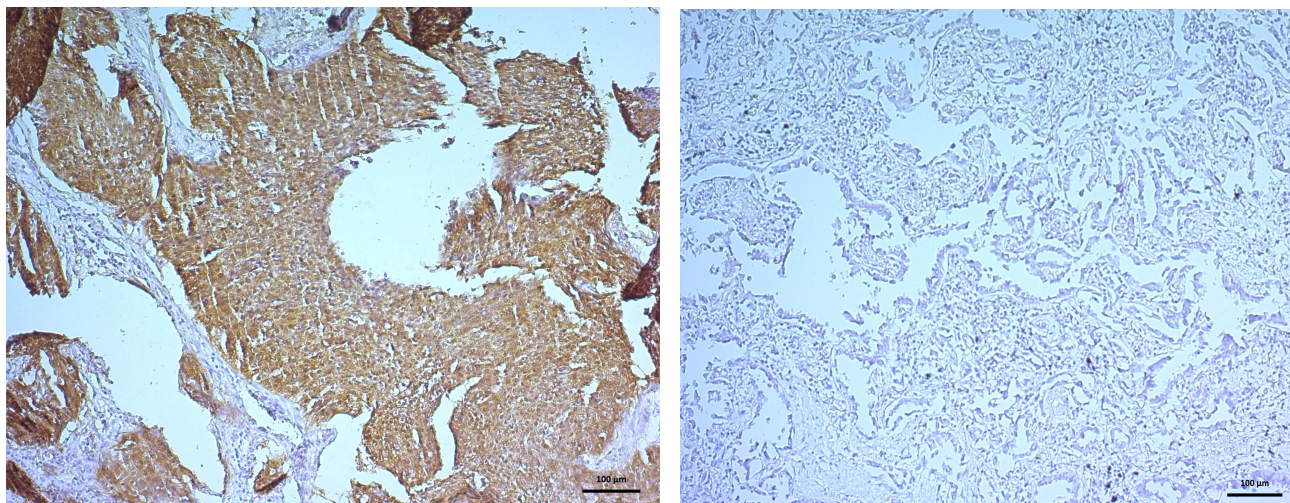
incubadas em citrato pH 6,0 – 0,01M. Após chegarem à temperatura ambiente, o bloqueio da peroxidase endógena era feito com BLOXALL(kit ImPRESS® - VECTOR Lab.) por 10 minutos. As lâminas depois seguiam para lavagem com PBS por 5 minutos, incubação com soro de cavalo a 2,5% por 20 minutos. Após remoção 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 1:100. No dia seguinte, após lavagem com PBS por 5 minutos, as amostras eram 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, eram 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 eram rapidamente lavadas em PBS, 2 vezes, por 5 minutos cada. Depois, seguiam para lavagem com água limpa e efetuava-se a contracoloração por 1 minuto e 30 segundos com Hematoxilina diluída em 1:2 com água destilada. Por fim, as lâminas eram postas para secar verticalmente em papel toalha, montadas com lamínula e Entellan® (Merk).(Figuras 5,6,7,8, 9 e 10 e 11)

Figuras 6 e 7 – Processamento da Imunohistoquímica.

