



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE TRANSLACIONAL**

JULLIANO MATHEUS DE LIMA MAUX

**DETECÇÃO DO DNA-HPV NO INTERSTÍCIO PULMONAR POR INTERMÉDIO DO
LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA) E ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS EM
PACIENTES DA REGIÃO METROPOLITANA DE RECIFE, PERNAMBUCO-BRASIL**

RECIFE

2024

JULLIANO MATHEUS DE LIMA MAUX

**DETECÇÃO DO DNA-HPV NO INTERSTÍCIO PULMONAR POR INTERMÉDIO DO
LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA) E ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS EM
PACIENTES DA REGIÃO METROPOLITANA DE RECIFE, PERNAMBUCO-BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional do Centro de Ciências Médicas, como requisito para obtenção do Título de Mestre. Área de concentração: Saúde Humana e Tecnologias Integrativas.

Orientador: Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Coorientador: Dr. Giwellington Silva Albuquerque

RECIFE

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na fonte:

Elaine Freitas - CRB4:1790

M459d Maux, Julliano Matheus de Lima
Detecção do DNA-HPV no interstício pulmonar por intermédio do lavado broncoalveolar (LBA) e alterações citológicas em pacientes da Região Metropolitana de Recife, Pernambuco-Brasil / Julliano Matheus de Lima Maux. – 2024.

73 p. : il.

Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional. Recife, 2024.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Lavado broncoalveolar. 2. Papillomavirus Humano. 3. Citologia. 4. Doenças Pulmonares Intersticiais. I. Silva Neto, Jacinto da Costa (orientador). II. Título.

614

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2024 - 170)

JULLIANO MATHEUS DE LIMA MAUX

**DETECÇÃO DO DNA-HPV NO INTERSTÍCIO PULMONAR POR INTERMÉDIO DO
LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA) E ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS EM
PACIENTES DA REGIÃO METROPOLITANA DE RECIFE, PERNAMBUCO-BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional do Centro de Ciências Médicas, como requisito para obtenção do Título de Mestre. Área de concentração: Saúde Humana e Tecnologias Integrativas.

Aprovado em: 26/03/2024.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo-Junior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Bianca de França São Marcos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Vanessa Emanuelle Pereira Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Senhor, que sempre me ajudou e que pôs pessoas tão importantes em minha vida, seja no âmbito profissional ou pessoal. E que nos momentos de tristeza nunca me deixou sozinho.

Aos meus pais, Joinville Maux e Maria Claudenice, minhas fontes de inspiração e minha base. Sem eles minha vida não teria sentido. Eterna gratidão por tudo que fizeram e fazem por mim.

A minha noiva, Karyne Mota, que sempre esteve ao meu lado, mesmo nos momentos que precisei me ausentar, mas que sempre me apoiou em tudo, principalmente nessa introdutória vida acadêmica. É a pessoa que mais me impulsionou a estudar e conquistar tudo na minha vida profissional. Amo você.

Ao meu irmão, Joinville Matheus, que sempre compartilha momentos de alegria e união.

Aos meus amigos do laboratório, cuja amizade ultrapassa o ambiente de trabalho: Emmanuel Nóbrega, Gabriel Matos, Helbert Gean, Isa Cordeiro e Júlia Jordão. Não haveria motivação e alegria na ausência deles, cada um compõe uma parte significativa da minha vida e são muito especiais para mim.

Ao meu orientador, Prof Jacinto Costa, que além de professor se tornou um amigo e compartilha não só ensinamentos, mas momentos alegres e descontraídos. Agradeço por sua paciência e pelo prazer que tens em fazer ciência, é uma honra pesquisar ao seu lado.

Ao meu coorientador, mas antes professor e amigo, Giwellington Albuquerque, o qual abriu meus olhos para a vida acadêmica e me auxiliou em todos os momentos. Faltam palavras que possam expressar minha gratidão e admiração por você.

Aos meus familiares que sempre torceram por mim, em especial, Voinha (Vó Julia), Tio Kinho e Kleyton Maux.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, em especial João Lucas, Andressa Cavalcante e Matheus Azevedo. A vossa contribuição colaborou desde a graduação até agora. Obrigado!

A todos meus amigos do ensino médio que sempre arrancam sorrisos verdadeiros e gargalhadas. É muito bom compartilhar e comemorar vitórias/alegria com vocês.

Aos incríveis profissionais do Hospital das Clínicas/UFPE, meu amigo Romildo Luciano, Sandra Sousa, Francisco Paes, Carolina Freitas e Thiago Matos.

Ao Hospital Universitário Oswaldo Cruz, na figura de Dr. Alfredo Leite, pelo fornecimento de amostras.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Pesquisa Citológicas e Moleculares (LPCM).

A todos do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE), coordenado pelo Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas, em especial a Anna Jéssica, Vanessa Emanuelle, Larissa Macêdo e Maria Conceição por todo esclarecimento e parcerias realizadas.

Aos meus colegas de mestrado, que compartilharam momentos bons e experiências.

Ao programa de Pós-Graduação em Saúde Translacional, incluindo todos os professores, secretárias e os coordenadores Prof Dr. Mário Melo e Prof Dr. Marcelo Guerino.

A banca examinadora pela disponibilidade e por contribuir com a melhora do projeto.

A CAPES pelo apoio financeiro.

“O que fazemos agora ecoa pela eternidade”.

(Aurélio, 161-180 d. C.)

RESUMO

As doenças pulmonares são grandes causadoras de morbimortalidade a nível mundial, sendo mais prevalentes as neoplasias e doenças intersticiais pulmonares (DIP). O lavado broncoalveolar (LBA) é uma técnica broncoscópica utilizada para recuperar células do interstício pulmonar, estas células podem indicar alterações parenquimais e até mesmo neoplasias, além da citologia, seu fluido pode ser utilizado para estudos moleculares. A pesquisa do Papilomavirus Humano (HPV) no pulmão é incomum nesta metodologia, mesmo que seu material genético já tenha sido encontrado no tecido pulmonar. Dessa forma, o presente estudo buscou detectar o DNA-HPV no trato respiratório inferior por intermédio do LBA, utilizando técnicas de PCR. Também foi realizado as análises citológicas destes casos. Um total de 132 pacientes foram incluídos no estudo, sendo elas alocadas em hospitais da Região Metropolitana de Recife. Para detecção do DNA-HPV, foram separadas 46 amostras após estabelecer critérios citológicos, como celularidade e presença de atipia. Entre estes, 4 (8.69%) foram positivas para HPV, as quais continham suspeitas para doenças intersticiais e resultados citopatológicos benignos, além de apresentarem características inflamatórias. Para a citologia, os principais achados citológicos foram aumento de neutrófilos (84.4%), seguindo de linfócitos (30.3%) e eosinófilos (15.1%). Casos de linfocitose tiveram maior peso diagnóstico, principalmente para as doenças intersticiais. Com base nos resultados, foi possível detectar DNA-HPV no interstício do trato respiratório inferior pela lavagem broncoalveolar. Estes achados são relevantes por se tratar de amostras não malignas e de metodologia broncoscópica bem tolerável, com apropriado custo-benefício e valor preditivo negativo, mostrando que o LBA é útil para detecção de HPV. Desse modo, acrescentar a detecção do vírus via LBA pode corroborar com o entendimento dos efeitos patogênicos do HPV no pulmão.

Palavras-chave: lavado broncoalveolar; HPV; citologia; doença intersticial pulmonar.

ABSTRACT

Lung diseases are major causes of morbidity and mortality worldwide, with neoplasms and interstitial lung diseases (ILD) being more prevalent. Bronchoalveolar lavage (BAL) is a bronchoscopic technique used to recover cells from the pulmonary interstitium, these cells can indicate parenchymal changes and even neoplasms, in addition to cytology, its fluid can be used for molecular studies. Screening for Human Papillomavirus (HPV) in the lung is unusual in this methodology, even though its genetic material has already been found in lung tissue. Thus, the present study sought to detect HPV-DNA in the lower respiratory tract by means of BAL, using PCR techniques. Cytological analyses of these cases were also performed. A total of 132 patients were included in the study, and they were allocated to hospitals in the Metropolitan Region of Recife. For the detection of HPV DNA, 46 samples were separated after establishing cytological criteria, such as cellularity and presence of atypia. Among these, 4 (8.69%) were HPV positive, which contained suspicions for interstitial diseases and benign cytopathological results, in addition to presenting inflammatory characteristics. For cytology, the main cytological findings were increased neutrophils (84.4%), followed by lymphocytes (30.3%) and eosinophils (15.1%). Cases of lymphocytosis had a higher diagnostic weight, especially for interstitial diseases. Based on the results, it was possible to detect HPV-DNA in the interstitium of the lower respiratory tract by bronchoalveolar lavage. These findings are relevant because they are non-malignant specimens and have a well-tolerated bronchoscopic methodology, with appropriate cost-benefit and negative predictive value, showing that BAL is useful for HPV detection. Thus, adding the detection of the virus via BAL may corroborate the understanding of the pathogenic effects of HPV on the lung.

Keywords: bronchoalveolar lavage; HPV; cytology; interstitial lung disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Macrófagos do LBA	10
Figura 2 – Diferenciação dos macrófagos	11
Figura 3 – Linfócitos do LBA	12
Figura 4 – Neutrófilos e eosinófilos no LBA	13
Figura 5 – Células colunares ciliadas e escamosas atípicas	15
Figura 6 – Genoma do HPV	19
Figura 7 – Pesquisa do HPV em diversos tecidos	22
Figura 8 – Suspeitas clínicas	28
Figura 9 – Associação de suspeita clínica com achados citológicos do LBA	30
Figura 10 – Eletroforese	31
Figura 11 – Microfotografia dos casos positivos para DNA-HPV.....	32
Figura 12 – Microfotografia de lesões malignas	33
Figura 13 – Resultados citológicos dos tipos de DIPs	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Padrão citológico do fluido do LBA em pacientes não-fumantes	10
Tabela 2 – Algoritmos diagnósticos baseados na contagem diferencial do LBA	14
Tabela 3 – Técnicas moleculares para o diagnóstico do HPV	20
Tabela 4 – HPV e câncer de pulmão: artigos de meta-análise	23
Tabela 5 – Padrões clínicos-sociais e citológicos das DIP	29
Tabela 6 – Detecção DNA-HPV em amostras de lavado broncoalveolar (LBA).....	31
Tabela 7 – Citologia relativa dos casos positivos para DNA-HPV.....	31
Tabela 8 – Perfil celular das DIPs.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN Adenocarcinoma

APC *Antigen Presenting Cells* (Células apresentadoras de antígeno)

CCE Carcinoma de Células Escamosas

CD *Cluster Differentiation*

CH Captura Híbrida

DIP Doença Intersticial Pulmonar

DAD Dano Alveolar Difuso

DPF Doença Pulmonar Fibrosante

DTC Doença do Tecido Conjuntivo

ICQ/IHQ Imunocitoquímica/Imunohistoquímica

HIS Hibridização *in situ*

HLA *Human Leukocyte Antigen*

HPV *Human Papillomaviruses* (Pailomavirus Humano)

LBA Lavado broncoalveolar

LPA Lesão Pulmonar Aguda

MA Macrófagos alveolares

mPCR *multiplex PCR* (PCR multiplex)

mRNA *messenger RNA* (RNA mensageiro)

NSCLC *Non-Small Cell Lung Cancer*

NGS *Next-generation Sequence*

PCO Pneumonia Criptogênica em Organização

PCR do inglês, *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PH Pneumonia de Hipersensibilidade

