



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

BIANCA DE FRANÇA SÃO MARCOS

**Avaliação do Microambiente Tumoral Pulmonar Infectado
com o Papilomavírus Humano**

Recife
2023

BIANCA DE FRANÇA SÃO MARCOS

Avaliação do Microambiente Tumoral Pulmonar Infectado com o Papilomavírus Humano

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Talita Helena Araújo de Oliveira

Coorientador: Cristiane Moutinho

Recife

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

São Marcos, Bianca de França

Avaliação do microambiente tumoral pulmonar infectado com o papilomavírus humano / Bianca de França São Marcos– 2023.

143 f. : il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientadoras: Talita Helena Araújo de Oliveira e Cristiane Moutinho

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética, Recife, 2023. Inclui referências e anexo.

1. Câncer de pulmão 2. Papilomavírus humano 3. Expressão gênica I. Freitas, Antonio Carlos de (orient.) II. Oliveira, Talita Helena Araújo de (coorient.) III. Moutinho, Cristiane (coorient.) IV. Título

616.99424

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -232

Bianca de França São Marcos

**Avaliação do Microambiente Tumoral Pulmonar Infectado
com o Papilomavírus Humano**

Aprovado em 13/03/2023

Banca Examinadora:

Dr. Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Antônio Roberto Lucena Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Fabrício Oliveira Souto
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Jacinto da Costa Silva Neto
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Valdir de Queiroz Albino
Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2023

Ao meu filho João Vitor, que fez parte dessa
jornada comigo.

Agradecimentos

Durante esta jornada, muitas vezes difíceis e exaustivas, tanto fisicamente como principalmente mentalmente. Quando dizem que fazer um doutorado é para poucos, hoje eu vejo que não é da boca para fora que falam. Ter pessoas ao seu lado nesse momento é a melhor forma de superar todas as dificuldades e graças a Deus me deparei com diversas pessoas que me apoiaram, incentivaram e ajudaram de alguma forma. Palavras não serão suficientes para agradecer a cada uma delas

Poderia começar por meus pais e meus irmãos, que fez de mim quem sou. Me apoiaram e acima de tudo se orgulharam de mim por ter chegado até aqui. Não poderia deixar de falar também da minha avó paterna, que não está mais entre nós, porém me ensinou a ser uma mulher independente, guerreira e que mesmo nas dificuldades sempre buscou motivos para sorrir.

Ao meu marido, por ter aguentado meus estresses, minhas noites mal dormidas e por me apoiar e acreditar em mim durante todo esse processo. Junto com ele, agradeço a minha filha de quatro patas, Doralice, que fez dos meus dias mais leves e mais feliz, sempre juntinho de mim.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, que me trataram sempre com muito carinho, onde criamos uma verdadeira família unida onde ninguém solta a mão de ninguém independente da situação. Nunca poderei esquecer um que cada um fez por mim e sei que os laços criados não deixarão de existir tão fácil. Não posso deixar de falar, principalmente de Daffany, que esteve ao meu lado em cada etapa desse projeto, juntas como patati e patatá, como fomos referências tantas vezes. Assim como preciso falar da nossa mãe, que sempre será, Anninha. Além daquela amiga que sempre está lá para dar uma chacoalhada e acordar para vida,

Lígia. Juntamente com elas, preciso falar de uma pessoa que me aguenta a tanto tempo, e que mesmo tão longe não soltou minha mão, minha co-orientadora Talita.

Não posso esquecer, de forma alguma, de agradecer ao professor e orientador Antonio, que muitas vezes brinquei que ele era o pai de todos nós, mas como falam, toda brincadeira tem um fundo de verdade, e essa não seria diferente. A sua sensibilidade em meio a tanto caos para lidar é o que ameniza todo o peso que já carregamos durante toda essa jornada.

Finalmente, agradeço imensamente à professora e, também, co-orientadora, Cristiane e todos do laboratório LAIA, que colocou a mão na massa, ficando até tarde no laboratório, para que todo esse projeto saísse. Se não fosse por cada um deles eu não teria conseguido finalizar esse doutorado.

Com certeza posso estar esquecendo alguém, porém a partir de hoje não teria como esquecer de um serzinho que está prestes a chegar e iluminar ainda mais minha vida, meu filho João Vitor, que veio de forma inesperada em meio a todo esse caos, mas veio trazendo a luz e a esperança, me dando ainda mais forças para enfrentar toda essa batalha que é a vida.

Gratidão.

RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco é o principal agente causador do câncer do colo do útero. No entanto, o HPV tem sido correlacionado com outros tipos de câncer, como o câncer de pulmão. No entanto, ainda não está claro como o HPV atua na carcinogênese pulmonar. Neste estudo, os tumores de pacientes com câncer de pulmão foram avaliados quanto à expressão das proteínas do HPV (E2, E5, E6 e E7) por RT-qPCR, bem como a expressão de fatores de transcrição (STAT4, STAT3, STAT6, JAK2 e FOXO4). Também foi realizada análises de imunofenotipagem de linfócitos e monócitos isolados de PBMC e cultivados in vitro juntamente com a linhagem celular A549 transfectadas com os oncogenes do HPV16. Pelo menos uma das proteínas do HPV foi encontrada em 66,7% dos tumores pulmonares. As oncoproteínas E5 e E7 foram superexpressas e com forte correlação positiva entre elas. Uma superexpressão de todos os fatores de transcrição foi observada nos tumores infectados pelo HPV, principalmente FOXO4 e STAT4. Houve um aumento de citocinas no sobrenadante, células T auxiliares e da atividade de células citotóxica, além de uma diminuição das células T reguladoras na presença das oncoproteínas virais. Destacando-se uma atividade anti-tumoral de E5 de HPV16. Nossos resultados sugerem que as oncoproteínas do HPV podem estar associadas à ativação de fatores de transcrição, assim como podem manipular células imunológicas do microambiente tumoral de pulmão.

Palavras-chave: Câncer de Pulmão; Papilomavírus Humano; Microambiente Tumoral; Fatores de Transcrição

ABSTRACT

High-risk Human Papillomavirus (HPV) is the main cause agent of cervical cancer. However, HPV has also been linked to other cancers such as lung cancer. However, it is still unclear how HPV acts in the development of lung cancer. In this study, tumors from patients with lung cancer were analyzed by RT-qPCR for the expression of HPV proteins (E2, E5, E6 and E7) and transcription factors (STAT4, STAT3, STAT6, JAK2 and FOXO4). Immunophenotyping analysis of lymphocytes and monocytes isolated from PBMC and cultured in vitro together with the A549 cell line transfected with the HPV16 oncogenes was also performed. At least one of the HPV proteins was found in 66.7% of the lung tumors. Oncoproteins E5 and E7 were overexpressed, with a strong positive association between them. Overexpression of all transcription factors was observed in HPV-infected tumors, especially FOXO4 and STAT4. There was an increase in supernatant cytokines, helper T cells and cytotoxic cell activity, and a decrease in regulatory T cells in the presence of viral oncoproteins. This suggests antitumor activity of E5 of HPV16. Our results suggest that HPV oncoproteins may be associated with transcription factor activation and manipulate immune cells in the lung tumor microenvironment.

Keywords: Lung cancer; HPV; Tumor Microenvironment; Immunological response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

Figura 1-	Estimativa da incidência da taxa de mortalidade no mundo em 2022 em ambos os sexos e todas as idades.	20
Figura 2-	Organização genômica do HPV do tipo alpha e função de cada proteína.	26
Figura 3 -	Ciclo de infecção do HPV no epitélio escamoso.	32
Figura 4 -	Diferentes hipóteses de transmissão do HPV para o pulmão.	38
Figura 5 -	Ação dos oncogenes em vias de sinalização celular.	42
Figura 6 -	Componentes do microambiente tumoral.	48
Figura 7 -	Diferenciação das células T CD4 em Th1, Th2, Th17 e Treg.	59
Figura 8	A modulação do HPV na via de sinalização de STAT3.	68

ARTIGO 1

Figura 1	Expressão das oncoproteínas do HPV.	80
Figura 2	Correlação das oncoproteínas do HPV.	80

Figura 3	Expressão de fatores de transcrição em amostras de HPV+ e HPV-.	82
Figura 4	Correlação entre oncogenes de HPV e fatores de transcrição em amostras de HPV+.	82

ARTIGO 2

Figura 1	Esquema dos grupos experimentais.	102
Figura 2	Perfil de estimulação de linfócitos T CD4+ cultivados com a linhagem celular de tumor de pulmão A549.	103
Figura 3	Perfil de estimulação de linfócitos T citotóxico CD8+ e CD56+ cultivados com linhagem tumoral de pulmão A549.	104
Figura 4	Perfil de estimulação de monócitos CD14+ cultivados com a linhagem A549 com e sem a presença das oncoproteínas do HPV16.	105
Figura 5	Produção de citocinas intracelular por linfócitos T CD4+ contra células tumorais de pulmão na presença e ausência de E5, E6 e E7 do HPV16	106
Figura 6	Citocinas intracelular produzidas por linfócitos TCD8+ contra células A549 com e sem a presença das oncoproteínas do HPV.	107

Figura 7	Citocinas intracelular produzidas por linfócitos T CD56+ contra células A549 com e sem a presença das oncoproteínas do HPV.	108
Figura 8	Citocinas presente no sobrenadante de linfócitos T cultivados com células tumorais de pulmão transfectadas ou não com as oncoproteínas do HPV.	109
Figura 9	Citocinas presente no sobrenadante de monócitos cultivados com células tumorais de pulmão transfectadas ou não com as oncoproteínas do HPV.	111

LISTA DE TABELAS

DISSERTAÇÃO

Quadro 1	Estudos que detectaram o DNA do HPV em amostras de pulmão.	33
Quadro 2	Atividade dos oncogenes do HPV em diferentes vias no câncer de pulmão.	44

ARTIGO 1

Tabela 1 -	Informação do conjunto de primers	77
Tabela 2	Frequência das características clínico-demográficas	78
Tabela 3	Relação entre a presença do HPV e a estimativa de risco segundo sexo, idade, etilismo e tabagismo	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Item	Definição
AhR	Receptor de hidrocarboneto arílico (do inglês - Aryl hydrocarbon receptor)
Bcl-2	Proteína de célula B de linfoma 2 (do inglês - B cell lymphoma 2)
BRAF	proto-oncogene B-Raf (do inglês - proto-oncogene B-Raf)
CAF	Fibroblastos associados ao câncer (do inglês - Cancer-associated fibroblast)
CTL	Células T/linfócitos citotóxico (do inglês - Cytotoxic T lymphocytes)
DBH	Hibridização dot blot (do ingles - Dot blot hybridization)
DC	Células dendríticas (do inglês - Dendritic cells)
E (1 a 8)	Gene de expressão precoce 1 a 8 (inglês - early expression gene 1 to 8)
E2F	Fator de transcrição E2 (do inglês - E2 transcription factors)
E6AP	Proteína ubiquitina ligase E3A associada a proteína E6 (do inglês - Ubiquitin-protein ligase E3 A)
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidermal
EMT	Transição-epitélio mesenquimal (do inglês - epithelial-mesenchymal transition)
EV	Epidermodisplasia verruciforme
FOXO	Fator de transcrição forkhead box (do inglês - Transcription factor forkhead box)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (do inglês - granulocyte -macrophage colony-stimulating factor)
GPCR	Receptor acoplado a proteína G (do inglês - G protein-coupled receptor)
HDAC	Histona desacetilase (do inglês - Histone deacetylase)
HIF-1a	Fator induzível de hipoxia 1 alfa (do inglês - Hypoxia-inducible factor 1-alpha)

HPV	Papilomavírus Humano (do inglês - Human Papillomavirus)
HPV HR	Papilomavírus Humano de alto risco
HSPG	Proteoglicanos heparan sulfato (do inglês - Heparan sulfate proteoglycans)
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
ISH	Hibridização in situ (do inglês - in situ hybridization)
JAK	Janus Quinase (do inglês - Janus kinase)
JEC	Juncção escamocolumnar
L1	Gene de expressão tardia 1 (do inglês - Late 1)
L2	Gene de expressão tardia 2 (do inglês -Late 2)
LCR	Longa região de controle (do inglês - Long control region)
MDSC	Células supressoras derivadas de mielóide (do inglês - myeloid-derived suppressor cells)
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade classe I (do inglês - Major histocompatibility complex classe I)
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II (do inglês - Major histocompatibility complex classe II)
MMP	Metaloproteinase (do inglês - Metalloproteinases)
NCR	Região não codificante (do inglês - noncoding region)
NK	Células matadoras naturais (do inglês - Natural Killer)
NSCLC	Câncer de pulmão de células não pequenas (do inglês- Non-small cell lung cancer)
ORF	Quadro aberto de leitura (do inglês - open reading frame)
p16	Proteína codificada pelo gene CDKN2A
p21	Proteína inibidora de quinase dependente de ciclina
p27	Proteína inibidora de quinase dependente de ciclina
p53	Gene que codifica uma fosfoproteína nuclear
p97	Promotor localizado no LCR do HPV
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, polymerase chain reaction)

PD-1	Proteína de morte celular programada 1 (Programmed cell death protein 1)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês, Platelet-derived growth factor)
PD-L1	Ligante da proteína morte celular programada 1 (do inglês, Programmed death ligand-1)
pRB	proteína do retinoblastoma
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina (Phosphatase and tensin homolog)
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RB	Retinoblastoma
RET	proto-oncogene codificante do receptor de tirosina quinase
RORyt	Fator de transcrição regulador de células T
SBH	Hibridização Southern blot (do inglês, southern blot hybridization)
SCLC	Câncer de pulmão de células pequenas (do inglês, Small cell lung cancer)
SOCs-1	Supressor de sinalização de citocinas 1
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição (do inglês, signal transducer and activator of transcription)
TAM	Macrófagos associados ao tumor (do inglês, tumor-associated macrophages)
TAN	Neutrófilos associados ao tumor (do inglês, tumor-associated neutrophils)
TCR	Receptor de células T (do inglês, T-cell receptor)
TLS	Estruturas linfóide terciárias (do inglês, tertiary lymphoid structure)
TME	Microambiente Tumoral (do inglês, tumor microenvironment)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês - Vascular endothelial growth factor)
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês - Peripheral blood mononuclear cells)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1	CÂNCER DE PULMÃO.....	20
2.2	PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	23
2.2.1	O papel das proteínas do HPV no ciclo da infecção.....	27
2.3	CÂNCER DE PULMÃO E SUA ASSOCIAÇÃO COM O HPV.....	33
2.3.1	Possíveis rotas de infecção pelo HPV.....	36
2.3.2	Prevalência epidemiológica do HPV no Câncer de Pulmão.....	39
2.3.3	Perfil molecular do microambiente tumoral pulmonar.....	41
2.4	RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS NO MICROAMBIENTE TUMORAL.....	47
2.4.1	Imunidade inata.....	52
2.4.2	Imunidade adaptativa.....	56
2.4.3	Quimiocinas e citocinas.....	61
2.5	MARCADORES MOLECULARES DO MICROAMBIENTE TUMORAS.....	63
2.5.1	JAK/STAT.....	63
2.5.2	FOXO4.....	69
3	OBJETIVOS.....	72
3.1	OBJETIVO GERAL.....	72
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	72
4	ARTIGO 1.....	73
5	ARTIGO 2.....	98
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	122
	REFERÊNCIAS.....	123
	APÊNDICE A.....	137
	ANEXO A.....	138
	ANEXO B.....	141

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, em 2020 foi responsável por mais de 10 milhões de mortes, e o câncer de pulmão é um dos mais incidentes tanto em homens quanto em mulheres. É bem estabelecido que a principal causa do câncer de pulmão é o consumo de cigarro de tabaco, no entanto, uma porcentagem considerável de pacientes com câncer de pulmão não está associada ao tabagismo, o que levanta a questão de outros fatores etiológicos estarem associados, como exposição ocupacional a agentes químicos ou físicos e agentes infecciosos virais.

Os agentes virais estão associados ao desenvolvimento de alguns cânceres, como é o caso do Papilomavírus Humano (HPV), o qual é um vírus de DNA que já está bem estabelecido como agente etiológico dos cânceres de colo de útero e de cabeça e pescoço. Além disso, recentemente, a capacidade transformante do HPV que conta com o auxílio de oncoproteínas envolvidas na indução da proliferação celular, bem como inibição de supressores tumorais, está sendo implicada no desenvolvimento de outros tipos de cânceres, como os de mama e pulmão.

Há cerca de 30 anos, os estudos sobre a atividade do HPV no câncer de pulmão têm observado que as oncoproteínas virais estão ativas e podem induzir o processo de carcinogênese, através do aumento da proliferação das células, inibição da apoptose, e manipulação do sistema imune do hospedeiro. A capacidade de evadir ou mesmo suprimir as respostas imunológicas antitumorais é uma das características fundamentais nas interações entre as células malignas e o microambiente tumoral. O HPV possui capacidade de se adaptar manipulando o

microambiente tumoral para escapar do monitoramento imunológico, diminuindo drasticamente a apresentação de antígenos virais às células imunológicas competentes.

O microambiente tumoral (TME) é uma estrutura dinâmica altamente interativa, composta por células cancerosas, células estromais não cancerosas, e células imunes. A análise histopatológica de tumores sólidos revela que eles são infiltrados por células imunes inatas e adaptativas que pode ser encontrada no TME pulmonar e abrigam atividades promotoras e supressoras de tumores que podem prever o resultado clínico dos pacientes. As células imunológicas mais estudadas nos cânceres são as células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos, bem como os linfócitos e suas citocinas e quimiocinas associadas.

Alguns fatores de transcrição, também, estão associados com o processo de carcinogênese em diversos tipos de câncer, incluindo cânceres associados à infecção pelo HPV, como é o caso de FOXO4 e JAK/STAT.

A via JAK/STAT desempenha um papel essencial na diferenciação de células Th, e a sua desregulação foi associada à promoção da progressão do câncer, bem como evasão imune e metástase. Sua ativação ocorre após a ligação de citocinas à receptores celulares, que por sua vez, resulta na ativação de JAKs seguido pelo recrutamento, fosforilação e ativação de proteínas STAT que são translocadas para o núcleo e se ligam a sequências promotoras específicas, levando a transcrição de genes alvos associados à proliferação celular.

Em contrapartida, o fator de transcrição FOXO4 é em geral considerado um supressor tumoral em diferentes tipos de tecidos, e é normalmente encontrado minimamente expressos em diversos tipos de cânceres, no entanto seu papel nos tumores associados ao HPV precisa ser mais bem elucidado.

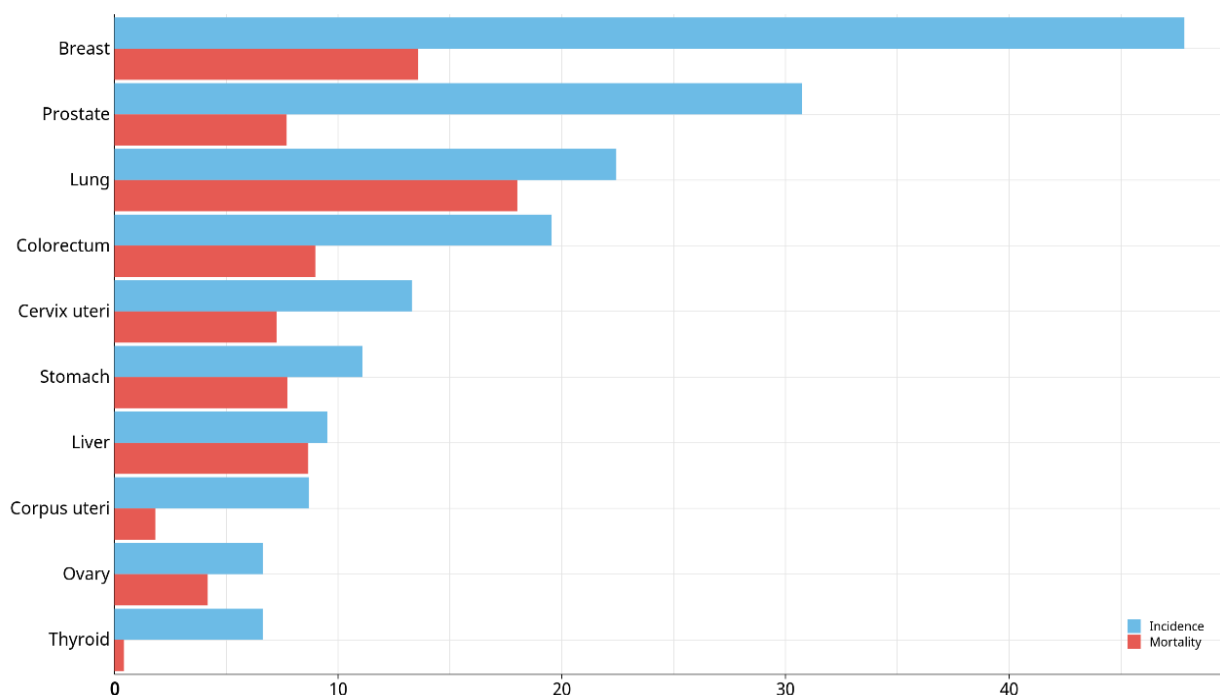
Com isso, sugere-se que o microambiente imunológico do tumor contribui para a carcinogênese pulmonar e sua associação com o HPV tem potencial de interferir na resposta imunológica do hospedeiro, o qual pode influenciar no prognóstico do paciente e nas estratégias de tratamento. Com esse intuito, o presente estudo visa avaliar o microambiente tumoral pulmonar associado à infecção pelo HPV considerando biomarcadores em potencial que possam auxiliar no resultado clínico do paciente e no desenvolvimento de terapias alvo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE PULMÃO

Quando uma célula, presente em um órgão específico, cresce de forma rápida e desordenada, além dos limites usuais, e pode invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos, ela é definida como uma célula caracteristicamente cancerígena. O câncer é um grupo de doenças que pode afetar qualquer parte do corpo, além de ser uma das principais causas de morte no mundo, e em 2020 foi responsável por quase 10 milhões de mortes. Os tipos de câncer mais comuns no mundo são: câncer de mama, seguido pelo câncer de pulmão, cólon e reto, próstata e estômago; sendo o câncer de pulmão o que mais mata no mundo (1,80 milhões de óbitos no ano de 2020) (Figura 1) (World Health Organization 2022).

Figura 1 - Estimativa da incidência da taxa de mortalidade no mundo em 2022 em ambos os sexos e todas as idade.



Fonte: World Health Organization (2022)

Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil a estimativa para o triênio 2020-2022 é de 30 mil casos novos de câncer de pulmão, 17.760 casos novos de câncer de pulmão em homens e 12.440 em mulheres. Somente em 2017, o câncer de pulmão foi responsável por cerca de 28 mil óbitos no Brasil (INCA 2019).

A maioria dos cânceres que começam no pulmão, conhecido como câncer primário de pulmão, são carcinomas derivados de células epiteliais. O câncer primário de pulmão é dividido em dois tipos, o carcinoma de pulmão de células pequenas (SCLC - do inglês *Small-cell lung carcinoma*) e carcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC – do inglês *non-small cell carcinoma*). O SCLC representa apenas 15% de todos os casos de câncer de pulmão, mas é um tumor altamente maligno derivado de células que exibem características neuroendócrinas. Já o NSCLC é responsável por 85% restante dos casos e é subdividido em 3 subtipos, o adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes (Akhtar and Bansal 2017a).

Nos últimos anos, a classificação de pulmão vem passando por algumas mudanças. Em 2015, o livro de classificação da OMS introduziu muitas mudanças importantes, devido ao avanço na compreensão da genética e das terapias moleculares direcionadas. De acordo com a OMS, para fazer a classificação do tumor deve-se usar primeiro a morfologia, apoiada pela imunohistoquímica, e depois as técnicas moleculares. Ao se basear nessas técnicas, o diagnóstico patológico dos tumores de pulmão se torna mais preciso, o que permite uma melhor estratégia de terapia molecular direcionada e maior sobrevida do paciente (Nicholson et al. 2022).

Algumas anormalidades moleculares individuais fazem parte dos critérios para o diagnóstico de alguns tumores de pulmão mais raros. Embora muitas

alterações moleculares ainda não tenham impacto na classificação de subtipos tumorais específicos. Por exemplo, nos NSCLC, atualmente, é recomendado testes de rotina para a presença de mutações/fusões de determinados genes. No caso do adenocarcinoma de pulmão, é possível identificar algumas mutações exclusivas, como as deleções do exon 19 de EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal) CSF juntamente com as mutações pontuais do exon 21 e a translocação do EML4-ALK. Ao contrário do adenocarcinoma de pulmão, não ocorreram grandes descobertas na caracterização molecular do carcinoma de células escamosas de pulmão. Contudo, mutações em EGFR e MET, como também, rearranjos em ALK e ROS1, podem ocorrer, especificamente em pacientes jovens que nunca fumaram (Nicholson et al. 2022).

Em geral os tipos de alterações genéticas associadas ao câncer de pulmão mais estudadas são: mutações em EGFR, rearranjo do gene ALK (linfoma quinase anaplásico), mutações no gene KRAS (homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kristen), rearranjos em ROS (Proto-oncogene 1, receptor de tirosina quinase), mutações em HER2 (receptor 2 de fator de crescimento epidérmico humano), rearranjos RET (proto-oncogene), mutações e amplificação do proto-oncogene MET, mutações oncogênicas em BRAF (proto-oncogene, serina/tirosina quinase), além de mutações, deleções e amplificações de PIK3CA (Villalobos and Wistuba 2017).

Como o câncer é uma doença multifatorial, diversos fatores podem estar interferindo em marcadores moleculares associados ao desenvolvimento e progressão tumoral. O tabagismo é o fator mais associado ao câncer de pulmão. Entretanto, cerca de 15% dos casos de câncer de pulmão ocorrem em pacientes não fumantes, então outros carcinógenos ambientais podem estar influenciando o

desenvolvimento do câncer de pulmão, tais como, arsênio, asbesto, radônio, poluição do ar, outras doenças respiratórias prévias como a bronquite crônica, enfisema, tuberculose, pneumonia e asma (Hessel et al. 2005; Liang et al. 2009; Shepshelovich et al. 2016). Além disso, infecções virais, como por exemplo pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV - do inglês), vírus Epstein-Barr e o Papilomavírus Humano (HPV - do inglês *Human papillomavirus*) têm sido apontados como possíveis agentes associados ao câncer de pulmão (Akhtar and Bansal 2017a).

2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

As infecções por microrganismos são responsáveis por 20-25% de todos os cânceres humanos. Dentre os microrganismos, o HPV é o que mais se destaca, pois é responsável por 30% de todos os cânceres relacionados a agentes infecciosos (Araldi et al. 2018).

A prevalência mundial do HPV varia de acordo com a população analisada e o nível de desenvolvimento econômico da região. Estima-se que o HPV cause 610.000 casos de câncer e 250.000 mortes ao ano. Segundo a OMS, 85% dessas mortes ocorrem em países em desenvolvimento. Além disso, a presença do HPV pode variar de acordo com o local anatômico do corpo. Acredita-se que o HPV seja responsável por mais de 90% dos cânceres cervicais, 88% dos cânceres anais e 50% dos cânceres de pênis. Foi observado, também, que a prevalência do HPV no Brasil pode variar de acordo com o local anatômico do corpo, apresentando menores taxas na cavidade oral em comparação com a região cervical, peniana e anal (Araldi et al. 2018; Colpani et al. 2020; World Health Organization 2022).

No Brasil, a prevalência do HPV é alta, variando nos cânceres genitais entre 10,4 e 72% dependendo do sexo. Por ser um país com proporções continentais e

significativa diversidade socioeconômica, a epidemiologia da infecção pelo HPV, no Brasil, também pode ser impactada por essas variáveis. O qual foi observado uma prevalência ligeiramente maior do vírus nas regiões nordeste e centro-oeste. (Colpani et al. 2020).

O HPV pertence à família *Papillomaviridae* que é uma das famílias virais mais antigas conhecidas. O primeiro registro da associação do HPV foi em lesões cutâneas papilomatosas com potencial carcinogênico, por volta da década de 1920, quando foi descrito pela primeira vez uma condição hereditária denominada Epidermodisplasia verruciforme (EV). Posteriormente, observaram que indivíduos com EV infectados com β -HPV 5 e 8 apresentaram maior risco de desenvolver câncer de pele não melanoma (Nunes et al. 2018).

A família *Papillomaviridae* é dividida em 39 gêneros. Há atualmente 205 tipos de HPV identificados, que foram categorizados em cinco gêneros, incluindo 65 *Alphapapillomaviruses*, 51 *Betapapillomaviruses*, 84 *Gamapapillomaviruses*, 4 *Mupapillomaviruses* e apenas um *Nupapillomavirus*. Os HPVs do gênero alfa são de maior importância, pois estão associados a cânceres orais, de mucosa e cânceres do trato anogenital (Harden and Munger 2017).

Há aproximadamente 40 tipos de HPVs alfa que infectam o epitélio da mucosa e são classificados como de baixo risco (LR – do inglês low risk) e de alto risco (HR – do inglês high risk) com base em sua associação clínica com verrugas ou lesões com propensão à progressão maligna. Todos os HPVs podem induzir lesões benignas proliferativas. No entanto, 12 tipos virais estão mais relacionados com neoplasias malignas (HPV- 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59)(Graham 2017; Harden and Munger 2017; Araldi et al. 2018). Aspectos morfológicos e genéticos do HPV

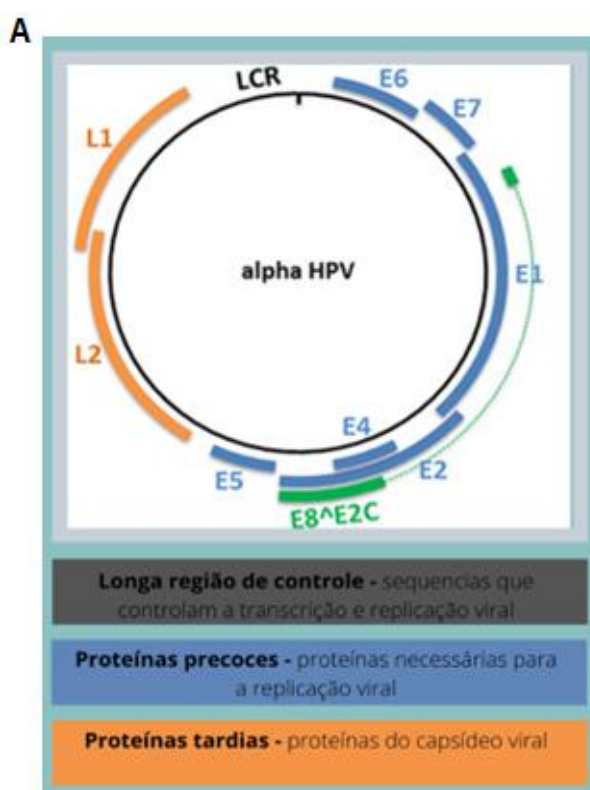
O HPV é uma partícula viral não envelopada de capsídeo icosaédrico, composto por uma única molécula de DNA circular de fita dupla com aproximadamente 8.000 pb. Apenas uma fita do genoma é utilizada como molde para a transcrição e esta fita codificante possui três regiões genômicas, incluindo aproximadamente 10 quadros abertos de leitura (ORF – do inglês *open reading frame*) (Harden and Munger 2017).

Muitas proteínas virais são expressas a partir de um mRNA policistrônico e, com o HPV, não é diferente. Seu transcrito contém as proteínas de expressão precoce (E) E1, E2, E4, E5, E6 e E7, as quais estão associadas com a replicação viral e proliferação celular; as proteínas de expressão tardia (L), a qual codifica a maior proteína (L1) e a menor proteína (L2) do capsídeo e; uma região não codificante (NCR), também conhecida como longa região de controle (LCR – do inglês *long control region*), que está localizada entre as ORFs de L1 e E6. Embora não codificante, a LCR possui muitos elementos regulatórios envolvidos na replicação do DNA e transcrição, incluindo a origem de replicação (*ori*) (Araldi, 2018). Além das proteínas precoces mencionadas, é observado em todos os PVs a proteína precoce E8, que atua como um repressor transcricional, juntamente com E2, e reprime a replicação dependente de E1/E2 (Tommasino 2014; Dreer et al. 2017; McBride 2017; Gheit 2019).

As características das regiões do genoma são compartilhadas entre todos os HPVs alfa, como pode ser observado na figura 2. Porém, apenas quatro ORFs (E1, E2, L1 e L2) são necessárias para garantir a replicação viral e a disseminação do vírus, e estão presentes em todos os PVs conhecidos. Certos gêneros e tipos de HPV não possui alguns tipos de ORFs, como por exemplo, a ORF E5 que está ausente nos HPVs do gênero beta, gama e mu, e as ORFs E5 e E6 que estão

ausente em três tipos de HPV gama (HPV 101, 103 e 108). Além disso, é observado em alguns HPVs beta e gama certas particularidades, como a de possuir um LCR mais curto em comparação com membros de outros gêneros (Gheit 2019).

Figura 2 – Organização genômica do HPV do tipo alpha e função de cada proteínas. (A) O genoma do HPV é dividido em proteínas precoces, proteínas tardias e longa região de controle. (B) As proteínas precoces são compostas por E1-E8, e as proteínas tardias por L1 e L2, cada uma delas com funções específicas na replicação viral.



B

E1	Atua com E2 formando o complexo E1-E2 responsável por atrair proteínas do hospedeiro necessárias para a replicação viral; Possui um domínio helicase dependente de ATP
E2	Atua como regulador transcricional das oncoproteínas E6 e E7 ao se ligar ao promotor p9; Regula o número de cópias virais
E4	Interagem com a queratina levando a fragilidade celular e contribuindo para a saída do vírion
E5	Atua sinergicamente com EGF, levando a proliferação celular; Envolvida na evasão imune e persistência da infecção; Formar proteína canal transmembrana
E6	Oncoproteína que possui ação transformante; Possui a capacidade de reduzir os níveis da proteína supressora tumoral p53, promovendo sua degradação
E7	Oncoproteína que se liga a oncoproteína supressora tumora pRB acarretando na translocação nuclear de E2F que promove a expressão de genes levando a proliferação celular
E8^E2	Atua como um repressor transcricional e reprime a replicação dependente de E1/E2 da origem viral
L1	Maior proteína do capsídeo e a mais conservada; crucial para a infecção viral pois se liga à HSPGs na membrana basal facilitando sua vacuolização
L2	Menor proteína do capsídeo; Necessária para a infecção viral e montagem, facilitando o empacotamento do DNA.

Fonte: A autora (2023)

2.2.1 O papel das proteínas do HPV no ciclo de infecção

O HPV é uma doença transmitida sexualmente, embora a infecção não sexual também possa ser possível. Evidências sugerem que o HPV pode ser verticalmente transmitido, pois foi possível observar a sequência do DNA viral na cavidade oral de recém-nascidos, leite materno, líquido amniótico, placenta, sangue de cordão umbilical e no espermatozóide (Araldi et al. 2018; Gheit 2019).

Cerca de 90% das infecções por HPV são combatidas pelo sistema imunológico do hospedeiro dentro de 1 a 2 anos e originam apenas infecções assintomáticas. Todavia, algumas infecções podem ser persistentes, o que é explicada por vários fatores, como o consumo de álcool que aumenta sinergicamente a carga viral do HPV HR; o tabagismo isolado também desempenha

um papel importante na aquisição de infecção persistente e; fatores de risco genético do hospedeiro que, também, pode predispor o indivíduo a uma infecção persistente (Gheit 2019).

Para que uma infecção pelo HPV se mantenha persistente, as células indiferenciadas epiteliais na camada basal devem ser infectadas. Porém, elas não são facilmente acessíveis e o vírus só é capaz de infectar as células basais por meio de micro feridas que expõe a camada epitelial inferior (Harden and Munger 2017) (Figura 3).

Uma vez que essas células tenham sido alcançadas, a proteína L1 se liga à proteoglicanos heparan sulfato (HSPGs – do inglês, Heparan sulfate proteoglycans), que serve como receptores primários de fixação nas células basais, promovendo uma mudança conformacional no capsídeo viral. Embora conhecido como um sítio de ligação importante, o HSPG não é único, pois estudos mostraram que a proteína L1 pode se ligar também a diferentes integrinas (Araldi et al. 2018; Scarth et al. 2021). Após as mudanças conformacionais no capsídeo, a região N-terminal de L2 é exposta e clivada pela furina, uma proteína com atividade proteolítica capaz de interagir com diferentes fatores de crescimento, receptores celulares e virais. Esta ação é necessária para promover uma segunda mudança conformacional no capsídeo viral que auxilia na ligação do vírus a receptores celulares. Posteriormente, o vírus é internalizado em estruturas vacuolares pela clatrina ou caveolina, mediado por mecanismos de endocitose. Quando os lisossomos se ligam à essas vesículas endocíticas é formado o fagolisossomo, onde ocorre a diminuição do pH, que leva a desmontagem do capsídeo viral e, finalmente, a liberação do genoma viral (Araldi et al. 2018; Scarth et al. 2021). O movimento do vírus através do citoplasma para o núcleo provavelmente ocorre ao

longo dos microtúbulos através da associação das vesículas à L2. A entrada do genoma viral no núcleo requer mitose e esse processo é mediado por L2 (Harden and Munger 2017).

Antes da sua entrada no núcleo das células epiteliais da camada basal, o DNA viral é mantido nas células como um plasmídeo multicópia estável ou episossoma. O HPV não é capaz de se auto-replicar, pois o vírus não expressa polimerases. Por este motivo, se inicia a ação das primeiras proteínas virais E1 e E2. Estas proteínas precoces interagem com a célula do hospedeiro, e induzem a entrada da fase S como mecanismo para obter DNA polimerases, acarretando na amplificação do genoma viral (Harden and Munger 2017; Araldi et al. 2018).

Embora acredite-se que a amplificação inicial requer E1 e E2, a proteína E1 pode não ser necessária, uma vez que o número de cópias virais tenha atingido um limite de 50-100 cópias. Nesta fase latente do ciclo de vida viral, os genomas do HPV persistem nas células epiteliais basais por anos e até décadas. No entanto, em algum momento, uma mudança na replicação estável para a replicação vegetativa do DNA viral, deve ocorrer, para permitir a produção de genomas para empacotamento em vírions (Mcbride 2017; Harden and Munger 2017; Tognon et al. 2019).