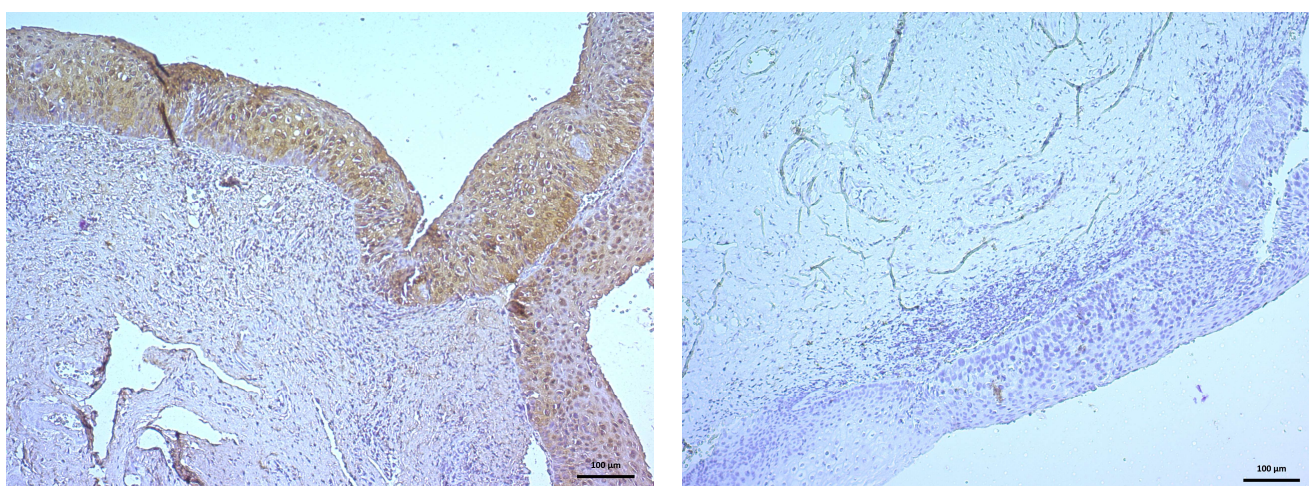


Fonte: A Autora(2021).

Figuras 8 e 9 - Amostra positiva (esquerda) para p16INK4a em tumor de pulmão e amostra negativa (direita), respectivamente. Na amostra positiva observa-se forte marcação de núcleo nas células.



Figuras 10 e 11: Amostra de câncer cervical como controle positivo (esquerda) para p16INK4a e amostra de controle negativo escamoso (direita).



Fonte: A Autora(2021).

4.7.5 Métodos estatísticos

Os dados foram analisados descritivamente por meio de frequências absolutas e percentuais para as variáveis categóricas e das medidas: média, desvio padrão e mediana da variável idade. Para avaliar associação entre duas variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson ou o teste Exato de Fisher quando a condição para utilização do teste Qui-quadrado não foi verificada. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%.

Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IBM - SPSS® versão 23.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 46 amostras coletadas, 43 foram consideradas elegíveis dentro dos critérios de inclusão e 3 foram excluídas por serem consideradas inelegíveis. A idade dos 43 pacientes analisados variou de 20 a 84 anos, teve média de 62,91 anos, desvio padrão de 13,99 anos e mediana de 66,00 anos.

Na Tabela 1 se apresenta os resultados do perfil demográfico onde pode ser observado que: mais da metade (58,1%) era do sexo feminino; a faixa etária menos prevalente (27,9%) foi 60 a 69 anos e os percentuais das outras duas faixas etárias variaram de 34,9% a 37,2%; a maioria (62,8%) tinha 20 a 69 anos e os 37,2% restante tinham 70 a 84 anos; os percentuais dos outros três anos analisados variaram de 32,6% a 34,9%.

Tabela 1 – Avaliação do perfil demográfico

Variável	n (%)
TOTAL	43 (100,0)
Sexo	
Masculino	18 (41,9)
Feminino	25 (58,1)
Faixa etária (anos): opção 1	
20 a 59	15 (34,9)
60 a 69	12 (27,9)
70 a 84	16 (37,2)
Faixa etária (anos): opção 2	
20 a 69	27 (62,8)
70 a 84	16 (37,2)
Ano	
2017	14 (32,6)

2018	14 (32,6)
2019	15 (34,9)

Fonte: IBM - SPSS® versão 23.

Na Tabela 2 se apresenta os resultados dos exames: PCR-GP5/6, PCR-E6/HPV16 e IHQ-p16. Desta tabela se enfatiza que: a maioria (95,7%) teve resultado positivo pelo teste PCR-GP5/6 e os 4,7% correspondendo a dois pacientes resultados negativos; um pouco mais da metade (55,0%) teve resultado positivo quando foi utilizado o teste PCR-HPV16 e os 45,0% demais resultados negativos; pelo teste IHQ-p16 a maioria (87,5%) teve resultado positivo e os 12,5% restante resultados negativos.