PHAA Pneumonia de Hipersensibilidade associada a Autoimune

PINE Pneumonia Intersticial Não-Específica

PIU Pneumonia Intersticial Usual

qPCR *quantitative real-time PCR* (PCR quantitativa, tempo real)

RT-PCR *Reverse Transcriptase-PCR* (PCR Transcriptase Reversa)

RT-qPCR *reverse transcription-quantitative PCR* (PCR em tempo real com transcrição reversa)

TLR: *Toll Like Receptors*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	CARACTERÍSTICAS CELULARES DO LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	18
3.1.1	Macrófagos	18
3.1.2	Linfócitos do LBA	20
3.1.3	Polimorfonucleares no LBA.....	21
3.1.4	Células epiteliais	23
3.2	DOENÇAS INTERSTICIAIS, INFECÇÕES E NEOPLASIAS PULMONARES...	24
3.3	UTILIZAÇÃO DO LBA NO DIAGNÓSTICO IMUNO-MOLECULAR.....	25
3.4	PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV)	26
3.4.1	Infecção, carcinogênese e evasão imunológica do HPV	28
3.4.2	HPV no tecido pulmonar	29
4	METODOLOGIA	33
4.1	AQUISIÇÃO DAS AMOSTRA E TRANSPORTE	33
4.1.1	Critérios de inclusão e exclusão.....	33
4.2	PROCESSAMENTO	33
4.2.1	Análise molecular.....	33
4.2.2	Análise citológica	34
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4.4	ASPECTOS ÉTICOS E DADOS HOSPITALARES	35
5	RESULTADOS	36
5.1	RESULTADOS MOLECULARES.....	38

5.2	RESULTADOS CITOLÓGICOS.....	40
5.3	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	43
6	DISCUSSÕES	44
7	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS	49
	APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL.....	57
	ANEXO A – FICHA DE COLETA	72
	ANEXO B – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO ADAPTADO	73

1 INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias crônicas, nas últimas décadas, ganharam notabilidade pelos altos índices de morbidade e mortalidade (Baptista, Dey e Pal, 2021). No campo oncológico, os cânceres pulmonares são líderes de letalidade, dispendo de 18% das neoplasias a nível mundial, excluindo pele não melanoma (Sung *et al.*, 2021). Enquanto no Brasil, é estimado que o número de novos casos de câncer de traqueia, brônquios e pulmão cheguem a 32.560, no triênio 2023-2025 (INCA, 2023). Fora do âmbito neoplásico, as doenças intersticiais pulmonares (DIP) ganham relevância na clínica pelas características etiopatogênicas e pela subjetividade do diagnóstico. Patologicamente, podem ser classificadas quanto a infiltração no interstício pulmonar; reações fibróticas ou inflamatórias e pela população celular daquele microambiente (Efareed *et al.*, 2017).

Devido a isto, com o objetivo de estudar esse acúmulo de células, foi desenvolvida, na década de 1970, uma técnica denominada lavagem ou lavado broncoalveolar (LBA) que tem como objetivo analisar as células do interstício pulmonar. A aquisição amostral é feita pela injeção de solução salina a partir do broncoscópico e, em seguida, aplica-se uma pressão negativa para recuperação das células da parede alveolar. No início, o princípio da técnica foi de reconhecer células cancerígenas no tecido broncoalveolar, entretanto, sua aplicação ganhou mais discernimento para avaliação de outras doenças do mesmo órgão, em especial as DIPs (Heron *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2012).

No contexto laboratorial, as DIP podem ser divididas consoantes a população celular predominante, comumente divididas entre: linfocitose, neutrofilia e/ou eosinofilia. Contudo, no campo clínico as DIP são divididas apenas entre causa conhecida e causa idiopática (Gharsalli *et al.*, 2018). As causas idiopáticas são geralmente mais estudadas baseada em pesquisas moleculares, já as de origem etiológica conhecida, podem ser estratificadas, tais como: alterações fibróticas, doenças granulomatosas, condições autoimunes e infectocontagiosas (Meyer *et al.*, 2012).

Uma das principais características clínicas observadas nos pacientes submetidos a lavagem broncoalveolar são os infiltrados que, trivialmente, podem ser causados por organismos infecciosos. Nesses casos, o fluido do LBA pode ser submetido a pesquisas bacterianas e fúngicas pela cultura microbiológica, enquanto

a investigação por vírus fica resignado a pesquisa molecular, principalmente (Recio *et al.*, 2021). Com maior acessibilidade do diagnóstico molecular, estudos utilizaram o LBA para analisar a presença de vírus, principalmente nas suspeitas de pneumonias. Os principais vírus relatados no fluido de LBA são: Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Citomegalovírus, Coronavírus e Influenza (Davidson *et al.*, 2020; Ishiguro *et al.*, 2019).

Contudo, não há relatos na literatura sobre a presença do Papilomavírus humano (HPV) em amostras de LBA, em contrapartida, a presença do DNA do HPV já foi descrita em tecidos exclusivamente epiteliais, parafinados e frescos, como em pulmão (Hussen *et al.*, 2021), mama (Cavalcante *et al.*, 2018) e tireoide (Muciño-Hernández *et al.*, 2021), assim como também em urina (Prezioso *et al.*, 2021). O HPV é um vírus de DNA que tem tropismo por células epiteliais escamosas, que também podem ser encontradas LBA. Além disso, os HPVs provocadores de lesões pré-cancerosas (HPV 16 e HPV 18) já foram relatados em neoplasias não ginecológicas (Araldi *et al.*, 2018; Beltrão *et al.*, 2015), o que abre um campo para pesquisar a presença do vírus em amostras intersticiais.

Como mencionado anteriormente, há uma classificação idiopática para DPI que englobam várias doenças, e dentre suas variadas possibilidades etiológicas, a atuação do HPV tem aptidão para gerar lesões no parênquima epitelial pulmonar. A confirmação da presença do vírus nesse tipo de amostra poderia aumentar o espectro de diagnóstico e auxiliar na obtenção de um diagnóstico precoce, conseqüentemente, aprimorando o tratamento do paciente em questão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a existência de DNA-HPV no trato respiratório inferior, por intermédio do LBA, e associar sua presença como agente infeccioso no interstício pulmonar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Auxiliar na detecção do HPV no pulmão a partir de amostras celulares, de natureza benigna ou maligna a partir de técnicas broncoscópicas;
- Colaborar com o esclarecimento da etiopatologia das doenças pulmonares;
- Associar as alterações citopatológicas a presença do DNA-HPV;
- Contribuir para o consenso de padrões citológicos em casos de DIP.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

A heterogeneidade das doenças pulmonares, principalmente as DIP, criaram a necessidade de estabelecer consensos loco regionais e multicêntricos para padronizar procedimentos broncoscópicos e técnicas laboratoriais (Cottin e Valenzuela, 2020; Hetzel *et al.*, 2021). É de senso comum que os diagnósticos finais das DIP necessitam da atuação multidisciplinar, a qual é constituída de exames clínicos, de imagens e morfológico. No critério morfológico, os principais meios de aquisição amostral são a biópsia pulmonar e o lavado broncoalveolar (LBA), por meio da broncoscopia. A citologia proveniente do LBA vem mostrando uma ampla utilidade no contexto clínico-laboratorial, podendo ser usada como parâmetro que discerne entre tecido pulmonar com ou sem alterações parenquimais (Meyer *et al.*, 2012).

É mais adequado utilizar a broncoscopia como primeira análise investigativa, visto que trata-se de uma técnica bastante tolerável, com riscos mínimos de intercorrência e especificidade propícia. O fluido do LBA contém células imunológicas, inflamatórias e epiteliais que devem ser analisadas e associadas com a suspeita clínica do paciente (Gharsalli *et al.*, 2018).

Por conta disto, a *American Thoracic Society* junto com a *European Respiratory Society* (ATS/ERS) em 2012, elaborou um sumário de padrão celular encontrado no LBA e suas possíveis alterações (Meyer *et al.*, 2012), como mostrado na Tabela 1. A citologia quantitativa é fundamental para triagem de DIP, além de doenças autoimunes e infecciosas (Gharsalli *et al.*, 2018).

A contagem diferencial aponta possíveis alterações no interstício pulmonar (Rice, 2021) e por isso deve representar 100% da lâmina analisada. Não há um consenso de quantas células devem ser contadas, no entanto, alguns estudos sugerem a contagem de 200 ou até 500 células (Frye *et al.*, 2020; Wahlstrom *et al.*, 2009). O aspecto de celularidade também deve ser considerado, visto que a quantidade global deve ser usada como característica do lavado para diagnóstico, assim como possíveis condições patológicas (Domagala-Kulawik, 2019), além disso, a descrição das características citomorfológicas são relevantes para representar a amostra como um todo, melhorando o diagnóstico clínico (Meyer *et al.*, 2012).

Tabela 1. Padrão citológico do fluido do LBA em pacientes não fumantes.

Tipo celular	Contagem diferencial (%)
Macrófagos alveolares	>85%
Linfócitos	10 – 15%
Neutrófilos	≤3%
Eosinófilos	≤1%
Células escamosas	≤5%
Células colunares ciliadas	≤5%

Legenda: Adaptado de Meyer *et al.* (2012).

3.1 CARACTERÍSTICAS CELULARES DO LAVADO BRONCOALVEOLAR

3.1.1 Macrófagos

Os macrófagos são as principais células que constituem o fluido do LBA, sua presença é indicativo de qualidade na coleta. É esperado que, em um indivíduo sadio e não tabagista, os macrófagos junto aos linfócitos somem 90% da amostra, aproximadamente (Meyer *et al.*, 2012). Suas características morfológicas são diversas, mas geralmente são células grandes, com citoplasma arenoso ou vacuolizado, podendo apresentar um único núcleo ou vários. A presença de nucléolos também é comum (Figura 1).

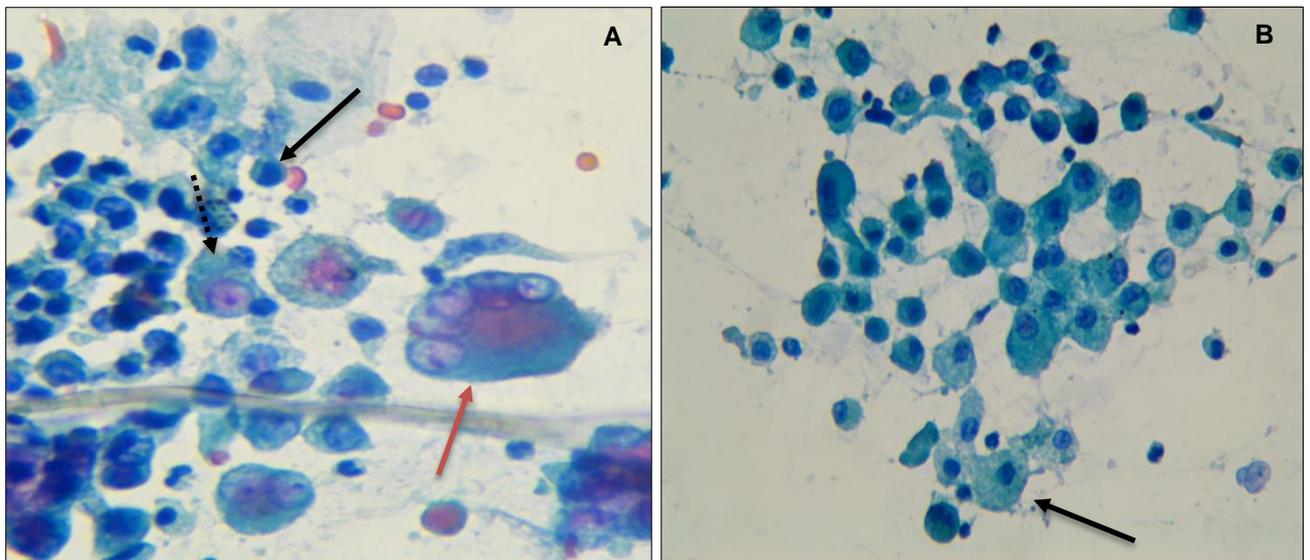


Figura 1: Microfotografia de macrófagos do LBA: (A) Macrófagos típicos, com único núcleo e cromatina homogênea (seta); Macrófagos espumosos com cromatina fantasma (núcleo pálido) e nucléolo proeminente, possuindo um único núcleo (seta pontilhada) e multinucleado (seta vermelha). (B) Macrófagos típicos e espumosos. Citoplasma amplo com granulações (seta). Colorações em Papanicolaou, 400x. Sistema de captura HAYEAR USB Microscope camera. Autoria própria, 2024.