O genoma do HPV HR pode integrar-se aos cromossomos do hospedeiro e é considerado um importante condutor da carcinogênese. A integração depende da inativação do gene E2, que é importante para alcançar a transformação neoplásica uma vez que E2 atua como um regulador transcricional de E6 e E7. Quando

presente em altos níveis, E2 se liga ao promotor p97, presente no LCR, impedindo a ligação da RNA polimerase II ao p97 e, consequentemente, reprimindo a expressão de E6 e E7 (Graham 2017; Araldi et al. 2018; Gheit 2019).

O mecanismo de integração do DNA pode contribuir para a transformação maligna de células cervicais induzidas por HPV, afetando a expressão de genes-chaves do hospedeiro próximo ao local de integração, uma vez que pode influenciar padrões de metilação e a expressão de genes importantes para a homeostase celular. A integração de sequências de HPV parece ocorrer preferencialmente em sítios frágeis comuns em cromossomos humanos, em regiões transcricionalmente ativas ou perto de microRNAs. Embora os pontos de quebra estejam distribuídos no genoma inteiro, os sítios frágeis são mais suscetíveis a integração viral, sugerindo que a integração é um evento não randômico (Mcbride 2017; Araldi et al. 2018; Gheit 2019).

Os danos genéticos induzidos pelas oncoproteínas do HPV ocorrem cedo nas lesões neoplásicas, quando o genoma do vírus ainda está no estado episomal. A integração parece ser uma consequência direta da instabilidade cromossômica induzida por E5, E6 e E7, que além disso também promovem a ativação da maquinaria de replicação do DNA. As ORFs E6 e E7 têm a capacidade de modificar o ambiente celular para permitir a amplificação do genoma viral nas células diferenciadas, que normalmente seriam incompetentes para a replicação do DNA (Araldi et al. 2018).

Estas modificações celulares se dão normalmente pela interação de E6 com a proteína supressora de tumor, p53. A proteína p53 tem sua ação na atividade proliferativa e pró-apoptótica, porém quando E6 se associa a p53 sua atividade é inibida. E6 também aumenta a atividade da telomerase, permitindo a manutenção

da integridade dos telômeros apesar das repetidas divisões celulares. A oncoproteína E7 também interfere no ambiente celular, atuando principalmente no supressor tumoral de retinoblastoma (pRB), que acarreta na liberação de membro da família E2F e resulta na ativação da expressão de genes que controlam a síntese de DNA e proliferação celular (Harden and Munger 2017; Scarth et al. 2021; Vats et al. 2021).

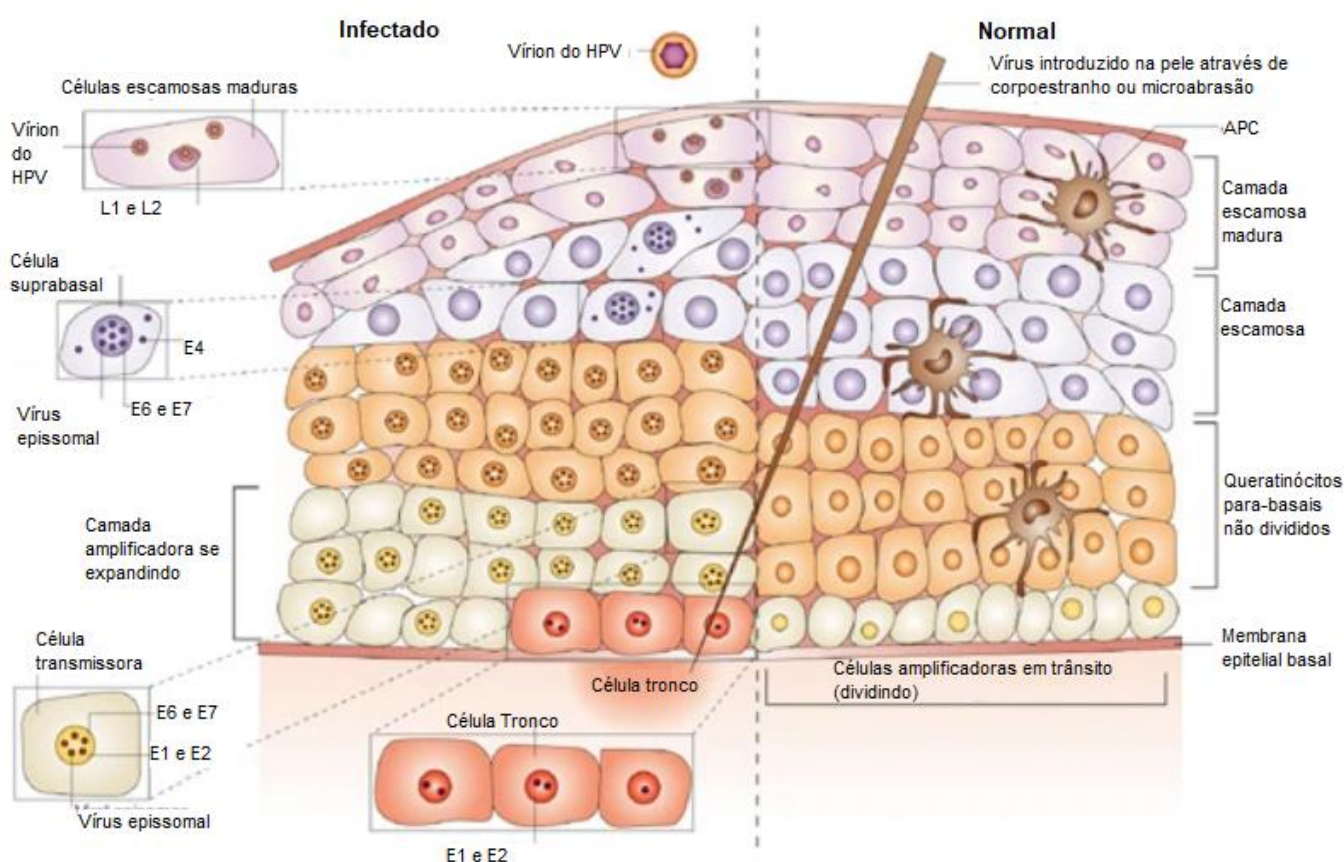
Além das oncoproteínas E6 e E7, a oncoproteína E5 é também de grande importância no processo carcinogênico das células. A proteína E5 do HPV atua sinergicamente com o fator de crescimento epidermal (EGF- do inglês *epidermal growth factor*), levando a proliferação celular. E5 também interfere no aparato de golgi, causando a retenção do complexo de histocompatibilidade classe I (HLA – do inglês *Human leucocyte Antigen*) e evita seu transporte à superfície celular. Esse é um dos mecanismos de evasão imune, que contribui para a persistência da infecção. Além disso, E5 foi classificada como uma viroporina, uma proteína canal capaz de modular a homeostase de íons, tráfico, produção de vírion e entrada do genoma viral, o qual afeta a comunicação intercelular e auxilia na transição epitélio-mesenquimal (Araldi et al. 2018; Scarth et al. 2021).

A conclusão do ciclo viral envolve a saída do ciclo celular e a expressão de L1 e L2 para permitir o empacotamento do genoma viral. A montagem viral é observada na maioria das camadas epiteliais diferenciadas, nos núcleos dos queratinócitos, nos quais ocorreu a replicação do genoma viral e a expressão das proteínas virais. A liberação do vírus ocorre através da degeneração das células diferenciadas, levando a formação de coilócitos. A formação dos coilócitos é atribuída às oncoproteínas E5 e E6, e o mecanismo da vacuolização citoplasmática contribui para a fragilidade dos queratinócitos, facilitando a liberação dos vírus. Ou

seja, os coilocitos são células destinadas a apoptose (Harden and Munger 2017; Araldi et al. 2018; Tognon et al. 2019).

E4 também pode contribuir para a liberação de vírions, ligando-se aos filamentos de citoqueratina e interrompendo sua estrutura. Sua expressão nas camadas epiteliais granular e suprabasal, interage com fibras amiloides associadas à queratina levando a fragilidade celular e contribuindo para a saída do vírion (Harden and Munger 2017; Araldi et al. 2018).

Figura 3 – Ciclo de infecção do HPV no epitélio escamoso. Diferenciação e maturação das células epiteliais escamosa (lado direito). Após infecção pelo HPV nas células da camada basal, ocorre a expressão das proteínas virais não estruturais. A população de células se expande verticalmente e as proteínas virais se expressam sequencialmente e os vírions maduros são produzidos e liberados na camada mais superficial. As células APC estão esgotadas no epitélio infectado.



Fonte: Adaptado de Frazer (2004).

2.3 CÂNCER DE PULMÃO E SUA ASSOCIAÇÃO COM O HPV

A possível associação do HPV com o câncer de pulmão teve início na década de 1970, no entanto, diferentemente do câncer cervical, o envolvimento do HPV no câncer de pulmão ainda não está bem estabelecido. A primeira evidência da relação entre o HPV e o câncer de pulmão foi observada por Roglic et al., em 1975, seguido por Rubel e Reynolds em 1979, onde encontraram em seus estudos semelhanças histológicas e citológicas características da infecção pelo HPV, como, por exemplo, a presença de coilocitose em amostras de escarro de lesões brônquicas benignas. Simultaneamente, em 1979 e 1980, Syrjanen também observou alterações condilomatosas no epitélio brônquico que lembravam lesões encontradas no trato genital, e sugeriu o envolvimento do HPV nesse processo (Roglic et al. 1975; Rubel and Reynolds 1979; Syrjänen 1979).

Com o avanço da biologia molecular, a identificação e tipificação do HPV, ficou mais precisa, e mais estudos foram surgindo com o objetivo de identificar o vírus no câncer de pulmão. Com isso, estudos epidemiológicos, realizados desde 1990, em diferentes locais do mundo como a França, EUA, Finlândia, Grécia, China, entre outros países, sugeriram a relação entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento do câncer de pulmão (Hsu et al. 2009; Cardona et al. 2018). É possível observar os estudos realizados até o presente momento na tabela 1.

Quadro 1 – Estudos que detectaram o DNA do HPV em amostras de pulmão

Ano	Autor	País	Tipo de HPV	Preservação do tecido	Técnica de detecção
1989	Syrjanen et al.	Finlândia	16	Tecido parafinado	PCR
1990	Kulski et al.	Australia	6, 11, 16, 18	Tecido parafinado	ISH

1995	Kinoshita et al.	Japão	18	Tecido fresco congelado	PCR/DBH
1995	Nuorva et al.	Finlândia	6, 11, 16, 18, 31, 33	Tecido parafinado	PCR
1996	Hirayasu et al.	Japão	6, 16, 18	Tecido parafinado	PCR
1998	Bohlmeier et al.	EUA	18	Tecido parafinado	PCR/SBH
1998	Tsuhako et al.	Japão	6, 11, 16, 18	Tecido parafinado	PCR
1999	Hiroshima et al.	Japão	16	Tecido parafinado	PCR
2000	Miyagi et al.	Japão	6, 11, 16, 18	Tecido parafinado	PCR
2001	Cheng et al.	China	16, 18	Tecido fresco	PCR/ISH
2003	Chiou et al.	Taiwan	16, 18	Tecido sanguíneo	PCR
2005	Jain et al.	Índia	18	Tecido parafinado e tecido sanguíneo	PCR
2005	Coissard et al.	França	16	Tecido fresco congelado	PCR
2006	Ciotti et al.	Italia	16, 18, 31	Tecido parafinado/ tecido fresco	PCR
2007	Nadji et al.	Iran	16, 18, 6, 11, 26, 31		PCR
2007	Aguayo et al.	Chile	6, 16, 18, 31, 45	Tecido parafinado	PCR
2007	Giuliani et al.	Italia	16, 18, 31, 53	Tecido prafinado	PCR/SBH
2008	Cheng et al.	China	16	Tecido fresco	ISH
2009	Hsu et al.	Taiwan	16, 18	Tecido parafinado	PCR
2010	Baba et al.	Japão	16, 33, 18, 6	Tecido parafinado	PCR
2010	Branica et al.	Croácia	16, 18, 33	Aspirado Bronquico	PCR
2010	Joh et al.	EUA	11, 16	Tecido fresco	PCR/Seq
2011	Carpagnano et al.	Italia	16, 30, 31, 39	Ar exalado condensado/ escovado brônquico/ tecido fresco	PCR/IHQ/ Pirosequenciamento
2011	Koshiol et al.	Italia	6, 18	Tecido parafinado	PCR
2011	Goto et al.	Japão Coréia	6, 11, 16, 18	Tecido parafinado	PCR
2012	Kato et al.	Japão	16, 58	Tecido parafinado	PCR

2012	Syrjanen et al.	Finlândia	16, 18	Tecido parafinado	PCR
2013	Mehra et al.	Canadá	16, 18, 35, 52, 53	Tecido parafinado	PCR
2013	Yanagawa et al.	Canadá	16	Tecido parafinado	PCR/ISH
2014	Sarchianaki et al.	Grécia	16, 18, 31, 33, 11, 6, 59	Tecido parafinado	qPCR
2014	Wang et al.	Taiwan	16, 18	Tecido parafinado/ Biopsia/ Efusão Pleural	PCR
2016	Ilahi et al.	Paquistão	16, 18	Tecido parafinado	PCR
2016	Robinson et al.	EUA	16, 44, 51, 52, 18, 39, 68	Tecido fresco congelado	PCR
2016	Lu et al.	China	16, 18	Tecido parafinado	PCR
2015	Hartley et al.	EUA	18	Tecido parafinado	PCR
2014	Isa et al.	Japão	6	Tecido parafinado	PCR
2016	Li et al.	China	16, 18, 53, 33	Tecido parafinado	PCR
2016	Kawaguchi et al.	Japão	16, 62, 66	Tecido parafinado	PCR
2017	Shikova et al.	Bulgária	16, 18	Tecido parafinado/ biopsia/ tecido fresco congelado	PCR
2018	Oliveira et al.	Brasil	16, 18	Tecido fresco congelado / tecido parafinado	PCR/IHQ
2020	Rezaei et al.	Irã	6, 11, 16, 18, 33	Tecido fresco congelado	PCR
2020	Yao Wu et al.	China	16	Sangue/ Tecido fresco congelado	PCR
2022	Hussen et al.	Irã	6, 11, 16, 18, 33	Tecido fresco congelado	PCR
2022	São Marcos et al	Brasil	16, 18	Tecido fresco e parafinado	qPCR
2023	Tsyganov et al	Suiça	16, 18, 31, 35, 45, 51, 52, 56	Tumores fresco e sangue	PCR

DHB hibridização dot blot, ISH hibridização in situ, SBH hibridização southern blot, Seq sequenciamento.

Fonte: A autora (2023)

2.3.1 Possíveis rotas de infecção pelo HPV

Sabe-se que o principal meio de transmissão do HPV no câncer cervical é através da relação sexual, onde o vírus infecta o epitélio basal da cérvix através de micro feridas presente no colo do útero ou através das junções escamo colunares (JEC), que ocorrem entre o encontro de dois epitélios diferentes.

Apesar do pulmão ser um órgão anatomicamente distinto do colo uterino, eles apresentam pequenas semelhanças histológicas. Por exemplo, o trato respiratório também é composto por dois epitélios diferentes, que contém várias JEC. Nos brônquios, as JEC podem ocorrer naturalmente ou como metaplasia escamosa secundária ao consumo de cigarro. O processo de metaplasia se inicia com a ativação e posterior hiper proliferação das células basais quiescentes presentes no epitélio pseudoestratificado. Como consequência, as células epiteliais começam a apresentar uma diferenciação de células escamosas, devido à expressão de citoqueratinas epiteliais escamosas e de moléculas de adesão celular. Por fim, as alterações bioquímicas e metabólicas que a metaplasia induz tornam o epitélio brônquico suscetível a infecção pelo HPV (F. Cardona et al. 2019; Tsyganov et al. 2019).

Como mencionado anteriormente, o tabagismo pode auxiliar no processo de infecção pelo HPV, além de ser o principal fator etiológico da carcinogênese pulmonar, é responsável por cerca de 80% dos casos de câncer de pulmão (Akhtar and Bansal 2017b). Após a confirmação da presença do HPV no câncer de pulmão, deram início estudos sobre a possível relação do tabagismo e o HPV. Em uma meta-análise realizada por Zhang et al, foi observado que a taxa de infecção pelo HPV em fumantes foi maior do que em pacientes com câncer de pulmão que nunca

fumaram, apoiando a ideia de que o tabagismo e o HPV possuem um efeito sinérgico no desenvolvimento do câncer de pulmão (Zhang et al. 2019).

A fumaça do tabaco possui cerca de 4000 compostos e mais de 60 deles têm atividade carcinogênica comprovada, e foram associados à ativação de algumas oncoproteínas do HPV. Como por exemplo, o benzopireno, que é um hidrocarboneto aromático policíclico presente na fumaça do cigarro, é capaz de aumentar a expressão da oncoproteína E7 nas células de câncer cervical. Além disso, foi demonstrado que o benzopireno é capaz de aumentar o número de vírions do HPV. A nicotina, importante componente da fumaça do tabaco, foi capaz de ativar LCR do HPV de alto risco no câncer cervical. Há, também, evidências da fumaça do tabaco associada com o vírus do HPV em células de pulmão. Além disso, Foi observado que a fumaça condensada do cigarro possui capacidade de ativar o promotor p97 do HPV 16 atuando na LCR nas células epiteliais do pulmão, bem como uma cooperação com os oncogenes E6 e E7, sensibilizando as células do pulmão a danos no DNA induzidos pela fumaça do tabaco (Peña et al. 2015).

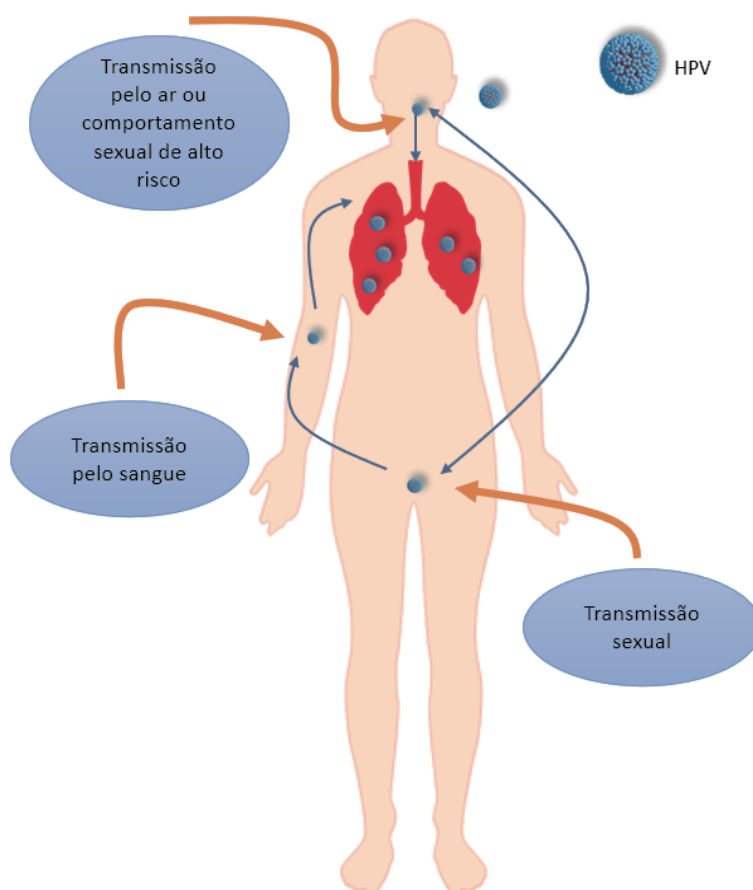
Em contrapartida, diversos estudos demonstram haver uma relação maior entre o HPV e pacientes do sexo feminino que nunca fumaram, associando essa relação com infecções prévias do HPV no colo uterino (Bae and Kim 2016). A metástase pulmonar é a mais comum no câncer do colo do útero, cuja incidência é de cerca de 4,33% (Chen et al. 2020). Inclusive, foi observado em um estudo, realizado em modelo murino de metástases pulmonares de câncer cervical, que a administração de uma vacina terapêutica, contendo um peptídeo E7 de HPV16, foi capaz de inibir o crescimento de metástase pulmonar (Suo et al. 2021). O que demonstra que o HPV pode estar interferindo, também, no desenvolvimento do câncer de pulmão, e que terapias voltadas tanto para tratar como para prevenir a

infecção do vírus do HPV, podem auxiliar na diminuição do desenvolvimento dos tumores pulmonares. Infelizmente, o prognóstico de pacientes com câncer cervical com metástase pulmonar ainda está longe de ser satisfatório.

Contudo, há outros meios pelo qual o HPV pode se estabelecer no pulmão. A principal hipótese é a via hematogênica, onde o HPV inicialmente infecta o sistema reprodutor feminino e masculino, podendo atingir, posteriormente, leucócitos circulantes que podem servir de reservatório viral para a infecção de outros órgãos. Como o pulmão é um tecido altamente vascularizado, isso o torna suscetível a capturar o vírus e eventualmente desenvolver o tumor. Há algumas evidências que apoiam essa hipótese, como a alta prevalência do DNA do HPV em amostras de sangue periférico observado em pacientes com NSCLC, como também a presença do HPV de alto risco no sangue periférico de doadores de sangue saudáveis (Chiou et al. 2003; F. Cardona et al. 2019).

Outras hipóteses referem-se à infecção oral-genital que causa a transmissão pela garganta para o pulmão, pois foi observado o DNA do HPV em homens cujas parceiras possuíam infecção cervical ou oral pelo HPV, e a infecção através do ar inalado pois, também foi visto o material genético do vírus no ar exalado condensado de pacientes com câncer de pulmão, propondo assim, que o HPV pode ser transmitido tanto pelo contato oral-oral e genital-oral, como também por inalar o ar infectado (F. Cardona et al. 2019) (Figura 4).

Figura 4 – Diferentes hipóteses de transmissão do HPV para o pulmão. A transmissão do HPV pode se dar através do ar, por comportamento sexual de alto risco, tanto através pelo contato da boca com os órgãos sexuais ou pelo contato entre os órgãos reprodutores de forma desprotegida, no qual o vírus pode ir até o pulmão através da via hematogênica.



Fonte: A autora (2023)

2.3.2 Prevalência epidemiológica do HPV em cânceres de pulmão

A frequência do vírus varia amplamente, desde a ausência total de vírus no tecido até uma frequência de mais de 75% nos tumores de pulmão. Isso pode se dar devido às diferentes localizações geográficas e metodologias utilizadas em cada estudo (Tsyganov et al. 2019). A maior prevalência do HPV, nos tumores de pulmão, foi detectada na Ásia, seguido pelas Américas e Europa. O Brasil, Coreia, Grécia e Taiwan apresentaram a maior percentagem média de ocorrência do vírus (mais de 40%) (Tsyganov et al. 2019; Karnosky et al. 2021).

No entanto, na América latina a prevalência do HPV nos tumores de pulmão variou de 7,7% à 64,3% (Castillo et al. 2006; Aguayo et al. 2007). Essa variação também pôde ser observada em diferentes localizações do Brasil, onde foi

encontrado o DNA do HPV em 52% das amostras de câncer de pulmão no Nordeste, enquanto que em um estudo realizado no sudeste do Brasil, não foi possível detectar o DNA do HPV em tumores de pulmão (de Oliveira et al. 2018a; Silva et al. 2019).

O principal tipo de HPV encontrado nos tumores pulmonares, são os tipos de HPV de alto risco 16 e 18, porém, nos três continentes a prevalência do HPV 16 é maior do que o HPV 18 (Karnosky et al. 2021). A maior ocorrência dos tipos mais oncogênicos (16 e 18) é observado na Ásia (40,3%), seguido pela América Latina (33,6%), Europa (25,6%) e América do Norte (15,4%). Os tipos de baixo risco (6 e 11) também foram detectados em alguns estudos. Os tipos 6 e 11 foram mais predominantes na Ásia (39,9%), depois Europa e América do Norte com 30% e 12,8%, respectivamente. Na América Latina os tipos de baixa oncogenicidade não foram detectados (Tsyganov et al. 2019).

Em grande parte dos estudos, o HPV foi detectado em diversos tipos de tecidos tumorais de pulmão com incidências variadas. A maior percentagem de detecção do HPV nos tecidos tumorais de pulmão foi observada no carcinoma de células escamosas do que no adenocarcinoma (25,8% e 21,1%, respectivamente) (Tsyganov et al. 2019). Porém, em outro estudo, mais recente, a frequência do HPV foi maior no adenocarcinoma (30,8%) do que no carcinoma de células escamosas (29,3%) (Karnosky et al. 2021).

Além disso, foi observado que determinados subtipos histológicos de NSCLC, como o câncer de pulmão de células escamosas, é mais comum em homens (44% dos casos em homens versus 25% em mulheres) e o adenocarcinoma é o tipo mais comum em mulheres (42 % dos casos em mulheres e 28 % em homens). Também foi demonstrado que o carcinoma de células

escamosas e o câncer de pequenas células estão mais associados ao tabagismo, em comparação com o adenocarcinoma que é mais comum em pacientes não fumantes. Além disso, a histologia de pacientes não fumantes com adenocarcinoma parece ser menos complexa, com uma maior presença de mutações específicas, particularmente EGFR, Her2, bem como translocações ROS e ALK (F. Cardona et al. 2019).

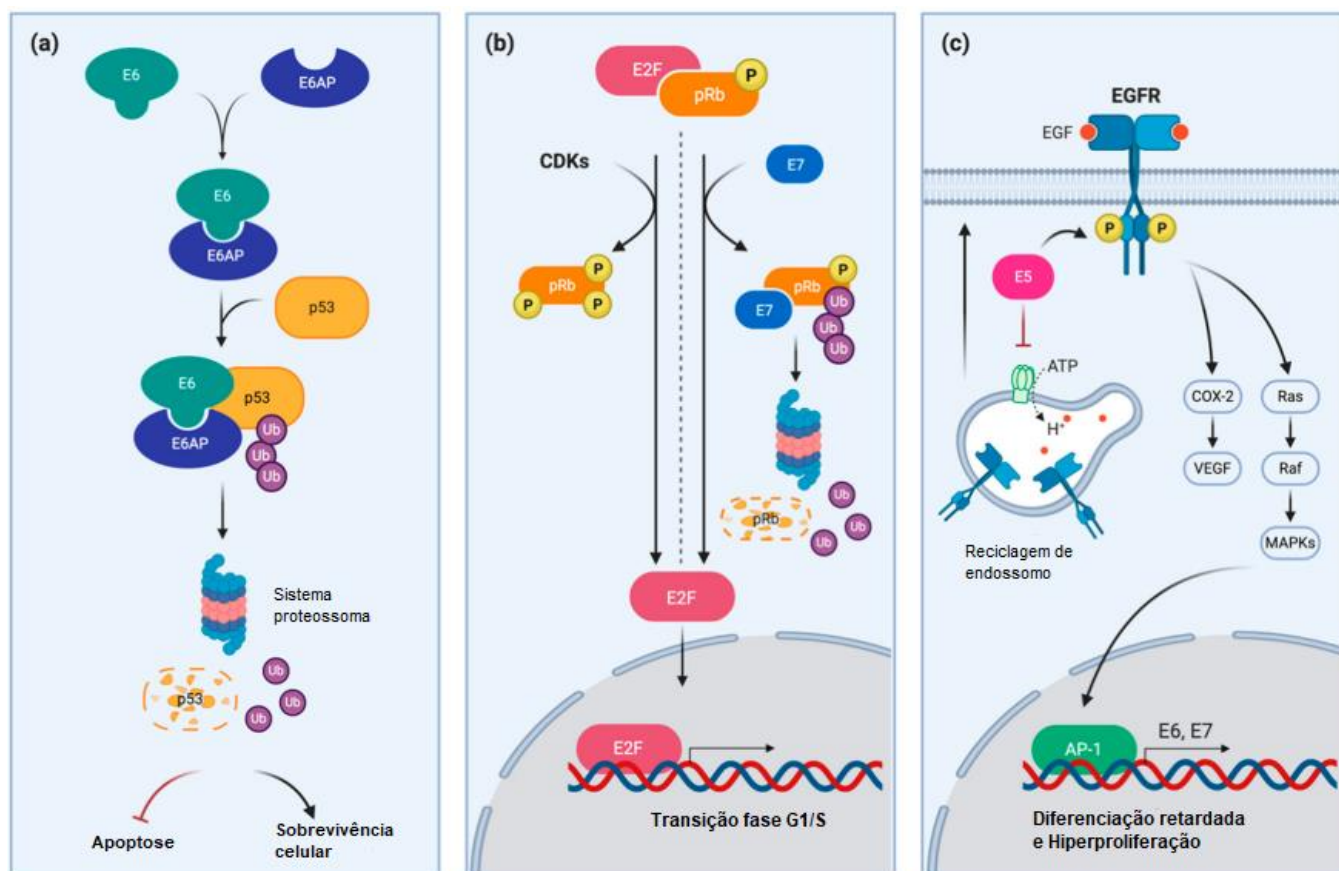
2.3.3 Perfil Molecular do microambiente tumoral pulmonar

O câncer de pulmão apresenta um perfil de alterações em mecanismos moleculares. No entanto, a presença do HPV nesses tipos de tumores pode modificar o perfil molecular. Oncoproteínas do HPV possuem a capacidade de interagir com alguns genes associados às vias que atuam na proliferação celular, tais como, p53, o gene da interleucina 10 (IL-10), os genes Bcl-2, cIAP2, EGFR, metaloproteinases, hTERT, HIF-1 α , RB e AhR (de Freitas et al. 2016).

As oncoproteínas E6 e E7 são as mais estudadas no câncer de pulmão. E6 é bastante associada com inativação da proteína supressora tumoral P53 e E7 à pRB, que também tem função de suprimir tumores. Juntas, E6 e E7, tem alto potencial de transformação e atuam cooperativamente na ativação da fase S nas células infectadas e evita a apoptose. Este ambiente provê um alto potencial maligno através da instabilidade genômica e interferência no ciclo celular, auxiliando no processo de carcinogênese pulmonar (Moody and Laimins 2010; de Freitas et al. 2016) (Figura 4).

Figura 5 – Ação dos oncogenes em vias de sinalização celular. (a) atividade de E6 na degradação de p53 acarretando na sobrevivência celular devido a inibição da apoptose; (b) E7 do HPV interagindo e degradando pRB, ativando a síntese celular; (c) regulação de EGFR pela

oncoproteína E5 do HPV, levando a hiperproliferação e no aumento da sinalização de EGFR e atraso na diferenciação celular.



Fonte: Adaptado de Medda et al. (2021)

A proteína TP53, quando ativa, tem a capacidade de induzir a parada do ciclo celular pela ativação de genes cuja proteínas atuam na proliferação celular. No entanto, quando a célula infectada pelo HPV, começa a expressar a oncoproteína E6 do HPV, esta tem a capacidade de se ligar a E6AP e juntos degradar a proteína TP53 ao formar o complexo E6/E6AP/P53. A degradação de TP53 impedirá a célula de entrar em apoptose (de Freitas et al. 2016). Esta atividade foi confirmada no câncer de pulmão infectado pelo HPV, onde o gene p53 mostrou-se menos expresso quando o HPV estava mais expresso nos tumores de pulmão (Rezaei et al. 2020).

Quanto à atividade de E7 nas células infectadas, esta oncoproteína se liga à pRB, resultando na dissociação do complexo E2F/pRB/HDAC. Esta dissociação permite que o HDAC e E2F fiquem livres para ativar a transcrição dos genes de proliferação celular e inativar genes supressores de tumor, como P16NK4, através de modificações epigenéticas, que hipermetila seu promotor e remodela a cromatina (Wu et al. 2005; de Freitas et al. 2016). No estudo realizado por Rezaei e colaboradores, pôde-se observar a diminuição da expressão do gene pRB que poderia ser justificado pela ação da oncoproteína E7, pois a diminuição de pRB, foi associada à alta expressão do HPV nas amostras de câncer de pulmão (Rezaei et al. 2020).

No entanto, o gene E5 do HPV, diferentemente do E6 e E7, não tem sido estudado no câncer de pulmão, mas baseado na sua atividade no câncer cervical, podemos destacar o quanto sua função na carcinogênese é importante. Por exemplo, alguns estudos demonstram que a oncoproteína E5 é capaz de aumentar a sinalização do EGFR através de mecanismos diretos e indiretos que levam a proliferação e progressão do ciclo celular no câncer cervical (Müller et al. 2015a). Além disso, alterações em EGFR é bastante comum em alguns tipos de câncer de pulmão, o que pôde ser visto, também nos cânceres de pulmão infectados pelo HPV, onde mutações em EGFR foi significativamente mais associada à presença do DNA do HPV em adenocarcinoma de pulmão (Kato et al. 2012; Tung et al. 2013a; Li et al. 2016a). No entanto, a correlação do EGFR com a oncoproteína E5 do HPV ainda não foi confirmada nos tumores pulmonares.

Recentemente, estudos avaliaram a expressão de miRNAs em tumores pulmonares associados ao HPV. Esses estudos mostraram que os miRNAs auxiliam no desenvolvimento, progressão e metástase do tumor. Entre os miRNAs

mais relevantes estão: miR-20, miR-424, let-7, miR-23, miR34, miR-125, miR-146, miR-210, miR-183, miR-182 e miR-144. Foi observado que o aumento da expressão dos genes do HPV, principalmente E6 e E7, poderia atuar na progressão e desenvolvimento do câncer de pulmão juntamente com miRNAs. Dentre os miRNAs mencionados, destaca-se, os miR-183, miR-210 e miR-182 que apresentaram níveis maiores nos NSCLC positivos para o DNA do HPV. Além disso, foi possível verificar que a expressão de E6/E7 e alguns miRNAs podem promover a transição epitélio-mesenquimal (EMT) (Hussen et al. 2021a; Wu et al. 2021).

Como mencionado, E6 e E7 são as oncoproteínas mais estudadas no câncer de pulmão e alguns desses estudos estão resumidos na tabela 2.

Quadro 2 – Atividade dos oncogenes do HPV em diferentes vias no câncer de pulmão

Oncoproteínas	Vias Celulares	Atividade no Câncer de Pulmão
E6	CiAP2/EGFR/PI3K/AKT	E6 regula ciAP2 através de EGFR/PI3K/AKT (com fosforilação de CREB) e ativação de NF-κB. Além disso, a regulação do ciAP pode estar correlacionada com a resistência à cisplatina em células de câncer de pulmão associadas ao HPV (Wu et al. 2010)
	p53/p21/DDX3	A oncoproteína E6 atua inibindo a proteína p53, que é degradada pela ligação ao E6AP, produzindo o complexo E6/E6AP/p53. DDX3 parece aumentar a transcrição de p21 pela p53, aumentando a ligação de SP1 dentro do promotor de p21. No entanto, em linhagens de células pulmonares infectadas pelo HPV, a expressão de p21 é diminuída devido à interação entre p53 e E6, o que causa uma alteração na via p53/DDX3, levando ao crescimento tumoral, pois essa interação causa uma diminuição da proteína supressora de p21 (Wu et al. 2011)

	IL-10/PI3K/AKT/cIAP	Em células infectadas pelo HPV, a oncoproteína E6 regula a expressão de IL-10 através da fosforilação de CREB e C/EBP β via PI3K/AKT. Além disso, a IL-10 aumenta a expressão de cIAP2 que inibe a proteína apoptótica. Assim, a expressão de IL-10 leva à progressão do carcinoma de pulmão associado ao HPV e leva a um pior prognóstico (Sung and Lee 2013).
	Mutação EGFR	E6 de HPV16 e 18 podem contribuir para uma mutação no EGFR em tumores pulmonares, levando ao aumento da fosforilação de 8-OH-dG por aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio - ROS, um agente que causa danos ao DNA, o que aumenta a taxa de mutação (Tung et al. 2013b).
	BCL-2/PI3K/AKT/NF-Kb/p53	A oncoproteína E6 aumenta a expressão de Bcl-2 em células tumorais de pulmão positivas para DNA de HPV. Bcl-2 é ativado por NF-kB através da via PI3K/AKT e é suprimido por p53. E6 ativa a via PI3K/AKT aumentando a expressão de Bcl-2, além disso E6 inibe a atividade de p53, aumenta a expressão de Bcl-2 e a sobrevivência celular é mantida (de Freitas et al. 2016)
	IL-6/TIMP3/Mcl-1	A oncoproteína E6 atua como um inibidor do promotor TIMP-3. A metilação do promotor TIMP-3 leva à perda de TIMP-3 e aumenta a IL-6 via TN α /NF-kB, enquanto IL-6 aumenta a Mcl-1 através da via PI3K/AKT, resultando na malignidade do tumor. Além disso, verificou-se que a via de sinalização TLR3/Scr juntamente com o E6 pode induzir a proliferação e invasão de NSCLC (de Freitas et al. 2016; Wang et al. 2017).
	hTERT/p53/c-Myc/SP1/LKB1	A oncoproteína E6 demonstrou aumentar a expressão de hTERT através de SP1 e c-Myc. A inibição de p53 por E6 leva ao aumento da expressão de c-Myc. Além disso, observou-se que a superexpressão de E6 regulou negativamente a expressão de LKB1. Esses resultados indicam que E6 desempenha um papel importante na regulação da atividade da telomerase (Cheng et al. 2008; Yang et al. 2017).

	LKB1-KIF7	E6, mas não E7, inibe a atividade antitumoral de LKB1 em células de câncer de pulmão, regulando negativamente a expressão de KIF7 e a atividade antitumoral de LKB1 (Hu et al. 2020).
E7	pRb/HDAC/E2F/p16	A oncoproteína E7 liga-se ao pRb e causa a dissociação do complexo E2F/pRb/HDAC. Quando HDAC e E2F estão livres, eles ativam a transcrição de genes supressores como p16 e genes de proliferação celular (de Freitas et al. 2016).
	AhR/E2F/pRb	E7 liga-se ao AhR e ativa genes envolvidos no crescimento celular. AhR liga-se a E2F e pRb, criando o complexo E2F/pRb/AhR que leva à parada do ciclo celular na fase G1. No câncer de pulmão, os níveis de fosforilação de pRB são aumentados pela ligação entre os membros do receptor de sinal E7 e AhR, inibindo CDKs como p21 e p16 (Elferink et al. 2001; Buonomo et al. 2011).
	MAOA-EMT- HIF-1 α	A oncoproteína E7 de HPV16 aumentou a expressão de MAOA e esta desempenhou um papel fundamental no acúmulo de proteína EMT e HIF-1 α induzida por E7 de HPV16 em células A549 e NCI-H460 NSCLC (Huang et al. 2017; Liu et al. 2018).
E6 e E7	HIF-1 α /VEGF/PI3K/AKT	O processo biológico EMT, que desempenha um papel crucial na invasão e metástase, é regulado por fatores de transcrição (ZEB1, Snail1, Slugs e Twist1) e é mediado pela via de sinalização PI3K/AKT/HIF-1 α . Além disso, o HPV pode afetar a expressão de fatores de transcrição que mediam as vias HIF-1 α , VEGF e IL-8 no câncer de pulmão (Zhang et al. 2017; Liu et al. 2018).
	miR-20 e miR-424	O nível de expressão de miR-20 e miR-424 foram reguladas positivamente em amostras HPV+ de câncer de pulmão do que em amostras HPV- (Hussen et al. 2020).
	miR-146, let-7, miR-23 e miR-125	Os miRNAs (let-7, miR-146, miR-23 e miR-125) foram regulados negativamente por E6 e E7 em pacientes com câncer de pulmão HPV-positivos em comparação com pacientes HPV-negativos (Hussen et al. 2020).