Tabela 2 – Resultados dos testes

Variável	n (%)
PCR-GP5/6	
Positivo	41 (95,3)
Negativo	2 (4,7)
TOTAL	43 (100,0)
PCR-E6/HPV16	
Positivo	22 (55,0)
Negativo	18 (45,0)
TOTAL ⁽¹⁾	40 (100,0)
IHQ- p16INK4a	
Positivo	35 (87,5)
Negativo	5 (12,5)
TOTAL ⁽¹⁾	40 (100,0)

Fonte: IBM - SPSS® versão 23. (1) Para três pacientes as amostras não foram válidas.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados dos testes segundo o sexo dos pacientes e na Tabela 4 segundo a faixa etária. Na Tabela 4 não foi registrada associação significativa ($p > 0,05$) entre sexo e os resultados dos testes.

Tabela 3 – Resultados dos testes segundo oSexo
sexo

Variável	Masculino	Feminino	Grupo Total	Valor de p
	n (%)	n (%)	n (%)	
PCR-GP5/6				$p^{(1)} = 1,000$
Positivo	17 (94,4)	24 (96,0)	41 (95,3)	
Negativo	1 (5,6)	1 (4,0)	2 (4,7)	
TOTAL	18 (100,0)	25 (100,0)	43 (100,0)	
PCR-E6/HPV16				$p^{(2)} = 0,436$
Positivo	10 (62,5)	12 (50,0)	22 (55,0)	
Negativo	6 (37,5)	12 (50,0)	18 (45,0)	
TOTAL	16 (100,0)	24 (100,0)	40 (100,0)	
IHQ-p16INK4a				$p^{(1)} = 0,631$
Positivo	15 (93,8)	20 (83,3)	35 (87,5)	
Negativo	1 (6,3)	4 (16,7)	5 (12,5)	
TOTAL	16 (100,0)	24 (100,0)	40 (100,0)	

(1) Pelo teste Exato de Fisher (2) Pelo teste Qui-quadrado de Pearson.

Fonte: IBM - SPSS® versão 23.

Não foram registradas associações significativas ($p > 0,05$) entre as faixas etárias e os resultados dos testes para a margem de erro fixada (5%), conforme resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4– Resultados dos testes segundo a faixa etária

Variável	20 a 69	70 a 84	Grupo Total	Valor de p
	n (%)	n (%)	n (%)	
PCR-GP5/6				$p^{(1)} = 0,133$
Positivo	27 (100,0)	14 (87,5)	41 (95,3)	
Negativo	-	2 (12,5)	2 (4,7)	
TOTAL	27 (100,0)	16 (100,0)	43 (100,0)	
PCR-E6/HPV16				$p^{(2)} = 0,145$

Positivo	17 (63,0)	5 (38,5)	22 (55,0)
Negativo	10 (37,0)	8 (61,5)	18 (45,0)
TOTAL	27 (100,0)	13 (100,0)	40 (100,0)

IHQ-p16INK4a			p ⁽¹⁾ = 1,000
Positivo	23 (85,2)	12 (92,3)	35 (87,5)
Negativo	4 (14,8)	1 (7,7)	5 (12,5)
TOTAL	27 (100,0)	13 (100,0)	40 (100,0)

Fonte: IBM - SPSS® versão 23. (1) Pelo teste Exato de Fisher / (2) Pelo teste Qui-quadrado de Pearson.

Na Tabela 5 não foram registradas associações significativas ($p > 0,05$) entre o teste PCR-GP5/6 e os outros dois testes.