Os principais tipos de macrófagos encontrados no LBA são os macrófagos alveolares (MA) e os macrófagos intersticiais, essa diferença é motivada pela posição anatômica, entretanto podem apresentar critérios morfológicos levemente distintos (Liegeois *et al.*, 2018).

Por muito tempo os macrófagos encontrados no LBA não tinham tanta significância clínica, contudo, sabe-se que sua polarização e suas subpopulações podem trazer relevância na esfera científica e laboratorial (Liegeois *et al.*, 2018). Os macrófagos possuem amplas funções imunológicas, inclusive mantendo a homeostase pulmonar (Aegerter, Lambrecht e Jakubzick, 2022). Porém, quando estimulados, secretam citocinas pró e anti-inflamatórias – as quais podem ser classificadas como assinaturas na diferenciação dos macrófagos M1 (via clássica) e M2 (via alternativa), respectivamente (Forbes *et al.*, 2014), como pode ser mostrado na figura 2.

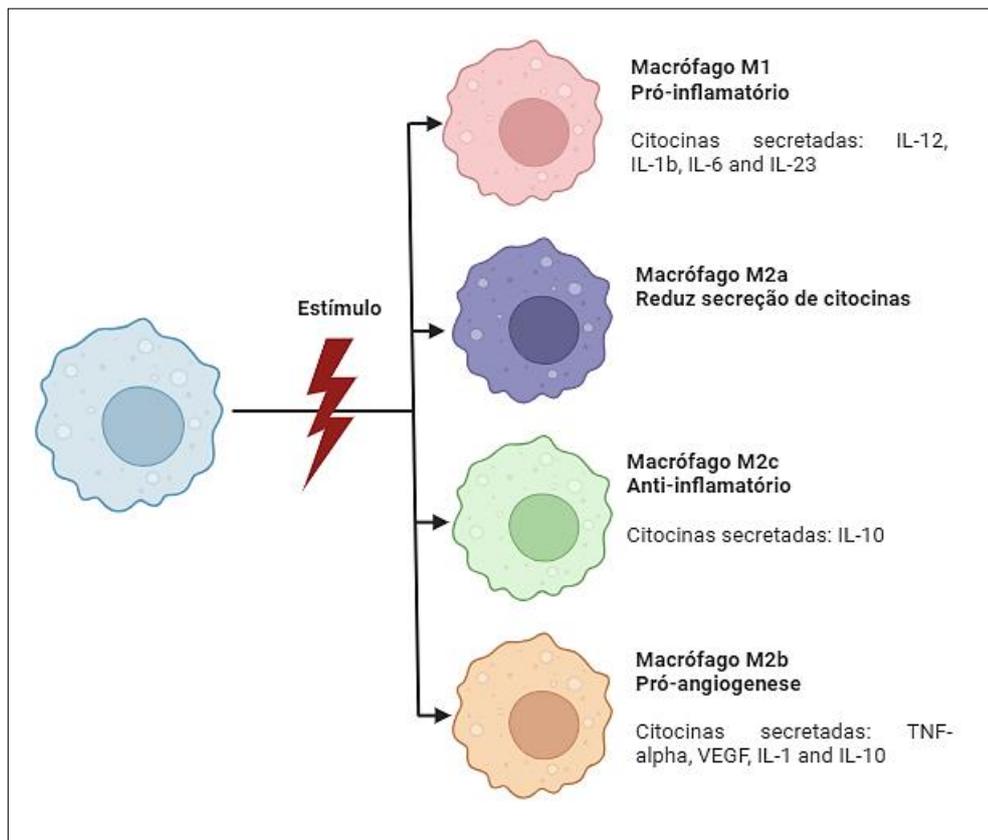


Figura 2: Diferenciação dos macrófagos: Subpopulações dos macrófagos. Adaptado de Forbes *et al.* (2014). Biorender.

As características de polarização dos macrófagos também são fundamentais para o diagnóstico diferencial de DIP. Técnicas moleculares, como a imunocitoquímica

(ICQ), e pesquisa de *cluster of differentiation* (CD), pela imunofenotipagem (citometria de fluxo), fornecem perfis celulares que corroboram com a investigação clínica, principalmente na esfera diagnóstica e prognóstica, além de contribuir com o avanço científico (Metovic *et al.*, 2020; Osinska, Wolosz e Domagala-Kulawik, 2014). Agregar esses achados com os demais leucócitos encontrados no LBA é uma possibilidade para implicar no aperfeiçoamento dos valores preditivos do lavado.

3.1.2 Linfócitos do LBA

Sendo a segunda população mais frequente no lavado, os linfócitos (Figura 3) chamam atenção devido sua vasta atividade imunológica (Jara-Palomares *et al.*, 2009). Diferente dos macrófagos, é comum utilizar a marcação de CD nos linfócitos, principalmente para investigar a proporção de CD4:CD8, a qual pode ser utilizada como critério diferencial no diagnóstico (Efares *et al.*, 2017). Os linfócitos podem possuir características plasmocitóide ou atípicas, sendo associadas a doenças malignas hematológicas e infecções virais, como por exemplo, casos de COVID-19 intensa (Gelarden *et al.*, 2021; Murro, Slade e Gattuso, 2015).

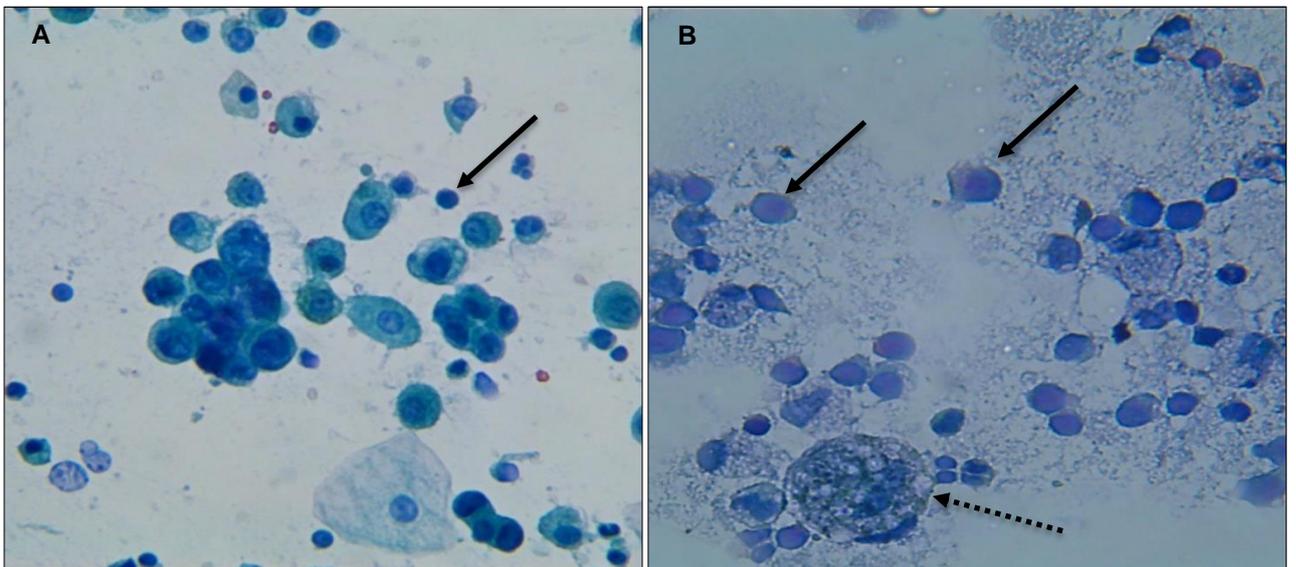


Figura 3: Microfotografia de linfócitos do LBA. (A) Linfócitos típicos (seta) e macrófagos. (B) Linfócitos típicos (seta) e macrófagos espumoso e pigmentado (seta pontilhada). Colorações em Papanicolaou, 400x. Sistema de captura HAYEAR USB Microscope camera. Autoria própria, 2024.

Várias condições intersticiais são causadas pelo acúmulo de linfócitos, como em doenças granulomatosas, reações a drogas, condições autoimunes e infecções (Adderley *et al.*, 2020; Tarasidis e Arce, 2020). A linfocitose (>15%) é comum, seja em DIP ou em outras doenças linfoproliferativas, por isso é importante associar o aumento da célula com condições clínico sociais e fatores de exposição (Kebbe e Abdo, 2017).

Na presença de linfocitose, alguns critérios também podem ser adotados. Alguns autores estabelecem que valores iguais ou maiores que 25% dos linfócitos apresentam maior valor preditivo negativo. Já resultados maiores que 50% têm potencial para excluir várias suspeitas, além de ser mais sensível (Meyer *et al.*, 2012; Sobiecka *et al.*, 2023). Como dito anteriormente, as taxas de CD4:CD8 são fundamentais para conclusão diagnóstica.

3.1.3 Polimorfonucleares no LBA

Os polimorfonucleares são divididos em neutrófilos e eosinófilos, demonstrado na figura 4. O infiltrado de neutrófilos em amostras de LBA remetem a vários significados, desde infecções, inflamações e até mesmo em condições idiopáticas, como a fibrose intersticial pulmonar (Efared *et al.*, 2017; O'Dwyer *et al.*, 2019).