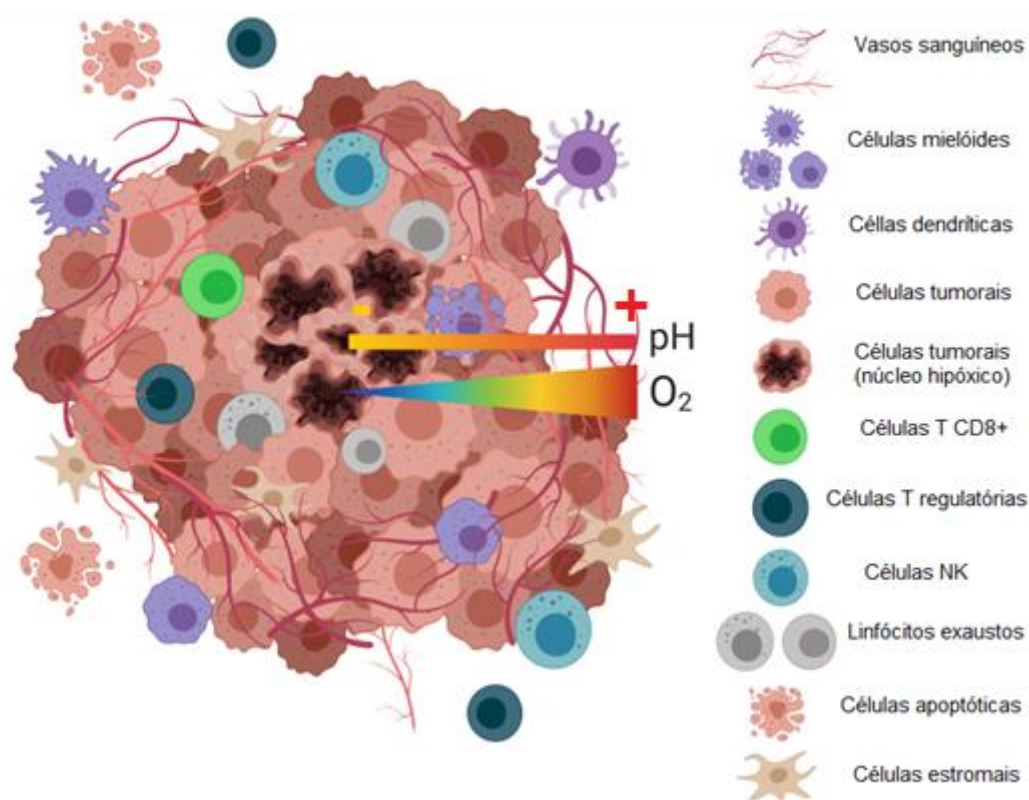
	PTEN-TXNIP-HIF-1 α	As proteínas E6/E7 do HPV16 reduziram a expressão de p-PTEN em células de câncer de pulmão, o knockdown de PTEN diminuiu ainda mais a expressão de TXNIP, que promoveu o acúmulo de HIF-1 α por inibir a translocação de HIF-1 α nuclear para o citoplasma, e consequentemente, aumentou a expressão de GLUT1 nos níveis de proteína e mRNA (Tang et al. 2020).
	miR-451, CAB39 and GLUT1	As proteínas E6/E7 do HPV16 inibiram a expressão de miR-451 em células de câncer de pulmão, a regulação negativa de miR-451 levou à expressão regulada positivamente de CAB39 e, subsequentemente, regulou positivamente GLUT1 (Wang et al. 2020).
	SLUG	A expressão de SLUG em amostras de HPV é uma correlação direta com a expressão de E6 e E7. Altos níveis de expressão de SLUG estão associados à expressão reduzida de E-caderina, alto grau histológico, metástases linfonodais, recorrência pós-operatória e menor sobrevida em pacientes com câncer (Rezaei et al. 2020)

Fonte: A autora (2023)

2.4 RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS NO MICROAMBIENTE TUMORAL

O microambiente tumoral (TME – do inglês, Tumor Microenvironment) é uma estrutura dinâmica altamente interativa, moldada em grande parte pelas células tumorais. Sua composição inclui além das células cancerosas, as células estromais não cancerosas, como os fibroblastos, matriz extracelular, macrófagos e células imunes, citocinas e quimiocinas, células endoteliais vasculares, além de possuir características físicas e químicas especiais, como hipóxia e baixo pH (Xu et al. 2021; Tan et al. 2021) (Figura 6).

Figura 6 – Componentes do microambiente tumoral. O microambiente tumoral é rico em diferentes células imunes, células estromais e vasos sanguíneos, também é observado uma diminuição do oxigênio e diminuição do pH dentro do TME.



Fonte: Adaptado de Fernández et al. 2019.

As interações das células tumorais com seu microambiente são diversas, o qual se aproveita da energia e dos nutrientes transportados pelos vasos sanguíneos e fatores de crescimento produzidos pelas células inflamatórias e estromais, com intuito de se expandir e escapar do ataque do sistema imune (Fridman et al. 2012).

Para que ocorra uma resposta imune anti-câncer efetiva, uma série de eventos devem ocorrer. A primeira etapa dessa resposta ocorre quando os neoantígenos produzidos por oncogenes são liberados e capturados pelas células dendríticas (DCs) para processamento. Com a finalidade de produzir uma resposta de células T, a primeira etapa deve ser acompanhada por sinais imunogênicos,

como citocinas pró-inflamatórias e fatores liberados por células tumorais. Posteriormente, as DCs apresentam os antígenos capturados através das moléculas MHC I e MHC II para as células T, resultando na ativação das respostas de células T efectoras. A natureza da resposta imune é determinada nesta fase, com um equilíbrio crítico na proporção de células T efectoras e células T reguladoras (Treg). Por fim, as células T efectoras ativadas se encaminham e se infiltram no tumor, reconhecendo e se ligando especificamente às células cancerígenas, por meio da interação entre o seu receptor de células T (TCR) e o antígeno cognato ligado ao MHC, acarretando a morte das células malignas alvo (Chen and Mellman 2013).

O impacto da resposta imune no processo de carcinogênese está intimamente associado, já que a incidência de cânceres induzidos por vírus é mais prevalente em indivíduos imunodeficientes, confirmando a importância do sistema imunológico em doenças infecciosas (Fridman et al. 2012). Há uma correlação entre infecção crônica, inflamação e câncer de pulmão, onde foi observado que infecções e inflamações potenciais estão associadas a 15 a 20 % das mortes por câncer em todo mundo. A persistência da inflamação é uma das características importantes dos tumores sólidos, onde o TME é amplamente regulado pelas células inflamatórias, promovendo proliferação tumoral, sobrevivência e metástase. A inflamação pode causar danos ao tecido tumoral, como quando afeta a taxa de divisão celular devido ao aumento dos danos ao DNA afetando promotores de sinais anti apoptóticos, como também genes ligados à formação de novos vasos sanguíneos, que ajudam no fornecimento de nutrientes para o crescimento e disseminação das células tumorais (Tan et al. 2021).

A inflamação normalmente é acompanhada pelo recrutamento de fibroblastos e pela indução de fibrose (Zhao et al. 2021). Os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) são capazes de induzir imunossupressão, crescimento celular e metástases nos cânceres associados ao HPV, como mama, pulmão e fibrossarcoma (Barros et al. 2018). Os CAFs também possuem a capacidade de produzir inúmeras citocinas e quimiocinas críticas para a função imunológica, incluindo osteoponina, CXCL1, CXCL2, CXCL12, CXCL13, IL-6, IL-1 β e CCL5. Além disso, foi observado que durante a tumorigênese os fibroblastos respondem às alterações nas células produzindo mediadores pró-inflamatórios (Zhao et al. 2021).

Quando este o HPV invade o corpo humano desencadeia uma variedade de reações imunológicas, no entanto a formação do tumor ocorre quando o HPV supera as respostas do sistema imunológico (Zhang et al. 2020). O HPV, possui um mecanismo intrínseco para reduzir a eficiência da vigilância imunológica do hospedeiro, o que pode aumentar a suscetibilidade persistente do vírus (Zhou et al. 2019). Isto ocorre devido a sua capacidade de imunovigilância, limitando a expressão dos seus genes em níveis muito baixos, o que diminui bastante a apresentação de antígenos virais para o MHC classe I e, portanto, o reconhecimento pelo sistema imune inato (Lechien et al. 2020a).

A reação do sistema imunológico depende da apresentação de antígenos virais pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). No entanto, o vírus se utiliza de algumas estratégias para evitar a detecção. Os antígenos do HPV não são encontrados no sistema devido ao baixo número de cópias expresso nas células basais, e também, porque o vírus não causa lise celular (Pešut et al. 2021).

Foi observado que os antígenos virais mais reconhecidos em lesões de baixo grau são as proteínas E2 e E6, enquanto os epítomos da oncoproteína E7 induzem maior resposta nas lesões de alto grau (Lechien et al. 2020b). Além disso, as oncoproteínas virais E5, E6 e E7, são as proteínas mais estudadas que possuem extrema importância no processo de evasão imune. As oncoproteínas também tem uma alta afinidade com moléculas reguladoras da imunidade celular interagindo com genes relacionados ao sistema imune e vias de sinalização imune em queratinócitos infectados (Zhou et al. 2019). Além disso, os próprios queratinócitos desempenham um papel na função imunológica e são considerados um tipo especializado de APCs, pois expressam receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) que detectam microorganismos exógenos e iniciam a sinalização imune inata e adaptativa (Pešut et al. 2021).

A análise histopatológica de tumores sólidos revela que eles são infiltrados por células imunes inatas e adaptativas, que também pode ser encontrada no TME pulmonar e abrigam atividades promotoras e supressoras de tumores, que podem prever o resultado clínico (Fridman et al. 2012; Altorki et al. 2019).

2.4.1 Imunidade Inata

O papel do sistema imunológico é erradicar antígenos estranhos, seja microrganismos exógenos e células próprias mutantes, mantendo um estado de homeostase. A primeira linha de defesa se dá pelas células de resposta imune inata, que é ativada após a exposição ao antígeno e, diferente da imunidade adaptativa, não é programada para produzir células citolíticas específicas (Saab et al. 2020).

As células mieloides de linhagens granulocíticas e monocíticas são componentes da imunidade inata e contribuem para a carcinogênese de várias formas (Altorki et al. 2019).

Uma dessas células mielóides é a DC, que é conhecida como orquestradora central da imunidade antitumoral diante de sua capacidade de capturar antígenos e transferir a informação do antígeno para ativar a resposta imune adaptativa (Altorki et al. 2019; Zhang et al. 2020). A ativação de DC leva a secreção de mediadores inflamatórios, como quimiocinas, que recrutam células imunes para o local de infecção. As DCs são capazes de regular a diferenciação de linfócitos T em subpopulações distintas, como Th1, Th2, Th17, Th22 e Treg (Zhao et al. 2021). Entretanto, o tumor pode suprimir a função de DCs ou alterar o microambiente para recrutar DCs imunossupressoras (Altorki et al. 2019).

Foi observado em células infectadas pelo HPV uma regulação negativa das moléculas de MHC e moléculas co-estimuladoras, incluindo CD80 e CD86 (B7.1 e B7.2, respectivamente), que causou a redução da capacidade de células DCs estimular células T específicas de antígenos. Além disso, também foi observada uma inibição na maturação de DCs devido a secreção de fatores imunossupressores derivados de células tumorais, como IL-10, fator de

crescimento transformador (TGF)- β , IL-6, prostaglandina E2 (PGE2) e fator estimulante de macrófagos granulocíticos (GM-CSF) (Zhou et al. 2019).

As células de Langerhans, é um tipo de DC que pode auxiliar na evasão imune pelo HPV, onde pequenas quantidades dessa célula foram encontradas infiltradas nos tumores, o que pode estar associado com a gravidade da doença em cânceres positivos para o HPV. Isto ocorre devido à regulação negativa da quimiocina CCL20 pelas oncoproteínas E6 e E7, que atrai as células de Langerhans para o local da inflamação. Como as oncoproteínas virais tem a capacidade de inibir a via de sinalização NF- κ B, esta inibição promove a regulação negativa de CCL20 (Zhou et al. 2019).

Outro tipo de leucócitos inatos são as células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs), que são um tipo de célula mielóide imatura com função imunossupressoras capaz de suprimir a proliferação de células T pela regulação negativa das citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e PGE2 (Zhou et al. 2019; Zhao et al. 2021). No TME, as MDSCs, expressam mediadores inflamatórios como COX2, IL-6, Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e arginase-1, induzindo o crescimento das células cancerígenas (Mangino et al. 2016). Quanto aos cânceres associados à infecção pelo HPV, houve uma maior infiltração de MDSCs nos tumores de cabeça e pescoço, o qual foi associada a uma maior produção de citocinas, incluindo CCL17, CCL21, IL-10, IL-17, IL-21, TNF- α e IFN- γ (Lechien et al. 2020b).

Os macrófagos são fortes mediadores das respostas inflamatórias inatas e adaptativas, principalmente na luta contra o câncer (Lechien et al. 2020a). Os macrófagos têm múltiplas funções e possui plasticidade fenotípica em resposta a um ambiente inflamatório, podendo ser dividido em macrófagos do tipo M1 e M2.

Os macrófagos M1 tem um fenótipo pró-inflamatório, onde no TME apresentam efeitos antitumorais, pois contribuem para a ativação de células T CD8+ citotóxicas e células Th1. Em contrapartida, os macrófagos M2 possuem características imunossupressoras, produzem citocinas anti-inflamatórias e são consideradas células imunes pró-tumorigênicas, pois estimulam a diferenciação de células Treg e secretam diversas citocinas (TGF β , TNF α e IL-10). Com isso, macrófagos M2 ajudam a criar um ambiente favorável à progressão do tumor, além de inibir os efeitos antitumorais das células imunes. Além disso, existem outras categorias de macrófagos, como os macrófagos associados ao tumor (TAMs), macrófagos CD169+, macrófagos TCR $\alpha\beta$ + e TCR $\gamma\delta$ +, que estão envolvidos na tolerância imunológica, doenças inflamatórias e infecciosas (Lechien et al. 2020b; Zhao et al. 2021).

Os TAMs são derivados de monócitos atraídos no TME por quimiocinas do tipo CCL2 e CCL8 e são diferenciados através de estímulos por IL-4, IL-10, IL-13 e TNF- α (Lechien et al. 2020b). Os macrófagos do tipo TAM são componentes abundantes do infiltrado imune nos tumores de pulmão de células não pequenas, onde observaram, em modelos de camundongos, que estas células expressavam IL-6 e interagem com receptores de IL-6 presente nas células tumorais, levando a ativação de STAT3 e, conseqüentemente, promovendo a progressão tumoral (Altorki et al. 2018). Altos níveis de TAMs estão associados a um mau prognóstico em vários cânceres, incluindo tumores positivos para HPV, devido principalmente a sua imunossupressão mediada por CTLA-4 e à expressão de citocinas imunossupressoras e PD-1 (proteína de morte celular programada 1) (Lechien et al. 2020b).

Entre as células imunes recrutadas para o local de inflamação, estão os neutrófilos que constituem a maior população de leucócitos circulantes no sangue e são críticos na defesa contra infecção por microrganismos (Zhao et al. 2021). Os neutrófilos infiltrantes podem auxiliar no processo de carcinogênese, aumentando a inflamação, consequentemente a angiogênese e metástase (Altorki et al. 2018). Ou seja, os neutrófilos associados ao tumor (TANs) estão associados à promoção e progressão tumoral, suprimindo a resposta imune adaptativa no TME (Zhao et al. 2021). Estas células foram observadas dominando o microambiente dos NSCLC (Altorki et al. 2018). Foram também encontradas em grandes quantidades em lesões de alto grau de câncer cervical, assim como, foram associadas a um mau prognóstico em pacientes com câncer de orofaringe positivos para o HPV (Barros et al. 2018).

As células Natural Killer (NK) também são linfócitos do sistema imune inato e são fundamentais nas respostas imunes antitumorais, pois reconhecem diretamente as células cancerígenas como alvo. Há alguns fatores que podem regular a resposta das células NK no TME, incluindo TGF- β , que medeia a polarização das células NK em direção a um fenótipo pró-angiogênico determinado pela expressão de VEGF, fator de crescimento placentário e IFN- γ . No câncer de pulmão foi observado uma disfunção das células NK, associada com a regulação negativa de receptores em sua célula, causando a diminuição de desgranulação e a perda da expressão de IFN- γ (Altorki et al. 2018; Zhao et al. 2021).

Sugere-se que as células NK realizem uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa através da liberação de IFN- γ , que auxiliam na expressão aumentada de MHC I nas células cancerígenas e a expressão de MHC II em APCs (Zhao et al. 2021). Nos cânceres associados ao HPV, o infiltrado de células NK foi reduzido,

devido à ação do vírus nas células tumorais (Barros et al. 2018; Pešut et al. 2021). O vírus possui métodos que ajudam na evasão e diminuição da atividade de NK, através da atividade das oncoproteínas do HPV, que podem interferir na produção de IFN que leva à diminuição da ativação de NK (Pešut et al. 2021).

2.4.2 Imunidade adaptativa

A imunovigilância tumoral é definida pela capacidade das células imunes reconhecerem e destruírem as células cancerosas. Esse processo ocorre devido ao reconhecimento de antígenos tumorais tanto pelo sistema imune inato quanto o adaptativo, embora este último desempenhe um papel mais proeminente (Saab et al. 2020).

A ativação de células do sistema imunológico adaptativo, composto por células T e B produz uma resposta imune tardia (Saab et al. 2020). A resposta humoral é baseada nas células B e a resposta mediada por células é baseada nas células T (Lechien et al. 2020b). A resposta imune adaptativa envolve uma rede complexa de células com diferentes fenótipos através de um conjunto de mediadores, como as citocinas (Alves et al. 2018).

As células T podem ser divididas em diferentes subgrupos de acordo com diferentes métodos de classificação. Com base nos marcadores de superfície, as células T são divididas em células T CD4⁺ e CD8⁺. Com base na sua função, as células T são divididas em células T/linfócitos citotóxico (CTLs), células T auxiliares (Th), células T reguladoras/supressoras (Treg) e células T de memórias (Zhang et al. 2020).

Quando ocorre a ativação das APCs, estas células têm por finalidade promover a diferenciação das células T CD4⁺ virgens em vários subconjuntos de

células T efetoras e em células T CD4+ de memória. Essa polarização depende de três sinais complementares: a interação do TCR da célula T CD4+ com o peptídeo presente no MHC II presente na APC; um sinal co-estimulatório; e a composição das citocinas no microambiente (Richardson et al. 2021).

Os principais subconjuntos das células T CD4+ são Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, Treg induzidas ou naturais (iTreg e nTreg, respectivamente) e Tfh (células T auxiliares foliculares). Esses diferentes tipos de células adquirem a capacidade de produzir e secretar citocinas por meio de um processo de diferenciação desencadeado em resposta a diversos sinais no ambiente, principalmente citocinas (Alves et al. 2018; Richardson et al. 2021; Saillard et al. 2021). Esses diferentes subconjuntos de células T CD4+ demonstram afetar de formas distintas o prognóstico de pacientes com câncer (Saillard et al. 2021).

As células Th são cruciais na elaboração de uma resposta imune adaptativa que protege o hospedeiro contra a infecção causada por patógenos e o desenvolvimento de tumores (Alves et al. 2018). As células Th1 estão presentes em vários tipos de câncer estabelecendo respostas antitumorais eficientes, além de estar associadas ao bom prognóstico no NSCLC, onde há uma maior quantidade de células Th1 infiltradas. No entanto, alguns tipos de células T CD4+ podem ter o efeito oposto e promover o crescimento e disseminação do tumor. Como no caso das células Th2, que facilita a carcinogênese e progressão tumoral nos carcinomas cervicais, criando um ambiente imunossupressor. Em relação às células Th17, estas tanto podem aumentar a progressão do tumor ativando a angiogênese e as atividade imunossupressoras, quanto podem ter função antitumoral, pois são capazes de aumentar a migração de CTL, células NK e neutrófilos para o TME. As células Th22 também tem a capacidade de promover a

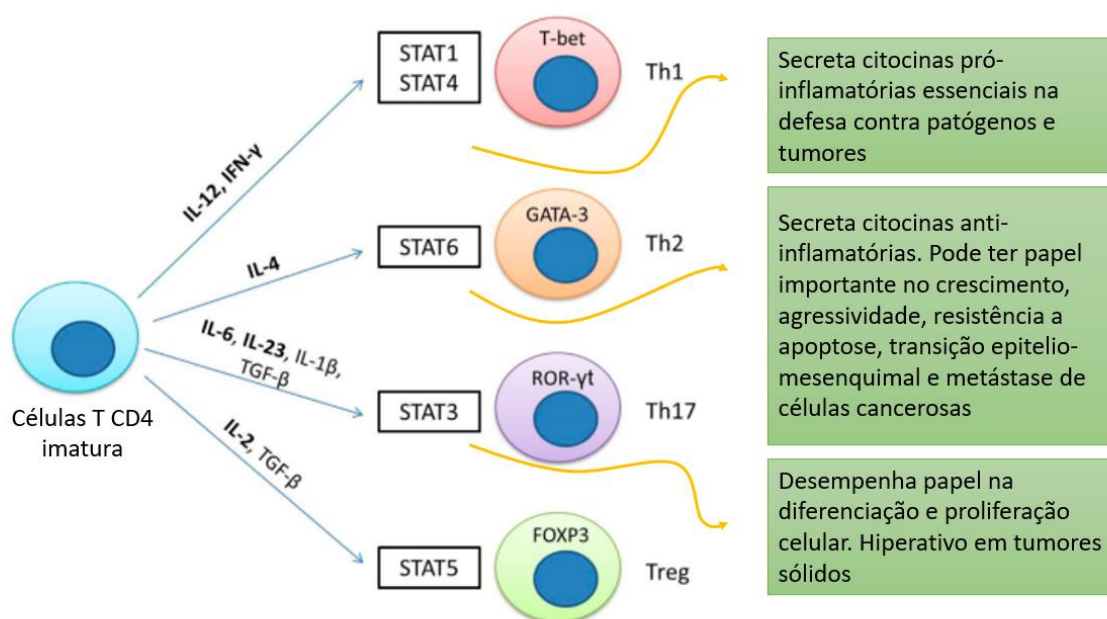
tumorigênese em alguns tipos de câncer, pois foi demonstrado que estavam mais presentes à medida que o estágio do tumor avançou (Saillard et al. 2021). As células Th9 apresentaram atividades antitumorais quando avaliadas *in vivo*, porém seu impacto nos tumores humanos ainda não está bem estabelecido (Richardson et al. 2021). Por fim, as células Treg estão em geral associadas à um bom prognóstico, no entanto sua presença em infecções virais persistentes pode promover a evasão imune e contribuir para a patogênese da doença (Zhou et al. 2019; Saillard et al. 2021).

A plasticidade e a flexibilidade das células T CD4⁺ são influenciados por vários fatores extrínsecos (citocinas) e intrínsecos, através da proteína STAT que controlam fatores de transcrição específicos da linhagem (Richardson et al. 2021). Ou seja, as citocinas induzem as redes de sinalização e transcrição, e a via JAK/STAT (Janus quinase/Transdutor de sinal e ativador de transcrição) é essencial para a diferenciação das células Th. Por exemplo, a diferenciação das células Th1 é conduzida por IL-12 e IFN- γ através da ativação de JAK2/TYK2 e em seguida ativando STAT4. A via Th1 também pode ser ativada através de JAK1/JAK2 seguida pela ativação de STAT1. Quanto ao fenótipo Th2, a IL-4 sinaliza através de JAK1/3 para ativar STAT6. Para a polarização das células Th17, é requerida a presença de TGF- β e IL-6, a IL-6 sinaliza através de JAK1/2 para ativação de STAT3. Por fim, na indução de Treg é importante a participação de TGF- β e IL-2, onde IL-2 sinaliza através da via JAK1/3 para ativar STAT5 (Gutiérrez-Hoya and Soto-Cruz 2020).

Além da ativação dos fatores de transcrição JAK/STAT, é necessária a ativação de dois ou mais tipos de fatores de transcrição. Os fatores de transcrição que também estão presentes na polarização das células Th são, T-bet para as

células Th1, GATA-3 para Th2, ROR γ T para TH17 e FOXP3 para iTreg (Gutiérrez-Hoya and Soto-Cruz 2020) (Figura 7).

Figura 7 – Diferenciação das células T CD4 em Th1, Th2, Th17 e Treg. A diferenciação da célula T CD4 são ativadas por seus respectivos fatores de transcrição e citocinas, e atuam de diferentes maneiras no TME.



Fonte: Adaptado de Gutiérrez-Hoya and Soto-Cruz (2020).

Em geral, as células Th1 são diferenciadas após estímulo com IFN- γ , TNF- α e IL-2, enquanto a polarização das células Th2 ocorre pela presença de IL-4 ou IL-10 e secretam IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Quanto às células Th17, estas secretam IL-17, IL-23 e IL-22, e são diferenciadas pela presença de TGF- β , IL-1 β e IL-6. Entretanto, a polarização das células Treg ocorre na presença de TGF- β e secretam citocinas imunossupressoras, incluindo IL-10 e TGF- β (Zhao et al. 2021)

Nos cânceres associados à infecção pelo HPV a falta de uma resposta Th1 tem sido associada à infecção persistente pelo vírus. Também foi observado em pacientes com lesões cervicais de alto grau positivos para HPV, uma resposta Th2

aumentada, caracterizada pela secreção de citocinas pró-tumorigênicas como IL-6, IL-8 e IL-10. A mudança de uma resposta imune Th1 para Th2 pode ocorrer pela atividade da evasão imune ao HPV. A resposta das células Th17 é considerada pró-inflamatória no contexto de respostas imunes contra patógenos exógenos extracelulares, no entanto, nos cânceres associados ao HPV são consideradas pró-tumorigênicas, devido o aumento desse linfócito em lesões cervicais infectadas pelo HPV, bem como por seu recrutamento através de quimiocinas derivadas de tumor e fibroblastos associados ao tumor (Zhou et al. 2019).

As células B são bem conhecidas pela sua capacidade de produzir anticorpos, como também de apresentar antígenos para as células T e secretar citocinas. Além disso, os linfócitos B também são capazes de desempenhar funções imunorreguladoras no câncer (Jee et al. 2020). As células B humanas podem ser classificadas em subconjuntos distintos, incluindo progenitores de células B, células B imaturas, células plasmáticas, células B de memória e células B imunossupressoras e reguladoras (B-regs). A formação de centros germinativos é uma característica marcante da imunidade adaptativa mediada por células B e é necessária para a maturação adequada da afinidade das células B e diversificação de anticorpos (Kim et al. 2020).

As células B infiltrantes surgiram como protagonistas no TME. As células B infiltrantes e células T CD4⁺ estão presentes dentro das estruturas linfóides terciárias (TLS) em pacientes com NSCLC, e essas estruturas estão associadas a um melhor prognóstico dos pacientes. Foi observado, também, que os linfócitos B infiltrantes de tumor podem apresentar antígenos tumorais endógenos para linfócitos infiltrantes T CD4⁺ e alterar seu fenótipo (Altorki et al. 2018). Em tumores associados ao HPV, foi observado em modelo de camundongo com câncer cervical

induzido por HPV que as células B promovem a progressão tumoral e contribuem para o estabelecimento do tumor (Jee et al. 2020). No entanto, em um estudo realizado por Kim e colaboradores, foi observado que as células B ativadas com radioterapia e terapia de bloqueio de PD-1, promovem a sobrevida dos pacientes com cânceres associados ao HPV (Kim et al. 2020). Além disso, foi demonstrado que há um aumento no número de células B-reg no câncer cervical associados ao HPV, além de estar relacionado com a progressão tumoral e metástase. Os linfócitos B, também foram capazes de prejudicar a função de células T CD8+ (Jee et al. 2020).

A formação de anticorpos gerados pelas células B efectoras com o auxílio das células T, é essencial para eliminar o patógeno e fornecer proteção futura contra quaisquer infecções recorrentes. No entanto, nem sempre isso ocorre, como nos casos de infecção pelo HPV. A produção de anticorpos neutralizantes naturais, nos cânceres cervicais mediado por HPV, depende do tipo de HPV, extensão da exposição ao vírus, antigenicidade da partícula viral e interação com epítomos antigênicos. Os anticorpos específicos mais detectados contra o HPV são principalmente contra proteína L1 do capsídeo do vírus, assim como anticorpos contra as oncoproteínas E6 e E7. Contudo, o estudo realizado por Wieland e colaboradores demonstraram que a proteína E2 do HPV pode ser um alvo imunológico importante, pois é uma proteína grande e possui mais epítomos de células T potenciais do que E6 e E7 combinados (Jee et al. 2020; Wieland et al. 2020).

2.4.3 Quimiocinas e citocinas

As quimiocinas, estas possuem papel importante no recrutamento de células inflamatórias durante a inflamação. As quimiocinas podem ser subdivididas em

quatro famílias (C, CC, CXC e CX₃C) de acordo com suas cisteínas N-terminais. As quimiocinas são liberadas principalmente por células da imunidade inata. As quimiocinas CC e CXC são secretadas durante a inflamação e direcionam a migração dos leucócitos influenciando na infiltração de células imunes (Zhao et al. 2021).

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular, além de ser moléculas sinalizadoras liberadas por células inflamatórias e envolvidas em diversas funções. Podem ser classificadas em citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-15, IL-17, IL-23, TNF- α e IFN- γ) e citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β) (Zhang et al. 2020; Zhao et al. 2021).

As citocinas possuem um papel importante na manutenção da inflamação crônica, promovendo a transformação de células malignas, além de inibir a vigilância imunológica do tumor e promover a metástase tumoral. As principais citocinas inflamatórias associadas ao câncer de pulmão são IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-11, IL-12, TNF- α e TGF- β . Dentre suas funções no TME de pulmão, em geral estas citocinas participam direta e indiretamente tanto na promoção e progressão das células cancerígenas, ao ativar fatores angiogênicos promovendo a metástase, como também enfraquecendo a imunidade antitumoral com suas funções imunossupressoras (Tan et al. 2021).

Entretanto, em células cancerígenas do colo uterino associadas ao HPV, há em geral uma maior expressão das citocinas IL-10, IL-17, IL-23 e TGF- β , principalmente quando infectadas com HPV de alto risco (Lina Zhang, 2020). Foi observado também que as citocinas IL-8, IL-1 β , IL-10, IL-21 e TNF- α estão associadas com a progressão das lesões pré-cancerosas no câncer cervical (Long et al. 2021). Enquanto no estudo realizado por Li e colaboradores, foi observado

que o aumento de IL-6 estava relacionado com a gravidade da doença em pacientes infectados com HPV de alto risco, em contrapartida houve uma diminuição de IL-2 a medida que a gravidade da doença aumentou (Li et al. 2019).

Há também uma forte correlação entre as oncoproteínas do HPV e a atividade de IFN em cânceres. A superexpressão de E6 e E7 está associada à diminuição da sinalização de IFN tipo I (Morgan and Macdonald 2020a). A família IFN possui três tipos principais: IFN tipo I, constituído pelos IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ e IFN- ω ; o tipo II que é composto pelo IFN- γ ; e o IFN tipo III, que incluem IFN- $\lambda 1$, IFN- $\lambda 2$ e IFN- $\lambda 3$ (Hong and Laimins 2017).

Quando uma célula é infectada por um vírus, a PRR reconhece e ativa a família IRF de fatores de transcrição. A família IRF é composta por nove membros (IRF1-9). Após a ativação do IRF, esta se liga à promotores de genes estimulados por interferon (ISGs) através de sequências específicas denominadas elementos de resposta estimuladora de interferon (ISRE) para ativar a transcrição. Como no caso dos IFN tipo I, que são sintetizados após o reconhecimento de genomas virais por PRRs, seguido pela ativação do fator de transcrição IRF. Já os IFN tipo II são sintetizados por células NK e TNK juntamente com células T CD4+ e CD8+. Os IFN tipo III atuam de forma similar ao tipo I, mas funcionam através de diferentes complexos de receptores de citocinas (Hong and Laimins 2017).

2.5 MARCADORES MOLECULARES DO MICROAMBIENTE TUMORAL

2.5.1 JAK/STAT

Nos últimos anos o papel da via JAK/STAT no desenvolvimento do câncer ganhou destaque, e alguns tipos de cânceres têm recebido mais atenção, como mama, fígado, pâncreas e pulmão (Gutiérrez-Hoya and Soto-Cruz 2020).

A via JAK/STAT possui importantes moléculas de sinalização associadas à regulação do desenvolvimento embrionário, manutenção de células-tronco e resposta inflamatórias. Entretanto, a desregulação da sinalização JAK/STAT também foi associada na promoção da progressão do câncer, bem como evasão imune e metástase. Sua ativação ocorre após a ligação de citocinas, como interleucinas, e fatores de crescimento em vários receptores transmembrana, que por sua vez, resulta na ativação de JAKs seguido pelo recrutamento, fosforilação e ativação de proteínas STAT. Após serem fosforilados, as proteínas STAT formam um homo/heterodímero. Consequentemente, os dímeros de STAT são translocados para o núcleo e se ligam a sequências promotoras específicas, levando a transcrição de genes alvos. Cada conjunto de homo/heterodímero formado possui diferentes genes alvos e é por isso que eles podem controlar diferentes processos (Gutiérrez-Hoya and Soto-Cruz 2020; Scarth et al. 2021).

A família de proteínas STAT foi identificada pela primeira vez como fatores de transcrição induzidos por IFN. Sete proteínas STAT foram identificadas em humanos, STAT1 e STAT4 presente no cromossomo 2q12-33; STAT3, STAT5a e STAT5b no cromossomo 12q13-14; e STAT2 e STAT6 localizados no cromossomo 17q11-22. Enquanto STAT1 e STAT2 estão associadas à sinalização imunológica iniciada por IFN, STAT3 e STAT5 têm sido mais associadas à sobrevivência e ao potencial proliferativo de diversos cânceres (Morgan and Macdonald 2020a).

A interação de receptores de citocinas é fundamental para a transfosforilação de JAK e o subsequente recrutamento de um ou mais STATs para serem fosforilados. Foram identificados em humanos quatro membros da família JAK: JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2 (Gutiérrez-Hoya and Soto-Cruz 2020). Estas proteínas compartilham semelhanças estruturais consideráveis, no entanto, JAK1,

JAK2 e TYK2 são expressos na maioria dos tecidos, enquanto a expressão de JAK3 é restrita às células hematopoiéticas (Morgan and Macdonald 2020a).

Todos os IFNs são capazes de ativar a via de sinalização JAK/STAT, que é considerado um nó central de comunicação do sistema imunológico, e as oncoproteínas do HPV interferem nessa via de diversas formas (Pešut et al. 2021). O HPV possui a capacidade de reprimir a expressão de IFN, bem como induzir a via JAK/STAT. A proteína E6 do HPV, por exemplo, interfere na ativação da proteína STAT, interagindo diretamente com TYK2 para prejudicar a fosforilação de STAT1 e STAT2. Igualmente, a oncoproteína E7 se liga a p48, que é um componente do complexo ISGF3, para bloquear a translocação do complexo para o núcleo e inibir a expressão do gene ISG (Hong and Laimins 2017).

Para estabelecer uma infecção persistente, os HPVs empregam vários mecanismos que interrompem a sinalização de STAT1/STAT2, e assim, inibem a expressão de genes estimulados por interferons (ISGs). Isso permite a manutenção do genoma viral (Morgan and Macdonald 2020a). A inibição da expressão de STAT1 pelas proteínas do HPV é fundamental para a manutenção dos epissomas virais, bem como sua amplificação em células em diferenciação. Quando células que mantêm epissomas de HPV foram transfectadas com vetores de expressão de STAT-1 a quantidade de genomas virais foi rapidamente diminuída (Hong and Laimins 2017).

As proteínas STAT3 e STAT5 estão envolvidos na transcrição de genes importantes para a proliferação e sobrevivência celular. O STAT3 induz a transcrição de genes que codificam reguladores de proliferação celular (como ciclina D1 e c-Myc), sobrevivência (como Bcl-X), além de citocinas incluindo IL-6, IL-22, IL-23 e IL-10; além de induzir o receptor do fator de crescimento endotelial e

receptores de citocinas (EGFR, c-Met e IL-23R), e protooncogenes citoplasmáticos como K-ras, Src e c-Abl. A ativação de STAT3 ocorre através de vários mecanismos, o mais comum deles ocorre através da família de citocina IL-6. No entanto, outros fatores estão associados, incluindo citocinas do tipo I, como IL-10 e IL-23, fator de crescimento, como EGF e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e ativadores GPCR (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos), como esfingosina-1-fosfato (S1P). Em contrapartida, a ativação persistente de STAT3 também interfere no seu regulador negativo PTEN, responsável pela sua desfosforilação, incluindo microRNA regulatório específico, como o miR-21, bastante presente em tumores de colo de útero (Shukla et al. 2019; Morgan and Macdonald 2020a).

De maneira semelhante ao PTEN, outros reguladores negativos de STAT3, incluindo GRIM-19 e SOCS-1 (supressor de sinalização de citocinas), são regulados negativamente durante a carcinogênese cervical. Além disso, vale ressaltar que ocorre uma ativação parácrina de STAT3 no microambiente de células imunes derivadas da expressão local de MMP-9 (metaloproteinase-9) (Shukla et al. 2019).

Tanto STAT3 como STAT5 foram expressas de forma exacerbada e constitutivamente ativadas no câncer cervical. Foi demonstrado que o STAT3 é indispensável para o ciclo de vida do HPV-18, pois sua oncoproteína E6 é capaz de induzir a ativação de STAT3, enquanto E7 do HPV-31 está envolvida na ativação de STAT5 (Pešut et al. 2021).