Tabela 5 – Avaliação da associação entre os PCR-GP5/6 com PCR-E6/HPV-16 e IHQ-p16

Variável	PCR-GP5/6		TOTAL	Valor de p
	Positivo	Negativo		
	n (%)	n (%)	n (%)	
PCR-E6/HPV16				**
Positivo	22 (55,0)	-	22 (55,0)	
Negativo	18 (45,0)	-	18 (45,0)	
TOTAL	40 (100,0)	-	40 (100,0)	
IHQ-p16INK4a				p ⁽¹⁾ = 1,000
Positivo	33 (82,5)	2 (5,0)	35 (87,5)	
Negativo	5 (12,5)	-	5 (12,5)	
TOTAL	38 (95,0)	2 (5,0)	40 (100,0)	

Fonte: IBM - SPSS® versão 23. (**) Não foi possível determinar devido à ocorrência de frequências em única categoria em uma das variáveis / (1) Pelo teste Exato de Fisher

A Tabela 6 não mostrou associação significativa ($p > 0,05$) entre o teste PCR-E6/HPV-16 e IHQ-p16INK4a. Tabela 6 – Avaliação da associação entre PCR-E6/HPV-16 e IHQ-p16

IHQ-p16INK4a	E6/HPV-16		TOTAL	Valor de p
	Positivo n (%)	Negativo n (%)		
Positivo	18 (47,4)	15 (39,5)	33 (86,8)	$p^{(1)} = 0,653$
Negativo	2 (5,3)	3 (7,9)	5 (13,2)	
TOTAL	20 (52,6)	18 (47,4)	38 (100,0)	

Fonte: IBM - SPSS® versão 23. (1) Pelo teste Exato de Fisher.

Os resultados referentes à detecção por DNA do HPV pelo *primer* GP5/6 obteve uma alta taxa de positividade (95,3%). Essa alta positividade pode ter sido devido ao tamanho do *primer* utilizado e/ou protocolos baseados em pesquisas com material cervical, devido ao baixo número de estudos com câncer de pulmão e HPV. Ressalto que as análises foram rigorosamente executadas mediante protocolos de biologia molecular, visando minimizar erros e contaminações. Portanto, concluímos que o uso da PCR convencional para GP5/6 não é um bom método para detecção de DNA do HPV, sendo necessárias análises com mais acurácia, como o sequenciamento para HPV.

Os resultados estatísticos referentes à faixa etária não demonstraram nenhuma associação relevante entre os casos positivos para PCR E6/HPV16 e os casos de tumores escamosos, tendo em vista que o gene E6 está diretamente associado a neoplasias escamosas(ZUR HAUSEN, 2002). Como os tumores obtidos na pesquisa variaram entre escamosos e adenocarcinomas, esperava-se obter alguma associação entre a presença do gene E6/HPV16 nos tumores escamosos, o que não foi possível concluir neste estudo.

A imunohistoquímica para p16INK4a apresentou resultados não significantes quando associado à positividade GP5/6 e E6/HPV16. Com isso, o teste não se

mostrou um bom parâmetro associativo entre a presença do HPV no tecido e a expressão da p16INK4a. Apesar da mesma está associada à presença do HPV em neoplasias cervicais associadas à expressão do gene E6(MUNGER et al., 2004), a p16INK4a está expressa em neoplasias malignas em outros tecidos. Portanto, não foi possível neste estudo estabelecer a associação direta da expressão da p16INK4a com a positividade para o HPV nos tumores de pulmão analisados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