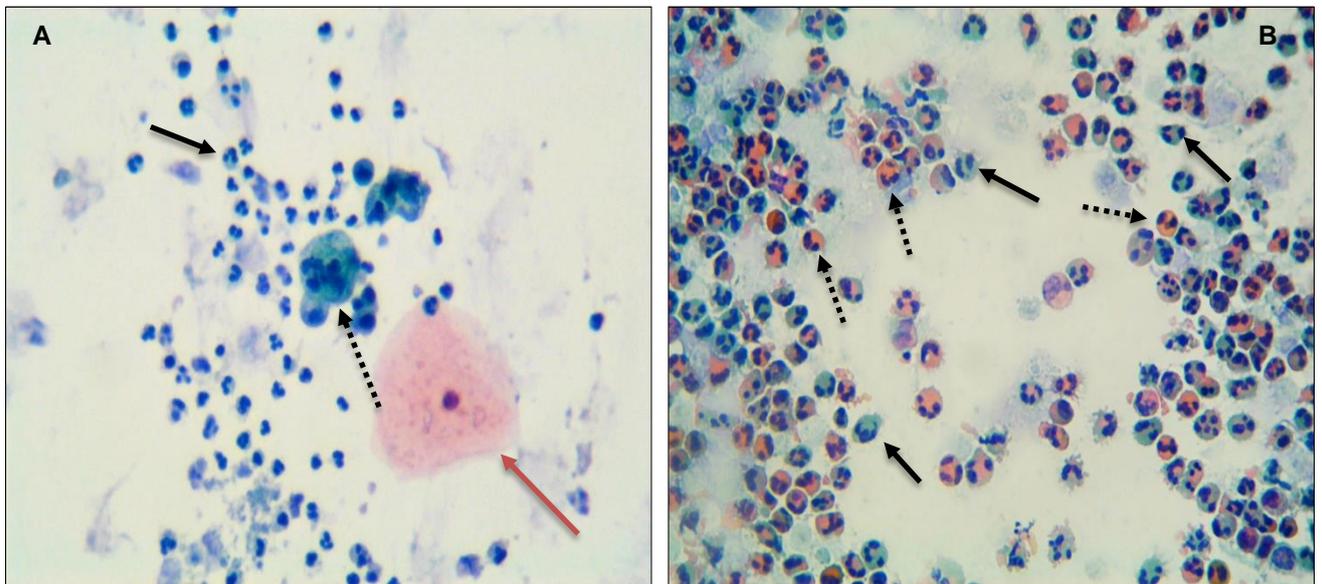


Figura 4: Microfotografia de neutrófilos e eosinófilos no LBA: (A) Neutrófilos (seta), macrófago multinucleado (seta pontilhada) e célula epitelial escamosas (seta vermelha). (B) Vários polimorfonucleados, destaque para o aumento de neutrófilos (setas) e para presença de eosinófilos (seta pontilhada). Colorações em Papanicolaou. Aumento 400x. Sistema de captura HAYEAR USB Microscope camera. Autoria própria, 2024.

Já a eosinofilia é associada a infecções parasitárias e processos alérgicos, normalmente. Sendo mais incidentes em regiões tropicais (Mullerpattan, Udwadia e Udwadia, 2013), as pneumonias eosinofílicas são divididas em dois grandes grupos: pneumonia secundária, onde tem conhecimento do agente causal, como reações farmacológicas e infecções microbiológicas; e a pneumonia primária ou sem causa conhecida, a qual engloba os casos idiopáticas. Contudo, outras condições também podem provocar o aumento na contagem de eosinófilos, como em transplantes e reações de hipersensibilidade (Giovannini-Chami *et al.*, 2016; Martinu *et al.*, 2020; Pourakbari *et al.*, 2016).

A contagem diferencial dos leucócitos, principalmente linfócitos e neutrófilos, fornecem algoritmos para diagnósticos de DIP, que, se somado as características dos exames de imagens, podem desfrutar de um resultado específico, como pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2. Algoritmos diagnósticos baseados na contagem diferencial do LBA.

Linfocitose (>15%)	Neutrofilia (>3%)	Eosinofilia (>1%)
Sarcoidose, doenças granulomatosas e crônicas	DPF	DPF
PCO	Infecções (bacteriana)	Infecções parasitárias
PH	DTC	Transplantes
PIU	DAD	Asma e bronquiolite
Condições autoimunes e reação medicamentosas	LPA	Pneumonias eosinofílicas (secundárias e idiopáticas)
Pneumonia virais	Pneumonia bacterianas	

Legenda: DAD = Dano Alveolar Difuso; DPF = Doença Pulmonar Fibrótica ou Pneumonia Fibrótica Idiopática (IPF); DTC = Doença do Tecido Conjuntivo; LPA = Lesão Pulmonar Aguda; PCO = Pneumonia Criptogênica em Organização; PH = Pneumonia de Hipersensibilidade; PINE = Pneumonia Intersticial Não Específica; PIU = Pneumonia Intersticial Usual. Adaptado de Costa e Silva; Rolo, 2017; Gharsalli *et al.* (2018); Meyer *et al.* (2012) e Rice, 2022.

A citologia quantitativa deve ser estável na diferenciação de DIP, pois alguns estudos (Efared *et al.*, 2017; Jara-Palomares *et al.*, 2009) mostraram que seus resultados possuem diferença estatística significativa entre parâmetros celulares de DIP. Porém, vale salientar que a falta de padronização multicêntrica, seja da broncoscopia ou da análise microscópica interfere na conclusão do laudo.

3.1.4 Células epiteliais

Os principais componentes epiteliais são as células escamosas e colunares ciliadas. Sua presença, caso represente mais de 5% da amostra, pode ser considerada contaminação no processamento broncoscópico, sendo considerada como critério de exclusão (Meyer *et al.*, 2012). Entretanto, em lesões neoplásicas, é possível identificar as células epiteliais atípicas ou já em estágios de malignidade, como mostrado na figura 5.

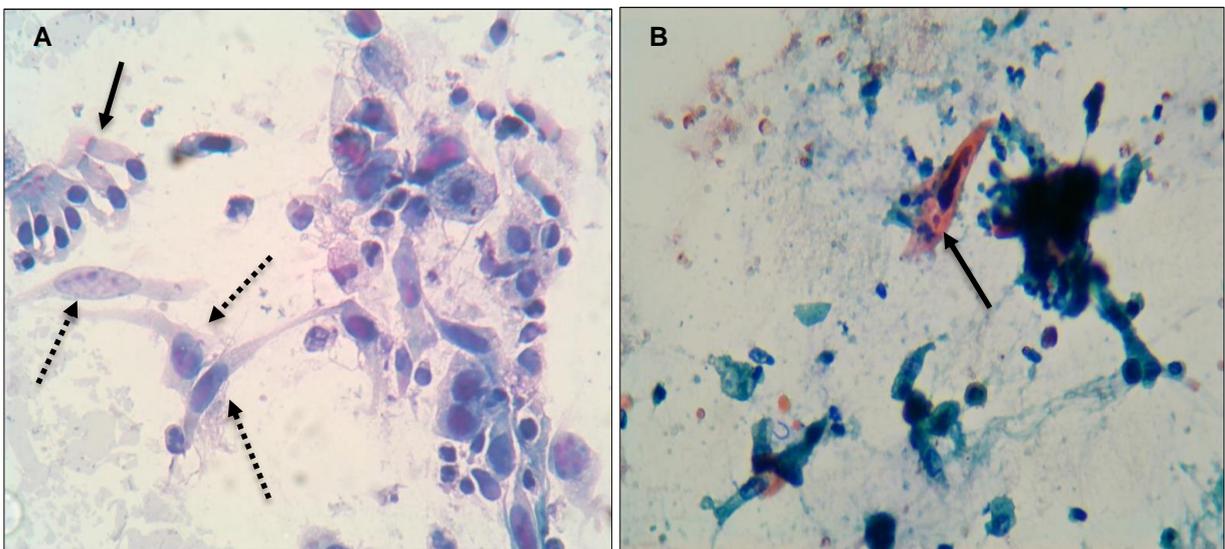


Figura 5: Microfotografia de células colunares ciliadas e escamosas atípicas: (A) Células colunares ciliadas típicas (seta), arranjadas em paliça e atípicas (seta pontilhada), apresentando núcleos alongados e hiper Cromáticos. Também é possível identificar macrófagos e linfócitos. (B) Célula escamosa disqueratótica e queratinizada, apresentando núcleo atípico e hiper Cromático (seta). Colorações em Papanicolaou. Aumento 400x. Sistema de captura *HAYEAR USB Microscope camera*. Autoria própria, 2024.

Como citado anteriormente, a citologia do LBA foi baseada na pesquisa de células cancerígenas, porém, suas principais utilidades, atualmente, são para pesquisa de DIP e infiltrados pulmonares (Choo *et al.*, 2019). É possível utilizar a citopatologia do LBA como pesquisa primária em pacientes com suspeita de lesão neoplásica, sendo considerada pertinente por ser uma técnica minimamente invasiva e com resultados específicos considerados satisfatórios (Girard *et al.*, 2017).

Entre as lesões cancerígenas, o câncer pulmonar de células não pequenas (do inglês, *Non-small cell lung cancer*, NSCLC) são as principais lesões malignas

detectadas pelo LBA, as quais são subclassificadas entre carcinoma de células escamosas (CCE) e adenocarcinoma (ADC). Entretanto, também é possível detectar demais lesões malignas, como leucemias, metástases, linfomas e outros tipos de neoplasias pulmonares (Bezel *et al.*, 2016). A divisão entre CCE e ADC é fundamental para o laudo citológico, assim como a abordagem clínica. Por fim, o diagnóstico diferencial é finalizado após somar os critérios morfológicos com a imuno-histoquímica (IHQ) (Sung *et al.*, 2020).

Investir na detecção prévia de lesões tumorais no pulmão é essencial para reduzir os casos de morbimortalidade (Sareen e Pandey, 2016). No caso da citologia do LBA, quando usada para diagnosticar CCE e ADC, alguns estudos mostram que a sensibilidade pode variar entre, aproximadamente, 48% a 73%; enquanto a especificidade é comumente maior que 95% (Pachori *et al.*, 2020; Sareen e Pandey, 2016).

3.2 DOENÇAS INTERSTICIAIS, INFECÇÕES E NEOPLASIAS PULMONARES

De uma forma geral, as doenças intersticiais pulmonares (DIP) possuem infiltração leucocitária que são associadas a inflamações agudas e/ou crônicas, entretanto, é difícil diagnosticá-las pelo fato de possuir uma natureza complexa e pela ausência de agentes etiológicos, muitas vezes sendo classificadas como doenças idiopáticas. Além disso, existem várias subclassificações de DIPs que parece se tratar das mesmas doenças, e isso também reflete em uma dificultosa determinação epidemiológica (Staal, van der *et al.*, 2023; Wijsenbeek, Suzuki e Maher, 2022).

Uma das principais DIPs são as pneumonias de hipersensibilidade (PH), pneumonia intersticial não específica (PINE), doença pulmonar fibrótica (DPF) ou pneumonia fibrótica idiopática (PFI) e pneumonias por causas secundárias, como doenças autoimunes e doenças granulomatosas. Como demonstrado na tabela 2, a quantidade relativa das células imunes da população do LBA possui relações diagnósticas com essas DIPs (Meyer *et al.*, 2012; Meyer e Raghu, 2011).

A análise do LBA, isto é, características físicas e componentes citológicos, quando somadas aos exames de imagens, são suficientes para determinar DIPs (Gharsalli *et al.*, 2018). O predomínio de leucócitos analisados na citologia relativa, como linfócitos, neutrófilos e eosinófilos são atrelados a tipos específicos de DIPs, como o aumento de linfócitos é mais comum em PH, entretanto, também pode ser

observado em DPF. Em casos de padrões citológicos semelhantes, dados clínicos, de imagens e fatores de exposição são critérios que auxiliam no diagnóstico diferencial (Sobiecka *et al.*, 2023).

Semelhante a investigação de DIP, os casos de infecções também alteram a contagem celular relativa, além de causar alterações reativas em células epiteliais (Pesci *et al.*, 2010). Essas alterações citológicas, geralmente, são mais específicas ao tipo de microrganismo infectante. Apesar de ser possível identificar alguns agentes pela microscopia ou os efeitos citopáticos, os melhores métodos para diagnosticar infecção a partir do LBA são os testes de cultura microbiológica e testes moleculares (Martínez-Girón e Pantanowitz, 2017; Subhagan *et al.*, 2022).