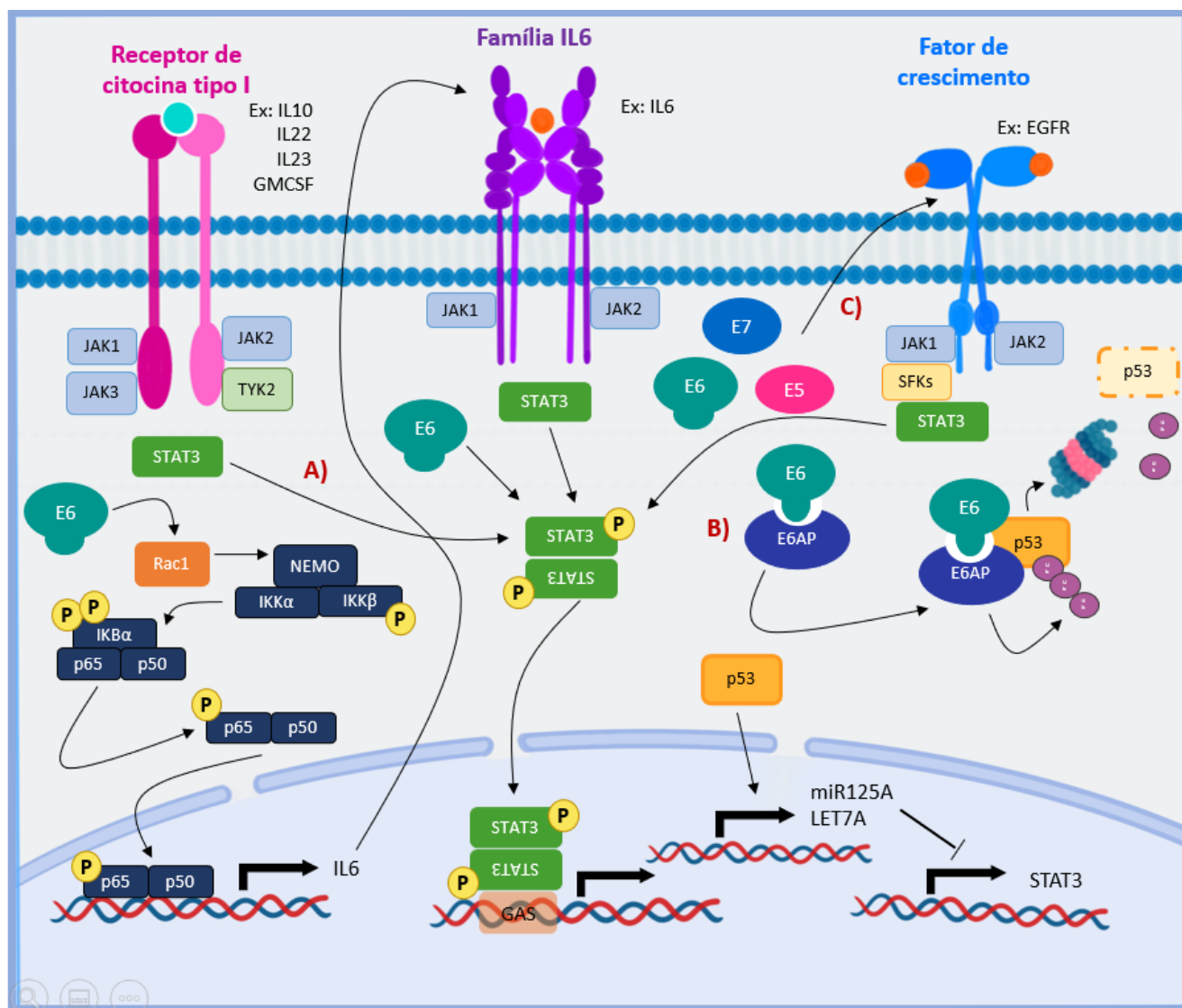
Tem sido relatado que a infecção pelo HPV induz o STAT3 e um alto nível Th17 de expressão de IL-17, que por sua vez induz a produção de VEGF vascular, PGE2 e óxido nítrico, o qual promovem a angiogênese e consequentemente o

crescimento tumoral (Alves et al. 2018). Além disso, foi demonstrado também que tanto IL-17 quanto IL-6 induzem a fosforilação de STAT3 que vai levar a produção de ligante de morte programada (PD-L1), que está relacionado à inibição de células T antitumorais (Marques et al. 2021).

Apesar de E6 ser o principal responsável pela fosforilação de STAT3 em queratinócitos contendo HPV, todas as três oncoproteínas podem induzir a fosforilação da proteína STAT3, através da sua interação e ativação com EGFR (Morgan and Macdonald 2020a). Em estudos realizados em linhagens celulares de câncer cervical, foi observado uma forte correlação positiva de STAT3 constitutivamente ativo com a expressão das oncoproteínas E6 e E7 de HPV-16 e uma correlação negativa com os níveis de p53 e pRB (Shukla et al. 2019).

Além do STAT3, a via NF- κ B também está correlacionada com o microambiente inflamatório. Foi observado que a fosforilação de STAT3 é alcançado através do aumento da sinalização de NF- κ B e ativação autócrina/parácrina de STAT3 pela citocina pró-inflamatória IL-6. A interação e ativação de STAT3 e NF- κ B desempenham um papel fundamental no controle da interação entre as células tumorais e o microambiente, principalmente em células imunes inflamatórias infiltradoras de tumor. No TME, a ativação dessas duas vias de sinalização pode promover a liberação de citocinas, quimiocinas e substâncias ativas correspondentes, bem como a proliferação maligna e adesão de células tumorais. Em geral, essas duas vias desempenham um papel importante na produção de células tumorais, sobrevivência, EMT, invasão, metástase, inibição da imunidade adaptativa e resistência a drogas (Scarath et al. 2021; Tan et al. 2021) (Figura 8).

Figura 8 – A modulação do HPV na via de sinalização de STAT3. A) E6 do HPV induz a expressão de IL-6 através da via de sinalização Rac1/NF- κ B, acarretando na sinalização autócrina/parácrina. B) E6 induz a degradação de p53 diminuindo a expressão do miR125a e Let-7a que bloqueiam a expressão de STAT3. C) E5, E6 e E7 induz a sinalização de EGFR levando a ativação de STAT3.



Fonte: Adaptado de Morgan and Macdonald (2020b).

2.5.2 FOXO4

O Forkhead box O 4 (FOXO4), é um fator de transcrição que regula diversos genes envolvidos na apoptose, ciclo celular e homeostase celular. Além de desempenhar um papel importante na regulação da transcrição em vários tecidos e órgãos, afetando a ocorrência e o desenvolvimento de muitas doenças (Sun et al. 2021). Estudos mais recentes vêm demonstrando a associação do FOXO4 no desenvolvimento de variados tipos de câncer, incluindo leucemias, câncer gástrico, câncer colorretal, carcinoma hepatocelular, câncer de próstata, câncer cervical, câncer de mama, câncer de pulmão, etc (Jiang et al. 2018).

O FOXO4 é um membro da família FOXO que também inclui, FOXO1, FOXO3 e FOXO6. Esses quatro fatores de transcrição FOXO se ligam aos genes alvo como monômero ou heterodímero para controlar o destino celular sob diferentes condições. Todas as proteínas FOXO tem 4 domínios funcionais de núcleo diferentes, o domínio de ligação ao DNA, a sequência de localização nuclear, a sequência de exportação nuclear e o domínio de transativação (Jiramongkol and Lam 2020). As proteínas FOXO estão envolvidas em diversas funções celulares, incluindo a regulação da resposta imune, incluindo a diferenciação das células Th22 por FOXO4 juntamente com BNC2 (Plank et al. 2017).

A regulação e desregulação dos fatores de transcrição FOXO ocorrem predominantemente nos níveis pós-transcricionais e pós-traducionais. Os tipos de regulação pós-traducionais, incluem fosforilação, acetilação, ubiquitinação e glicosilação, os quais são essenciais para controlar a atividade de FOXO4 (Jiang et al. 2018; Jiramongkol and Lam 2020).

As modificações pós-transcricionais se dão principalmente pela ação de microRNAs, os quais demonstraram ser capazes de interferir na expressão de FOXO4, diminuindo sua expressão à níveis baixos, indicando seu envolvimento na carcinogênese, invasão do câncer e metástase. Alguns miRNA foram observados em diferentes tipos de câncer, interferindo na expressão de FOXO4, incluindo o miR-1274a (câncer gástrico), miR-421 (carcinoma nasofaríngeo), miR-499-5p (câncer colorretal), miR-664 (osteossarcoma) e miR-150 (câncer cervical e NSCLC) (Jiang et al. 2018). Ou seja, o nível atenuado de FOXO4 é em parte devido à interferência de miRNAs, o que resulta na diminuição da expressão de alvos de FOXO4, como p21, p27 e ciclina D1 (Jiang et al. 2018; Jiramongkol and Lam 2020).

O FOXO4 também mostrou estar associado ao fator de transcrição NF- κ B. Um estudo realizado por Zhou e colaboradores, sugeriu que o fator de transcrição FOXO4 interage fisicamente com o NF- κ B e inibe sua ligação ao DNA e sua atividade transcricional, o que leva a uma ativação mínima de NF- κ B para manter uma inflamação crônica de baixo grau. Sinais inflamatórios ativam NF- κ B através da inativação de FOXO4, o que deixa o NF- κ B livre e ativo para combater a inflamação (Zhou et al. 2009).

No câncer cervical, o fator de transcrição FOXO4 foi observado estar menos expresso e correlacionado positivamente com a carga viral do HPV (Qin et al. 2017). De fato, a baixa expressão da proteína FOXO4 está associada com um mau prognóstico em diversos tipos de câncer, pois este fator de transcrição atua como um supressor de tumor, assim como p53. Apesar de FOXO4 e p53 compartilharem várias características comuns, existem algumas distinções entre eles, por exemplo, a expressão de p53 normalmente é perdida, diferente do que ocorre com FOXO4, que tem sua inativação induzida por atividades pós-transcricionais e traducionais.

Ou seja, a proteína FOXO4 ainda pode ser reativada, enquanto a perda genética é irreversível (Jiang et al. 2018).

Em geral, diversas pesquisas demonstraram que o papel chave da proteína FOXO é de supressor de tumor, que é mediado pela sua capacidade de regular genes essenciais para a parada da proliferação celular, morte celular, autofagia, senescência, angiogênese, migração celular e metástase. No entanto, existem evidências de que os fatores de transcrição FOXO tenham um papel oncogênico, apoiando a progressão do câncer, angiogênese, metástase e resistência a drogas (Jiramongkol and Lam 2020). Assim, as proteínas FOXO foram estabelecidas não apenas como marcadores importantes para diagnóstico e prognóstico do câncer, mas também como alvos para intervenção do câncer.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa avaliar perfil de respostas imunes em tumores de pulmão quando associado com a infecção pelo Papilomavírus Humano

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o perfil de expressão dos oncogenes E5, E6 e E7 do HPV 16 em tumores de pulmão frescos e congelados;
2. Analisar o perfil de expressão dos fatores de transcrição STAT4, JAK2, STAT6, STAT3 e FOXO4, e avaliar a correlação com a expressão dos oncogenes do HPV16;
3. Analisar o perfil da resposta imune em células da linhagem A549 transfectadas com os oncogenes do HPV16.

4 ARTIGO 1

TITLE: EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM CÂNCER DE PULMÃO POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HPV16.

AUTHORS: São Marcos, Bianca de França^A, MSc

Cruz, Bruna Isabel Santos^B

Silva, Guilherme Antonio de Souza^C

De Melo, Cristiane Moutinho Lagos^D

Oliveira, Talita Helena de Araújo^E, PhD

Freitas, Antonio Carlos de^{F*}, PhD

AFFILIATIONS: ^A Department of Genetics, Federal University of Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brasil - CEP: 50670-901. biancasaomarcos@gmail.com

^B Department of Genetics, Federal University of Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brasil - CEP: 50670-901 bruna.scruez@gmail.com

^C Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco – Av. Prof Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brasil – CEP: 50670901. guilherme.assufpe@gmail.com

^D Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco – Av. Prof Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brasil – CEP: 50670901

^E Patrick G Johnston Centre for Cancer research, Queen's University Belfast, Northern Ireland t.oliveira@qub.ac.uk

^F Department of Genetics, Federal University of Pernambuco – Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brasil - CEP: 50670-901. acf_ufpe@yahoo.com.br

*CORRESPONDING AUTHOR DETAILS

Antonio Carlos de Freitas, acf_ufpe@yahoo.com.br - Fone: (+55 81) 2126 8520

ORCID: 0000-0002-4957-9549

ABSTRACT

Objetivo: O Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco é o principal agente causador do câncer cervical, contribuindo com cerca de 95% dos casos de câncer cervical. No entanto, o HPV tem sido correlacionado com outros tipos de câncer, como o câncer de pulmão, onde a sua presença e atividade viral têm sido observadas em vários estudos. Porém, ainda não está claro como o HPV atua na carcinogênese pulmonar, neste sentido é importante compreender a atividade das oncoproteínas do HPV nas células do câncer de pulmão.

Métodos: Tumores de 18 pacientes com câncer de pulmão foram avaliados quanto à expressão de oncoproteínas do HPV (E2, E5, E6 e E7) por RT-qPCR, bem como a expressão de fatores de transcrição (STAT4, STAT3, STAT6, JAK2 e FOXO4) associados com proliferação, diferenciação e metástase celular.

Resultados: Pelo menos uma das oncoproteínas do HPV foi encontrada em 66,7% dos tumores pulmonares analisados. As oncoproteínas E5 e E7 foram superexpressas e com forte correlação positiva entre elas. Além disso, também foi observada uma forte correlação negativa entre E6 e E2, sugerindo uma possível integração viral. Uma superexpressão de todos os fatores de transcrição foi observada em tumores infectados por HPV em comparação com tumores negativos para HPV, principalmente FOXO4 e STAT4.

Conclusões: Nossos resultados sugerem que as oncoproteínas do HPV podem estar associadas à ativação de fatores de transcrição associados à progressão do câncer de pulmão.

Keywords: Lung cancer; Human Papillomavirus; Transcription Factors; JAK/STAT; FOXO4

INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, responsável por quase 10 milhões de mortes em 2020, e o câncer de pulmão é o mais incidente tanto em homens quanto em mulheres. A exposição prolongada à fumaça do tabaco é a causa mais comum de câncer de pulmão. No entanto, foram diagnosticados entre 10 a 15% dos casos de câncer do pulmão em pacientes não fumantes (Rudin et al. 2009; de Groot e Munden 2012; Akhtar e Bansal 2017a), o que levanta a possibilidade de uma associação com outros factores, incluindo a ação de agentes virais, como o papilomavírus humano (HPV) (Prabhu et al. 2012).

O HPV é um vírus de DNA de fita dupla, com aproximadamente 8.000 pb, que codifica três oncogenes principais (E5, E6 e E7), envolvidos na transformação celular (Moody and Laimins 2010). Embora ainda controverso, o HPV pode ser um possível participante do processo carcinogênico pulmonar (de Freitas et al. 2016). A capacidade do HPV de induzir câncer de pulmão pode ser conferida pela ação das oncoproteínas E5, E6 e E7, que atuam aumentando a proliferação celular, inibindo a apoptose e manipulando o sistema imunológico do hospedeiro através de diversas vias (de Freitas et al. 2016).

Há cerca de 40 anos, estudos sobre a atividade do HPV no câncer de pulmão observaram que as oncoproteínas virais são ativas e podem induzir o processo de carcinogênese, desde o aumento da proliferação celular e inibição da apoptose até a manipulação do sistema imunológico do hospedeiro (Syrjänen 1979; de Oliveira et al. 2018b; F. Cardona et al. 2019). A capacidade de evadir ou mesmo suprimir as respostas imunes antitumorais é a característica fundamental das interações das células malignas com o microambiente tumoral. Além disso, o HPV pode se adaptar para escapar do monitoramento imunológico, diminuindo drasticamente a apresentação de antígenos virais às células imunológicas competentes, como os linfócitos T (Barros et al. 2018; Zhou et al. 2019; Zhang et al. 2020).

Além disso, alguns factores de transcrição desempenham um papel fundamental no processo de carcinogênese em vários tipos de câncer, incluindo cânceres associados à infecção por HPV. Vários estudos observaram que as oncoproteínas virais podem interagir com fatores de transcrição em células que estão associadas à progressão de células cancerosas, como os fatores de transcrição FOXO4 e STAT (Jiang et al. 2018; Scarth et al. 2021).

A via JAK/STAT que desempenha um papel essencial na diferenciação de células Th, bem como na sua desregulação, tem sido associada à promoção da progressão do câncer, bem como à evasão imune e à metástase. Sua ativação ocorre após a ligação de citocinas, que por sua vez resulta na ativação de JAKs seguida pelo recrutamento, fosforilação e ativação de proteínas STAT que são translocadas para o núcleo e se ligam a sequências promotoras específicas, levando à transcrição de genes alvo. associada à proliferação celular

(Gutiérrez-Hoya and Soto-Cruz 2020). Em contraste, o fator de transcrição FOXO4 é geralmente considerado um supressor tumoral em diferentes tipos de tecidos e normalmente é encontrado minimamente expresso em vários tipos de câncer, no entanto, seu papel em tumores associados ao HPV precisa ser melhor elucidado (Jiramongkol and Lam 2020)

Por fim, é importante compreender o papel das oncoproteínas do HPV na interação com fatores de transcrição associados à proliferação celular e progressão do câncer de pulmão, pois auxiliará na determinação de potenciais biomarcadores que podem facilitar o diagnóstico e prognóstico do paciente, além de ajudar no desenvolvimento de terapias direcionadas específicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Objeto de estudo

O material biológico foi obtido de pacientes submetidos à cirurgia torácica no serviço de pneumologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz. Dezoito biópsias frescas/congeladas foram obtidas e armazenadas em tubos estéreis com solução RNAlater a -80°C. Um termo de consentimento foi aplicado a todos os pacientes e o presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética (registro 06396812.0.3001.5192).

Extração de RNA e Síntese de cDNA

As extrações de RNA foram lisadas com reagente Trizol, depois o kit RNeasy Mini (Qiagen) foi usado para isolar e purificar o RNA. O RNA extraído foi verificado quanto à sua integridade e qualidade através da visualização das bandas de RNA ribossômico em eletroforese em gel de agarose a 1% e no nanodrop (Thermo Scientific) considerando a proporção 260/280. A síntese de cDNA foi realizada seguindo as instruções do kit Maxima First Strand cDNA Synthesis com dsDNase (Thermo Scientific).

Desenho de primer e estimativa de eficiência para qPCR

Os primers para os oncogenes do HPV foram desenhados através do software CLCbio Main Workbench versão 5.7.1. Os genes para subpopulações de linfócitos T foram desenhados com base em estudos anteriores (tabela 1). Os genes de referência ACTB e EEF1A1, utilizados para quantificação relativa, foram previamente validados em tecido pulmonar. A eficiência dos primers foi avaliada por diluições seriadas de 10 potências e foi utilizada a linhagem celular THP1 (monócitos isolados de um paciente com leucemia monocítica aguda) e uma amostra positiva de câncer de pulmão para exemplificar as condições reais do ensaio.

PCR em Tempo Real

A análise da expressão gênica foi realizada para todas as 18 amostras de tumores de pulmão frescos / congelados usando Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), e a amplificação foi realizada em AriaMx Real-Time PCR (Agilent Technologies). As condições de ciclagem foram 95°C por 20 segundos para ativação da polimerase, seguida de 40 ciclos de 95°C por 3 segundos para desnaturação e 60°C por 30 segundos para anelamento e extensão.

Assim, a média geométrica dos genes de referência foi utilizada para calcular a expressão relativa de todos os alvos nas amostras (Livak and Schmittgen 2001).

Tabela 1 - Informações do conjunto de primers

Gene	Sequence	Annealing Temp.	Reference
E5 HPV16	F: ACTGGCTGCTTTTTGCTTTG R: GACACAGACAAAAGCAGCGG	60°C	-
E6 HPV16	F: TGCAATGTTTCAGGACCC R: CATAACTGTGTGGTAACCTTCTGGG	58°C	-
E7HPV16	F: AGCTCAGAGGAGGAGGATGA R: GAGACCAGATGGGGCACACA	56°C	-
STAT4	F: CCTGGGTGGACCAATCTGAA R: CTCGCAGGATGTCAGCGAA	60°C	(Usui et al. 2003)
JAK2	F: TCTGGGGAGTATGTTGCAGAA R: AGACATGGTTGGGTGGATACC	60°C	(Park et al. 2019)
STAT6	F: CAAAGCCCTAGTGCTGAAGAG R: CTCCTGCTGTAGCTGGGAATA	60°	(Park et al. 2019)
STAT3	F: GGAGGAGGCATTTCGAAAG R: TCGTTGGTGTACACAGAT	60°C	(Zhao et al. 2018)
FOXO4	F: CTTTCTGAAGACTGGCAGGAATGTG R: GATCTAGGTCTATGATCGCGGCAG	60°C	(Su et al. 2014)
ACTB	F:AAGAGAGGCATCCTCACCCCT R: TACATGGCTGGGGTGTTGAA	60°C	-
EEF1A1	F: GTTGCGGTGGGTGTCATCA R: GAGTGGGGTGGCAGGTAT	60°C	-

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (versão 9.0.0). Foram realizados testes de contingência e exato de Fisher para estimar o valor de p e o risco relativo. Foram realizados testes de distribuição normal e aplicados o teste de Mean-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação de Dunn para comparar os níveis de expressão dos oncogenes, os fatores de transcrição e a presença de infecção pelo HPV. O teste de Correlação de Spearman foi realizado para avaliar a correlação entre a expressão do gene. Quanto ao valor de p, foram considerados estatisticamente significativos valores de p menores que $p < 0,05$.

RESULTADOS

Caracterização das Amostras

O estudo foi realizado utilizando 18 amostras frescas/congeladas de tumores pulmonares. A maioria das amostras avaliadas era do sexo masculino (66,7%), com idade entre 56 e 81 anos (66,7%), tabagistas (77,8%) e etilistas (61,10%). Verificou-se que as oncoproteínas do HPV16 estavam expressas em 66,7% das amostras, sugerindo uma possível atividade viral em células tumorais de pulmão infectadas por HPV (tabela 2). Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre as características clínico-demográficas e a presença e ausência de infecção pelo HPV, nem em relação à estimativa de risco (tabela 3).

Tabela 2 - Frequências das características clínico-demográficas

Características	Frequencia
Gênero	
Masculino	12 (66.70%)
Feminino	6 (33.30%)
Idade	
11 - 55	6 (33.30%)
56 - 81	12 (66.70%)
Tabagismo	
Sim	14 (77.80 %)
Não	4 (22.20%)
Consumo de Álcool	
Sim	10 (61.10%)
Não	8 (38.90%)
presença do HPV	
Sim	12 (66.70%)
Não	6 (33.30%)

Tabela 3 - Relação entre a presença de HPV e a estimativa de risco segundo sexo, idade, etilismo e tabagismo.

Características	HPV positivo (%)	HPV negativo (%)	Total	OR (95% CI)	P value
Sexo				3.571 (0.3508-49.41)	0.6000
Femiino	5 (27.78)	1 (5.56)	6		
Masculino	7 (38.89)	5 (27.78)	12		
Total	12	6	18		
Idade				0.3333 (0.0551-2.184)	0.3441
<55	3 (16.67)	3 (16.67)	6		
>55	9 (50.00))	3 (16.67)	12		
Total	12	6	18		
Álcool				0.7000 (0.1037-5.609)	>0.9999
Yes	7 (38.89)	4 (36.36)	11		
No	5 (27.78)	2 (11.11)	7		
Total	12	6	18		
Tabagismo				0.6000 (0.0392-5.188)	>0.9999
Yes	9 (50.00)	5 (27.78)	14		
No	3 (16.67)	1 (5.56)	4		
Total	12	6	18		

Expressão dos oncogenes nas amostras de tumores de pulmão

Foi observada maior expressão dos oncogenes E5 e E7, em contrapartida, as proteínas E6 e E2 foram menos expressas neste tipo de tumor. Houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão de E2 e E5, E2 e E7, E5 e E6, bem como E5 e E7, com $p < 0,05$ (figura 1).

Quanto ao estudo de correlação entre as proteínas do HPV, foi observada correlação negativa moderada entre E2 e E6 e correlação negativa leve entre E2 e E5, porém nenhuma delas foi estatisticamente significativa. Além disso, também foi observada uma correlação positiva leve entre E6 e E5 e, E6 e E7 (sem

significância estatística), e uma correlação positiva moderada entre E5 e E7 estatisticamente significativa com valor de $p < 0,05$ (figura 2).

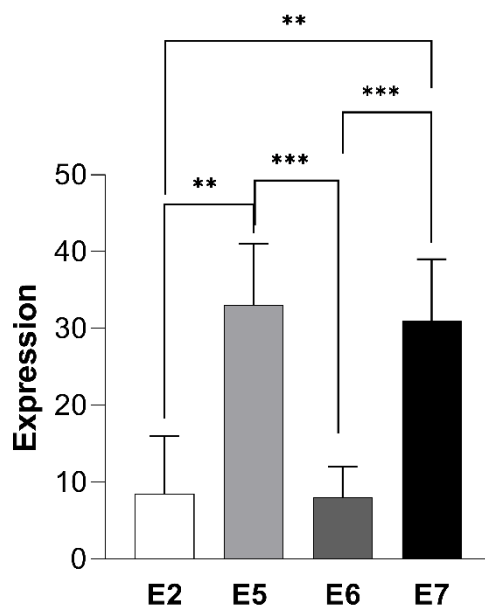


Figura 1 – Expressão das proteínas do HPV. Gráfico de classificação do teste Kruskal-Wallis com mediana e IC 95%. Foi encontrada significância estatística com $p < 0,05$ entre a expressão de E2 e E5 ($p = 0,0040$), E2 e E7 ($p = 0,0066$), E5 e E6 ($p = 0,0001$) e, E6 e E7 ($p = 0,0002$).

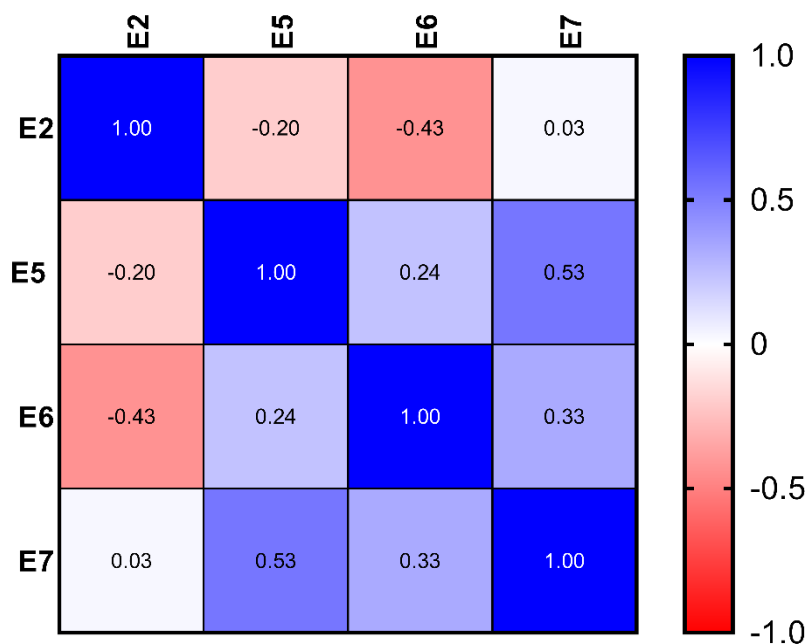


Figura 2- Correlação das oncoproteínas do HPV. Heatmap do teste de correlação de Spearman entre E2, E5, E6 e E7. O coeficiente r é colocado dentro das células com uma variação de 1 (correlação positiva) a -1 (correlação negativa). Foi observada significância estatística entre E5 e E7 com valor de p 0,029.

Comparação entre a expressão dos oncogenes e os fatores de transcrição no câncer de pulmão

A expressão dos fatores de transcrição STAT3, STAT4, STAT6, JAK2 e FOXO4 foram analisadas nas amostras. Os tumores foram divididos em HPV negativos (HPV-), quando não expressavam nenhuma das proteínas do vírus, e HPV positivos (HPV+), quando as amostras apresentavam expressão para pelo menos uma das proteínas do HPV. Os fatores de transcrição foram analisados em conjunto comparando sua expressão em amostras de HPV+ e HPV-. Em geral, como visto acima, todos os fatores de transcrição foram mais expressos nas amostras de HPV+ (figura 3). Além disso, é possível observar maior expressão do fator de transcrição FOXO4, seguido de STAT4, JAK2, STAT3 e finalmente STAT6. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre a expressão de STAT3 e amostras de FOXO4 em HPV+. Nas amostras negativas para HPV, houve diferenças estatisticamente significativas entre STAT6 e FOXO4 e; STAT3 e FOXO4. Isso demonstra que em amostras com presença de mRNA de HPV, FOXO4 foi mais expresso que STAT3, e em amostras sem presença de HPV, o fator de transcrição FOXO4 foi mais expresso que STAT6 e STAT3.

O objetivo do gráfico de correlação é mostrar que alguns genes podem aumentar ou diminuir juntos (correlação positiva), ou mostrar que um gene tende a aumentar à medida que outros diminuem (correlação negativa). Nas amostras positivas para expressão de proteínas do HPV, foi possível observar fortes correlações positivas entre E7 e E5, STAT3 e STAT4, STAT3 e JAK2 e, FOXO4 e JAK2; correlação positiva moderada entre STAT4 e E5, STAT6 e E5, STAT6 e E7, STAT3 e STAT6 e, FOXO4 e STAT3; e correlação positiva leve entre E6 e E5, E7 e E6, STAT6 e E6, FOXO4 e E2. Também foi observada forte correlação negativa entre STAT3 e E2; correlação negativa moderada entre E6 e E2; e alguma correlação negativa leve entre E5 e E2, STAT4 e E2, STAT4 e E6, JAK2 e E2, JAK2 e E5, JAK2 e E7, STAT6 e E2 e, STAT3 e E6. Porém, apenas as correlações entre E7 e E5, STAT3 e JAK2 e, FOXO4 e JAK2 foram estatisticamente significativas com $p < 0,05$ (Figura 4).

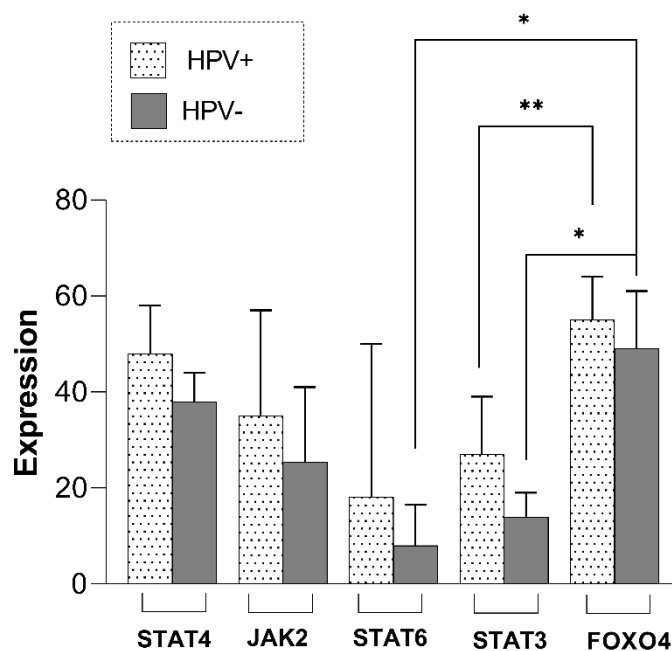


Figura 3 – Expressão de fatores de transcrição em amostras de HPV+ e HPV-. O Rank Plot de expressão dos fatores de transcrição foi analisado pelo teste de Kurkal-Wallis. Foi considerado estatisticamente significativo quando o valor de p foi <0,05 (valor de p: *<0,04; **<0,007).

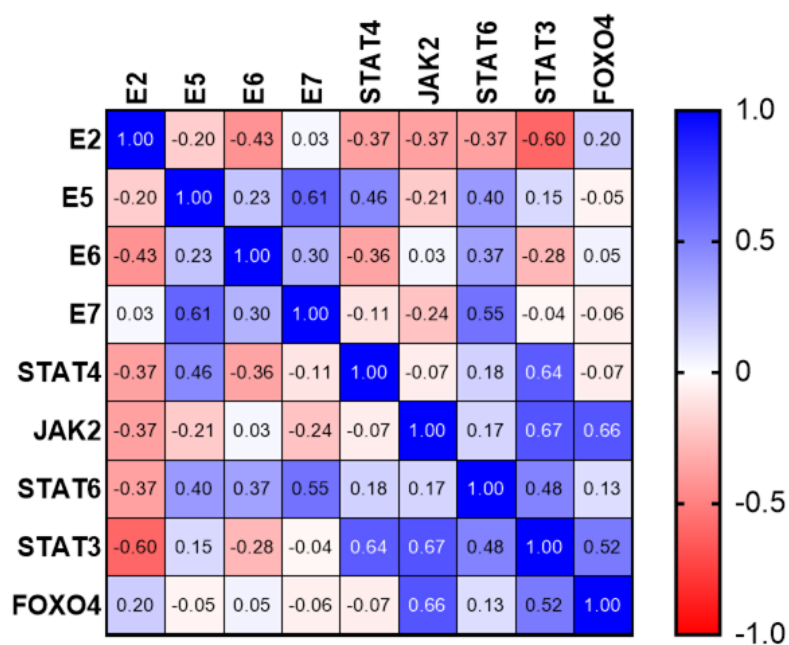


Figura 4 - Correlação entre oncogenes de HPV e fatores de transcrição em amostras de HPV+. Cada seção genética mostra o coeficiente de correlação positivo ($r = 1$) ou negativo ($r = -1$). Apenas as correlações entre

E7 e E5 ($p = 0,007$), STAT3 e JAK2 ($p = 0,0028$), FOXO4 e JAK2 ($p = 0,031$) foram estatisticamente significativas.

DISCUSSÃO

As infecções por HPV são as principais causas de lesões malignas e benignas no colo do útero. No último ano, tais infecções foram associadas a vários tumores não anogenitais (Tsyganov et al. 2019; Rezaei et al. 2020; Karnosky et al. 2021). Entre os tipos de HPV de alto risco mais detectados em tumores pulmonares, o HPV16 e o HPV18 foram os tipos mais prevalentes (F. Cardona et al. 2019; Rezaei et al. 2020; Karnosky et al. 2021; Hussen et al. 2021b). Porém, sua incidência variou de acordo com a localização geográfica em que o estudo foi realizado e sua metodologia.

O HPV16 foi o mais prevalente nos estudos de meta-análise mais recentes, com alta incidência na Ásia, seguido pela América Latina, Europa e América do Norte (Tsyganov et al. 2019; Karnosky et al. 2021). O mesmo foi observado em estudo publicado pelo nosso grupo, que mostrou que no Brasil o HPV foi detectado em amostras de tumores de pulmão, com incidência de 52% sendo o HPV16 o mais prevalente (de Oliveira et al. 2018a). Portanto, nosso estudo verificou a expressão dos principais oncogenes do HPV16 (E2, E5, E6 e E7) associados ao ciclo da infecção viral e à carcinogênese. A expressão de pelo menos uma das proteínas do HPV foi detectada em 66,7% das amostras de câncer de pulmão. Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença e a ausência do HPV, bem como o risco de infecção pelo HPV em relação à idade, sexo, consumo de tabaco e álcool.

As oncoproteínas E5 e E7 do HPV16, foram as proteínas virais mais expressas em nossas amostras. A oncoproteína E5 pode aumentar a sinalização de EGFR através de mecanismos diretos e indiretos no câncer cervical (Müller et al. 2015b). Mutações de EGFR são comuns em alguns tipos de câncer de pulmão, que podem estar associadas à atividade de E5, essas mutações foram mais prevalentes em adenocarcinoma de pulmão que apresentaram o DNA do HPV (Kato et al. 2012; Tung et al. 2013c; Robinson et al. 2016; Li e outros 2016b). Além disso, tanto E5 como E7 são capazes de ativar o EGFR que fosforila os fatores de transcrição STAT (Morgan e Macdonald 2020a).

A atividade E7 também está associada à inativação do gene supressor de tumor pRB (de Freitas et al. 2016). Este achado foi confirmado por um estudo que observou diminuição da expressão de pRB devido à ação da oncoproteína E7 em amostras de câncer de pulmão (Rezaei et al. 2020). Além disso, a desregulação do Rb resultou no aumento da expressão de p16. A proteína p16 é usada clinicamente como um biomarcador prognóstico favorável associado à infecção por HPV de alto risco. A atividade deste supressor tumoral foi

significativamente associada à presença do vírus HPV em amostras de câncer de pulmão (Robinson et al. 2016). Isto fornece evidências de que o vírus pode interferir na maquinaria de replicação celular, principalmente através da atividade da oncoproteína E7.

Em nossas amostras foi observada correlação negativa entre E6 e E2. Isto pode ser indicativo da atividade de integração do genoma viral no DNA do hospedeiro, no qual a proteína E2 do HPV atua como um regulador transcricional reprimindo a expressão de E6 e E7, e durante a integração o E2 é frequentemente perdido. Ou seja, a baixa expressão de E2, e a alta expressão de E6 e E7 são indicativas da integração e ativação da ação transformadora do vírus nas células infectadas (Araldi et al. 2018; Gheit 2019). Em nosso estudo é possível observar diminuição da expressão de E2 nos tumores de pulmão, seguida de aumento na expressão de E7, embora não tenha sido significativo.

Também foi avaliada a atividade de fatores de transcrição importantes na ativação do processo de carcinogênese. De modo geral, todos os fatores de transcrição avaliados estavam ativos e com expressão aumentada nos tumores pulmonares infectados pelo HPV. Além disso, a maioria dos fatores de transcrição foram correlacionados negativamente com E2, o que pode indicar que a forma integrada do vírus poderia estar interferindo na ativação da via JAK/STAT.