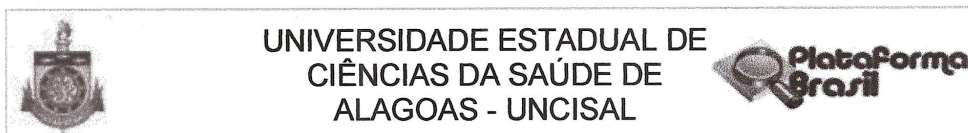
- A expressão imunohistoquímica para as proteínas p16INK4a, não se mostrou estatisticamente significativa frente às amostras, porém continua a ser um ótimo marcador de lesão neoplásica, apesar de não ter mostrado associação direta com o DNA do HPV detectado nas amostras.
- A detecção do DNA do HPV se mostrou extremamente dificultosa devido ao caráter da amostra(material parafinado), porém abriu novas perspectivas para estabelecimento de protocolos e desenho de *primers* específicos para o material de tumor de pulmão. No entanto, viu-se que a técnica de PCR convencional poderia ser substituída por técnica mais sensíveis, como a PCR em tempo real.
- O estudo se mostrou promissor, apesar dos resultados obtidos apresentarem resultados não conclusivos para a pergunta do estudo.
- Os resultados demonstraram a necessidade de envio das amostras para sequenciamento genético, visando detectar os tipos de HPV encontrados nas amostras positivas para GP5/6. Com isso, espera-se com os resultados, contribuir no conhecimento da carcinogênese tumoral e possível envolvimento do HPV na etiologia dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- BURCHELL A. N. **Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection.** Vaccine, V. 24, S. 3, Pgs S52-S61, 2006.
- CIOTTI, M et al. **Detection and expression of human papillomavirus oncogenes in non-small cell lung cancer.** Oncology reports, 16: 183-189, 2006.
- CHENG YA-WEN et al. **Human Papillomavirus 16/18 E6 Oncoprotein Is Expressed in Lung Cancer and Related with p53 Inactivation.** American Association for Cancer Research, 2007.
- DOORBAR J. **The Papillomavirus life cycle.** J Clin Virol; 32:7–15, 2005.
- DOORBAR J. **Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer.** Clin Sci (Lond);110(5):525-41, 2006.
- FERENCZY, A. et al. **Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments.** Canadian Medical Association, 69(5): 419-431, 2003.
- GAMEZ, R G et al. **Cytology of Metastatic Cervical Squamous Cell Carcinoma in Pleural Fluid: Report of a Case Confirmed by Human Papillomavirus Typing.** Diagnostic Cytopathology, Vol 37, N° 5, 2009.
- MISSAOUI N, et al. **p16INK4a overexpression in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix in Tunisian women.** Pathol Res Pract. 2010.
- MUNGER, K. et al. **Mechanisms of human papillomavirus- induced oncogenesis.** J Virol.;78:11451–60, 2004.
- MUNOZ, N. et al. **HPV in the etiology of human cancer.** Chapter 1, Vaccine. 31;24, Suppl 3: S3/1-10. Epub Jun 23, 2006.
- PALEFSKY, J.M. & HOLLY, E. A. **Immunosuppression and Co-infection with HIV.** Journal of the National Cancer Institute Monographs, No. 31, 2003.
- PARISI, S. G, et al. **Anal and oral human papillomavirus (HPV) infection in HIV-infected subjects in northern Italy: a longitudinal cohort study among men who have sex with men.** BMC Infectious Diseases, 11:150, 2011.
- REZAZADEH, A. et al. **The Role of Human Papilloma Virus in Lung Cancer: A Review of the Evidence.** The American Journal of the Medical Sciences, v.338, n.1, July 2009.
- RONG FAN et al. **Overexpression of HPV16 E6/E7 mediated HIF-1 α upregulation of GLUT1 expression in lung cancer cells.** International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM), 2015.
- SANTOS, M. et al. **Immunohistochemical staining for p16 and p53 in premalignant and malignant epithelial lesions of the vulva.** Int J Gynecol Pathol, 23(3):206-14, 2004.
- TUNG, MIN-CHE et al. **Association of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations with Human Papillomavirus 16/18 E6 Oncoprotein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer.** American Cancer Society, September, 2013.

ZUR HAUSEN H. **Papillomavirus infections-a major cause of human cancers.** Biochim Biophys Acta.1288(2):F55–78, 1996.

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

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**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 locuto 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)3315-6787 **Fax:** (82)3315-6787 **E-mail:** comitedeeticauncisal@gmail.com