Apesar de ser desenvolvida com o objetivo de diagnosticar neoplasias pulmonares, a citologia do LBA possui algumas limitações para a pesquisa de células malignas, como o local anatômico e o tamanho do tumor (Boonsarngsuk, Kanoksil e Laungdamerongchai, 2015). Mesmo assim, as análises citopatológicas possuem especificidade considerável, enquanto sensibilidade com ampla variância (Girard *et al.*, 2017; Tomar *et al.*, 2016).

3.3 UTILIZAÇÃO DO LBA NO DIAGNÓSTICO IMUNO-MOLECULAR

As infecções do trato respiratório inferior são responsáveis por grandes números de morbimortalidade no mundo (Martínez-Girón e Pantanowitz, 2017). Uma das principais aplicações do LBA é a pesquisa de agentes infecciosos por testes de culturas microbiológicas (Recio *et al.*, 2021). É rotineiro a pesquisa de fungos e bactérias no trato respiratório inferior por intermédio do LBA, mas com o progresso do diagnóstico molecular, doenças provocadas por vírus, principalmente as pneumonias virais, foram inclusas na pesquisa clínica (Davidson *et al.*, 2020).

Não apenas voltada a pesquisa viral, as técnicas moleculares são fundamentais para uma detecção de microrganismos de forma mais sensível, principalmente quando os pacientes estão sob tratamento médico ou quando os testes convencionais não são suficientes (Subhagan *et al.*, 2022). Uma das principais metodologias se baseia na amplificação do material genético, sendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a mais comum na pesquisa de patógenos respiratórios. Além de ser utilizada para detecção de material genético de microrganismos e vírus, a PCR também pode detectar mutações em genes superexpressos, os quais podem

estar associados a doenças malignas (Han *et al.*, 2023; Ryu *et al.*, 2023).

Outras técnicas baseadas na PCR são utilizadas para diagnosticar doenças a partir do LBA, como Nested-PCR, a qual dispõe de uma melhor sensibilidade, podendo ser utilizada nos casos onde pouco material genético é encontrado; Multiplex-PCR, que permite identificar espécie e genótipos diferentes, além de poder reconhecer genes alterados; e por fim, a PCR em tempo real, apresentando melhor sensibilidade e especificidade que a PCR convencional, podendo quantificar o material genético expresso na amostra (Lee *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2019; Scherer *et al.*, 2018).

Nos casos de doenças autoimunes, as marcações por imunofenotipagem são determinantes, principalmente nos casos de linfocitose (Davidson *et al.*, 2020; Takeshita *et al.*, 2021). A citometria de fluxo, além de especificar os tipos de doenças autoimunes e linfoproliferativas, pode indicar fatores prognósticos e alvo terapêutico. Além das razões CD4:CD8 dos linfócitos, a diferenciação dos macrófagos é uma metodologia usada para determinar atividades imunológicas, incluindo doenças cancerígenas. Estes testes são imprescindíveis quando a suspeita clínica e exames de imagens não fornecem hipóteses concretas, além de contribuir com o diagnóstico diferencial (Kwiecień *et al.*, 2023; Oda *et al.*, 2014; Wahlstrom *et al.*, 2009).

Outro meio diagnóstico é desempenhado pela marcação antígeno-anticorpo, pela imunocitocitoquímica. O diagnóstico final possui valores preditivos de qualidade, além de determinar o fator prognóstico tanto para doenças infecciosas, intersticiais e neoplásicas. Comumente, as células epiteliais têm marcações favoráveis, principalmente na pesquisa de metástases. Entretanto, células do parênquima também podem ser usadas para o diagnóstico diferencial (Chen *et al.*, 2014; Metovic *et al.*, 2020).

3.4 PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV)

O HPV é um vírus que pertence a família Papillomaviridae, tem formato icosaedro, não envelopado, com diâmetro entre 44 e 55 nanômetro (nm) e possui o ácido desoxirribonucleico (DNA), com aproximadamente 8000 pares de bases (pb), como seu material genético. O seu genoma é dividido entre a região LCR (do inglês, *Long Control Region*); os genes tardios L1 e L2 (do inglês, *Late*); e por fim, os genes precoces E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (do inglês, *Early*) (Figura 6). Os genes L1 e L2 são

responsáveis por codificar as proteínas estruturais do vírus, enquanto os genes precoces codificam as oncoproteínas. Ele dispõe de vários genótipos que são capazes de infectar humanos e animais (Beltrão *et al.*, 2015; Bhatla e Singhal, 2020; Hausen, Zur, 2002). Aproximadamente 200 tipos de HPV podem infectar humanos – os quais são classificados entre: Alto risco (AR), Baixo risco (BR) oncogênico ou risco indeterminado (Freitas, de *et al.*, 2016; Giannella *et al.*, 2021).

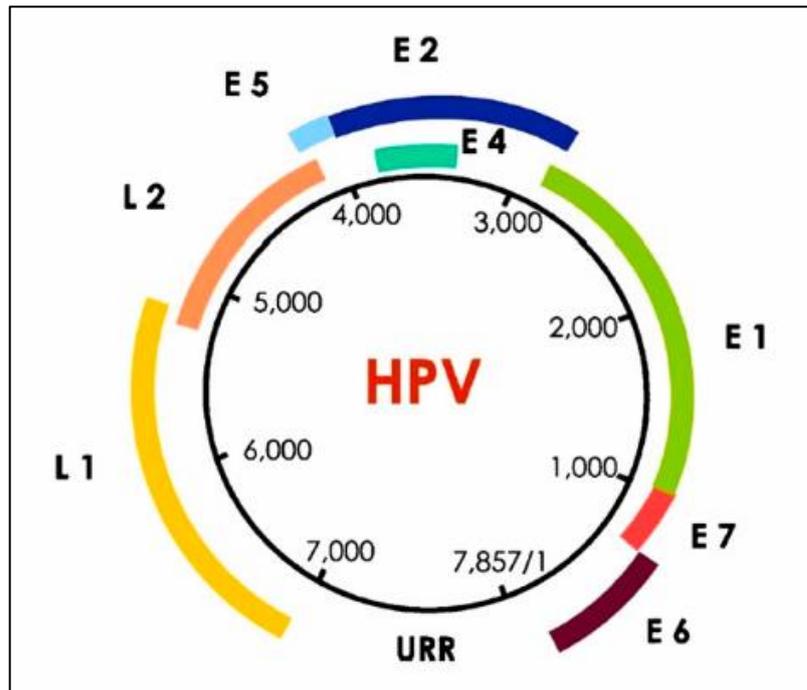


Figura 6. Genoma do HPV: Região URR (do inglês, *Upstream Regulatory Region*) é sinônimo de LCR. Fonte: Eide e Debaque (2012).

A principal infecção genital no mundo é provocada pelo HPV (Eide e Debaque, 2012) e os tipos mais frequentes de HPV-AR são os HPV16 e HPV18, enquanto os HPV-BR são os HPV6 e HPV11 (Stanley, 2014). Entretanto, devido as mutações genéticas do vírus, é comum que em cada região apresente prevalência diferente sobre os tipos de HPV (Araldi *et al.*, 2018).

Os HPV-AR são provocadores de lesões precursoras do câncer no colo uterino, enquanto os HPV-BR provocam lesões verrucosas e condiloma (Sasagawa, Takagi e Makinoda, 2012). A infecção pelo vírus HPV, no epitélio cervical, inicia-se pela penetração do vírus através de microlesões no tecido e pela persistência, onde o HPV entra em contato com células basais e é internalizado por processo de fagocitose (Araldi *et al.*, 2018; Westrich, Warren e Pyeon, 2017). Até provocar alguma lesão inicial, o processo de replicação viral deve ser cautelosamente coordenado entre as

oncoproteínas virais e as proteínas das células do hospedeiro. As principais oncoproteínas do HPV são as E6 e E7, as quais inibem as funções da proteína p53 e retinoblastoma (pRb), respectivamente (Szymonowicz e Chen, 2020).

Para detectar o HPV nas células do hospedeiro são necessários técnicas que busquem marcar ou amplificar proteínas que estão associadas ao vírus. Geralmente essas técnicas partem do princípio de marcar reações do tipo antígeno-anticorpo, ou detectar genes, ácidos nucleicos ou as oncoproteínas virais. Uma das principais técnicas é denominada Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (León-Ordóñez e Abad-Sojos, 2019).

Apesar da PCR – e de suas variações – serem mais utilizadas, outras técnicas podem ser utilizadas para identificar o HPV, como a IHQ, Hibridização, *Western blot*, microarranjos e entre outras (Knör *et al.*, 2015; Rajaram e Gupta, 2021). A tabela 3 resume as principais técnicas e suas metodologias utilizadas para detectar o HPV.

Tabela 3. Técnicas moleculares para o diagnóstico do HPV

Alvo	Método	Técnica	Acurácia
L1	Amplificação	PCR convencional, Nested-PCR, mPCR e PCRq	95 – 100%
L1	Sonda	CH, HIS	~86%
E6 e E7	Amplificação específica, Sonda e Sequenciamento	HIS, NGS, PCR específica, mPCR, qPCR e RT-qPCR	>96%
mRNA E6 ou E7	Sonda e Sequenciamento	HIS, NGS e RT-qPCR	>96%
Ki-67 e p16	Reação Antígeno- Anticorpo	IHQ	~88%

Legenda: CH = Captura Híbrida; HIS = Hibridização *in situ*; IHQ = Imuno-Histoquímica; mRNA = messenger RNA (RNA mensageiro); NGS = *Next Generation-Sequence*; mPCR = multiplex PCR; qPCR = *quantitative* PCR (PCR em tempo real); RT-qPCR = PCR em tempo real com transcrição reversa. Fonte: Adaptado de Arbyn *et al.* (2021); León-Ordóñez e Abad-Sojos, (2019); Mes *et al.* (2020); Prigge *et al.* (2017); Rajaram; Gupta, (2021) e Torres, (2019).

3.4.1 Infecção, carcinogênese e evasão imunológica do HPV

Tomando como referência o tecido cervico-vaginal, para que ocorra a infecção do HPV, é necessário uma microfissura no epitélio e uma exposição prévia de células

mitóticas, sendo as proteínas do capsídeo (L1 e L2) facilitadoras da entrada na camada basal. Após contato com genoma do hospedeiro, as oncoproteínas E1 e E2 fazem a replicação e transcrição do DNA viral, e, posteriormente, somadas a E4, E5, E6 e E7 auxiliam na alteração da homeostase celular, criando um ambiente propício para infecção e replicação viral, além da evasão imunológica. O processo infeccioso é bem coordenado pelas oncoproteínas virais, sendo as proteínas E5, E6 e E7 as mais relacionadas aos *hallmarkers* do câncer (Burd e Dean, 2016; Roden e Stern, 2018).

Como exposto anteriormente, as oncoproteínas E6 e E7 dos HPV-AR são as principais causadoras da carcinogênese. Quando ativada, a E6 tem como principal alvo a p53, que, quando alterado, contribui com a resistência a apoptose e instabilidade cromossômica – enquanto a E7 degrada a pRb, estimulando a divisão celular e a tumorigênese. Até provocar uma lesão maligna, é necessário que a infecção seja persistente por anos, além da colaboração de cofatores que auxiliem a carcinogênese, como baixa imunidade, não aderência da vacinação e exposição a múltiplos parceiros (Fera et al., 2021; Gravitt e Winer, 2017; Hausen, Zur, 2002).