Aumento da expressão do fator de transcrição STAT4 foi observado em nossas amostras. A proteína STAT4 é fosforilada pela IL-12, uma citocina antitumoral relacionada à ativação da resposta imune das células Th1, que atua na defesa contra infecções virais (Yang et al. 2020). Em geral, a expressão de STAT4 está associada a mau prognóstico e metástase. No entanto, poucos estudos avaliaram a atividade do STAT4 em cânceres associados ao HPV. Foi relatada alta expressão de STAT4 no câncer cervical em comparação com lesões não cancerosas (Gutiérrez-Hoya e Soto-Cruz 2020). Além disso, foi demonstrado que a superexpressão de E7 aumenta a expressão da via JAK/STAT, incluindo STAT1, STAT2, STAT3 e STAT4 em modelos de camundongos transgênicos que expressam E7 (Ibarra Sierra et al. 2012). Dados semelhantes foram observados em nossas amostras de câncer de pulmão, nas quais houve aumento na expressão de E7, bem como de STAT4 e STAT3.

Outro fator de transcrição superexpresso em nossas amostras foi o FOXO4. Esta proteína regula vários genes envolvidos na apoptose, ciclo celular e homeostase celular (Sun et al. 2021). Independentemente dos estudos que demonstram que a principal função das proteínas FOXO é suprimir tumores, as evidências mostram um papel oncogênico deste fator de transcrição (Jiramongkol e Lam 2020). Observamos um aumento na expressão de FOXO4 em tumores de pulmão, especialmente em amostras que expressavam proteínas do

HPV. Porém, mais estudos são necessários, pois a principal forma de regulação do FOXO4 é através de modificações pós-transcricionais pela atividade do microRNA (Jiang et al. 2018). Ou seja, é necessário avaliar a atividade da proteína FOXO4, ou se esta proteína está sendo bloqueada e, por isso, está ocorrendo um aumento na transcrição do mRNA para manter a atividade supressora de FOXO4 em tumores de pulmão.

Uma correlação positiva entre STAT3 e JAK2 também foi encontrada em nosso estudo, o que corrobora com vários estudos (Morgan e Macdonald 2019; Morgan e Macdonald 2020a). Esses estudos demonstraram que E6 atua na transcrição do NF- κ B, que transcreve as citocinas IL-6, capaz de atuar de forma autócrina e parácrina na ativação de JAK2 e induz a fosforilação de STAT3. Posteriormente, o STAT3 fosforilado será translocado para o núcleo, ativando genes necessários para a proliferação e sobrevivência de células malignas (Morgan e Macdonald 2019). Além disso, também foi observado, em linhagens celulares de câncer de pulmão transfectadas com HPV E6 e E7, que a oncoproteína E6 promoveu a ativação de STAT3 (Zhang et al. 2017).

A fosforilação do STAT3 também foi correlacionada com a carga viral e o estado físico do HPV. Uma correlação direta foi demonstrada quando a expressão diminuída de STAT3 foi associada a um baixo número de cópias do vírus e menor integração (Shukla et al. 2019). Este fato corrobora a baixa carga viral encontrada nos tumores pulmonares infectados pelo HPV (Aguayo et al. 2010). Assim como nossos achados, embora não tenhamos encontrado significância estatística, foi observada baixa expressão de E2 e aumento de oncoproteínas, indicando uma possível integração viral. Além disso, também foi encontrada uma forte correlação negativa entre E2 e STAT3, bem como um aumento na expressão de E7 que foi associado à ativação de STAT3. Ou seja, a integração viral e o aumento da expressão da oncoproteína E7 podem estar associados à ativação de STAT3.

Quanto ao factor de transcrição STAT6, o seu papel no câncer ainda não está claro. Alguns estudos afirmam que sua ativação está correlacionada com tamanhos menores de tumores e melhor sobrevida, pois também demonstraram que seu silenciamento induz apoptose e expressão de p53 em células HeLa. (Gutiérrez-Hoya e Soto-Cruz 2020). Em nossas amostras, há aumento da expressão de STAT6 em tumores pulmonares HPV-positivos em comparação com tumores pulmonares HPV-negativos, o que corrobora com o estudo realizado por Wenzhang Zang et al, no qual foi demonstrado que células pulmonares que expressavam E6 e E7 foram capazes de promover um aumento em STAT6 e STAT2 (Zhang et al. 2017). Mesmo assim, em nossas amostras, o STAT6 não foi o fator de transcrição mais expresso analisado. Foi possível observar maior expressão dos fatores de transcrição FOXO4, STAT4, JAK2 e STAT3 em nosso estudo.

CONCLUSÃO

Os mecanismos moleculares pelos quais o HPV promove o câncer de pulmão não são totalmente conhecidos. Com este intuito, nosso estudo avaliou o papel das proteínas do HPV na atividade de fatores de transcrição associados à carcinogênese. Em nosso estudo, encontramos evidências de que os fatores de transcrição JAK/STAT e FOXO4 foram mais expressos em tumores pulmonares infectados por HPV. Além disso, foi possível observar que houve expressão de oncogenes do HPV, principalmente E5 e E7, o que pode estar associado à ativação das vias JAK/STAT, principalmente STAT4, JAK2 e STAT3, em amostras de câncer de pulmão. Este estudo foi o primeiro a avaliar o papel do FOXO4 nos tumores de pulmão infectados pelo HPV, onde apresentou uma superexpressão em nossas amostras HPV positivas, demonstrando um possível mecanismo do HPV na ativação deste fator de transcrição. São necessários mais estudos que possam avaliar como as oncoproteínas do HPV podem interferir nestes fatores de transcrição e aumentar a carcinogênese pulmonar, pois este conhecimento pode auxiliar no desenvolvimento de futuras abordagens terapêuticas e prognósticas de pacientes com câncer de pulmão associados ao HPV.

REFERENCES

- Aguayo F, Anwar M, Koriyama C, Castillo A, Sun Q, Morewaya J, Eizuru Y and Akiba S (2010) Human papillomavirus-16 presence and physical status in lung carcinomas from Asia. *Infect Agent Cancer* 5:20. doi: 10.1186/1750-9378-5-20
- Aguayo F, Castillo A, Koriyama C, Higashi M, Itoh T, Capetillo M, Shuyama K, Corvalan A, Eizuru Y and Akiba S (2007) Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile. *Br J Cancer* 97:85–91. doi: 10.1038/sj.bjc.6603848
- Akhtar N and Bansal JG (2017a) Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Curr Probl Cancer* 41:328–339. doi: 10.1016/J.CURRPROBLCANCER.2017.07.002
- Akhtar N and Bansal JG (2017b) Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Curr Probl Cancer* 41:328–339. doi: 10.1016/j.currproblcancer.2017.07.002
- Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, Port JL, Saxena A, Stiles B, McGraw T and Mittal V (2019) The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer* 19:9–31. doi:

10.1038/s41568-018-0081-9

Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, Port JL, Saxena A, Stiles B, McGraw T and Mittal V (2018) The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2018 191 19:9–31. doi: 10.1038/s41568-018-0081-9

Alves JJP, Fernandes TAA de M, De Araújo JMG, Cobucci RNO, Lanza DCF, Bezerra FL, Andrade VS and Fernandes JV (2018) Th17 response in patients with cervical cancer. *Oncol Lett* 16:6215–6227. doi: 10.3892/ol.2018.9481

Araldi RP, Sant’Ana TA, Módolo DG, de Melo TC, Spadacci-Morena DD, de Cassia Stocco R, Cerutti JM and de Souza EB (2018) The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomed Pharmacother* 106:1537–1556. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.149

Bae JM and Kim EH (2016) Human papillomavirus infection and risk of breast cancer: A meta-analysis of case-control studies. *Infect Agent Cancer*. doi: 10.1186/s13027-016-0058-9

Barros MR, De Melo CML, Barros MLMGR, De Cássia Pereira De Lima R, De Freitas AC and Venuti A (2018) Activities of stromal and immune cells in HPV-related cancers. *J Exp Clin Cancer Res* 37:1–18. doi: 10.1186/s13046-018-0802-7

Buonomo T, Carraresi L, Rossini M and Martinelli R (2011) Involvement of aryl hydrocarbon receptor signaling in the development of small cell lung cancer induced by HPV E6/E7 oncoproteins. *J Transl Med* 9:1–11. doi: 10.1186/1479-5876-9-2

Cardona AF, Ruiz-Patiño A, Ricaurte L, Rojas L, Zatarain-Barrón ZL, Arrieta O and Rosell R (2018) Human Papillomavirus Infection and Lung Cancer. *Curr Perspect Hum Papillomavirus*. doi: 10.5772/INTECHOPEN.80706

Castillo A, Aguayo F, Koriyama C, Shuyama K, Akiba S, Herrera-Goepfert R, Carrascal E, Klinge G, Sánchez J and Eizuru Y (2006) Human papillomavirus in lung carcinomas among three Latin American countries. *Oncol Rep* 15:883–888. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004

Chen DS and Mellman I (2013) Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* 39:1–10. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2013.07.012

Chen X, Chen L, Zhu H and Tao J (2020) Risk factors and prognostic predictors for Cervical Cancer patients with lung metastasis. *J Cancer* 11:5880. doi: 10.7150/JCA.46258

Cheng YW, Lee H, Shiau MY, Wu TC, Huang TT and Chang YH (2008) Human papillomavirus type 16/18 up-regulates the expression of interleukin-6 and antiapoptotic Mcl-1 in non-small cell lung cancer. *Clin*

Cancer Res 14:4705–4712. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4675

Chiou HL, Wu MF, Liaw YC, Cheng YW, Wong RH, Chen CY and Lee H (2003) The presence of human papillomavirus type 16/18 DNA in blood circulation may act as a risk marker of lung cancer in Taiwan.

Cancer 97:1558–1563. doi: 10.1002/cncr.11191

Colpani V, Soares Falcetta F, Bacelo Bidinotto A, Kops NL, Falavigna M, Serpa Hammes L, Schwartz Benzaken A, Kalume Maranhão AG, Domingues CMAS and Wendland EM (2020) Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: A systematic review and meta-analysis. PLoS One 15:e0229154. doi: 10.1371/journal.pone.0229154

de Freitas AC, Gurgel AP, de Lima EG, de França São Marcos B and do Amaral CMM (2016) Human papillomavirus and lung carcinogenesis: an overview. J Cancer Res Clin Oncol 142:2415–2427. doi: 10.1007/s00432-016-2197-1

de Groot P and Munden RF (2012) Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. Radiol Clin North Am 50:863–876. doi: 10.1016/j.rcl.2012.06.006

de Oliveira THA, do Amaral CM, de França São Marcos B, Nascimento KCG, de Miranda Rios AC, Quixabeira DCA, Muniz MTC, Silva Neto J da C and de Freitas AC (2018a) Presence and activity of HPV in primary lung cancer. J Cancer Res Clin Oncol 0:0. doi: 10.1007/s00432-018-2748-8

de Oliveira THA, do Amaral CM, de França São Marcos B, Nascimento KCG, de Miranda Rios AC, Quixabeira DCA, Muniz MTC, Silva Neto J da C and de Freitas AC (2018b) Presence and activity of HPV in primary lung cancer. J Cancer Res Clin Oncol 144:2367–2376. doi: 10.1007/s00432-018-2748-8

Dreer M, Poel S Van De and Stubenrauch F (2017) Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E_2 protein E8 E. Virus Res 231:96–102. doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.005

Elferink CJ, Ge N-L and Levine A (2001) Maximal Aryl Hydrocarbon Receptor Activity Depends on an Interaction with the Retinoblastoma Protein. 59:664–673.

F. Cardona A, Ruiz-Patiño A, Ricaurte L, Rojas L, Lucia Zatarain-Barrón Z, Arrieta O and Rosell R (2019) Human Papillomavirus Infection and Lung Cancer. Curr Perspect Hum Papillomavirus. doi: 10.5772/intechopen.80706

Fernández JP, Luddy KA, Harmon C and O'Farrelly C (2019) Hepatic tumor microenvironments and effects on NK cell phenotype and function. Int J Mol Sci. doi: 10.3390/ijms20174131

Frazer IH (2004) Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. Nat Rev Immunol 2004 4:46–55. doi: 10.1038/nri1260

- Fridman WH, Pagès F, Sauts-Fridman C and Galon J (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012 124 12:298–306. doi: 10.1038/nrc3245
- Gheit T (2019) Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. *Front Oncol*. doi: 10.3389/fonc.2019.00355
- Graham SV (2017) The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci* 131:2201–2221. doi: 10.1042/CS20160786
- Gutiérrez-Hoya A and Soto-Cruz I (2020) Role of the JAK/STAT Pathway in Cervical Cancer: Its Relationship with HPV E6/E7 Oncoproteins. *Cells* 9:1–22. doi: 10.3390/cells9102297
- Harden ME and Munger K (2017) Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Mutat Res* 772:3–12. doi: 10.1016/j.mrrev.2016.07.002
- Hessel PA, Gamble JF and McDonald JC (2005) Asbestos, asbestosis, and lung cancer: a critical assessment of the epidemiological evidence. *Thorax* 60:433–436. doi: 10.1136/THX.2004.037267
- Hong S and Laimins LA (2017) Manipulation of the innate immune response by human papillomaviruses. *Virus Res* 176:139–148. doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.004.Manipulation
- Hsu N-Y, Cheng Y-W, Chan I-P, Ho H-C, Chen C-Y, Hsu C-P, Lin M-H and Chou M-C (2009) Association between expression of human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein and survival in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 21:81–87. doi: 10.3892/or_00000192
- Hu Y, Wu MZ, Gu NJ, Xu HT, Li QC and Wu GP (2020) Human papillomavirus 16 (HPV 16) E6 but not E7 inhibits the antitumor activity of LKB1 in lung cancer cells by downregulating the expression of KIF7. *Thorac cancer* 11:3175–3180. doi: 10.1111/1759-7714.13640
- Huang CG, Lee LA, Liao CT, Yen TC, Yang SL, Liu YC, Li JC, Gong YN, Kang CJ, Huang SF et al. (2017) Molecular and serologic markers of HPV 16 infection are associated with local recurrence in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 8:34820–34835. doi: 10.18632/oncotarget.16747
- Hussen BM, Ahmadi G, Marzban H, Ebadi M, Azar F, Sorayyayi S, Karampour R, Sadri Nahand J, Hidayat HJ and Moghoofei M (2020) The role of HPV gene expression and selected cellular MiRNAs in lung cancer development. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104692
- Hussen BM, Ahmadi G, Marzban H, Fard Azar ME, Sorayyayi S, Karampour R, Nahand JS, Hidayat HJ and Moghoofei M (2021a) The role of HPV gene expression and selected cellular MiRNAs in lung cancer development. *Microb Pathog* 150:104692. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104692
- Hussen BM, Ahmadi G, Marzban H, Fard Azar ME, Sorayyayi S, Karampour R, Nahand JS, Hidayat HJ and

- Moghoofei M (2021b) The role of HPV gene expression and selected cellular MiRNAs in lung cancer development. *Microb Pathog* 150:104692. doi: 10.1016/J.MICPATH.2020.104692
- Ibarra Sierra E, Díaz Chávez J, Cortés-Malagón EM, Uribe-Figueroa L, Hidalgo-Miranda A, Lambert PF and Gariglio P (2012) Differential gene expression between skin and cervix induced by the E7 oncoprotein in a transgenic mouse model. *Virology* 433:337–345. doi: 10.1016/J.VIROL.2012.08.024
- INCA (2019) Estimativa 2020 Incidência de Câncer no Brasil.
- Jee B, Yadav R, Pankaj S and Shahi SK (2020) Immunology of HPV-mediated cervical cancer: current understanding. *Int Rev Immunol* 0:1–20. doi: 10.1080/08830185.2020.1811859
- Jiang S, Yang Z, Di S, Hu W, Ma Z, Chen F and Yang Y (2018) Novel role of forkhead box O 4 transcription factor in cancer: Bringing out the good or the bad. *Semin Cancer Biol* 50:1–12. doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2018.04.007
- Jiramongkol Y and Lam EWF (2020) FOXO transcription factor family in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2020 393 39:681–709. doi: 10.1007/S10555-020-09883-W
- Karnosky J, Dietmaier W, Knuettel | Helge, Freigang V, Koch M, Koll F, Zeman F and Schulz | Christian (2021) HPV and lung cancer: A systematic review and meta-analysis. doi: 10.1002/cnr2.1350
- Kato T, Koriyama C, Khan N, Samukawa T, Yanagi M, Hamada T, Yokomakura N, Otsuka T, Inoue H, Sato M et al. (2012) EGFR mutations and human papillomavirus in lung cancer. *Lung Cancer* 78:144–147. doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2012.08.011
- Kim SS, Shen S, Miyauchi S, Dominick Sanders P, Franiak-Pietryga I, Mell L, Silvio Gutkind J, Cohen EEW, Califano JA and Sharabi AB (2020) B-cells improve overall survival in HPV-associated squamous cell carcinomas and are activated by radiation and PD-1 blockade. *Clin Cancer Res* 26:3345. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3211
- Lechien JR, Descamps G, Seminerio I, Furgiele S, Dequanter D, Mouawad F, Badoual C, Journe F and Saussez S (2020a) HPV Involvement in the Tumor Microenvironment and Immune Treatment in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancers (Basel)*. doi: 10.3390/CANCERS12051060
- Lechien JR, Descamps G, Seminerio I, Furgiele S, Dequanter D, Mouawad F, Badoual C, Journe F and Saussez S (2020b) HPV involvement in the tumor microenvironment and immune treatment in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancers (Basel)* 12:1–25. doi: 10.3390/cancers12051060
- Li B, Zhang L, Zhao J, Tan G, Zhang W, Zhang N, Tian J and Qu P (2019) The value of cytokine levels in triage and risk prediction for women with persistent high-risk human papilloma virus infection of the cervix.

Infect Agent Cancer 14:1–12. doi: 10.1186/S13027-019-0231-Z/TABLES/7

Li M, Deng F, Qian LT, Meng SP, Zhang Y, Shan WL, Zhang XL and Wang BL (2016a) Association between human papillomavirus and EGFR mutations in advanced lung adenocarcinoma. *Oncol Lett* 12:1953. doi: 10.3892/OL.2016.4847

Li M, Deng F, Qian LT, Meng SP, Zhang Y, Shan WL, Zhang XL and Wang BL (2016b) Association between human papillomavirus and EGFR mutations in advanced lung adenocarcinoma. *Oncol Lett* 12:1953. doi: 10.3892/OL.2016.4847

Liang H-Y, Li X-L, Yu X-S, Guan P, Yin Z-H, He Q-C and Zhou B-S (2009) Facts and fiction of the relationship between preexisting tuberculosis and lung cancer risk: A systematic review. doi: 10.1002/ijc.24636

Liu J, Huang B, Xiu Z, Zhou Z, Liu J, Li X and Tang X (2018) PI3K / Akt / HIF-1 α signaling pathway mediates HPV-16 oncoprotein-induced expression of EMT-related transcription factors in non-small cell lung cancer cells. *J Cancer* 9:3456–3466. doi: 10.7150/jca.26112

Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25:402–408. doi: 10.1006/METH.2001.1262

Long DL, Song HL and Qu PP (2021) Cytokines profiles in cervical mucosa in patients with cervical high-risk human papillomavirus infection. *J Infect Dev Ctries* 15:719–725. doi: 10.3855/JIDC.12147

Mangino G, Chiantore MV, Iuliano M, Fiorucci G and Romeo G (2016) Inflammatory microenvironment and human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 30:103–111. doi: 10.1016/J.CYTOGFR.2016.03.007

Marques HS, de Brito BB, da Silva FAF, Santos MLC, de Souza JCB, Correia TML, Lopes LW, Neres NS de M, Dórea RSDM, Dantas ACS et al. (2021) Relationship between Th17 immune response and cancer. *World J Clin Oncol* 12:845–867. doi: 10.5306/wjco.v12.i10.845

Mcbride AA (2017) Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. 398:919–927. doi: 10.1515/hsz-2017-0113

Medda A, Duca D and Chiocca S (2021) Human Papillomavirus and Cellular Pathways: Hits and Targets. *Pathogens* 10:1–23. doi: 10.3390/PATHOGENS10030262

Moody CA and Laimins LA (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010 108 10:550–560. doi: 10.1038/nrc2886

- Morgan EL and Macdonald A (2020a) Manipulation of JAK/STAT Signalling by High-Risk HPVs: Potential Therapeutic Targets for HPV-Associated Malignancies. *Viruses*. doi: 10.3390/V12090977
- Morgan EL and Macdonald A (2020b) Manipulation of JAK/STAT signalling by high-risk HPVs: Potential therapeutic targets for HPV-associated malignancies. *Viruses*. doi: 10.3390/v12090977
- Morgan EL and Macdonald A (2019) JAK2 Inhibition Impairs Proliferation and Sensitises Cervical Cancer Cells to Cisplatin-Induced Cell Death. *Cancers (Basel)*. doi: 10.3390/CANCERS11121934
- Müller M, Prescott EL, Wasson CW and MacDonald A (2015a) Human papillomavirus E5 oncoprotein: Function and potential target for antiviral therapeutics. *Future Virol* 10:27–39. doi: 10.2217/FVL.14.99/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE2.JPEG
- Müller M, Prescott EL, Wasson CW and MacDonald A (2015b) Human papillomavirus E5 oncoprotein: Function and potential target for antiviral therapeutics. *Future Virol* 10:27–39. doi: 10.2217/FVL.14.99/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE2.JPEG
- Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, Dacic S, Jain D, Kerr KM, Lantuejoul S et al. (2022) The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol* 17:362–387. doi: 10.1016/j.jtho.2021.11.003
- Nunes EM, Talpe-Nunes V and Sichero L (2018) Epidemiology and biology of cutaneous human papillomavirus. *Clinics* 73:1–9. doi: 10.6061/clinics/2018/e489s
- Park SY, Lee CJ, Choi JH, Kim JH, Kim JW, Kim JY and Nam JS (2019) The JAK2/STAT3/CCND2 Axis promotes colorectal Cancer stem cell persistence and radioresistance. *J Exp Clin Cancer Res*. doi: 10.1186/S13046-019-1405-7
- Peña N, Carrillo D, Muñoz JP, Chnaiderman J, Urzúa U, León O, Tornesello ML, Corvalán AH, Soto-Rifo R and Aguayo F (2015) Tobacco Smoke Activates Human Papillomavirus 16 p97 Promoter and Cooperates with High-Risk E6/E7 for Oxidative DNA Damage in Lung Cells. *PLoS One* 10:e0123029. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0123029
- Pešut E, Đukić A, Lulić L, Skelin J, Šimić I, Gašperov NM, Tomaić V, Sabol I and Grce M (2021) Human papillomaviruses-associated cancers: An update of current knowledge. *Viruses*. doi: 10.3390/v13112234
- Plank MW, Kaiko GE, Maltby S, Weaver J, Tay HL, Shen W, Wilson MS, Durum SK and Foster PS (2017) Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity. *J Immunol* 198:2182–2190. doi: 10.4049/jimmunol.1601480
- Prabhu PR, Jayalekshmi D and Pillai MR (2012) Lung cancer and human papilloma viruses (HPVs):

Examining the molecular evidence. *J Oncol*. doi: 10.1155/2012/750270

Qin Y, Ekmekcioglu S, Forget MA, Szekvolgyi L, Hwu P, Grimm EA, Jazaeri AA and Roszik J (2017) Cervical Cancer Neoantigen Landscape and Immune Activity is Associated with Human Papillomavirus Master Regulators. *Front Immunol* 8:16. doi: 10.3389/FIMMU.2017.00689

Rezaei M, Mostafaei S, Aghaei A, Hosseini N, Darabi H, Nouri M, Etemadi A, Neill AO, Nahand JS, Mirzaei H et al. (2020) The association between HPV gene expression, inflammatory agents and cellular genes involved in EMT in lung cancer tissue. *BMC Cancer* 20:916. doi: 10.1186/S12885-020-07428-6/TABLES/4

Richardson JR, Schöllhorn A, Gouttefangeas C and Schuhmacher J (2021) CD4+ T cells: Multitasking cells in the duty of cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)* 13:1–19. doi: 10.3390/cancers13040596

Robinson LA, Jaing CJ, Pierce Campbell C, Magliocco A, Xiong Y, Magliocco G, Thissen JB and Antonia S (2016) Molecular evidence of viral DNA in non-small cell lung cancer and non-neoplastic lung. *Br J Cancer* 115:497–504. doi: 10.1038/bjc.2016.213

Roglic M, Jukic S and Damjanov I (1975) Cytology of the solitary papilloma of the bronchus. *Acta Cytol* 19:11–13.

Rubel L and Reynolds RE (1979) Cytologic description of squamous cell papilloma of the respiratory tract. *Acta Cytol* 23:227–31.

Rudin CM, Avila-Tang E and Samet JM (2009) Lung cancer in never smokers: A call to action. *Clin Cancer Res* 15:5622–5625. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0373

Saab S, Zalzal H, Rahal Z, Khalifeh Y, Sinjab A and Kadara H (2020) Insights Into Lung Cancer Immune-Based Biology, Prevention, and Treatment. *Front Immunol* 11:159. doi: 10.3389/FIMMU.2020.00159/BIBTEX

Saillard M, Cenerenti M, Romero P and Jandus C (2021) Impact of immunotherapy on cd4 t cell phenotypes and function in cancer. *Vaccines* 9:1–21. doi: 10.3390/vaccines9050454

Scarth JA, Patterson MR, Morgan EL and Macdonald A (2021) The human papillomavirus oncoproteins: A review of the host pathways targeted on the road to transformation. *J Gen Virol*. doi: 10.1099/JGV.0.001540

Shepshelovich D, Goldvaser H, Edel Y, Shochat T and Lahav M (2016) High Lung Cancer Incidence in Heavy Smokers Following Hospitalization due to Pneumonia. *Am J Med* 129:332–338. doi: 10.1016/J.AMJMED.2015.10.030

Shukla S, Jadli M, Thakur K, Shishodia G, Mahata S, Basir SF, Das BC and Bharti AC (2019) Level of

- phospho-STAT3 (Tyr705) correlates with copy number and physical state of human papillomavirus 16 genome in cervical precancer and cancer lesions. *PLoS One*. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0222089
- Silva EM, Mariano VS, Pastrez PRA, Pinto MC, Nunes EM, Sichero L, Villa LL, Scapulatempo-Neto C, Syrjanen KJ and Longatto-Filho A (2019) Human papillomavirus is not associated to non-small cell lung cancer: data from a prospective cross-sectional study. *Infect Agent Cancer* 14:12–18. doi: 10.1186/s13027-019-0235-8
- Su L, Liu X, Chai N, Lv L, Wang R, Li X, Nie Y, Shi Y and Fan D (2014) The transcription factor FOXO4 is down-regulated and inhibits tumor proliferation and metastasis in gastric cancer. *BMC Cancer* 14:378. doi: 10.1186/1471-2407-14-378
- Sun Y, Wang L, Xu X, Han P, Wu J, Tian X and Li M (2021) FOXO4 Inhibits the Migration and Metastasis of Colorectal Cancer by Regulating the APC2/ β -Catenin Axis. *Front Cell Dev Biol*. doi: 10.3389/FCELL.2021.659731/FULL
- Sung W-W and Lee H (2013) The role of interleukin-10 in the progression of human papillomavirus-associated lung carcinoma. *Oncoimmunology* 2:e25854. doi: 10.4161/onci.25854
- Suo J, Yang Y, Che Y, Chen C, Lv X and Wang X (2021) Anti-pulmonary metastases from cervical cancer responses induced by a human papillomavirus peptide vaccine adjuvanted with CpG-oligodeoxynucleotides in vivo. *Int Immunopharmacol* 90:107203. doi: 10.1016/J.INTIMP.2020.107203
- Syrjänen KJ (1979) Condylomatous Changes in Neoplastic Bronchial Epithelium. *Respiration* 38:299–304. doi: 10.1159/000194095
- Tan Z, Xue H, Sun Y, Zhang C, Song Y and Qi Y (2021) The Role of Tumor Inflammatory Microenvironment in Lung Cancer. *Front Pharmacol* 12:1168. doi: 10.3389/FPHAR.2021.688625/BIBTEX
- Tang JY, Li DY, He L, Qiu XS, Wang EH and Wu GP (2020) HPV 16 E6/E7 Promote the Glucose Uptake of GLUT1 in Lung Cancer Through Downregulation of TXNIP Due to Inhibition of PTEN Phosphorylation. *Front Oncol*. doi: 10.3389/FONC.2020.559543
- Tognon MG, Akgül B, Banks L and Gheit T (2019) Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. *Front Oncol* | www.frontiersin.org 1:355. doi: 10.3389/fonc.2019.00355
- Tommasino M (2014) The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 26:13–21. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.11.002
- Tsyganov MM, Pevzner · A M, Ibragimova · M K, Deryusheva · I V and Litviakov · N V (2019) Human papillomavirus and lung cancer: an overview and a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 145:1919–1937.

doi: 10.1007/s00432-019-02960-w

Tung M-C, Wu H-H, Cheng Y-W, Wang L, Chen C-Y, Yeh S-D, Wu T-C and Lee H (2013a) Association of epidermal growth factor receptor mutations with human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein expression in non-small cell lung cancer. *Cancer* 119:3367–76. doi: 10.1002/cncr.28220

Tung MC, Wu HH, Cheng YW, Wang L, Chen CY, Yeh S Der, Wu TC and Lee H (2013b) Association of epidermal growth factor receptor mutations with human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein expression in non-small cell lung cancer. *Cancer* 119:3367–3376. doi: 10.1002/CNCR.28220

Tung MC, Wu HH, Cheng YW, Wang L, Chen CY, Yeh S Der, Wu TC and Lee H (2013c) Association of epidermal growth factor receptor mutations with human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein expression in non-small cell lung cancer. *Cancer* 119:3367–3376. doi: 10.1002/cncr.28220

Usui T, Nishikomori R, Kitani A and Strober W (2003) GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* 18:415–428. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00057-8

Vats A, Trejo-Cerro O, Thomas M and Banks L (2021) Human papillomavirus E6 and E7: What remains? *Tumour Virus Res* 11:200213. doi: 10.1016/j.tvr.2021.200213

Villalobos P and Wistuba II (2017) Lung Cancer Biomarkers. *Hematol Oncol Clin North Am* 31:13. doi: 10.1016/J.HOC.2016.08.006

Wang HM, Lu YJ, He L, Gu NJ, Wang SY, Qiu XS, Wang EH and Wu GP (2020) HPV16 E6/E7 promote the translocation and glucose uptake of GLUT1 by PI3K/AKT pathway via relieving miR-451 inhibitory effect on CAB39 in lung cancer cells. *Ther Adv Chronic Dis*. doi: 10.1177/2040622320957143

Wang X, Zhang Z, Cao H, Niu W, Li M, Xi X and Wang J (2017) Human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein promotes proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells through Toll-like receptor 3 signaling pathway. *J Med Virol* 1–31. doi: 10.1002/jmv.24845

Wieland A, Patel MR, Cardenas MA, Eberhardt CS, Hudson WH, Obeng RC, Griffith CC, Wang X, Chen ZG, Kissick HT et al. (2020) Defining HPV-specific B cell responses in patients with head and neck cancer. *Nat* 2020 5977875 597:274–278. doi: 10.1038/s41586-020-2931-3

World Health Organization (2022) World Health Statistics. World Health, 1-177.

Wu DW, Liu WS, Wang J, Chen CY, Cheng YW and Lee H (2011) Reduced p21WAF1/CIP1 via alteration of p53-DDX3 pathway is associated with poor relapse-free survival in early-stage human papillomavirus-associated lung cancer. *Clin Cancer Res* 17:1895–1905. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2316

- Wu HH, Wu JY, Cheng YW, Chen CY, Lee MC, Goan YG and Lee H (2010) cIAP2 upregulated by E6 oncoprotein via epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway confers resistance to cisplatin in human papillomavirus 16/18-infected lung cancer. *Clin Cancer Res* 16:5200–5210. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0020
- Wu MF, Cheng YW, Lai JC, Hsu MC, Chen JT, Liu WS, Chiou MC, Chen CY and Lee H (2005) Frequent p16INK4a promoter hypermethylation in human papillomavirus- infected female lung cancer in Taiwan. *Int J Cancer* 113:440–445. doi: 10.1002/ijc.20597
- Wu Y, Yin Q, Zhou YL, He L, Zou ZQ, Dai XY and Xia W (2021) Evaluation of microRNAs as potential biomarkers in circulating HPV-DNA-positive non-small cell lung cancer patients. *Cancer Biol Ther* 22:136–148. doi: 10.1080/15384047.2021.1872155/SUPPL_FILE/KCBT_A_1872155_SM6432.DOCX
- Xu MJ, O. J and Ha H e PK (2021) Biology of Head and Neck Cancers - ClinicalKey. 1032–1042.
- Yang C, Mai H, Peng J, Zhou B, Hou J and Jiang D (2020) STAT4: An immunoregulator contributing to diverse human diseases. *Int J Biol Sci* 16:1575–1585. doi: 10.7150/ijbs.41852
- Yang JH, Li XY, Wang X, Hou WJ, Qiu XS, Wang EH and Wu GP (2017) Long-term persistent infection of HPV 16 E6 up-regulate SP1 and hTERT by inhibiting LKB1 in lung cancer cells. *PLoS One* 12:e0182775. doi: 10.1371/journal.pone.0182775
- Zhang L, Mao Z, Lai Y, Wan T, Zhang K and Zhou B (2020) A review of the research progress in T-lymphocyte immunity and cervical cancer. *Transl Cancer Res* 9:2026–2036. doi: 10.21037/tcr.2020.01.33
- Zhang R, Chen L, Cui YD and Li G (2019) The Association between Human Papillomavirus Infection and Smoking, Age, Gender in Lung Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Iran J Public Health* 48:1. doi: 10.18502/ijph.v48i1.777
- Zhang W, Wu X, Hu L, Ma Y, Xiu Z, Huang B, Feng Y and Tang X (2017) Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances epithelial-mesenchymal transition via STAT3 signaling pathway in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Res* 25:843–852. doi: 10.3727/096504016X14813880882288
- Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y and Li Y (2021) Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther* 2021 6:1–46. doi: 10.1038/s41392-021-00658-5
- Zhao M, Tan Y, Peng Q, Huang C, Guo Y, Liang G, Zhu B, Huang Y, Liu A, Wang Z et al. (2018) IL-6/STAT3 pathway induced deficiency of RFX1 contributes to Th17-dependent autoimmune diseases via

epigenetic regulation. *Nat Commun* 2018 9:1–14. doi: 10.1038/s41467-018-02890-0

Zhou C, Tuong ZK and Frazer IH (2019) Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. *Front Oncol*. doi: 10.3389/fonc.2019.00682

Zhou W, Cao Q, Peng Y, Zhang QJ, Castrillon DH, DePinho RA and Liu ZP (2009) FoxO4 Inhibits NF- κ B and Protects Mice Against Colonic Injury and Inflammation. *Gastroenterology* 137:1403. doi: 10.1053/J.GASTRO.2009.06.049

5 ARTIGO 2

TÍTULO: PERFIL DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE PULMÃO TRANSFECTADAS COM AS ONCOPROTEÍNAS DO PAPILOMAVIRUS HUMANO

Bianca de França São Marcos^A, Daffany Luana dos Santos^A, Georon Ferreira de Souza^C, Leonardo Carvalho de Oliveira Cruz^C, Bárbara Rafaela da Silva Barros^C, Silva, Guilherme Antonio de Souza^C, Oliveira, Talita Helena de Araújo^E, Cristiane Moutinho Lagos de Melo^C, Antonio Carlos de Freitas^{*}

^A Department of Genetics, Federal University of Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brasil - CEP: 50670-901.

^B Department of Genetics, Federal University of Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brasil - CEP: 50670-901

^C Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco – Av. Prof Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brasil – CEP: 50670901.

^D Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco – Av. Prof Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brasil – CEP: 50670901

^E Patrick G jonhston Centre for Cancer research, Queen’s University Belfast, Northern Ireland

^{*} Correspondente: Department of Genetics, Federal University of Pernambuco –

Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brasil - CEP: 50670-901.

acf_ufpe@yahoo.com.br ORCID: 0000-0002-4957-9549

Resumo: O câncer de pulmão é a neoplasia que mais leva a óbito no mundo. O papilomavirus Humano (HPV) é um dos fatores associado à sua carcinogênese, especialmente devido a ação dos seus oncogenes E5, E6 e E7. Em microambientes tumorais, o HPV tem como principalmente função a evasão do sistema imune nos cânceres cervicais, no entanto seu papel nos cânceres de pulmão permanece incerto. Com intuito de avaliar o papel do HPV no microambiente de tumores de pulmão, cultivamos in vitro a linhagem celular A549 transfectadas com E5, E6 e E7 de HPV16 e, co-cultivamos com células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Os linfócitos T CD4⁺ (CD25⁺/FoxP3), CD8⁺, CD56⁺, bem como os monócitos (CD14⁺) e a expressão de HLA-DR e suas moléculas co-estimuladoras (B7.1 e B7.2), foram analisados por citometria de fluxo. Houve um aumento de células T CD4⁺, bem como da atividade citotóxica das células CD8⁺ e CD56⁺, e uma diminuição

das células Treg, juntamente com o aumento de IL-2, IL4, IL-6, TNF- α e IL-10 na presença das oncoproteínas virais. Destacando uma atividade anti-tumoral de E5 de HPV16 nesta linhagem tumoral pulmonar, podendo ser utilizada em futuras estratégias terapêuticas contra cânceres de pulmão associados ao HPV.

Palavras chaves: Câncer de Pulmão; HPV; Microambiente tumoral; Resposta imunológica

1. Introdução

No mundo, o câncer de pulmão é a doença que mais leva à óbito e, uma das principais causas associada é o tabagismo, no entanto 15% dos casos de câncer de pulmão estão associadas a outros fatores, dentre eles, as infecções virais, como por exemplo, o papilomavirus humano (HPV) [1].

O HPV, é um vírus de DNA dupla fita, que possui ação tumorigênicas, devido a expressão de três diferentes oncoproteínas, E5, E6 e E7, que estão atuando inibindo diversos genes supressores tumorais, bem como ativando alguns fatores de transcrição que estão associadas à proliferação celular descontroladas em diversos cânceres anogenitais e de cabeça e pescoço [2,3].

A associação do HPV na carcinogênese pulmonar surgiu inicialmente em 1970, por Syjanen e colaboradores, desde então, vários estudos veem demonstrado a atividade deste vírus nos tumores de pulmão [4]. O câncer de pulmão pode ser classificado em dois grandes grupos: carcinoma de células pequenas (SCLC) e carcinoma de células não pequenas (NSCLC). Este último é subdividido em carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de células grandes [2]. O adenocarcinoma de pulmão, foi um dos tipos de tumores mais associados à infecção pelo HPV [5–7].