Na resposta inata, os macrófagos e células *natural killer* (NK) são recrutados pela expressão de *Toll Like Receptors* (TLR) e *Major Histocompatibility Complex* (MHC), respectivamente. Para o escape imunológico, as proteínas E6 e E7 contribuem com a evasão pela baixa expressão de moléculas de adesão quando o vírus entra em contato com células do hospedeiro, evadindo do TLR e, conseqüentemente, das células apresentadoras de antígenos (do inglês, APC). Além das proteínas E6 e E7, a E5 desempenha um papel muito importante no escape imune, retendo o sistema dos Antígenos Leucocitários Humanos (do inglês, HLA) (Franciosi et al., 2020; Sasagawa, Takagi e Makinoda, 2012).

3.4.2 HPV no tecido pulmonar

Já é consenso que o HPV é o principal agente etiológico do câncer de colo uterino, (Chagas et al., 2013), porém não abstém apenas ao sítio ginecológico. O vírus também pode ser encontrado em vários tipos de tecidos (ver figura 7).

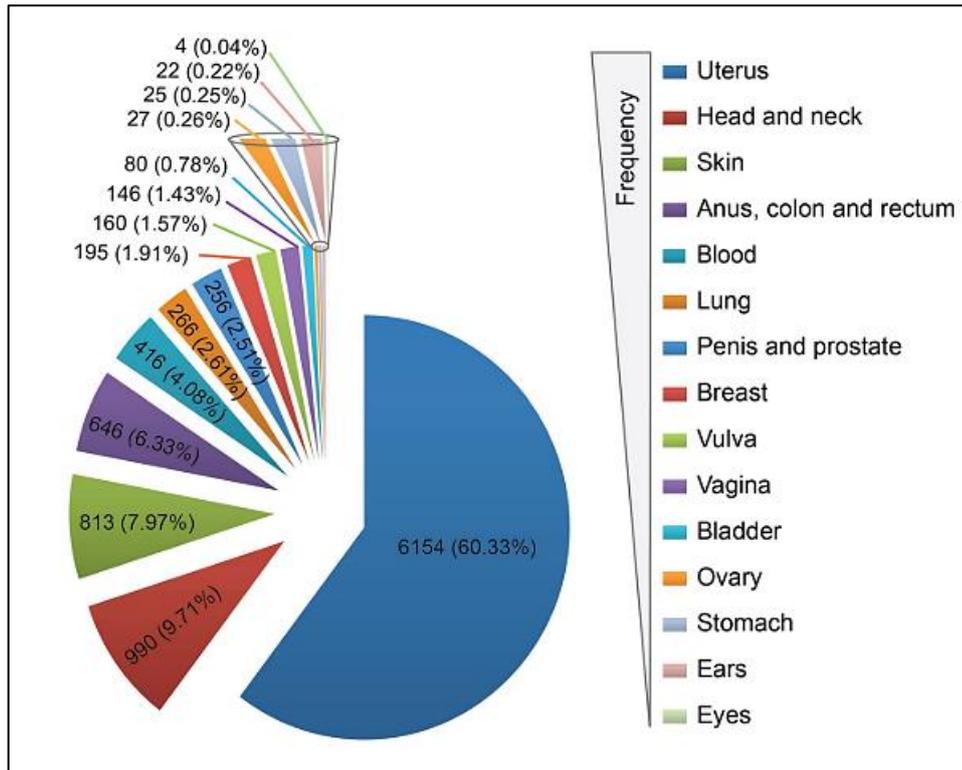


Figura 7. Pesquisas do HPV em diversos órgãos: Pesquisa em bases de dados mostrando sítios de infecção do HPV. Representação de 10,200 artigos publicados entre 2000 e 2013, utilizando descritores “HPV” e interligando com “uterus”, “cervical”, “vagina”, “vulva”, “ovary”, “stomach”, “Anus, colon and/or rectum and/or anal”, “bladder”, “Penis and/or prostate”, “head and neck and/or oral cavity and/or nose and paranasal sinuses and/or pharynx and/or larynx and/or respiratory”, “ears”, “lung”, “eyes”, “breast”, “skin”, “blood”. Fonte: Beltrão *et al.* (2015).

A pesquisa do HPV no tecido pulmonar foi impulsionada no final da década de 1970, quando Syrjanen publicou um relato de caso em que foi observado, em uma biópsia broncoscópica, células com alterações disqueratóticas, tecido com características semelhantes de lesões condilomatosas e presença de coilocitose (Syrjanen, 1979; Zhai, Ding e Shi, 2015). A partir desse ponto, vários estudos buscam associar a infecção do HPV como um fator de risco para a carcinogênese pulmonar, principalmente em lesões de ADN e CCE, incluindo pessoas não fumantes (Karnosky *et al.*, 2021). Uma das principais divergências entre os resultados encontrados são as metodologias abordadas para detectar o HPV, fatores geográficos e étnicos (Li *et al.*, 2016).

Alguns genes que estão associados a carcinogênese pulmonar também são alvos do HPV quando E6 e E7 são expressas, como a p53, pRb, HIF-1 α , EGFR, VEGF, Bcl-2 e outros genes, gerando proliferação das células pulmonares,

angiogênese e imortalização celular (Li *et al.*, 2016; Tsyganov *et al.*, 2019). O grau da lesão (estadiamento morfológico) também deve ser considerado, já que o nível de expressão de E2, E6 e E7 podem estar relacionados com o estágio da lesão (Rezaei *et al.*, 2020). Os principais HPV-AR e HPV-BR são usados como referência na detecção do vírus no tecido pulmonar. É fundamental diferenciar os tipos de HPV e os tipos histológicos do tumor, visto que a frequência da infecção viral e o risco de desenvolver o tipo da lesão diverge entre CCE e ADC (Freitas, de *et al.*, 2016; Tsyganov *et al.*, 2019; Zhai, Ding e Shi, 2015) ou não tem associação estatisticamente significativa. A tabela 4 representa uma busca no banco de dados da *PubMed* (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI), nos últimos 10 anos, artigos de meta-análise focado na presença de HPV em câncer de pulmão.

Tabela 4. HPV e câncer de pulmão: Artigos de meta-análise.

Autor/ano	Quantidade de amostras (casos/controles)	Prevalência de HPV (casos/controles)	Prevalência do HPV e tipo histológico	Locais estudados
Zhai; Ding; Shi, 2015	1578 (1094/484)	Casos: 411(37,57%); Controles: 51 (10,54%)	CCE: 529/239 (45,18%); ADC: 224/51 (22,78%)	Ásia (77,77%); Europa (22,23%)
Tsyganov <i>et al.</i> , 2019	17807 (11928/5879)	Casos: 3500 (19,65%); Controles: 1360 (23,13%)	CCE 5397/1571 (29,10%); ADC: 3906/597 (15,28%)	Ásia (46,31%); Europa (36,84%); América do Norte (10,52%); América Latina (4,21%); Oceania (2,10%)
Karnosky <i>et al.</i> , 2021	2504 (1750/754)	Casos: 548 (31,31%); Controles: 42 (5,60%)	CCE: 2750/492(17,90%); ADC: 2887/265 (9,20%)	Ásia (66,66%); Europa (26,66%); Américas (6,66%)

Legenda: No estudo de Zhai; Ding; Shi, 2015, a prevalência do HPV inclui HPV-AR e HPV-BR. Entretanto, o HPV16 foi mais prevalente (19,8% nos casos). No estudo de Tsyganov *et al.*, 2019, seus resultados sobre a prevalência de HPV nos casos estudados e em amostras controle são expressos de forma independente do tipo morfológico. Contudo, o tipo morfológico é abordado em associação com a área demográfica (p.e.: O CCE foi mais prevalente na Ásia, seguido das Américas e Europa, com prevalência estimada em 28,8%, 10,0% e 5,1%, respectivamente).

O HPV já foi detectado também em sangue periférico de pacientes com e sem lesão cervical (Nascimento, Do *et al.*, 2021), o que pode sugerir que seu material ganhe a circulação hematológica e infecte outros tecidos, já que seu DNA foi detectado em células mononucleares sanguíneas, e em pacientes com câncer de pulmão e sem câncer de pulmão (Tsyganov *et al.*, 2019; Zhai, Ding e Shi, 2015).

Dentre as doenças não neoplásicas do pulmão, a infecção viral também pode ser considerada um fator para as DIP, principalmente na Pneumonia Fibrótica Idiopática/Doença Pulmonar Fibrótica (DPF) e na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (Rezaei *et al.*, 2020).

Alguns estudos (Hussen *et al.*, 2021; Karnosky *et al.*, 2021; Tsyganov *et al.*, 2019; Zhai, Ding e Shi, 2015) confirmam a detecção do DNA-HPV em biópsias pulmonares sem lesão cancerígena, entretanto não caracterizam, morfológicamente, o diagnóstico final da biópsia. Vale salientar que a inflamação crônica estimulada pelo HPV corrobora com alterações no microambiente tumoral assim como alterações parenquimais, podendo ser um facilitador para lesão pulmonar de forma geral (Rojas *et al.*, 2022). Marcadores inflamatórios também se encontram elevados na presença do HPV no tecido pulmonar (Rezaei *et al.*, 2020), fazendo com que vírus oncogênicos não sejam fatores de risco apenas para doenças neoplásicas do pulmão.

Apesar de confirmar a presença do HPV no tecido pulmonar, ainda falta estudos que confirmem que seus mecanismos oncogênicos resultem na carcinogênese pulmonar e como infectam as células pulmonares (Freitas *et al.*, 2016).

4 METODOLOGIA

Refere-se a um estudo observacional, analítico transversal.

4.1 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS E TRANSPORTE

Anteriormente a aquisição da amostra, os participantes da pesquisa foram informados pelo procedimento e submetidos a um questionário simples com a finalidade de obter dados clínicos sociais. Os pacientes não foram, unicamente, remetidos a broncoscopia para a finalidade acadêmica, mas também para fins diagnósticos ou investigação clínica. A obtenção do fluido do LBA consiste na técnica de broncoscopia, a qual utiliza um broncoscópio – tubo de visualização, sendo acoplado com uma câmera em sua extremidade para analisar as vias aéreas (nasofaringe, laringe, traqueia e brônquios). Tal técnica é considerada minimamente invasiva. Após identificação do local a ser estudado, foi injetado, aproximadamente, 100 mililitros (mL) de solução salina, e então recuperou-se, no mínimo, 5% do volume instilado. Em seguida, a amostra recuperada que contém células da árvore brônquica é transferida a um recipiente de plástico, previamente identificado, para transporte. As amostras foram coletadas nos hospitais da região Metropolitana do Recife pela equipe médica da pneumologia e transportadas em temperatura refrigerada (aproximadamente 4°C), sem substância preservadora e recebidas no LPCM (Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares), do laboratório central do Centro de Biociências (CB). O transporte é feito logo após o procedimento broncoscópico, respeitando o limite de menos de 24h após aquisição amostral.

4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram aceitas amostras transportadas em temperatura refrigerada, com mais de 5mL, recebidas durante o turno matutino e/ou vespertino, com suas devidas identificações e com a ficha de coleta propriamente preenchida (Anexo A), conforme pré-estabelecido pelo LPCM. Após validação pré-analítica, as amostras foram quanto a turbidez e coloração macroscópica. Não foram aceitas amostras sem identificação.

4.2 PROCESSAMENTO

4.2.1 Análise molecular

Inicialmente, é aliqüotado, em duplicata, 500 microlitros (μ L) do fluido do LBA

para microtubos (*eppendorf*) de 1,5mL contendo 1000µL de Phosphate-buffered saline (PBS) em temperatura ambiente. Em seguida, os microtubos contendo PBS e fluido do LBA foram transferidos a freezer de -20°C e 80-°C. A extração do DNA consistiu na adaptação do protocolo do kit de extração EasyPure Genomic® Transgene (Anexo B). Posteriormente a isolação do *template*-DNA, as amostras foram submetidas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando *primers* para β-globina (*reverse*PC04: ACACA ACTGTGTTCACTAGC; *forward*GH20: CAACTTCATCCACGTTCCACC) para controle endógeno. Para detectar DNA-HPV, foi utilizado o conjunto de *primers* MY 09/11. (MY09: CGTCCMARRGGAWACTGATC MY11: GCMCAGGGWCATAAYAATGG). Em seguida, foi realizada Nested-PCR com os *primers* GP5/6 (GP5: TTTGTTACTGTGGTAGATAC GP6: GAAAATAAACTGTAAATCA). O resultado da amplificação foi analisado em gel de agarose (2%), vinde eletroforese.

4.2.2 Análise citológica

Após o recebimento das amostras, foi feita a análise pré-analítica. Em seguida, a amostra é transferida a tubos de polipropileno para centrifugação (10 min a 1200 RPM). Após formação do sedimento, descarta a metade do sobrenadante e pipeta 200 microlitros (µL) da amostra (*pellet* e sobrenadante) e transfere para câmara de amostra, a qual está acoplada com a lâmina microscópica, devidamente identificada, para seguir a citocentrifugação (5 min a 1200 RPM). Posteriormente, as lâminas são submetidas a colorações de Papanicolaou, May-Grunwald-Giemsa (MGG) e coloração rápida (panóptico). A determinação de celularidade foi feita a partir da contagem de células epiteliais pela câmara de Neubauer, considerando hiper celular amostras com $>2.5 \times 10^5$ mL ou pela análise quantitativa relativa, onde foi considerado hiper celular amostras com >30 células epiteliais por campo, utilizando o aumento em 100x e >10 células por campo, utilizando o aumento em 400x. Não houve nenhum tipo de automação no preparo e análise das amostras. Na análise citopatológica, foram avaliados os parâmetros morfológicos, contagem diferencial leucocitária e detecção, quando possível, de agentes microbiológicos.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram demonstrados e organizados em planilhas do software Excel (Microsoft), SPSS e BioEstat 5,0. Os testes estatísticos feitos

consistem em: Cálculo de *Odds ratio* (OR), para mensurar o risco relativo entre a exposição ao HPV com a possibilidade desenvolver a doença; por fim, o Teste exato de Fisher, o qual calcula a hipótese de duas variáveis.

4.4 ASPECTOS ÉTICOS E DADOS HOSPITALARES

A realização da presente pesquisa obedece aos preceitos éticos da Resolução 466/12 ou 510/16 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Seguindo os requisitos da Resolução 196 de 1996 e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), número do parecer: 5.736.581 e CAAE 62776022.6.0000.5208. Os dados clínicos-sociais e prontuários foram utilizados para associar com os resultados microscópicos e moleculares. Estes documentos ficaram arquivados no LPCM no período de 5 anos após conclusão deste projeto.

5 RESULTADOS

Um total de 146 pacientes foram selecionados neste estudo. Alguns lavados foram descartados por conta de hipocelularidade leucocitária e epitelial, degeneração ou outra razão que não possibilitou a análise celular, totalizando 132 pacientes inclusos. Desses, 73 (55.30%) foram mulheres e 59 (44.70%) homens. As amostras foram provenientes de hospitais da região metropolitana de Recife, totalizando 115 (87.12%) do hospital das clínicas/UFPE e 17 (12.87%) do hospital universitário Oswaldo Cruz.

Desses casos utilizados no estudo, 53 (40.15%) possuíam suspeitas de DIP; 30 (22.72%) suspeitas infecção; 19 (14.39%) suspeitas de neoplasias; 19 (14.39%) não tinham suspeitas clínicas bem concretizadas e 11 (8.33%) possuíam suspeitas de doenças secundárias (Figura 8).

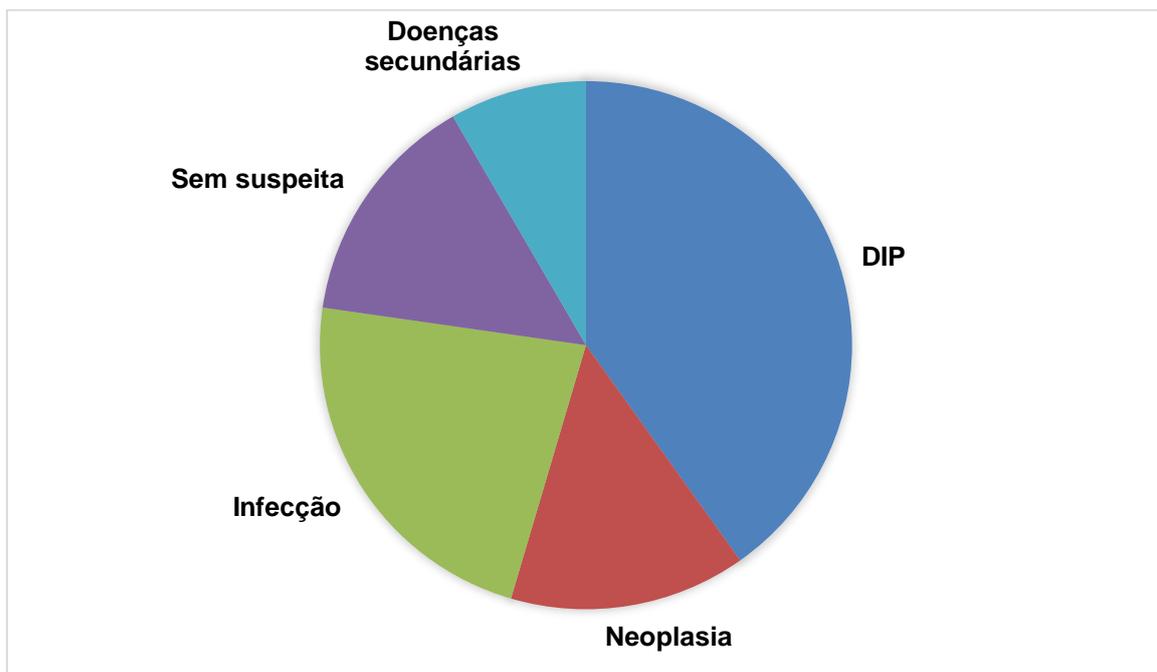


Figura 8. Suspeitas clínicas: Entre as principais DIP suspeitas, a Pneumonia de Hipersensibilidade (PH), Pneumonia Intersticial Não-Específica (PINE) e Bronquiólite foram as mais ocorrentes. A classificação de neoplasia inclui as neoplasias primárias, enquanto a categoria de Doenças secundárias engloba alterações provocadas por doenças de origem não pulmonar. Autoria própria.

As características clínico-sociais foram sumarizadas na tabela 5. Os pacientes com suspeita de neoplasia foram predominantemente do sexo masculino e com histórico de tabagismo. A média de idade também foi maior no grupo neoplasia em

comparação ao grupo DIP e infecção. Não houve diferença significativa nos grupos DIP e infecção em comparação ao sexo e fator tabagismo. Os pacientes do grupo DIP e infecção são os que mais usam medicamentos esteroidais e imunossupressores, representando, aproximadamente, 34% e 37%, respectivamente. Apesar de dados escassos, os fatores de exposição foram mais incidentes em pacientes com suspeita de DIP, os quais possuíam padrões citológicos de PH.

Tabela 5. características clínico-sociais.

Fatores clínico-sociais				
Idade	Tabagismo	Uso de esteroides/imunossupressores	Fatores de exposição ou ocupacionais	
57.82 (14.7)	Fumantes ou ex-fumantes = 58 (43.93%)	Sim = 48 (36.36%)	Sim = 3 (2.27%)	
	Não-fumantes = 66 (50%)	Não = 75 (56.81%)	Não = 129 (97.73%)	
Padrões clínicos associados a suspeita				
	DIP (53)	Infecção (30)	Neoplasia (19)	Outras doenças (30)
Idade	61.78 (11.8)	52.97 (16.5)	66,24 (10.0)	51,33 (14.9)
Sexo				
Homem	29 (54.72%)	14 (46.66%)	12 (63.16%)	9 (30%)
Mulher	24 (45.28%)	16 (53.33%)	7 (36.84%)	21 (70%)
Tabagismo				
Fumantes ou ex-fumantes	27 (50.94%)	14 (46.66%)	12 (63.15%)	5 (16.67%)
Não-fumantes	22 (41.50%)	14 (46.66%)	6 (31.58%)	25 (83.33%)
Uso de esteroides/imunossupressores				
Sim	18 (33.96%)	11 (36.66%)	4 (21.05%)	15 (50%)
Não	32 (60.37%)	16 (53.33%)	14 (73.68%)	14 (46.66%)
Fator de exposição ou ocupacionais				
Sim	2 (3,77%)	1 (3,33%)	NI	NI
Não	51 (96,23%)	29 (96,66%)	19 (100%)	NI

Legenda: NI = Não informado. O grupo de Outras doenças englobam doenças secundárias do pulmão e pacientes sem suspeitas clínicas e radiológicas bem definidas, excluindo DIP, neoplasias primárias e infecções.

A figura 9 mostra os casos que possuem concordância e discordância entre as suspeitas clínicas e análise citológica relativa, como estabelecido por Meyer *et al.* (2012) (Meyer *et al.*, 2012).

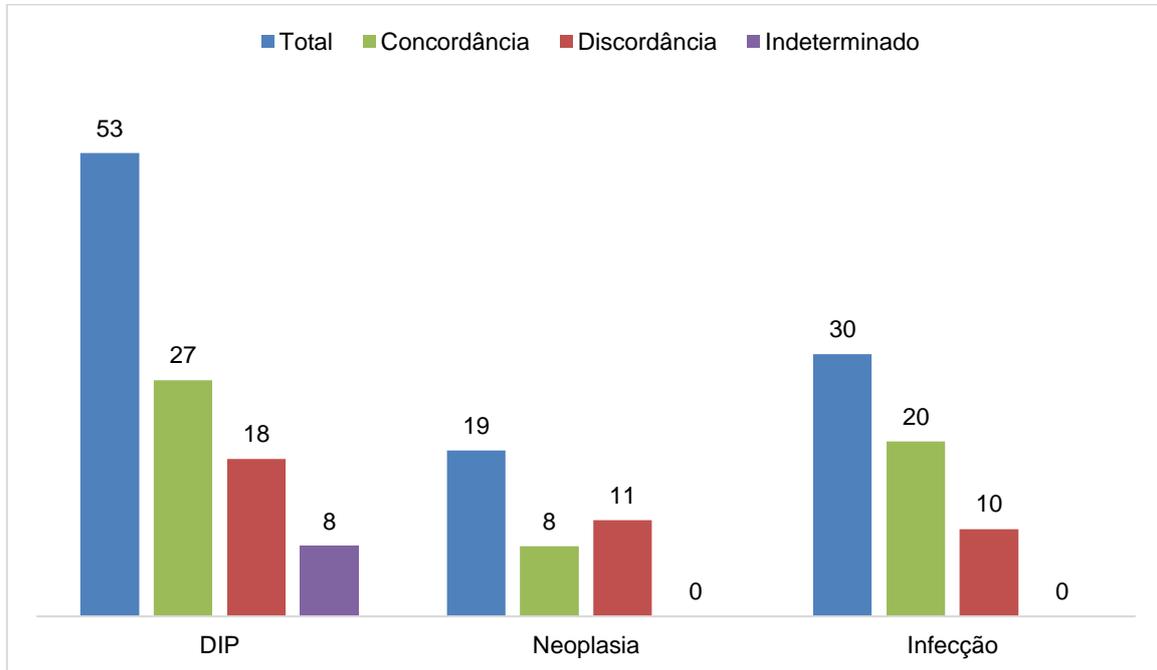


Figura 9. Associação de suspeita clínica com achados citológicos do LBA: As taxas de concordâncias foram mais promissoras em suspeitas de DIP e infecção quando comparado as suspeitas de neoplasia primária. Os casos indeterminados demonstram que a contagem relativa pode culminar em resultados fiéis, porém depende de dados dos exames de imagens e algoritmos citológicos. Autoria própria.