O HPV interage com o microambiente tumoral manipulando-o com objetivo principal de escapar do sistema imune do hospedeiro. O microambiente tumoral (TME) é uma estrutura dinâmica altamente interativa, composta por células cancerosas, células estromais não cancerosas, e células imunes [8,9]. A análise histopatológica de tumores sólidos revela que eles são infiltrados por células imunes inatas e adaptativas que pode ser encontrada no TME pulmonar e abrigam atividades promotoras e supressoras de tumores que podem prever o resultado clínico dos pacientes [10,11].

Dentre as células imunes inatas, destaca-se as células apresentadoras de antígenos, como por exemplo os macrófagos. Os macrófagos são importantes mediadores da resposta inflamatória inatas e adaptativas, principalmente no combate ao câncer [12]. Os macrófagos podem ser classificados em macrófagos do tipo M1 e M2, no qual o M1 possui um fenótipo pró-inflamatório, apresentando um efeito anti-tumoral no microambiente dos tumores. Em contrapartida, o M2 produz citocinas anti-inflamatórias e são consideradas

pró-tumorigênicas. Além disso, há os macrófagos associados a tumores (TAMs) que são derivados de monócitos e atraídos para o microambiente tumoral, principalmente no infiltrado imune de tumores de pulmão de células não pequenas. Alto nível de TAMs estão associados ao mau prognóstico em cânceres positivos para HPV devido a sua característica imunossupressora [12–14].

A resposta imune adaptativa envolve uma rede complexa de células, um exemplo de célula imune adaptativa bastante estudada em cânceres, são os linfócitos T. As células T podem ser divididas em diferentes subgrupos de acordo com diferentes métodos de classificação. Com base nos marcadores de superfície, as células T são divididas em CD4+ e CD8+. Com base na sua função, estas células são divididas em células T/linfócitos citotóxicos (CTLs), células T auxiliares (Th), células T reguladoras /supressoras (Treg) [15]

Neste estudo, tivemos como objetivo avaliar o perfil de resposta imune, simulando *in vitro* o microambiente tumoral pulmonar associado à infecção pelo HPV. Para isso transfectamos a linhagem A549 de adenocarcinoma de pulmão com os três principais oncogenes do HPV 16, e analisamos a resposta imune e a ativação dos linfócitos e macrófagos que foram co-cultivados com as células tumorais expressando as oncoproteínas virais. Com isso, será possível compreender melhor o papel do HPV no TME de adenocarcinoma de pulmão, dispondo de importantes informações que podem ajudar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Linhagem celular

A célula tumoral A549 é uma linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão, adequada para transfecções com características aderentes. Esta célula foi cultivada a 37°C em DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium – Invitrogen®) adicionado de 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibico®); L-Glutamina 1% (Sigma®) – DMEM completo.

2.2. Células mononuclear isoladas de sangue periférico (PBMC)

Cerca de 8-10ml de sangue periférico foram coletados em tubo de EDTA de doadores voluntários saudáveis. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas utilizando 1.077 g/mL de solução Ficoll (300 xg /30 min/ 26°C) (GE healthcare®). Após duas lavagens com PBS 1x, as células foram ressuspensas em DMEM com 10% de SBF, L-Glutamina 1% e antibióticos. As células obtidas de cada voluntário foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² (24 horas/ CO₂ 5%/ 37°C). no dia seguinte, os linfócitos suspensos foram centrifugados em PBS 1x (200 xg/10min) e contados utilizando o contador de

células Countess 3 (Thermo Fisher ®). Do mesmo frasco de cultura, os macrófagos aderidos foram removidos com a ajuda de tripsina 2%, seguida pela centrifugação com PBS 1x (200 xg/ 10min) e contadas (Countess 3). Os linfócitos e macrófagos foram plaqueados (placas de 48 poços/10⁵ de células por poço).

2.3. *Produção e transfecção de oncoproteínas do HPV*

Os oncogenes E5, E6 e E7 do HPV 16 foram baseadas nas sequencias de referência depositada no GenBank (K02718.1) foram clonadas no vetor de expressão para células de mamíferos, pcDNA 3.1(+). Os clones foram confirmados por análise de restrição e submetidos a sequenciamento automático utilizando o kit de sequenciamento de ciclo ABI PRISM BigDye™ terminator v3.1 (Applied Biosystems ®). Após a confirmação da clonagem, o DNA dos vetores recombinantes foi isolado pelo Kit Plus Maxi (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Foi realizado uma transfecção em células de adenocarcinoma de pulmão (A549), em placas de cultura celular de 48 poços, onde 10⁵ de células tumorais foram semeadas em 1 ml de meio DMEM completo. Os vetores recombinantes foram transfectados utilizando o reagente de transfecção Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher ®). As células tumorais foram transfectadas com 250 ng/ul de plasmídeo com cada oncogene por poço. Todos os experimentos foram realizados em cinco repetições experimentais.

2.4. *Estimulação in vitro de PBMC*

Para a estimulação in vitro com PBMCs, foram plaqueadas as células tumorais A549 (10⁵ células / poço) e após 80 % de confluência, linfócitos ou monócitos foram inseridos nas culturas para investigar os estímulos imunológicos. Os linfócitos e monócitos obtidos conforme descrito anteriormente, foram cultivados separadamente em placas de 48 poços previamente semeadas com as células tumorais seguindo o seguinte esquema de cultivo exposto na Figura 1. Além disso, linfócitos ou macrófagos foram cultivados sem a presença de estímulos como controle negativo. As células cultivadas foram mantidas por 24 horas sob estímulos das células tumorais com e sem transfecção e após esse período as células imunes foram marcadas para imunofenotipagem, e o sobrenadante da cultura foram armazenadas para pesquisa de citocinas.

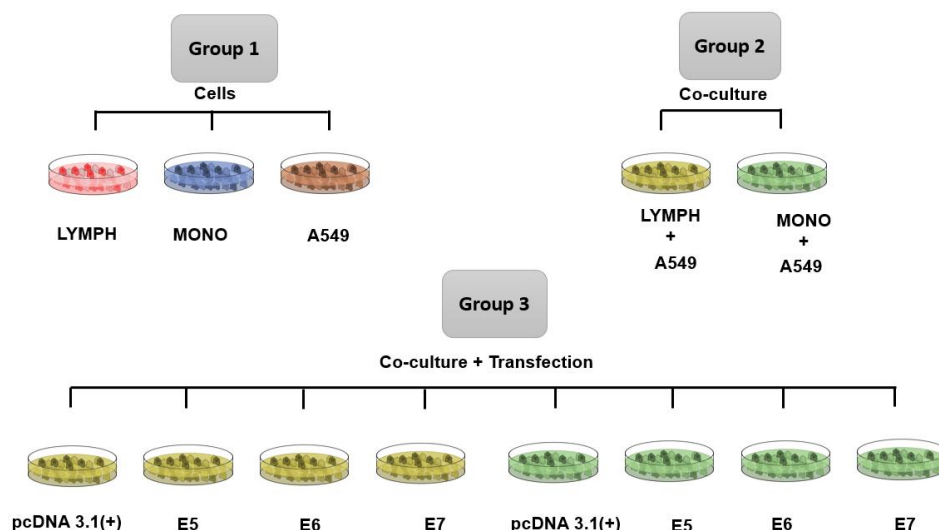


Figura 1. Esquema dos diferentes grupos experimentais

2.5. *Imunofenotipagem de PBMCs estimuladas in vitro com células tumorais de pulmão e investigação de citocinas produzidas no sobrenadante de cultura*

O ensaio de imunofenotipagem foram conduzidos in vitro para investigar a resposta imune induzidas por células tumorais em PBMCs, por meio de anticorpos de superfície anti-CD3 (FITC ou APC), -CD4 (FITC ou APC), -CD8 (FITC ou PE), -CD56 (PEcy5.5 ou APC), -CD25 (PercP), -CD14 (FITC), -B7.1 (PE), B7.2 (APC), HLA-DR (PercP). Anticorpos intracelulares anti- FoxP3 (PE), -Perforina (FITC), granzima (PercP), -IL-17 (PE), -IFN (APC), -IL-10 (PE), também foram utilizados. Para identificação específica da linhagem A549, foi utilizado o anticorpo específico anti-CD90 (todos os anticorpos utilizados foram da BD®). As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17 foram investigadas utilizando o Kit CBA (BD ®) a partir do sobrenadante da cultura. Todas as aquisições foram realizadas por citometria de fluxo (Accuri BD®), onde 30.000 eventos foram realizados para investigação celular e 2.100 eventos para investigação humoral. As análises foram realizadas utilizando a plataforma de citometria Accuri.

2.6. *Análise estatística*

A distribuição dos dados foi verificada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Todas as amostras que adotaram distribuição normal foram submetidas ao teste Ordinary One-way ANOVA. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism versão 9.0.0 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, EUA).

3. Resultados

3.1. Perfil de estimulação de Linfócitos T CD4+

Na investigação do perfil de células imunológicas estimuladas com oncoproteínas do HPV, os linfócitos e monócitos co-cultivados *in vitro* juntamente com células tumorais de pulmão (A549) transfectadas com vetor que expressam os genes E5, E6 e E7 do HPV16, demonstraram um aumento dos linfócitos T CD4+ frente ao estímulo com as oncoproteínas em comparação com os linfócitos sozinhos e com os linfócitos co-cultivados com a célula tumoral sem a presença dos genes virais (p valor < 0,0001) (Figura 1A). No entanto, ao analisar o perfil do linfócito supressor Treg, este diminuiu consideravelmente, principalmente quando as células tumorais expressaram a oncoproteína E5 do HPV 16 (p valor <0,01) (Figura 1B).

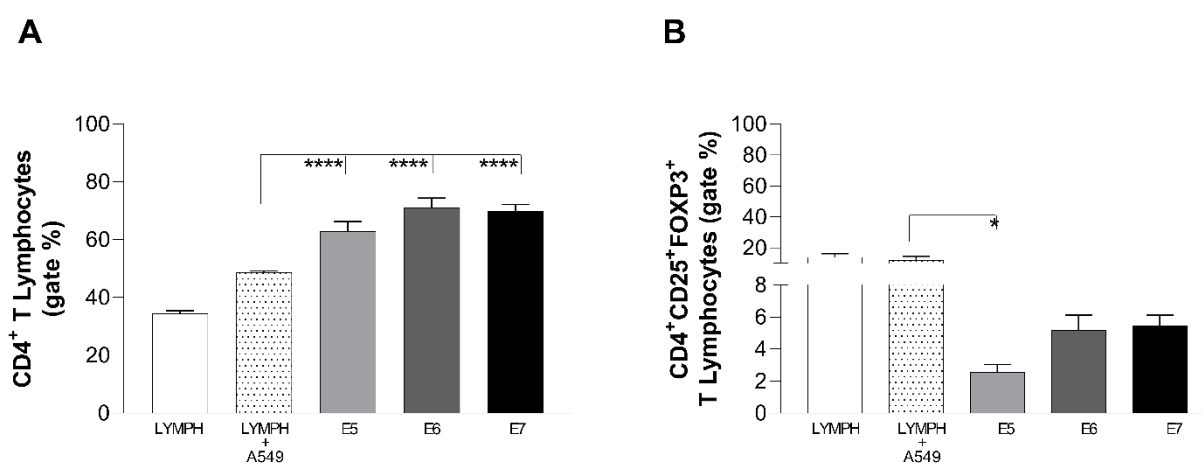


Figura 2. Perfil de estimulação de linfócitos T CD4+ cultivados com a linhagem celular de tumores de pulmão A549. Os grupos experimentais foram compostos apenas por linfócitos (LYMPH), linfócitos cultivados com A549 (LYMPH+A549) e linfócitos cultivados com A549 transfectados com E5, E6 e E7. A – Contagem diferencial de linfócitos T CD4+. B- Contagem diferencial do subconjunto CD25+ de linfócitos T CD4+ e seu perfil de expressão intracelular da molécula supressora FOXP3. Os asteriscos representam a significância estatística (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). Barras de erro: erro padrão entre as amostras.

3.2. Perfil de estimulação de linfócitos T citotóxicos

Na análise da ação citotóxica da célula T CD8+ contra as células tumorais com e sem os oncogenes não mostraram mudanças na contagem dessas células (Figura 2A), no entanto há um aumento significativo da enzima perforina dentro das células T CD8+ quando estimuladas com as células tumorais transfectadas com E6 e E7, além de uma diminuição sem valor estatístico significativo de granzima dentro dos linfócitos T CD8+ co-cultivadas com E6 e E7 (Figura 2B). Resposta mais acentuada foi encontrada para os linfócitos T Natural

Killer (CD56+) quando cultivados com a linhagem A549 transfectadas ou não com os oncogenes. Há um aumento desses linfócitos, especialmente quando estimulados com a célula tumoral de pulmão contendo o gene E5 do HPV (Figura 2C), seguido pelo aumento da capacidade de resposta citotóxica devido à maior expressão de perforina e granzima dentro dos linfócitos T NK estimulados com os oncogenes virais (p valor<0,001).

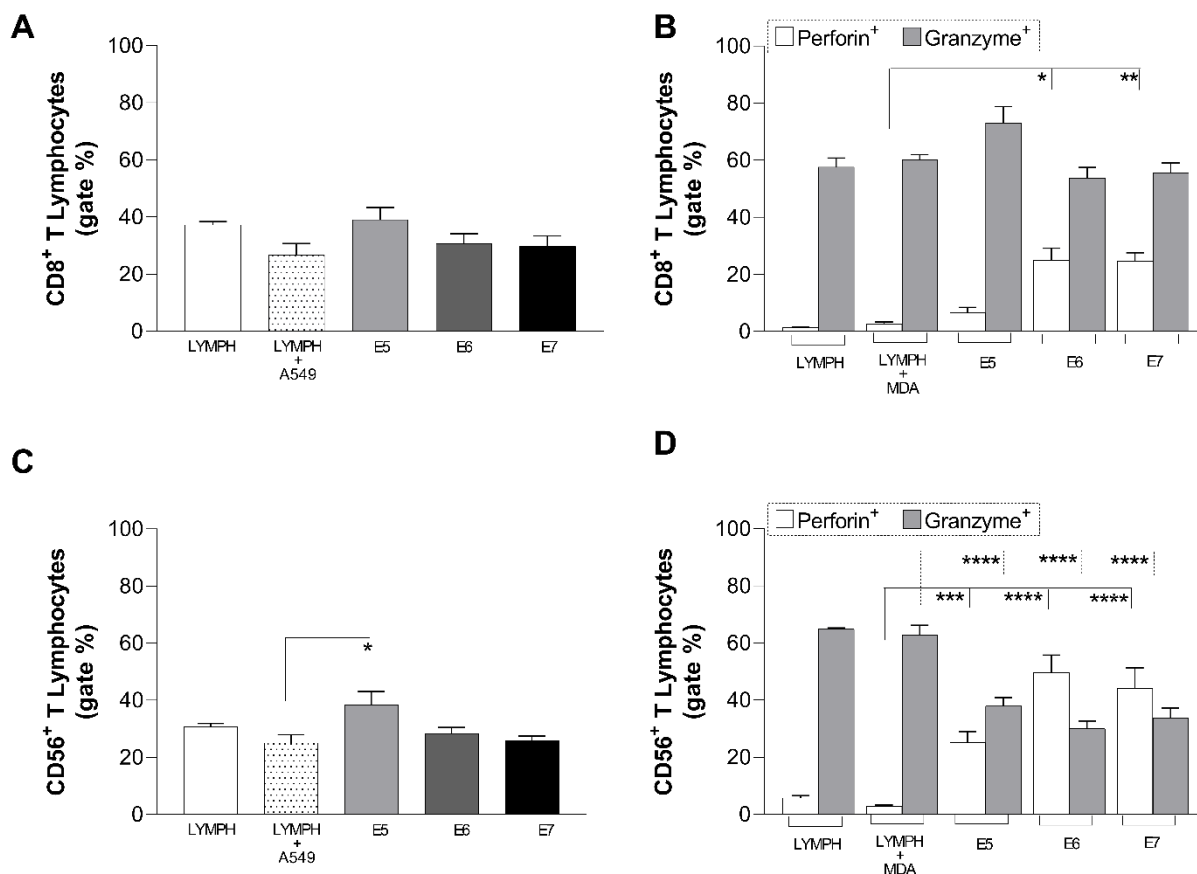


Figura 3. Perfil de estimulação de linfócitos T citotóxico CD8⁺ e CD56⁺ cultivados com a linhagem tumoral de pulmão A549. Os grupos experimentais foram compostos apenas por linfócitos (LYMPH), linfócitos cultivados com A549 (LYMPH+A549) e linfócitos cultivados com A549 transfectados com E5, E6 e E7. A- Contagem diferencial de linfócitos T CD8⁺. B- Produção intracelular de perforina e granzima dentro das células T CD8⁺. C- Contagem diferencial de linfócitos T CD56⁺. D- Produção intracelular de perforina e granzima dentro de linfócitos T CD56⁺. Os asteriscos representam a significância estatística (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). Barras de erro: erro padrão entre as amostras.

3.3. Perfil de estimulação de monócitos CD14⁺

O perfil de resposta imune induzida por monócitos contra as células tumorais mostrou uma supressão promovida pelas oncoproteínas E6 e E7 (figura 3A), seguida pela diminuição da resposta co-estimulatória

pelas moléculas B7.1 e HLADR, principalmente diante a presença dos genes E6 e E7, diferentemente da oncoproteína E5 que aumentou o estímulo desses monócitos (Figura 3 B e D). No entanto, ao avaliarmos B7.2 foi possível observar um aumento dessas células na presença das oncoproteínas do HPV16 (Figura 3C). Houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

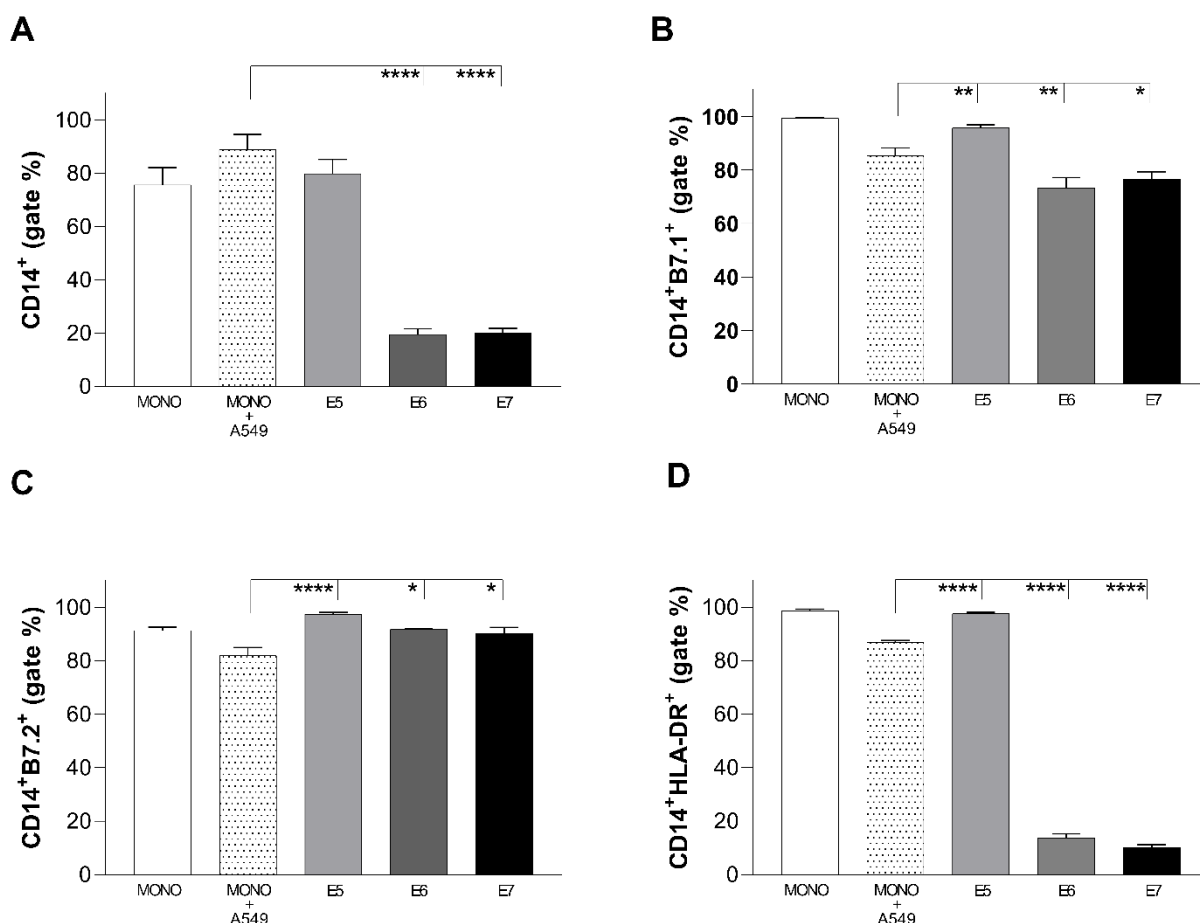


Figura 4. Perfil de estimulação de monócitos CD14⁺ cultivados com a linhagem A549 com e sem a presença das oncoproteínas do HPV16. Grupos experimentais: somente monócitos (MONO), monócitos cultivados com A549 (MONO+A549) e monócitos cultivados com A549 transfectados com os genes E5, E6 e E7 do HPV16. A- contagem diferencial dos monócitos CD14⁺. B- Produção da molécula de superfícies co-estimuladora B7.1. C- Produção da molécula de superfície co-estimuladora B7.2. D- Produção da molécula de superfície co-estimuladora HLADR. Os asteriscos representam a significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Barras de erro: erro padrão entre as amostras.

3.4. Citocinas intracelular produzidas por linfócitos T CD4⁺ contra células tumorais de pulmão

A produção de citocinas foi investigada intracelularmente nos linfócitos T CD4⁺, na qual apresentou uma decaimento na produção de IFN, IL-17 e IL-10 na presença das oncoproteínas do HPV16, exceto na

produção de IL-17 na presença do gene E5 que aumentou significativamente ($p < 0,0001$) (Figura 4 A, B e C).

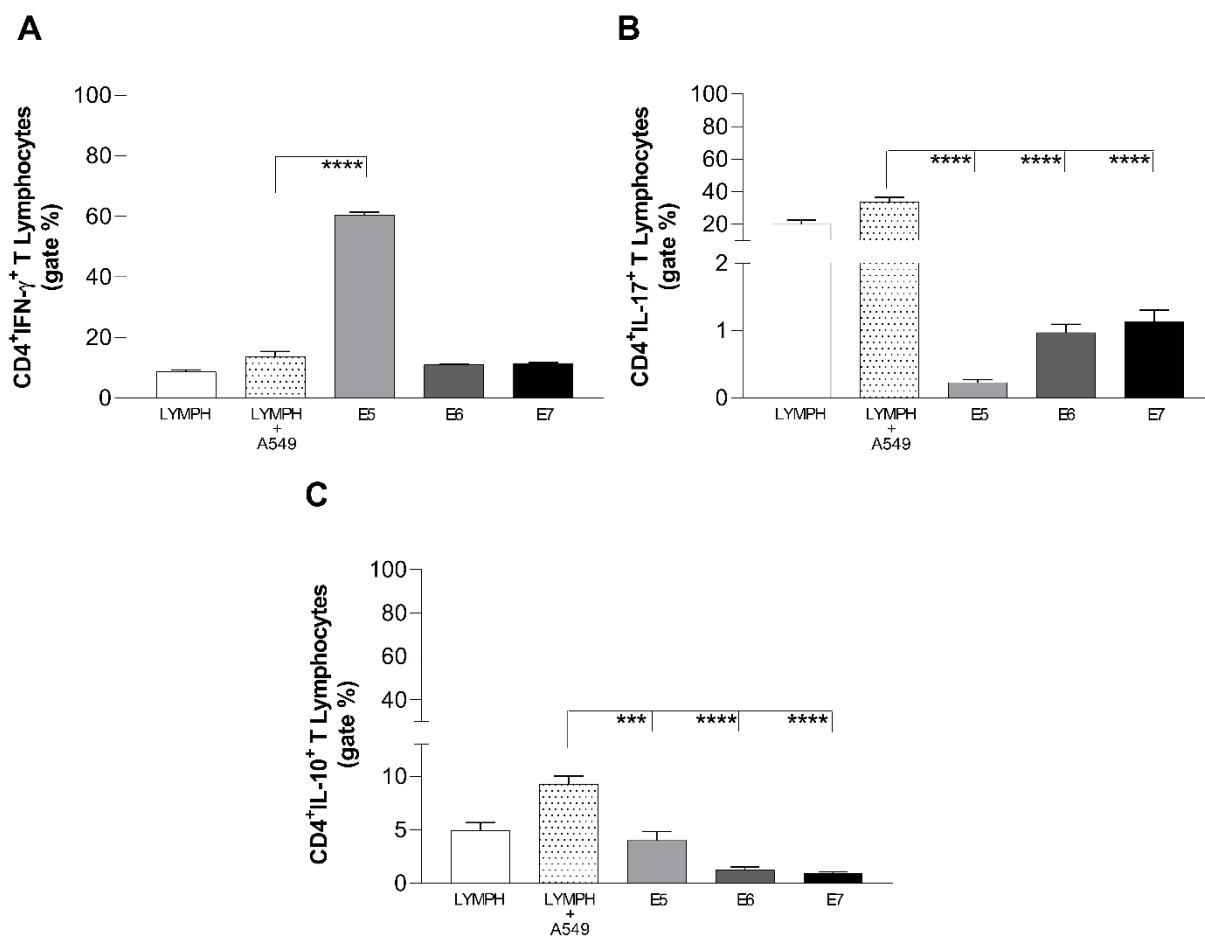


Figura 5. Produção de citocinas intracelular por linfócitos T CD4⁺ contra contra células tumorais de pulmão na presença e ausência de E5, E6 e E7 do HPV16. Grupo de estudo: linfócitos sozinhos (LYMPH), linfócitos cultivados com A549 (LYMPH+A549), linfócitos cultivados com A549 transfectados com E5, E6 e E7. A- produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺. B- Produção de IL-17 por linfócitos T CD4⁺. C- Produção de IL-10 por linfócitos T CD4⁺. Os asteriscos representam a significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Barras de erro: erro padrão entre as amostras.

3.5. Citocinas intracelular produzidas por linfócitos T CD8⁺ contra células tumorais de pulmão

A produção de citocinas intracelulares, como o IFN- γ , IL-17 e IL-10, pelos linfócitos T CD8⁺ demonstraram ser mais produzidas diante os estímulos com as oncoproteínas do HPV16 em comparação com os linfócitos sozinhos e os linfócitos cultivados apenas com as células tumorais sem a presença das proteínas do HPV (p valor $< 0,001$) (Figura 4 A, B e C).

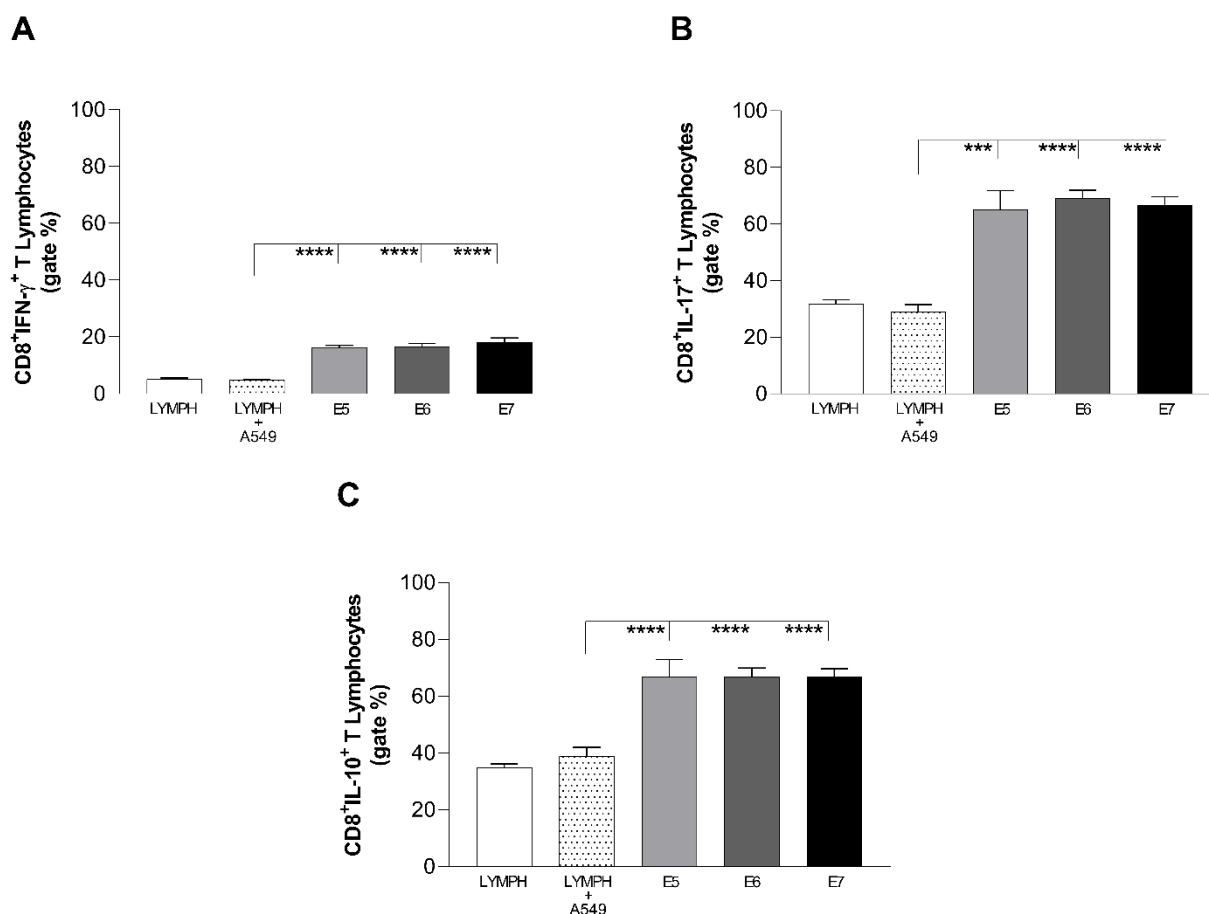


Figura 6. Citocinas intracelular produzidas por linfócitos T CD8⁺ contra células A549 com e sem a presença das oncoproteínas do HPV. Grupo de estudo: linfócitos sozinhos (LYMPH), linfócitos cultivados com A549 (LYMPH+A549), linfócitos cultivados com A549 transfectados com E5, E6 e E7. A- Produção de IFN-γ por linfócitos T CD8⁺. B- Produção de IL-17 por linfócitos T CD8⁺. C- Produção de IL-10 por linfócitos T CD8⁺. Os asteriscos representam a significância estatística (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). Barras de erro: erro padrão entre as amostras.

3.6. Citocinas intracelular produzidas por linfócitos T CD56⁺ contra células tumorais de pulmão

Houve uma diminuição significativa de IFN-γ produzido intracelularmente pelas células CD56⁺ co-cultivadas com as células tumorais que apresentaram as oncoproteínas do HPV, principalmente as oncoproteínas E6 e E7 (Figura 5A). Resultado semelhante foi encontrado referente a produção de IL-17 pelos linfócitos T CD56⁺, onde as oncoproteínas virais foi responsável pela diminuição da produção intracelular dessa citocina (Figura 5B). Porém, ao analisar a produção de IL-10 dentro dessa célula imunológica, foi observado um aumento estatisticamente significativo (p<0,01) na produção intracelular dessas citocinas quando as células tumorais apresentaram as oncoproteínas E6 e E7 do HPV16 (Figura 5C)

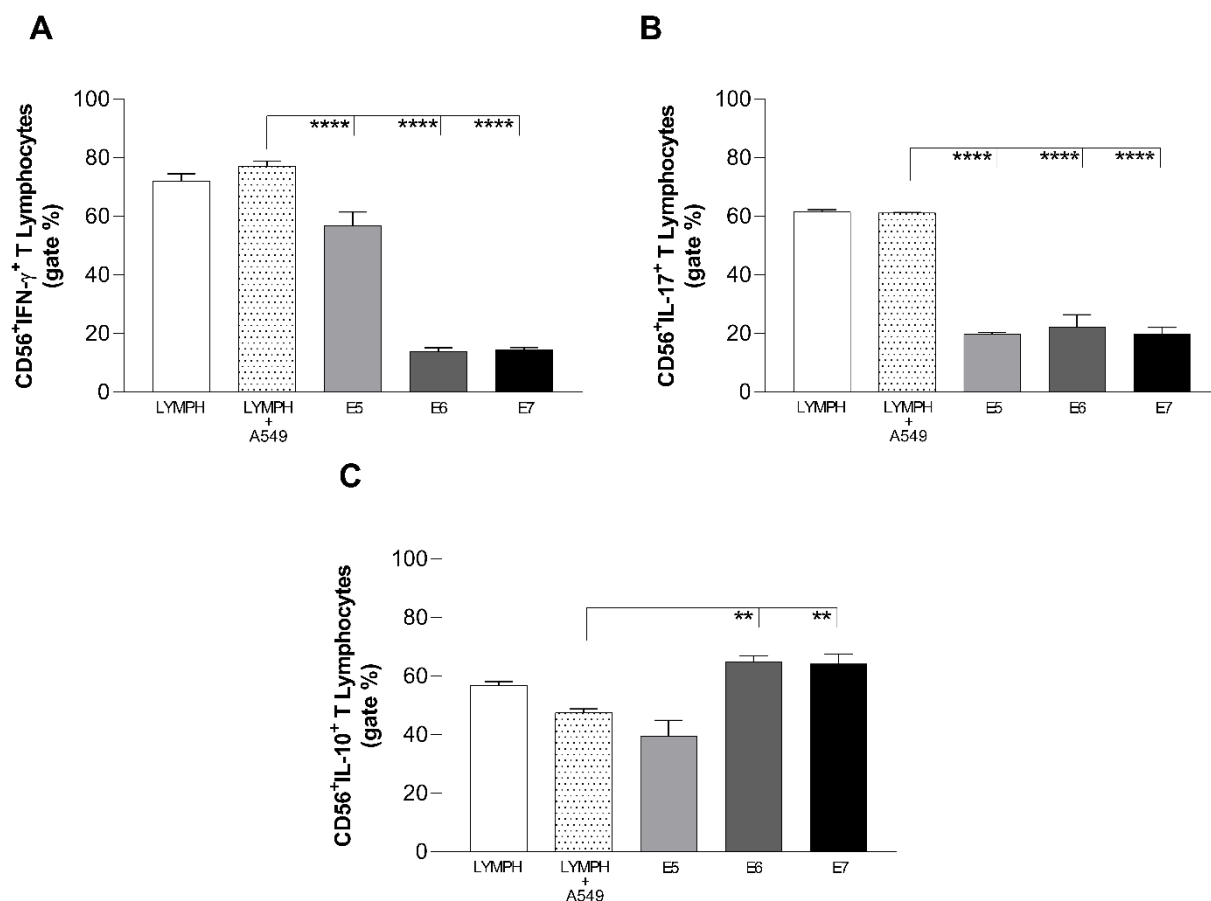


Figura 7. Citocinas intracelular produzidas por linfócitos T CD56⁺ contra células A549 com e sem a presença das oncoproteínas do HPV. Grupo de estudo: linfócitos sozinhos (LYMPH), linfócitos cultivados com A549 (LYMPH+A549), linfócitos cultivados com A549 transfectados com E5, E6 e E7. A- Produção de IFN- γ por linfócitos T CD56⁺. B- Produção de IL-17 por linfócitos T CD56⁺. C- Produção de IL-10 por linfócitos T CD56⁺. Os asteriscos representam a significância estatística (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). Barras de erro: erro padrão entre as amostras.

3.7. Citocinas produzidas no sobrenadante de linfócitos T e células tumorais de pulmão

A citocinas produzidas pelos linfócitos T juntamente com as células A549 e liberadas no sobrenadante foram comparadas com os linfócitos T cultivados com as células tumorais que expressavam as oncoproteínas do HPV16. Os resultados demonstraram que os linfócitos cultivados com as células tumorais transfectadas promoveram um aumento na liberação de todas as citocinas avaliadas neste estudo (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN, IL17), havendo diferença na liberação diante às diferentes oncoproteína transfectadas (Figura 7 A-G).

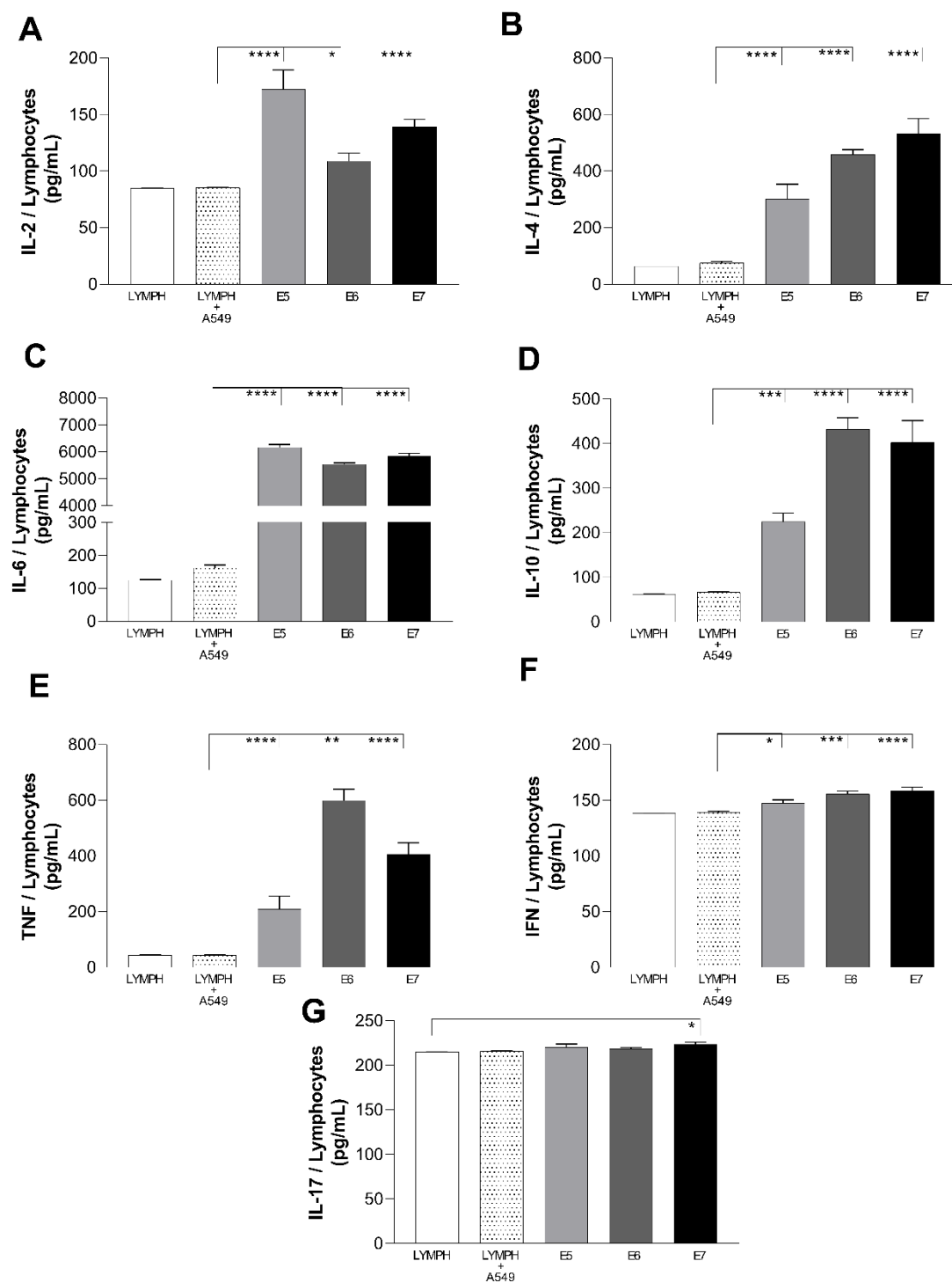


Figura 8. Citocinas presente no sobrenadante de linfócitos T cultivados com células tumorais de pulmão transfectadas ou não com as oncoproteínas do HPV. A- G – citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ e IL-17, respectivamente. Os asteriscos representam a significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Barras de erro: erro padrão entre as amostras.

3.8. *Citocinas produzidas no sobrenadante de monócitos e células tumorais de pulmão*

O resultado das culturas de monócitos e da linhagem A549 transfectadas com as oncoproteínas do HPV16, mostrou um aumento significativo na liberação de citocinas, principalmente de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α (Figura 7 A-E). Houve, também, um leve aumento significativo de IFN- γ no sobrenadante dos cultivos de monócitos juntamente com as células tumorais transfectadas com E7 do HPV16 (Figura F). No entanto, não houve diferença estatística significativa na produção de IL-17 entre os grupos avaliados (Figura G).

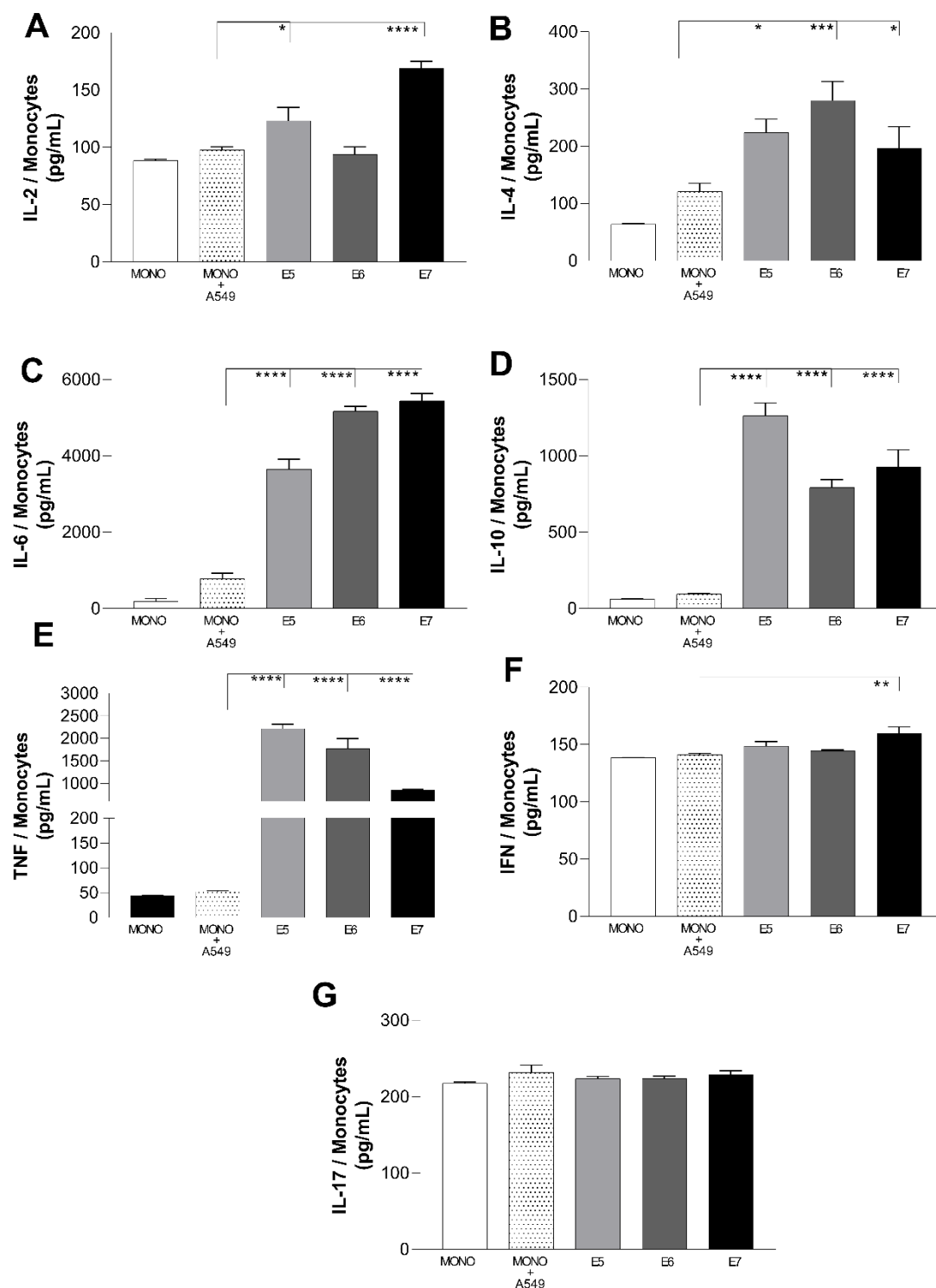


Figura 9. Citocinas presente no sobrenadante de monócitos cultivados com células tumorais de pulmão transfectadas ou não com as oncoproteínas do HPV. A- G – citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ e IL-17, respectivamente. Os asteriscos representam a significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Barras de erro: erro padrão entre as amostras.

4. Discussão

Nos últimos anos a função do microambiente tumoral na iniciação e progressão do carcinoma pulmonar primário tem sido mais explorado, principalmente devido à promessa na melhora do prognóstico dos pacientes, como também, no futuro desenvolvimento de novas imunoterapias [13]. Além disso, estudos recentes têm apontado que o HPV pode desempenhar um papel nos cânceres de pulmão, no entanto, pouco se sabe ainda dessa correlação, principalmente se o vírus pode estar modulando respostas imunes no microambiente tumoral deste câncer [16,17]. Neste sentido, este estudo buscou avaliar o papel das principais oncoproteínas do HPV16 em linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão na modulação das principais células imunológicas encontradas em um microambiente tumoral.

Nos NSCLC, a infiltração de células imunes sugere que o TME contribui para a carcinogênese pulmonar e que esses tumores são compostos em grande parte por linfócitos T e B, bem como macrófagos, células Natural Killer (NK) e células dendríticas [18]. Em nosso estudo, avaliamos a atividade de linfócitos T CD4+, Treg, T CD8+ e T NK (CD56+), bem como a atividade de monócitos (CD14+) e a produção de citocinas por essas células quando cultivadas juntamente com a linhagem celular A549 com e sem a presença das oncoproteínas do HPV16. O qual foi possível observar que as oncoproteínas virais, produzidas pelas células tumorais de pulmão, modularam a atividade dessas células imunes.

Atualmente, as células T CD4+ tem ganhado mais atenção na imunoterapia contra o câncer, pois não são somente importantes para promover a ativação de células T CD8+, mas também são capazes de matar células tumorais diretamente ou indiretamente [19]. Analisamos o papel de células T CD4+ em linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão e observamos que houve um aumento dessas células na presença de células tumorais de pulmão, e uma presença ainda maior quando os tumores apresentavam as oncoproteínas do HPV16. Em estudos realizados no câncer cervical, o padrão de infiltração de células T CD4+ nos tumores cervicais é reduzido em lesões de baixo e alto grau em relação ao tecido normal, e maior infiltração no câncer [20]. Em geral, este aumento de células T CD4+ em cânceres positivos para HPV, está associado com um efeito positivo no prognóstico do paciente.

Um dos subtipos das células T CD4+, são as células T CD4+ reguladoras (Treg) que expressam os fatores de transcrição FoxP3, CD4+ e CD25+. As células Treg apresentam papel importante no processo de carcinogênese, principalmente devido a sua função imunossupressora em tumores maligno. Com isso, espera-

se que estas células possuam uma maior infiltração em tecidos tumorais. No entanto, ao avaliarmos o perfil dessas células *in vitro*, quando estimuladas com a linhagem de adenocarcinoma de pulmão transfectadas com os oncogenes do HPV 16, foi observado uma diminuição das células Treg na presença das oncoproteínas virais, principalmente quando o gene E5 do HPV 16 foi expresso nas células de câncer de pulmão. Estes resultados sugerem que as oncoproteínas virais podem regular negativamente as células Treg, diferentemente do que geralmente ocorre em cânceres associados ao HPV, que são encontrados mais expressos nos cânceres cervicais, o qual atuam nos mecanismos de evasão imune [20,21].

Além dos linfócitos T CD4+, investigamos, também, as células T citotóxicas CD8+ e CD56+ e sua atividade citotóxica em linhagem celular de tumor de pulmão transfectadas com as oncoproteínas E5, E6 e E7 do HPV. Estas células imunes adaptativas são capazes de se infiltrar em lesões e eliminar células infectadas por vírus [20]. Quanto às células T CD8+, seu aumento nos cânceres associados ao HPV, estão correlacionados com o melhor prognóstico do paciente, como visto em estudos realizados em câncer de cabeça e pescoço [22]. Em nosso estudo, também houve um aumento das células T CD8+ nas células tumorais de adenocarcinoma de pulmão que apresentavam as oncoproteínas virais, destacando-se a oncoproteína E5 do HPV 16, no entanto não houve significância estatística. Esses resultados foram similares para as células T CD56+, porém houve diferença estatística significativa entre os grupos de células A549 que expressavam a oncoproteína E5 em comparação com as células tumorais sem a presença do HPV.

Nossos resultados referentes as células T NK (CD56+), corroboram com estudos realizados em câncer de orofaringe, onde houve um aumento dessas células em pacientes que apresentavam tumores de orofaringe HPV+, o qual, também, foi associado a uma melhor sobrevida desses pacientes, demonstrando o efeito anticancer dessas células no microambiente de tumores infectados pelo HPV [23,24]. Além disso também se observou uma maior atividade citotóxica dessas células, através da produção de granzima B principalmente nos tumores associados ao HPV, o que pode contribuir para um estado favorável desses pacientes [24].

A granzima B e a perforina são importantes enzimas liberadas por células citotóxicas, como as células T CD8+ e células NK T. essas enzimas são responsáveis por montar uma resposta imune contra o câncer. A interação entre essas duas enzimas fornece uma função citolítica efetiva, pois a perforina ajuda a criar canais através da membrana permitindo que a granzima B entre na célula alvo. A resistência ao ataque dessas células citotóxicas por mecanismos de evasão imune é essencial para a sobrevivência e proliferação do câncer de pulmão [25]. A atividade citotóxica dessas células foi observada *in vitro* em nosso estudo, no qual as células presentes no PBMC de pacientes saudáveis foram co-cultivadas com células de câncer de pulmão transfectadas

com os genes do HPV 16. Nossos resultados demonstraram um alta atividade citotóxica tanto nas células T CD8⁺ quanto nas células T CD56⁺ quando associadas a presença das oncoproteínas virais, demonstrando uma maior produção de perforina principalmente nas células T CD56⁺ e, um aumento de granzima nas células T CD8⁺ quando os oncogenes foram expressos pelas células tumorais. Estes resultados sugerem que a presença do HPV no câncer de pulmão, do tipo adenocarcinoma, exerce uma função anti-câncer, devido à uma maior atividade citolítica de CD8⁺ e CD56⁺.

A produção de citocinas também possui um papel importante na atividade citotóxica desses linfócitos. Neste sentido, avaliamos a produção de IFN, IL-10 e IL17 pelas células T CD4⁺, T CD8⁺ e T CD56⁺. O IFN é regulado negativamente quando associado ao HPV, devido a sua capacidade do HPV ativar a evasão imune principalmente na presença das oncoproteínas E6 e E7 [26], achados este que foi observado também em nosso estudo realizado em células tumorais de pulmão, onde a expressão de interferon foi reduzida nas células T CD4⁺ e T CD56⁺, incubadas com as células tumorais de pulmão que expressavam E6 e E7. No entanto, resultado inverso foi observado quando estas células foram cultivadas com a linhagem de câncer de pulmão expressando o E5 do HPV16, onde houve um aumento na produção de IFN- γ , principalmente, nas células T CD4⁺. Este resultado sugere que a oncoproteína E5 pode ter uma ação anti-tumoral quando associado ao câncer de pulmão durante o início da infecção viral quando o vírus está no seu estado episomal, pois o gene E5 geralmente é perdido depois da integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro [27]. Ou seja, a ativação do IFN- γ na presença de E5 do HPV16, pode contribuir para um microambiente anti-tumoral, pois essa citocina inibe a angiogênese e a proliferação celular, além de promover a apoptose das células cancerígenas, bem como ativar o sistema imune adaptativo contribuindo para o processamento e apresentação de antígenos eficazes [25].

A citocina IL-17 é secretada principalmente por células Th17. A função dessa citocina no câncer ainda não está totalmente elucidada, podendo tanto promover o desenvolvimento do tumor, induzindo a angiogênese e suprimindo as funções imunes, como também está associada a respostas anti-tumorais através do recrutamento de células imunes para o tumor e ativando as células T CD8⁺ [15]. Em cânceres associados ao HPV, esta citocina medeia a resposta imune que aumenta a gravidade da doença, criando uma condição hiper inflamatória que leva ao câncer [28]. Como foi relatado por Jinsen Xue (2018), que observou em pacientes com câncer cervical associado a infecção pelo HPV, que as células Th17 presente nos tumores, bem como a citocina IL-17, apresentaram um aumento a medida que as lesões cervicais progredia, sugerindo que esta

citocina pode contribuir para a progressão da doença [29]. Nós identificamos uma diminuição dessa citocina nos linfócitos T CD4⁺ e T NK quando co-cultivadas com a linhagem celular de câncer de pulmão que expressavam as oncoproteínas do HPV16, ocorrendo uma diminuição mais significativa quando as células tumorais expressaram o gene E5. Este achado pode indicar que a presença das oncoproteínas do HPV no câncer de pulmão pode exercer uma supressão de IL-17. No entanto, devido a ação ambígua desta citocina nos cânceres, é preciso mais estudos para elucidar o efeito desta citocina no microambiente tumoral do pulmão associado ao HPV.

Dentre as citocinas avaliadas nesse estudo, a IL-10 é a citocinas que mais está associada à uma função anti-inflamatória nos cânceres, além de também está associada a evasão imune devido a sua ação de imunossupressão, no entanto sua função no câncer ainda é controversa. Nos cânceres cervicais associados ao HPV, o nível de IL-10 tendem a aumentar devido a atividade das proteínas E2, E6 e E7, enquanto que esta citocina também estimula a expressão de E6 e E7, criando um ciclo vicioso que pode favorecer um microambiente imunossuprimido, facilitando a progressão da infecção e do câncer [30]. Observamos resultados similares, onde as oncoproteínas do HPV expressas nas células tumorais de câncer de pulmão aumentou a produção de IL-10 por células T CD8⁺ e CD56⁺, além de haver um aumento destas citocinas no sobrenadante destas células tumorais transfectadas co-cultivada tanto com linfócitos como monócitos. No entanto quando avaliamos essa citocina dentro das células T CD4⁺, foi observado que as oncoproteínas virais inibiu a produção de IL-10 em comparação com as células tumorais de pulmão sem as proteínas do HPV, principalmente na presença de E6 e E7. O que sugere que esta interleucina está sendo produzida e liberada principalmente por linfócitos CD8⁺ e CD56⁺ em adenocarcinoma de pulmão infectados pelo HPV. O aumento de IL-10 em canceres de pulmão associados ao HPV também foi sugerido por Sung e Lee (2013), no qual sugeriram que a secreção desta citocina promove a progressão dos tumores pulmonares, impactando negativamente no prognóstico do paciente [31].

Outras citocinas foram avaliadas no sobrenadantes das células tumorais de pulmão transfectadas com o HPV16 e co-cultivadas com linfócitos, dentre elas IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-17. Todas as citocinas foram encontradas em maior quantidade nas culturas de células tumorais que apresentavam as oncoproteínas do HPV, destacando-se IL-2, IL-4, IL-6 e TNF- α com maior diferença significativa em comparação com as células tumorais de pulmão que não apresentavam as oncoproteínas do vírus. Estas citocinas estão associadas com a diferenciação de células T CD4⁺ em Th1 (IL-2, TNF- α e IFN- γ), Th2 (IL-4 ou IL-10), Th17 (IL-17 e IL-6) e Treg (IL-10) [14]. Nos cânceres infectados pelo HPV há uma resposta Th1 e Th2 aumentada, que são

caracterizadas pela secreção de citocinas pró-tumorigênicas [32]. Como visto anteriormente, a resposta Th17 e Treg, também estão associadas com a progressão das lesões cervicais associadas ao HPV [29,32,33]. Perfil semelhantes dessas citocinas, também foram encontradas nos sobrenadantes de monócitos cultivados juntamente com as células cancerígenas de pulmão contendo as proteínas do HPV. Ou seja, o aumento dessas citocinas secretadas tanto por linfócitos quanto por monócitos em células de adenocarcinoma de pulmão expressando as oncoproteínas do HPV podem estar associadas com a progressão das células cancerígenas.

As células apresentadoras de antígenos (APCs), entre eles os macrófagos, expressam o complexo principal de histocompatibilidade classe I e II (MHC I e II) e moléculas co-estimuladoras, incluindo CD80 e CD86 (B7.1 e B7.2, respectivamente), o qual estimula a apresentação de antígenos às células T [34]. Para a avaliação da via de apresentação de antígeno por MHC classe II, foi quantificado a expressão do HLA-DR, que é um receptor de superfície celular MHC classe II codificado pelo complexo antígeno leucocitário humano. Além da quantificação da expressão das moléculas coestimuladoras B7.

Foi demonstrado anteriormente que até 60% dos tumores de cabeça e pescoço evitam o reconhecimento imunológico por meio da regulação negativa ou perda de HLA [35]. No entanto em câncer cervicais associados ao HPV, observou-se uma expressão constitutiva de HLA-DR em linhagem celular ME180, no entanto as células T CD4⁺ só reconheceu o tumor HPV⁺ após tratamento com IFN- γ , sugerindo que esta citocina aumenta os componentes de apresentação de antígenos [36].

Em um estudo realizado por Sato e colaboradores (2022), foi observado, também, um aumento na expressão das moléculas coestimuladoras B7 em câncer de pulmão de células não pequenas, além disso o status de CD80 foi associado ao mau prognóstico dos pacientes, devido à sua associação com o escape do ataque imunológico possivelmente através da sinalização de CTLA-4 e/ou PD-L1 nos carcinomas de pulmão (Sato, 2022). Quanto a expressão dessas moléculas no epitélio cervical normal, foi observado a expressão de CD86, no entanto, na presença do HPV-16 houve uma diminuição na expressão de CD86 [37].

Nas células tumorais de pulmão transfectadas com E5, E6 e E7 do HPV16, observamos que houve uma diminuição considerável de monócitos (células T CD14⁺) na presença de E6 e E7, bem como houve uma diminuição na expressão de HLA-DR nessas células imunes quando co-cultivadas com células de adenocarcinoma de pulmão contendo E6 e E7 do HPV16. Em contrapartida, a oncoproteína E5 foi capaz de manter os monócitos no microambiente tumoral de pulmão, aumentando também a expressão de HLA-DR. O que demonstra uma diminuição na ativação da resposta imune no câncer de pulmão expressando E6 e E7 do HPV, diferentemente da oncoproteína E5, o qual podemos sugerir que o E5 do HPV16 melhora a resposta

imune contra os tumores. Além disso, houve um aumento das moléculas co-estimulatórias B7.1 e B7.2 na presença das três oncoproteínas virais expressas por células cancerígenas pulmonar, sugerindo que pode haver uma maior ativação das células T CD4+ nos tumores de pulmão associados ao HPV, no entanto mais estudos são necessários no intuito de avaliar moléculas inibidoras imunológicas, como CTLA-4 e PD-L1, que interferem na ativação das células T.

Em resumo, neste estudo observamos que as oncoproteínas E5, E6 e E7 do HPV16 possuem a capacidade de modular a resposta imunológica em uma linhagem de câncer de pulmão. Onde o vírus ativou uma resposta imune anti-carcinogênica. Em nossas análises, os resultados obtidos demonstraram que as oncoproteínas aumentou as células T CD4+ juntamente com a produção de IFN- γ que foi ativado principalmente por E5 nessas células. Também houve um aumento na atividade citotóxica das células CD8+ e CD56+ na presença das oncoproteínas virais, assim como uma diminuição das células Treg e de monócitos com baixa expressão de HLA-DR. Estes resultados podem estar associados à um bom prognóstico do paciente, principalmente na fase inicial da infecção viral quando há um aumento da expressão da oncoproteína E5 do HPV [27], o qual foi vista como uma das principais proteínas virais que mais ativou uma resposta imune contra o tumor de pulmão. Corroborando com recentes estudos, que demonstraram que o HPV está relacionado à melhora na taxa de sobrevivência nos pacientes com cânceres de pulmão [6,38,39].

5. Conclusão

Por fim, este estudo avaliou o perfil de respostas de linfócitos e monócitos no microambiente de um dos tumores de pulmão com maior prevalência associado ao HPV 16, trazendo novas informações, principalmente sobre a oncoproteína E5 do HPV, que auxiliará na compreensão deste agente infeccioso em um câncer não ano-genital, podendo ajudar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no combate aos cânceres de pulmão infectados pelo HPV. No entanto, mais estudos são necessários para entender melhor os mecanismos desse vírus em outros tipos de câncer de pulmão.

Referencias

1. Akhtar, N.; Bansal, J.G. Risk Factors of Lung Cancer in Nonsmoker. *Curr. Probl. Cancer* **2017**, *41*, 328–339, doi:10.1016/j.crrproblcancer.2017.07.002.
2. Akhtar, N.; Bansal, J.G. Risk Factors of Lung Cancer in Nonsmoker. *Curr. Probl. Cancer* **2017**, *41*, 328–339, doi:10.1016/J.CURRPROBLCANCER.2017.07.002.
3. Scarth, J.A.; Patterson, M.R.; Morgan, E.L.; Macdonald, A. The Human Papillomavirus Oncoproteins: A Review of the Host Pathways Targeted on the Road to Transformation. *J. Gen.*

- Virol.* **2021**, *102*, doi:10.1099/JGV.0.001540.
4. Syrjänen, K.J. Condylomatous Changes in Neoplastic Bronchial Epithelium. *Respiration* **1979**, *38*, 299–304, doi:10.1159/000194095.
 5. Karnosky, J.; Dietmaier, W.; Knuettel, | Helge; Freigang, V.; Koch, M.; Koll, F.; Zeman, F.; Schulz, | Christian HPV and Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **2021**, doi:10.1002/cnr2.1350.
 6. Guo, L.; Liu, S.; Zhang, S.; Chen, Q.; Zhang, M. Human Papillomavirus Infection as a Prognostic Marker for Lung Adenocarcinoma : A Systematic Review and Meta-Analysis. **2017**, *8*, 34507–34515.
 7. Mehra, R.; Egleston, B.; Yang, D.; Scott, W.; Borghaei, H.; Ragin, C. A Pilot Study of the Association and Prevalence of the Human Papillomavirus (HPV) in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Cancer Res.* **2013**, *73*, 4785–4785, doi:10.1158/1538-7445.AM2013-4785.
 8. Xu, M.J.; O., J.; Ha, H. e P.K. Biology of Head and Neck Cancers - ClinicalKey Available online: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323611794000739> (accessed on 16 June 2022).
 9. Tan, Z.; Xue, H.; Sun, Y.; Zhang, C.; Song, Y.; Qi, Y. The Role of Tumor Inflammatory Microenvironment in Lung Cancer. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 1168, doi:10.3389/FPHAR.2021.688625/BIBTEX.
 10. Fridman, W.H.; Pagès, F.; Sauts-Fridman, C.; Galon, J. The Immune Contexture in Human Tumours: Impact on Clinical Outcome. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 298–306, doi:10.1038/nrc3245.
 11. Altorki, N.K.; Markowitz, G.J.; Gao, D.; Port, J.L.; Saxena, A.; Stiles, B.; McGraw, T.; Mittal, V. The Lung Microenvironment: An Important Regulator of Tumour Growth and Metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 9–31, doi:10.1038/s41568-018-0081-9.
 12. Lechien, J.R.; Descamps, G.; Seminerio, I.; Furgiuele, S.; Dequanter, D.; Mouawad, F.; Badoual, C.; Journe, F.; Saussez, S. HPV Involvement in the Tumor Microenvironment and Immune Treatment in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, doi:10.3390/CANCERS12051060.
 13. Altorki, N.K.; Markowitz, G.J.; Gao, D.; Port, J.L.; Saxena, A.; Stiles, B.; McGraw, T.; Mittal, V. The Lung Microenvironment: An Important Regulator of Tumour Growth and Metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *19*, 9–31, doi:10.1038/s41568-018-0081-9.

14. Zhao, H.; Wu, L.; Yan, G.; Chen, Y.; Zhou, M.; Wu, Y.; Li, Y. Inflammation and Tumor Progression: Signaling Pathways and Targeted Intervention. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 1–46, doi:10.1038/s41392-021-00658-5.
15. Zhang, L.; Mao, Z.; Lai, Y.; Wan, T.; Zhang, K.; Zhou, B. A Review of the Research Progress in T-Lymphocyte Immunity and Cervical Cancer. *Transl. Cancer Res.* **2020**, *9*, 2026, doi:10.21037/TCR.2020.01.33.
16. Xiong, W.M.; Xu, Q.P.; Li, X.; Xiao, R.D.; Cai, L.; He, F. The Association between Human Papillomavirus Infection and Lung Cancer: A System Review and Meta-Analysis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 96419, doi:10.18632/ONCOTARGET.21682.
17. Osorio, J.C.; Candia-Escobar, F.; Corvalán, A.H.; Calaf, G.M.; Aguayo, F. High-Risk Human Papillomavirus Infection in Lung Cancer: Mechanisms and Perspectives. *Biology (Basel)*. **2022**, *11*, doi:10.3390/biology11121691.
18. Stankovic, B.; Bjørhovde, H.A.K.; Skarshaug, R.; Aamodt, H.; Frafjord, A.; Müller, E.; Hammarström, C.; Beraki, K.; Bækkevold, E.S.; Woldbæk, P.R.; et al. Immune Cell Composition in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 3101, doi:10.3389/fimmu.2018.03101.
19. Richardson, J.R.; Schöllhorn, A.; Gouttefangeas, C.; Schuhmacher, J. CD4⁺ T Cells: Multitasking Cells in the Duty of Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, 1–19, doi:10.3390/cancers13040596.
20. Litwin, T.R.; Irvin, S.R.; Chornock, R.L.; Sahasrabudhe, V. V.; Stanley, M.; Wentzensen, N. Infiltrating T-Cell Markers in Cervical Carcinogenesis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Br. J. Cancer* **2021**, *124*, 831–841, doi:10.1038/s41416-020-01184-x.
21. Ao, C.; Zeng, K. The Role of Regulatory T Cells in Pathogenesis and Therapy of Human Papillomavirus-Related Diseases, Especially in Cancer. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *65*, 406–413, doi:10.1016/J.MEEGID.2018.08.014.
22. Lechien, J.R.; Descamps, G.; Seminerio, I.; Furgiuele, S.; Dequanter, D.; Mouawad, F.; Badoual, C.; Journe, F.; Saussez, S. HPV Involvement in the Tumor Microenvironment and Immune Treatment in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 1–25, doi:10.3390/cancers12051060.
23. Wagner, S.; Böckmann, H.; Gattenlöhner, S.; Klussmann, J.P.; Wittekindt, C. Das Angeborene

- Immunsystem Beim Oropharynxkarzinom: Immunmodulation Durch HPV. *HNO* **2018**, 66, 301–307, doi:10.1007/s00106-018-0480-y.
24. Wagner, S.; Wittekindt, C.; Reuschenbach, M.; Hennig, B.; Thevarajah, M.; Würdemann, N.; Prigge, E.S.; Von Knebel Doeberitz, M.; Dreyer, T.; Gattenlöhner, S.; et al. CD56-Positive Lymphocyte Infiltration in Relation to Human Papillomavirus Association and Prognostic Significance in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Cancer* **2016**, 138, 2263–2273, doi:10.1002/ijc.29962.
 25. Hodge, G.; Barnawi, J.; Jurisevic, C.; Moffat, D.; Holmes, M.; Reynolds, P.N.; Jersmann, H.; Hodge, S. Lung Cancer Is Associated with Decreased Expression of Perforin, Granzyme B and Interferon (IFN)- γ by Infiltrating Lung Tissue T Cells, Natural Killer (NK) T-like and NK Cells. *Clin. Exp. Immunol.* **2014**, 178, 79–85, doi:10.1111/cei.12392.
 26. Morgan, E.L.; Macdonald, A. Manipulation of JAK/STAT Signalling by High-Risk HPVs: Potential Therapeutic Targets for HPV-Associated Malignancies. *Viruses* **2020**, 12, doi:10.3390/v12090977.
 27. De Freitas, A.C.; De Oliveira, T.H.A.; Barros, M.R.; Venuti, A. HrHPV E5 Oncoprotein: Immune Evasion and Related Immunotherapies. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2017**, 36, 1–15, doi:10.1186/s13046-017-0541-1.
 28. Sahu, U.; Khare, P. Role of Interleukin-17 in Human Papillomavirus Infection and Associated Malignancies. *Microb. Pathog.* **2021**, 161, 105294, doi:10.1016/J.MICPATH.2021.105294.
 29. Xue, J. Sen; Wang, Y.L.; Chen, C.; Zhu, X.J.; Zhu, H.; Hu, Y. Effects of Th17 Cells and IL-17 in the Progression of Cervical Carcinogenesis with High-Risk Human Papillomavirus Infection. *Cancer Med.* **2018**, 7, 297–306, doi:10.1002/cam4.1279.
 30. Berti, F.C.B.; Pereira, A.P.L.; Cebinelli, G.C.M.; Trugilo, K.P.; Brajão de Oliveira, K. The Role of Interleukin 10 in Human Papilloma Virus Infection and Progression to Cervical Carcinoma. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2017**, 34, 1–13, doi:10.1016/j.cytogfr.2017.03.002.
 31. Sung, W.-W.; Lee, H. The Role of Interleukin-10 in the Progression of Human Papillomavirus-Associated Lung Carcinoma. *Oncoimmunology* **2013**, 2, e25854, doi:10.4161/onci.25854.
 32. Zhou, C.; Tuong, Z.K.; Frazer, I.H. Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. *Front. Oncol.* **2019**, 9, doi:10.3389/fonc.2019.00682.
 33. Saillard, M.; Cenerenti, M.; Romero, P.; Jandus, C. Impact of Immunotherapy on Cd4 t Cell Phenotypes and Function in Cancer. *Vaccines* **2021**, 9, 1–21, doi:10.3390/vaccines9050454.

34. Sato, T.; Takagi, K.; Higuchi, M.; Abe, H.; Kojimahara, M.; Sagawa, M.; Tanaki, M.; Miki, Y.; Suzuki, T.; Hojo, H. Immunolocalization of CD80 and CD86 in Non-Small Cell Lung Carcinoma: CD80 as a Potent Prognostic Factor. *ACTA Histochem. Cytochem.* **2022**, *55*, 21–00075, doi:10.1267/ahc.21-00075.
35. Russell, S.M.; Angell, T.E.; Lechner, M.G.; Liebertz, D.J.; Correa, A.J.; Sinha, U.K.; Kokot, N.; Epstein, A.L. Immune Cell Infiltration Patterns and Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck Oncol.* **2013**, *5*, 1–17.
36. Zehbe, I.; Höhn, H.; Pilch, H.; Neukirch, C.; Freitag, K.; Maeurer, M.J. Differential MHC Class II Component Expression in HPV-Positive Cervical Cancer Cells: Implication for Immune Surveillance. *Int. J. Cancer* **2005**, *117*, 807–815, doi:10.1002/ijc.21226.
37. Ortiz-Sánchez, E.; Chávez-Olmos, P.; Piña-Sánchez, P.; Salcedo, M.; Garrido, E. Expression of the Costimulatory Molecule CD86, but Not CD80, in Keratinocytes of Normal Cervical Epithelium and Human Papillomavirus-16 Positive Low Squamous Intraepithelial Lesions. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2007**, *17*, 571–580, doi:10.1111/J.1525-1438.2007.00904.X.
38. Cardona, A.F.; Ruiz-Patiño, A.; Ricaurte, L.; Rojas, L.; Zatarain-Barrón, Z.L.; Arrieta, O.; Rosell, R. Human Papillomavirus Infection and Lung Cancer. *Curr. Perspect. Hum. Papillomavirus* **2018**, doi:10.5772/INTECHOPEN.80706.
39. Tsyganov, M.M.; Ibragimova, M.K.; Rodionov, E.O.; Cheremisina, O. V.; Miller, S. V.; Tuzikov, S.A.; Litvyakov, N. V. Human Papillomavirus in Non-Small Cell Lung Carcinoma: Assessing Virus Presence in Tumor and Normal Tissues and Its Clinical Relevance. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1–14, doi:10.3390/microorganisms11010212.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou o papel das proteínas do HPV16 no funcionamento de fatores de transcrição associados à carcinogênese pulmonar, bem como na atividade de células imunes na presença de células tumorais de pulmão que expressavam as oncoproteínas virais. Foi possível observar a expressão de ao menos uma das proteínas do HPV (E2, E5, E6 e E7), em 66,7% dos tumores de pulmão. Houve uma superexpressão das oncoproteínas virais, principalmente E5 e E7 nas amostras de câncer de pulmão. Foi observado uma correlação negativa entre E2 e E6, sugerindo uma possível integração viral, já que a expressão de E2 foi diminuída. Nas amostras de tumores de pulmão foi observada uma maior resposta de Th1(STAT4 e JAK2), Th17 (STAT3) e Th22 (FOXO4). No experimento *in vitro*, foi observado uma maior resposta Th1 e Th17 associada a expressão de E5 do HPV16, e uma resposta Th2 e Treg associada a expressão de E7 do HPV16. Houve um aumento da célula T CD4+, bem como da atividade citotóxica das células CD8+ e CD56+, além de uma diminuição das células Treg, na linhagem A549 infectadas pelas oncoproteínas. E5 foi capaz de aumentar a produção de monócitos bem como a expressão de suas moléculas co-estimulatórias, diferentemente de E7. Estes achados demonstram que o vírus do HPV possui a capacidade de modular a resposta imune de linfócitos e monócitos, possivelmente através da ativação dos fatores de transcrição JAK/STAT em células tumorais de pulmão. Estudos como estes que busquem entender a função da atividade do HPV no câncer de pulmão, pode auxiliar no desenvolvimento futuro de terapias alvo, como também pode ser utilizado no prognóstico dos pacientes com câncer de pulmão.

Referências

- Aguayo F, Anwar M, Koriyama C, Castillo A, Sun Q, Morewaya J, Eizuru Y and Akiba S (2010) Human papillomavirus-16 presence and physical status in lung carcinomas from Asia. *Infect Agent Cancer* 5:20. doi: 10.1186/1750-9378-5-20
- Aguayo F, Castillo A, Koriyama C, Higashi M, Itoh T, Capetillo M, Shuyama K, Corvalan A, Eizuru Y and Akiba S (2007) Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile. *Br J Cancer* 97:85–91. doi: 10.1038/sj.bjc.6603848
- Akhtar N and Bansal JG (2017a) Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Curr Probl Cancer* 41:328–339. doi: 10.1016/J.CURRPROBLCANCER.2017.07.002
- Akhtar N and Bansal JG (2017b) Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Curr Probl Cancer* 41:328–339. doi: 10.1016/j.currproblcancer.2017.07.002
- Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, Port JL, Saxena A, Stiles B, McGraw T and Mittal V (2019) The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer* 19:9–31. doi: 10.1038/s41568-018-0081-9
- Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, Port JL, Saxena A, Stiles B, McGraw T and Mittal V (2018) The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2018 19:9–31. doi: 10.1038/s41568-018-0081-9
- Alves JJP, Fernandes TAA de M, De Araújo JMG, Cobucci RNO, Lanza DCF, Bezerra FL, Andrade VS and Fernandes JV (2018) Th17 response in patients with cervical cancer. *Oncol Lett* 16:6215–6227. doi: 10.3892/ol.2018.9481
- Araldi RP, Sant’Ana TA, Módolo DG, de Melo TC, Spadacci-Morena DD, de Cassia Stocco R, Cerutti JM and de Souza EB (2018) The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomed Pharmacother* 106:1537–1556. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.149
- Bae JM and Kim EH (2016) Human papillomavirus infection and risk of breast

cancer: A meta-analysis of case-control studies. *Infect Agent Cancer*. doi: 10.1186/s13027-016-0058-9

Barros MR, De Melo CML, Barros MLCMGR, De Cássia Pereira De Lima R, De Freitas AC and Venuti A (2018) Activities of stromal and immune cells in HPV-related cancers. *J Exp Clin Cancer Res* 37:1–18. doi: 10.1186/s13046-018-0802-7

Buonomo T, Carraresi L, Rossini M and Martinelli R (2011) Involvement of aryl hydrocarbon receptor signaling in the development of small cell lung cancer induced by HPV E6/E7 oncoproteins. *J Transl Med* 9:1–11. doi: 10.1186/1479-5876-9-2

Cardona AF, Ruiz-Patiño A, Ricaurte L, Rojas L, Zatarain-Barrón ZL, Arrieta O and Rosell R (2018) Human Papillomavirus Infection and Lung Cancer. *Curr Perspect Hum Papillomavirus*. doi: 10.5772/INTECHOPEN.80706

Castillo A, Aguayo F, Koriyama C, Shuyama K, Akiba S, Herrera-Goepfert R, Carrascal E, Klinge G, Sánchez J and Eizuru Y (2006) Human papillomavirus in lung carcinomas among three Latin American countries. *Oncol Rep* 15:883–888. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004

Chen DS and Mellman I (2013) Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* 39:1–10. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2013.07.012

Chen X, Chen L, Zhu H and Tao J (2020) Risk factors and prognostic predictors for Cervical Cancer patients with lung metastasis. *J Cancer* 11:5880. doi: 10.7150/JCA.46258

Cheng YW, Lee H, Shiau MY, Wu TC, Huang TT and Chang YH (2008) Human papillomavirus type 16/18 up-regulates the expression of interleukin-6 and antiapoptotic Mcl-1 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 14:4705–4712. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4675

Chiou HL, Wu MF, Liaw YC, Cheng YW, Wong RH, Chen CY and Lee H (2003) The presence of human papillomavirus type 16/18 DNA in blood circulation may act as a risk marker of lung cancer in Taiwan. *Cancer* 97:1558–1563. doi: 10.1002/cncr.11191

Colpani V, Soares Falcetta F, Bacelo Bidinotto A, Kops NL, Falavigna M, Serpa Hammes L, Schwartz Benzaken A, Kalume Maranhão AG, Domingues CMAS and

- Wendland EM (2020) Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 15:e0229154. doi: 10.1371/journal.pone.0229154
- de Freitas AC, Gurgel AP, de Lima EG, de França São Marcos B and do Amaral CMM (2016) Human papillomavirus and lung carcinogenesis: an overview. *J Cancer Res Clin Oncol* 142:2415–2427. doi: 10.1007/s00432-016-2197-1
- de Groot P and Munden RF (2012) Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Radiol Clin North Am* 50:863–876. doi: 10.1016/j.rcl.2012.06.006
- de Oliveira THA, do Amaral CM, de França São Marcos B, Nascimento KCG, de Miranda Rios AC, Quixabeira DCA, Muniz MTC, Silva Neto J da C and de Freitas AC (2018a) Presence and activity of HPV in primary lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 0:0. doi: 10.1007/s00432-018-2748-8
- de Oliveira THA, do Amaral CM, de França São Marcos B, Nascimento KCG, de Miranda Rios AC, Quixabeira DCA, Muniz MTC, Silva Neto J da C and de Freitas AC (2018b) Presence and activity of HPV in primary lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 144:2367–2376. doi: 10.1007/s00432-018-2748-8
- Dreer M, Poel S Van De and Stubenrauch F (2017) Control of viral replication and transcription by the papillomavirus $\text{E}2$ protein E8 E. *Virus Res* 231:96–102. doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.005
- Elferink CJ, Ge N-L and Levine A (2001) Maximal Aryl Hydrocarbon Receptor Activity Depends on an Interaction with the Retinoblastoma Protein. 59:664–673.
- F. Cardona A, Ruiz-Patiño A, Ricaurte L, Rojas L, Lucia Zatarain-Barrón Z, Arrieta O and Rosell R (2019) Human Papillomavirus Infection and Lung Cancer. *Curr Perspect Hum Papillomavirus*. doi: 10.5772/intechopen.80706
- Fernández JP, Luddy KA, Harmon C and O'Farrelly C (2019) Hepatic tumor microenvironments and effects on NK cell phenotype and function. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms20174131
- Frazer IH (2004) Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 2004 4:46–55. doi: 10.1038/nri1260
- Fridman WH, Pagès F, Sauts-Fridman C and Galon J (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012

124 12:298–306. doi: 10.1038/nrc3245

Gheit T (2019) Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. *Front Oncol*. doi: 10.3389/fonc.2019.00355

Graham SV (2017) The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci* 131:2201–2221. doi: 10.1042/CS20160786

Gutiérrez-Hoya A and Soto-Cruz I (2020) Role of the JAK/STAT Pathway in Cervical Cancer: Its Relationship with HPV E6/E7 Oncoproteins. *Cells* 9:1–22. doi: 10.3390/cells9102297

Harden ME and Munger K (2017) Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Mutat Res* 772:3–12. doi: 10.1016/j.mrrev.2016.07.002

Hessel PA, Gamble JF and McDonald JC (2005) Asbestos, asbestosis, and lung cancer: a critical assessment of the epidemiological evidence. *Thorax* 60:433–436. doi: 10.1136/THX.2004.037267

Hong S and Laimins LA (2017) Manipulation of the innate immune response by human papillomaviruses. *Virus Res* 176:139–148. doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.004.Manipulation

Hsu N-Y, Cheng Y-W, Chan I-P, Ho H-C, Chen C-Y, Hsu C-P, Lin M-H and Chou M-C (2009) Association between expression of human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein and survival in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 21:81–87. doi: 10.3892/or_00000192

Hu Y, Wu MZ, Gu NJ, Xu HT, Li QC and Wu GP (2020) Human papillomavirus 16 (HPV 16) E6 but not E7 inhibits the antitumor activity of LKB1 in lung cancer cells by downregulating the expression of KIF7. *Thorac cancer* 11:3175–3180. doi: 10.1111/1759-7714.13640

Huang CG, Lee LA, Liao CT, Yen TC, Yang SL, Liu YC, Li JC, Gong YN, Kang CJ, Huang SF et al. (2017) Molecular and serologic markers of HPV 16 infection are associated with local recurrence in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 8:34820–34835. doi: 10.18632/oncotarget.16747

Hussen BM, Ahmadi G, Marzban H, Ebadi M, Azar F, Sorayyayi S, Karampour R, Sadri Nahand J, Hidayat HJ and Moghoofei M (2020) The role of HPV gene

expression and selected cellular MiRNAs in lung cancer development. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104692

Hussen BM, Ahmadi G, Marzban H, Fard Azar ME, Sorayyayi S, Karampour R, Nahand JS, Hidayat HJ and Moghoofei M (2021a) The role of HPV gene expression and selected cellular MiRNAs in lung cancer development. *Microb Pathog* 150:104692. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104692

Hussen BM, Ahmadi G, Marzban H, Fard Azar ME, Sorayyayi S, Karampour R, Nahand JS, Hidayat HJ and Moghoofei M (2021b) The role of HPV gene expression and selected cellular MiRNAs in lung cancer development. *Microb Pathog* 150:104692. doi: 10.1016/J.MICPATH.2020.104692

Ibarra Sierra E, Díaz Chávez J, Cortés-Malagón EM, Uribe-Figueroa L, Hidalgo-Miranda A, Lambert PF and Gariglio P (2012) Differential gene expression between skin and cervix induced by the E7 oncoprotein in a transgenic mouse model. *Virology* 433:337–345. doi: 10.1016/J.VIROL.2012.08.024

INCA (2019) Estimativa 2020 Incidência de Câncer no Brasil.

Jee B, Yadav R, Pankaj S and Shahi SK (2020) Immunology of HPV-mediated cervical cancer: current understanding. *Int Rev Immunol* 0:1–20. doi: 10.1080/08830185.2020.1811859

Jiang S, Yang Z, Di S, Hu W, Ma Z, Chen F and Yang Y (2018) Novel role of forkhead box O 4 transcription factor in cancer: Bringing out the good or the bad. *Semin Cancer Biol* 50:1–12. doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2018.04.007

Jiramongkol Y and Lam EWF (2020) FOXO transcription factor family in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2020 393 39:681–709. doi: 10.1007/S10555-020-09883-W

Karnosky J, Dietmaier W, Knuettel | Helge, Freigang V, Koch M, Koll F, Zeman F and Schulz | Christian (2021) HPV and lung cancer: A systematic review and meta-analysis. doi: 10.1002/cnr2.1350

Kato T, Koriyama C, Khan N, Samukawa T, Yanagi M, Hamada T, Yokomakura N, Otsuka T, Inoue H, Sato M et al. (2012) EGFR mutations and human papillomavirus in lung cancer. *Lung Cancer* 78:144–147. doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2012.08.011

Kim SS, Shen S, Miyauchi S, Dominick Sanders P, Franiak-Pietryga I, Mell L, Silvio Gutkind J, Cohen EEW, Califano JA and Sharabi AB (2020) B-cells improve overall survival in HPV-associated squamous cell carcinomas and are activated by radiation and PD-1 blockade. *Clin Cancer Res* 26:3345. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3211

Lechien JR, Descamps G, Seminerio I, Furgiuele S, Dequanter D, Mouawad F, Badoual C, Journe F and Saussez S (2020a) HPV Involvement in the Tumor Microenvironment and Immune Treatment in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancers (Basel)*. doi: 10.3390/CANCERS12051060

Lechien JR, Descamps G, Seminerio I, Furgiuele S, Dequanter D, Mouawad F, Badoual C, Journe F and Saussez S (2020b) HPV involvement in the tumor microenvironment and immune treatment in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancers (Basel)* 12:1–25. doi: 10.3390/cancers12051060

Li B, Zhang L, Zhao J, Tan G, Zhang W, Zhang N, Tian J and Qu P (2019) The value of cytokine levels in triage and risk prediction for women with persistent high-risk human papilloma virus infection of the cervix. *Infect Agent Cancer* 14:1–12. doi: 10.1186/S13027-019-0231-Z/TABLES/7

Li M, Deng F, Qian LT, Meng SP, Zhang Y, Shan WL, Zhang XL and Wang BL (2016a) Association between human papillomavirus and EGFR mutations in advanced lung adenocarcinoma. *Oncol Lett* 12:1953. doi: 10.3892/OL.2016.4847

Li M, Deng F, Qian LT, Meng SP, Zhang Y, Shan WL, Zhang XL and Wang BL (2016b) Association between human papillomavirus and EGFR mutations in advanced lung adenocarcinoma. *Oncol Lett* 12:1953. doi: 10.3892/OL.2016.4847

Liang H-Y, Li X-L, Yu X-S, Guan P, Yin Z-H, He Q-C and Zhou B-S (2009) Facts and fiction of the relationship between preexisting tuberculosis and lung cancer risk: A systematic review. doi: 10.1002/ijc.24636

Liu J, Huang B, Xiu Z, Zhou Z, Liu J, Li X and Tang X (2018) PI3K / Akt / HIF-1 α signaling pathway mediates HPV-16 oncoprotein-induced expression of EMT-related transcription factors in non-small cell lung cancer cells. *J Cancer* 9:3456–3466. doi: 10.7150/jca.26112

Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data

Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25:402–408. doi: 10.1006/METH.2001.1262

Long DL, Song HL and Qu PP (2021) Cytokines profiles in cervical mucosa in patients with cervical high-risk human papillomavirus infection. *J Infect Dev Ctries* 15:719–725. doi: 10.3855/JIDC.12147

Mangino G, Chiantore MV, Iuliano M, Fiorucci G and Romeo G (2016) Inflammatory microenvironment and human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 30:103–111. doi: 10.1016/J.CYTOGFR.2016.03.007

Marques HS, de Brito BB, da Silva FAF, Santos MLC, de Souza JCB, Correia TML, Lopes LW, Neres NS de M, Dórea RSDM, Dantas ACS et al. (2021) Relationship between Th17 immune response and cancer. *World J Clin Oncol* 12:845–867. doi: 10.5306/wjco.v12.i10.845

Mcbride AA (2017) Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. 398:919–927. doi: 10.1515/hsz-2017-0113

Medda A, Duca D and Chiocca S (2021) Human Papillomavirus and Cellular Pathways: Hits and Targets. *Pathogens* 10:1–23. doi: 10.3390/PATHOGENS10030262

Moody CA and Laimins LA (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010 108 10:550–560. doi: 10.1038/nrc2886

Morgan EL and Macdonald A (2020a) Manipulation of JAK/STAT Signalling by High-Risk HPVs: Potential Therapeutic Targets for HPV-Associated Malignancies. *Viruses*. doi: 10.3390/V12090977

Morgan EL and Macdonald A (2020b) Manipulation of JAK/STAT signalling by high-risk HPVs: Potential therapeutic targets for HPV-associated malignancies. *Viruses*. doi: 10.3390/v12090977

Morgan EL and Macdonald A (2019) JAK2 Inhibition Impairs Proliferation and Sensitises Cervical Cancer Cells to Cisplatin-Induced Cell Death. *Cancers (Basel)*. doi: 10.3390/CANCERS11121934

Müller M, Prescott EL, Wasson CW and MacDonald A (2015a) Human papillomavirus E5 oncoprotein: Function and potential target for antiviral

therapeutics. *Future Virol* 10:27–39. doi:

10.2217/FVL.14.99/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE2.JPEG

Müller M, Prescott EL, Wasson CW and MacDonald A (2015b) Human papillomavirus E5 oncoprotein: Function and potential target for antiviral therapeutics. *Future Virol* 10:27–39. doi:

10.2217/FVL.14.99/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE2.JPEG

Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, Dacic S, Jain D, Kerr KM, Lantuejoul S et al. (2022) The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol* 17:362–387. doi: 10.1016/j.jtho.2021.11.003

Nunes EM, Talpe-Nunes V and Sichero L (2018) Epidemiology and biology of cutaneous human papillomavirus. *Clinics* 73:1–9. doi: 10.6061/clinics/2018/e489s

Park SY, Lee CJ, Choi JH, Kim JH, Kim JW, Kim JY and Nam JS (2019) The JAK2/STAT3/CCND2 Axis promotes colorectal Cancer stem cell persistence and radioresistance. *J Exp Clin Cancer Res*. doi: 10.1186/S13046-019-1405-7

Peña N, Carrillo D, Muñoz JP, Chnaiderman J, Urzúa U, León O, Tornesello ML, Corvalán AH, Soto-Rifo R and Aguayo F (2015) Tobacco Smoke Activates Human Papillomavirus 16 p97 Promoter and Cooperates with High-Risk E6/E7 for Oxidative DNA Damage in Lung Cells. *PLoS One* 10:e0123029. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0123029

Pešut E, Đukić A, Lulić L, Skelin J, Šimić I, Gašperov NM, Tomaić V, Sabol I and Grce M (2021) Human papillomaviruses-associated cancers: An update of current knowledge. *Viruses*. doi: 10.3390/v13112234

Plank MW, Kaiko GE, Maltby S, Weaver J, Tay HL, Shen W, Wilson MS, Durum SK and Foster PS (2017) Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity. *J Immunol* 198:2182–2190. doi: 10.4049/jimmunol.1601480

Prabhu PR, Jayalekshmi D and Pillai MR (2012) Lung cancer and human papilloma viruses (HPVs): Examining the molecular evidence. *J Oncol*. doi: 10.1155/2012/750270

Qin Y, Ekmekcioglu S, Forget MA, Szekvolgyi L, Hwu P, Grimm EA, Jazaeri AA

and Roszik J (2017) Cervical Cancer Neoantigen Landscape and Immune Activity is Associated with Human Papillomavirus Master Regulators. *Front Immunol* 8:16. doi: 10.3389/FIMMU.2017.00689

Rezaei M, Mostafaei S, Aghaei A, Hosseini N, Darabi H, Nouri M, Etemadi A, Neill AO, Nahand JS, Mirzaei H et al. (2020) The association between HPV gene expression, inflammatory agents and cellular genes involved in EMT in lung cancer tissue. *BMC Cancer* 20:916. doi: 10.1186/S12885-020-07428-6/TABLES/4

Richardson JR, Schöllhorn A, Gouttefangeas C and Schuhmacher J (2021) CD4+ T cells: Multitasking cells in the duty of cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)* 13:1–19. doi: 10.3390/cancers13040596

Robinson LA, Jaing CJ, Pierce Campbell C, Magliocco A, Xiong Y, Magliocco G, Thissen JB and Antonia S (2016) Molecular evidence of viral DNA in non-small cell lung cancer and non-neoplastic lung. *Br J Cancer* 115:497–504. doi: 10.1038/bjc.2016.213

Roglic M, Jukic S and Damjanov I (1975) Cytology of the solitary papilloma of the bronchus. *Acta Cytol* 19:11–13.

Rubel L and Reynolds RE (1979) Cytologic description of squamous cell papilloma of the respiratory tract. *Acta Cytol* 23:227–31.

Rudin CM, Avila-Tang E and Samet JM (2009) Lung cancer in never smokers: A call to action. *Clin Cancer Res* 15:5622–5625. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0373

Saab S, Zalzale H, Rahal Z, Khalifeh Y, Sinjab A and Kadara H (2020) Insights Into Lung Cancer Immune-Based Biology, Prevention, and Treatment. *Front Immunol* 11:159. doi: 10.3389/FIMMU.2020.00159/BIBTEX

Saillard M, Cenerenti M, Romero P and Jandus C (2021) Impact of immunotherapy on cd4 t cell phenotypes and function in cancer. *Vaccines* 9:1–21. doi: 10.3390/vaccines9050454

Scarth JA, Patterson MR, Morgan EL and Macdonald A (2021) The human papillomavirus oncoproteins: A review of the host pathways targeted on the road to transformation. *J Gen Virol*. doi: 10.1099/JGV.0.001540

Shepshelovich D, Goldvaser H, Edel Y, Shochat T and Lahav M (2016) High Lung

Cancer Incidence in Heavy Smokers Following Hospitalization due to Pneumonia. *Am J Med* 129:332–338. doi: 10.1016/J.AMJMED.2015.10.030

Shukla S, Jadli M, Thakur K, Shishodia G, Mahata S, Basir SF, Das BC and Bharti AC (2019) Level of phospho-STAT3 (Tyr705) correlates with copy number and physical state of human papillomavirus 16 genome in cervical precancer and cancer lesions. *PLoS One*. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0222089

Silva EM, Mariano VS, Pastrez PRA, Pinto MC, Nunes EM, Sichero L, Villa LL, Scapulatempo-Neto C, Syrjanen KJ and Longatto-Filho A (2019) Human papillomavirus is not associated to non-small cell lung cancer: data from a prospective cross-sectional study. *Infect Agent Cancer* 14:12–18. doi: 10.1186/s13027-019-0235-8

Su L, Liu X, Chai N, Lv L, Wang R, Li X, Nie Y, Shi Y and Fan D (2014) The transcription factor FOXO4 is down-regulated and inhibits tumor proliferation and metastasis in gastric cancer. *BMC Cancer* 14:378. doi: 10.1186/1471-2407-14-378

Sun Y, Wang L, Xu X, Han P, Wu J, Tian X and Li M (2021) FOXO4 Inhibits the Migration and Metastasis of Colorectal Cancer by Regulating the APC2/ β -Catenin Axis. *Front Cell Dev Biol*. doi: 10.3389/FCELL.2021.659731/FULL

Sung W-W and Lee H (2013) The role of interleukin-10 in the progression of human papillomavirus-associated lung carcinoma. *Oncoimmunology* 2:e25854. doi: 10.4161/onci.25854

Suo J, Yang Y, Che Y, Chen C, Lv X and Wang X (2021) Anti-pulmonary metastases from cervical cancer responses induced by a human papillomavirus peptide vaccine adjuvanted with CpG-oligodeoxynucleotides in vivo. *Int Immunopharmacol* 90:107203. doi: 10.1016/J.INTIMP.2020.107203

Syrjänen KJ (1979) Condylomatous Changes in Neoplastic Bronchial Epithelium. *Respiration* 38:299–304. doi: 10.1159/000194095

Tan Z, Xue H, Sun Y, Zhang C, Song Y and Qi Y (2021) The Role of Tumor Inflammatory Microenvironment in Lung Cancer. *Front Pharmacol* 12:1168. doi: 10.3389/FPHAR.2021.688625/BIBTEX

Tang JY, Li DY, He L, Qiu XS, Wang EH and Wu GP (2020) HPV 16 E6/E7 Promote the Glucose Uptake of GLUT1 in Lung Cancer Through Downregulation

of TXNIP Due to Inhibition of PTEN Phosphorylation. *Front Oncol*. doi: 10.3389/FONC.2020.559543

Tognon MG, Akgül B, Banks L and Gheit T (2019) Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. *Front Oncol* | www.frontiersin.org 1:355. doi: 10.3389/fonc.2019.00355

Tommasino M (2014) The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 26:13–21. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.11.002

Tsyganov MM, Pevzner · A M, Ibragimova · M K, Deryusheva · I V and Litviakov · N V (2019) Human papillomavirus and lung cancer: an overview and a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 145:1919–1937. doi: 10.1007/s00432-019-02960-w

Tung M-C, Wu H-H, Cheng Y-W, Wang L, Chen C-Y, Yeh S-D, Wu T-C and Lee H (2013a) Association of epidermal growth factor receptor mutations with human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein expression in non-small cell lung cancer. *Cancer* 119:3367–76. doi: 10.1002/cncr.28220

Tung MC, Wu HH, Cheng YW, Wang L, Chen CY, Yeh S Der, Wu TC and Lee H (2013b) Association of epidermal growth factor receptor mutations with human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein expression in non–small cell lung cancer. *Cancer* 119:3367–3376. doi: 10.1002/CNCR.28220

Tung MC, Wu HH, Cheng YW, Wang L, Chen CY, Yeh S Der, Wu TC and Lee H (2013c) Association of epidermal growth factor receptor mutations with human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein expression in non-small cell lung cancer. *Cancer* 119:3367–3376. doi: 10.1002/cncr.28220

Usui T, Nishikomori R, Kitani A and Strober W (2003) GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* 18:415–428. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00057-8

Vats A, Trejo-Cerro O, Thomas M and Banks L (2021) Human papillomavirus E6 and E7: What remains? *Tumour Virus Res* 11:200213. doi: 10.1016/j.tvr.2021.200213

Villalobos P and Wistuba II (2017) Lung Cancer Biomarkers. *Hematol Oncol Clin*

North Am 31:13. doi: 10.1016/J.HOC.2016.08.006

Wang HM, Lu YJ, He L, Gu NJ, Wang SY, Qiu XS, Wang EH and Wu GP (2020) HPV16 E6/E7 promote the translocation and glucose uptake of GLUT1 by PI3K/AKT pathway via relieving miR-451 inhibitory effect on CAB39 in lung cancer cells. *Ther Adv Chronic Dis*. doi: 10.1177/2040622320957143

Wang X, Zhang Z, Cao H, Niu W, Li M, Xi X and Wang J (2017) Human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein promotes proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells through Toll-like receptor 3 signaling pathway. *J Med Virol* 1–31. doi: 10.1002/jmv.24845

Wieland A, Patel MR, Cardenas MA, Eberhardt CS, Hudson WH, Obeng RC, Griffith CC, Wang X, Chen ZG, Kissick HT et al. (2020) Defining HPV-specific B cell responses in patients with head and neck cancer. *Nat* 2020 5977875 597:274–278. doi: 10.1038/s41586-020-2931-3

World Health Organization (2022) World Health Statistics. World Health, 1-177.

Wu DW, Liu WS, Wang J, Chen CY, Cheng YW and Lee H (2011) Reduced p21WAF1/CIP1 via alteration of p53-DDX3 pathway is associated with poor relapse-free survival in early-stage human papillomavirus-associated lung cancer. *Clin Cancer Res* 17:1895–1905. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2316

Wu HH, Wu JY, Cheng YW, Chen CY, Lee MC, Goan YG and Lee H (2010) cIAP2 upregulated by E6 oncoprotein via epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway confers resistance to cisplatin in human papillomavirus 16/18-infected lung cancer. *Clin Cancer Res* 16:5200–5210. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0020

Wu MF, Cheng YW, Lai JC, Hsu MC, Chen JT, Liu WS, Chiou MC, Chen CY and Lee H (2005) Frequent p16INK4a promoter hypermethylation in human papillomavirus- infected female lung cancer in Taiwan. *Int J Cancer* 113:440–445. doi: 10.1002/ijc.20597

Wu Y, Yin Q, Zhou YL, He L, Zou ZQ, Dai XY and Xia W (2021) Evaluation of microRNAs as potential biomarkers in circulating HPV-DNA-positive non-small cell lung cancer patients. *Cancer Biol Ther* 22:136–148. doi: 10.1080/15384047.2021.1872155/SUPPL_FILE/KCBT_A_1872155_SM6432.DO

CX

Xu MJ, O. J and Ha H e PK (2021) Biology of Head and Neck Cancers - ClinicalKey. 1032–1042.

Yang C, Mai H, Peng J, Zhou B, Hou J and Jiang D (2020) STAT4: An immunoregulator contributing to diverse human diseases. *Int J Biol Sci* 16:1575–1585. doi: 10.7150/ijbs.41852

Yang JH, Li XY, Wang X, Hou WJ, Qiu XS, Wang EH and Wu GP (2017) Long-term persistent infection of HPV 16 E6 up-regulate SP1 and hTERT by inhibiting LKB1 in lung cancer cells. *PLoS One* 12:e0182775. doi: 10.1371/journal.pone.0182775

Zhang L, Mao Z, Lai Y, Wan T, Zhang K and Zhou B (2020) A review of the research progress in T-lymphocyte immunity and cervical cancer. *Transl Cancer Res* 9:2026–2036. doi: 10.21037/tcr.2020.01.33

Zhang R, Chen L, Cui YD and Li G (2019) The Association between Human Papillomavirus Infection and Smoking, Age, Gender in Lung Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Iran J Public Health* 48:1. doi: 10.18502/ijph.v48i1.777

Zhang W, Wu X, Hu L, Ma Y, Xiu Z, Huang B, Feng Y and Tang X (2017) Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances epithelial-mesenchymal transition via STAT3 signaling pathway in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Res* 25:843–852. doi: 10.3727/096504016X14813880882288

Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y and Li Y (2021) Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther* 2021 61 6:1–46. doi: 10.1038/s41392-021-00658-5

Zhao M, Tan Y, Peng Q, Huang C, Guo Y, Liang G, Zhu B, Huang Y, Liu A, Wang Z et al. (2018) IL-6/STAT3 pathway induced deficiency of RFX1 contributes to Th17-dependent autoimmune diseases via epigenetic regulation. *Nat Commun* 2018 91 9:1–14. doi: 10.1038/s41467-018-02890-0

Zhou C, Tuong ZK and Frazer IH (2019) Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. *Front Oncol*. doi: 10.3389/fonc.2019.00682

Zhou W, Cao Q, Peng Y, Zhang QJ, Castrillon DH, DePinho RA and Liu ZP (2009)
FoxO4 Inhibits NF- κ B and Protects Mice Against Colonic Injury and Inflammation.
Gastroenterology 137:1403. doi: 10.1053/J.GASTRO.2009.06.049

APÊNDICE A

Hindawi
Cellular Microbiology
Volume 2022, Article ID 9144334, 13 pages
<https://doi.org/10.1155/2022/9144334>



Research Article

Correlation between HPV PCNA, p16, and p21 Expression in Lung Cancer Patients

B. F. São Marcos ,^{1,2} T. H. A. de Oliveira ,^{1,2} C. M. M. Do Amaral,^{1,2} M. T. C. Muniz ,^{1,2} and A. C. Freitas ^{1,2}

¹Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brazil

²Molecular Biology Laboratory, Pediatric Oncohematology Center, University of Pernambuco, Avenida Agamenon Magalhães, S/N, Pernambuco, Brazil

Correspondence should be addressed to A. C. Freitas; acf_upe@yahoo.com.br

Received 30 March 2022; Revised 12 July 2022; Accepted 2 September 2022; Published 28 September 2022

Academic Editor: Shiek Ahmed

Copyright © 2022 B. F. São Marcos et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Purpose. Evaluate if human papillomavirus (HPV) infection in lung cancer patients might be helping cancer development by altering p16, p21, and PCNA, key human genes involved in cell proliferation and tumor development. **Methods.** 63 fresh-frozen (FF) and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples from lung tumor patients were used to detect HPV by PCR, followed by genotype through sequencing. The host gene expressions of p21, p16, and PCNA were quantified by qPCR in both FF and FFPE samples, and the expression of viral oncogenes E5, E6, and E7 was also measured by qPCR in 19 FF samples. **Results.** 74.6% of samples were positive for HPV, 33/44 FFPE samples and 14/19 FF samples. HPV-16 and HPV-18 were detected in 31/33 and 7/33 FFPE, respectively, and HPV-16 was the only type in FF samples. E5, E6, and E7 were expressed in 10/19, 2/19, and 4/19 FF samples, respectively. The p16 RNA expression was higher in FF HPV+ samples and FFPE+FF HPV+ samples, while p21 showed higher expression in all HPV- samples. In turn, the PCNA expression was higher in HPV+ FF samples; however, in FFPE and FFPE+FF samples, PCNA was higher in HPV- samples. In FF samples, PCNA, p16, and p21 showed a significant positive correlation as well as E5 and E7, and E5 was inversely correlated to p21. In FFPE, also, a positive correlation was observed between PCNA HPV+ and p21 HPV+ and PCNA HPV+ and p16 HPV+. In FF+FFPE analysis, a direct correlation was found between PCNA HPV+ and p21 HPV+, p21 HPV+ and p16 HPV+, and PCNA HPV+ and p16 HPV+, and an inverse correlation between PCNA HPV+ and p16 HPV+. Also, the p16 protein was positive in 10 HPV+ samples and 1 HPV-. **Conclusions.** Our data show that lung cancer patients from Northeast Brazil have a high prevalence of HPV, and the virus also expresses its oncogenes and correlates with key human genes involved in tumor development. This data could instigate the development of studies focused on preventive strategies, such as vaccination, used as a prognostic indicator and/or individualized therapy.

1. Introduction

The relationship between the human papillomavirus (HPV) infection and cervical tumor development is well known. However, other types of tumors have been associated with the activity of HPV [1, 2]. One of these possible HPV-related cancers is lung cancer; however, the presence and activity of the virus remain controversial [3–5].

This virus can disrupt several cell pathways through the work of E6 and E7 oncoproteins, and one of the paths is the cell cycle, which leads to cell proliferation and stops of cell differentiation through changes in the expression of p53 and pRb proteins, and these functions were already confirmed in lung infected cells [6].

Since HPV requires the host cell DNA replication machinery for its progeny production, the virus must ensure

Anexo A

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos

CEP - CCS - UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO PAPILOMAVÍRUS E POLIMORFISMOS EM PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO

Pesquisador: CAROLINA MARIA MEDEIROS DO AMARAL

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 06396812.0.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 968.840

Data da Relatoria: 29/01/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se e emenda ao projeto de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPE em parceria com o Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) cujo objetivo é incluir o Hospital AC Camargo Cancer Center (São Paulo) visando aumentar o número de amostras de DNA e RNA de tumores frescos e a inclusão dos pesquisadores Antonio Hugo Jose Froes Marques Campos, Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osório e Jefferson Luiz Gross, todos do A C Camargo.

O presente estudo de corte transversal retrospectivo, tem por objetivo avaliar a presença do papilomavírus humano em tecido pulmonar de pacientes com câncer de pulmão através da detecção e tipificação viral, análise da integração do DNA e expressão dos oncogenes virais, além da análise de polimorfismos gênicos.

O material biológico será obtido do Biobanco do Hospital AC Camargo, que possui procedimentos operacionais padrão para coleta, armazenamento, solicitação, processamento e distribuição de material biológico humano (amostras de tecido congelado e/ou sangue) aprovado dentro de seu protocolo de desenvolvimento (Registro CONEP B-001).

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos

CEP-008-UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 968.840

Serão selecionadas alíquotas de três microgramas de DNA e RNA extraídas de tumores de pacientes com câncer de pulmão utilizando-se os kits aprovados para uso pelo referido Biobanco e amostras de DNA e RNA de pacientes cujas biopsias apresentaram diagnósticos negativos para o câncer de pulmão. Os diagnósticos correspondentes serão revisados pelo Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos, patologista responsável pelo Biobanco, e pela Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osório, patologista do Departamento de Anatomia Patológica. Dados clínicos de prontuário (idade, gênero, profissão, história de câncer na família, história de tabagismo) serão associados às amostras fornecidas pelo Biobanco do A. C. Camargo Cancer Center.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem por objetivo geral avaliar a presença do Papilomavírus humano em tecido pulmonar de pacientes com câncer de pulmão e por objetivos específicos: 1) detectar a presença do DNA de Papilomavírus humano em material pulmonar e sanguíneo de pacientes com câncer de pulmão; 2) identificar os tipos de HPV presentes no material pulmonar e sanguíneo de pacientes com câncer de pulmão; 3) avaliar a expressão dos genes E2, E6 e E7 do HPV no material pulmonar de pacientes com câncer de pulmão; 4) avaliar a presença das oncoproteínas E5, E6, E7 e p16INK4A no tecido tumoral e 5) avaliar a presença de polimorfismos gênicos em material pulmonar e sanguíneo de pacientes com câncer de pulmão.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto a etapa a ser realizada no A C Camargo Cancer Center, motivo da formulação desta emenda, as amostras e dados associados serão fornecidas aos pesquisadores pelo Biobanco sem identificadores que possam implicar risco de quebra da privacidade dos participantes. A transferência de responsabilidades será feita por assinatura de Termo de Transferência de Material Biológico Humano.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é relevante e é viável do ponto de vista metodológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conteúdo avaliado anteriormente pelo CEP tendo sido considerado adequado.

Recomendações:

Incluir o Lattes dos pesquisadores colaboradores do A C Camargo Dr. Antonio Hugo Jose Froes Marques Campos (Biobanco), Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osório (Departamento de Patologia) e Dr. Jefferson Luiz Gross (Núcleo de Pulmão e Tórax) e de Bianca de França São Marcos (Biomédica do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental da UFPE). Quanto as

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 968.840

cartas de anuência recomendamos que as mesmas, no caso a do Biobanco de AC Camargo, não sejam assinadas por membros da equipe de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda aprovada.

RECIFE, 02 de Março de 2015

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

ANEXO B



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS)

Convido o (a) Sr.(a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa (*"Identificação da presença do Papillomavirus humano e polimorfismos em pacientes com câncer de pulmão"*), que está sob a responsabilidade da pesquisadora (Carolina Maria Medeiros do Amaral, Rua Maria Jaboatão, 70 – Apt 704 – Várzea, Recife – PE/86581242/carolnamed3@gmail.com.br. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Paulo Gomes da Silva – 82483450; Antonio Carlos de Freitas – 96067671; Maria Tereza Cartaxo Muniz – 99056802; Jacinto da Costa Silva Neto – 97269509 e está sob a orientação de:

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr.(a) não será penalizado (a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Este estudo vai avaliar se o Papillomavirus humano está presente no sangue e no pulmão para identificar se este vírus está envolvido no desenvolvimento do câncer de pulmão e ajudará no desenvolvimento de medidas para prevenir e tratar este tipo de câncer.

Serão coletadas informações (através de questionário) sobre seus hábitos de vida, fatores que podem facilitar a infecção pelo vírus e que podem causar o aparecimento do câncer de pulmão. Além disso, serão coletados 5ml de seu sangue e caso você necessite fazer cirurgia (por ordem do seu médico), você será incluído (a) no grupo de casos e será coletada uma amostra do tumor para análise.

Em relação aos riscos em participar desta pesquisa, você poderá se sentir constrangido (a) em responder ao questionário sobre seus hábitos de vida. Quando for coletado o sangue, você poderá sentir um desconforto, como ardor durante a picada com agulha e também poderá aparecer um hematoma no local onde foi feita a coleta (mancha azulada que desaparece em poucos dias, geralmente não há complicações). A coleta da amostra do tumor será feita quando você se submeter à cirurgia para tratamento da doença. O risco não está relacionado a este projeto de pesquisa.

Como benefícios diretos em participar deste estudo, será possível auxiliar seu médico no diagnóstico preventivo do câncer de pulmão, quando identificado a presença e os tipos de vírus nas amostras estudadas. Como benefícios indiretos, será possível identificar outros fatores que causam o câncer de pulmão além do uso de cigarros; desenvolvimento de medidas que diminuem o risco e que tratam este tipo de câncer.

Sua participação nesta pesquisa terá validade de 5 anos. Você tem a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento sem nenhum custo ou dano. Todos os



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**(PARA MAIORES DE 18 ANOS)**

dados referentes a presente pesquisa serão armazenados no laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, com acesso restrito aos pesquisadores, durante o período de vigência do projeto (cinco anos). Os dados e amostras obtidos serão utilizados exclusivamente para a realização deste projeto e estarão sob a responsabilidade da pesquisadora principal, Carolina Maria Medeiros do Amaral.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – email: cepcos@ufpe.br).

 (assinatura do pesquisador)
CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG/ CPF/ _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo _____, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data _____ Nome e Assinatura do participante ou responsável: _____
 Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:



Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental



Ficha Nº _____
 Nº Protocolo HUOC _____
 Data ____/____/____

Pesquisa (Pacientes)

I) Informações Pessoais:

Nome: _____ Idade: _____
 Município: _____ Estado: _____
 Zona: ☐ Rural ☐ Urbana
 Parceiro sexual: ☐ Sim ☐ Não
☐ Fixo ☐ Varia
 Raça / Cor: ☐ Branca ☐ Negra ☐ Parda ☐ Amarela

II) Fatores Interferentes:

Idade da 1ª relação sexual _____ Idade da 1ª gestação _____	Número de gestações _____ Número de parceiros _____	Uso de anticoncepcional hormonal? ☐ Sim ☐ Não Qual? _____	Método contraceptivo atual Qual? _____
Uso atual de medicações ☐ Sim ☐ Não Qual? _____ Tempo? _____	Fuma? ☐ Sim ☐ Não ☐ Ex-fumante Há quanto tempo? _____ Quantos cigarros/dia? _____		
DST? ☐ Sim ☐ Não Quais? ☐ HIV/AIDS ☐ Hepatite B ☐ Sífilis ☐ HPV ☐ Outros: _____	Bebidas alcoólicas ☐ Nunca ☐ Sim ☐ Não agora, mas já consumia		
Número de partos Vaginal ☐ Cessáreo ☐	Convive com algum fumante? _____ Quanto tempo por dia? _____		
Esta exposto a algum tipo de radiação? Sim ☐ Não ☐ Qual? _____	Tem ou já teve asma? _____ Há quanto tempo? _____		
Profissão? _____ Há quanto tempo? _____	Inala óleo de cozinha ou óleo combustível com frequência? _____		
Sofre exposição a algum tipo de metal pesado ou arsênio? Há quanto tempo? _____			

III) Histórico de Câncer Familiar

☐ Sim ☐ Não
 Em caso de positivo – Tipo: _____
 Grau de parentesco: _____