5.1 RESULTADOS MOLECULARES

As amostras que foram submetidas a pesquisa de HPV foram selecionadas em 3 grupos: Citologias confirmatórias para DIP (G1); LBA com hiper celularidade escamosa (G2) e amostras suspeitas/confirmadas para neoplasia pulmonar (G3), totalizando 46 amostras. A celularidade foi definida por leitura prévia da lâmina, com auxílio de câmara de Neubauer e análise da citologia relativa. Apenas as células epiteliais foram englobadas na caracterização de celularidade. A classificação constitui-se entre: hipocelular; celularidade moderada e hiper celular. Foi considerado com celularidade moderada amostras que possuíam >10 células em aumento de 100 e >5 células em aumento de 400x. A hiper celularidade foi considerada em amostras com >30 células por campo, em aumento de 100x, e >10 células por campo, em aumento de 400x.

Todas as amostras tiveram amplificação do gene β -globina. Não houve detecção de DNA-HPV utilizando a PCR convencional. Entretanto, houve amplificação em 4 (8,69%) em Nested-PCR (figura 10). Resultados demonstrado na tabela 6.

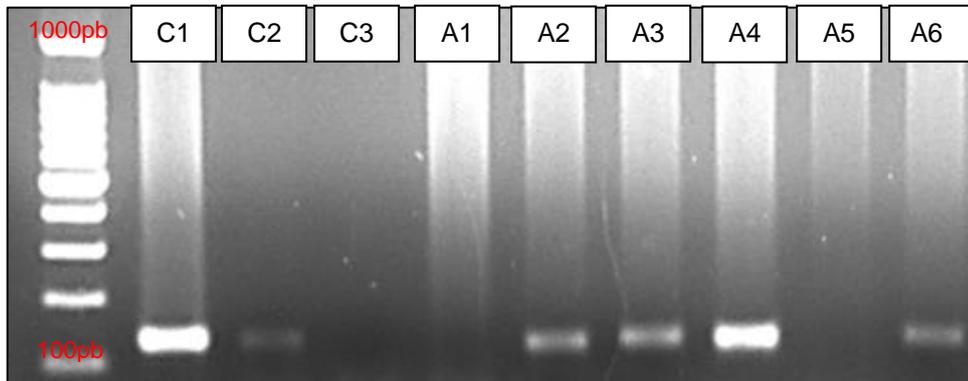


Figura 10. Eletroforese: Gel de agarose 2%. C1 e C2 referentes aos controles positivos, oriundas de *Hela* HPV18 e amostra cervical (LSIL, Lesão de baixo grau). C3 referente ao controle negativo (*DNase free*). Os poços entre A1 e A6 são pertinentes ao DNA extraído de células do LBA. Houve positividade nos casos A2, A3, A4 e A6.

Tabela 6. Detecção DNA-HPV em amostras de lavado broncoalveolar (LBA).

	PCRc	Nested-PCR (%)	OR	Fisher	Valor de P
G1 (18)	--	2 (11.1%)	0.875	0.21	0.111
G2 (16)	--	2 (12.5%)	1.142	0.27	0.125
G3 (12)	--	--	NR	NR	NR
Total (46)	--	4 (8.69%)	2.095	0.65	0.672

Legenda: Detecção. NR = Não realizado; PCRc = PCR convencional. OR = *Odds ratio*; Fisher = Teste exato de Fisher. G1 = Casos de DIP confirmados pela citologia; G2 = LBA com hiperplasia escamosa; G3 = Casos suspeitos/confirmados para neoplasia pulmonar pela citologia.

A tabela 7 revela as características citológicas das amostras positivas. A figura 11 une as microfotografias dos casos positivos para DNA-HPV.

Tabela 7. Citologia relativa dos casos positivos para DNA-HPV.

	Macrófagos (%)	Linfócitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Células epiteliais
Amostra 1	82	10	08	--	> 5%
Amostra 2	51	09	38	--	Até 5%
Amostra 3	70	07	21	02	> 5%
Amostra 4	38	29	33	--	Até 5%

Legenda: As células epiteliais englobam células escamosas e colunares, consoante Meyer et al. (2012).

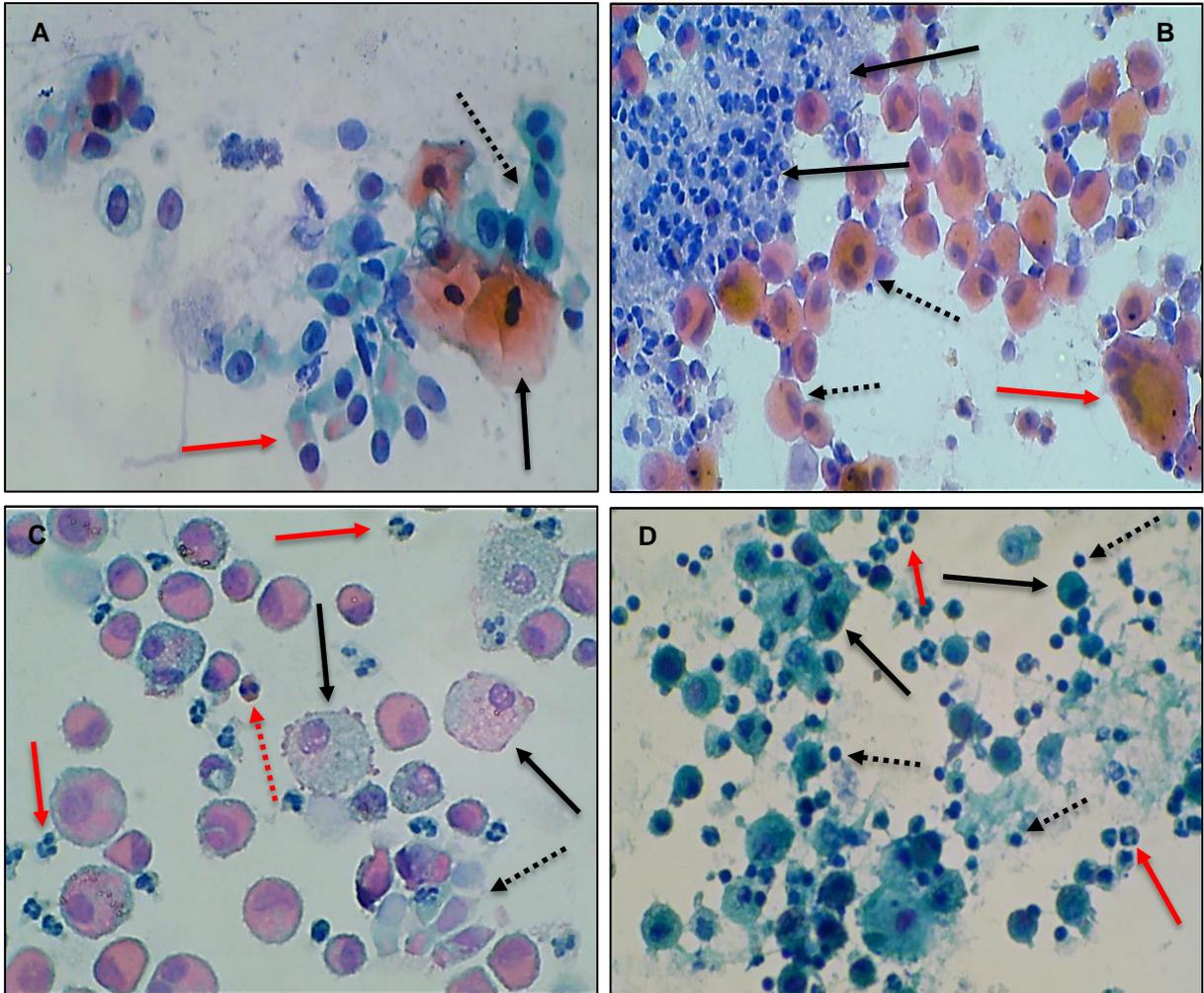


Figura 11. Microfotografia dos casos positivos para DNA-HPV. (A) Referente a amostra 1, apresentou várias células epiteliais, destaque para células escamosas queratinizadas (seta) e em metaplasia (seta pontilhada). Também é possível identificar células colunares (seta vermelha). (B) Referente a amostra 2, tendo como principal característica o predomínio de neutrófilos (setas), além de macrófagos (seta pontilhada) e um único multinucleado (seta vermelha). (C) Referente a amostra 3, apresentando vários macrófagos espumosos e com hemácias aderidas ao citoplasma (setas), células colunares ciliadas (seta pontilhada), neutrófilos (setas vermelhas) e um único eosinófilo (seta pontilhada vermelha). (D) Referente a amostra 4, apresentando vários macrófagos (setas), linfócitos (setas pontilhadas) e neutrófilos (setas vermelhas). Colorações em Papanicolaou. Aumento 400x. Sistema de captura HAYEAR USB Microscope camera. Autoria própria, 2024.

5.2 RESULTADOS CITOLÓGICOS

Como demonstrado na tabela 2, as alterações leucocitárias no LBA indicam padrões citológicos de doenças intersticiais e infecções. Observou-se que a neutrofilia

apresentou a maior incidência, sendo identificada em 112 casos, correspondendo a 84.8% do total. Em seguida, o predomínio de linfócitos foi observado em 40 casos (30.3%), enquanto a eosinofilia foi registrada em 20 casos (15.1%).

Além disso, a coexistência de mais de um tipo de predomínio celular foi notada em alguns casos. Linfocitose e neutrofilia ocorreu em 29 casos (21.9%), indicando uma ocorrência relativamente frequente dessa associação. Por outro lado, a linfocitose associada à eosinofilia foi consideravelmente mais rara, aparecendo em apenas 2 casos (1.5%). A neutrofilia e eosinofilia, coexistindo, foram identificadas em 20 casos (15.1%), refletindo uma proporção similar à da eosinofilia isolada.

Notavelmente, a associação de linfocitose, neutrofilia e eosinofilia foi excepcionalmente rara, sendo encontrada em apenas 2 casos (1.5%). Essa observação sublinha a infrequência de uma resposta inflamatória que envolva simultaneamente os três tipos de células.

Nos casos de infecções, o aumento de neutrófilos foi evidenciado. Os achados neoplásicos são determinantes quando é observado atipia ou malignidade em células epiteliais, sendo representada na figura 12. Além disso, foi observado neste estudo que a neutrofilia foi presente em quase todos os casos de suspeita de neoplasia.

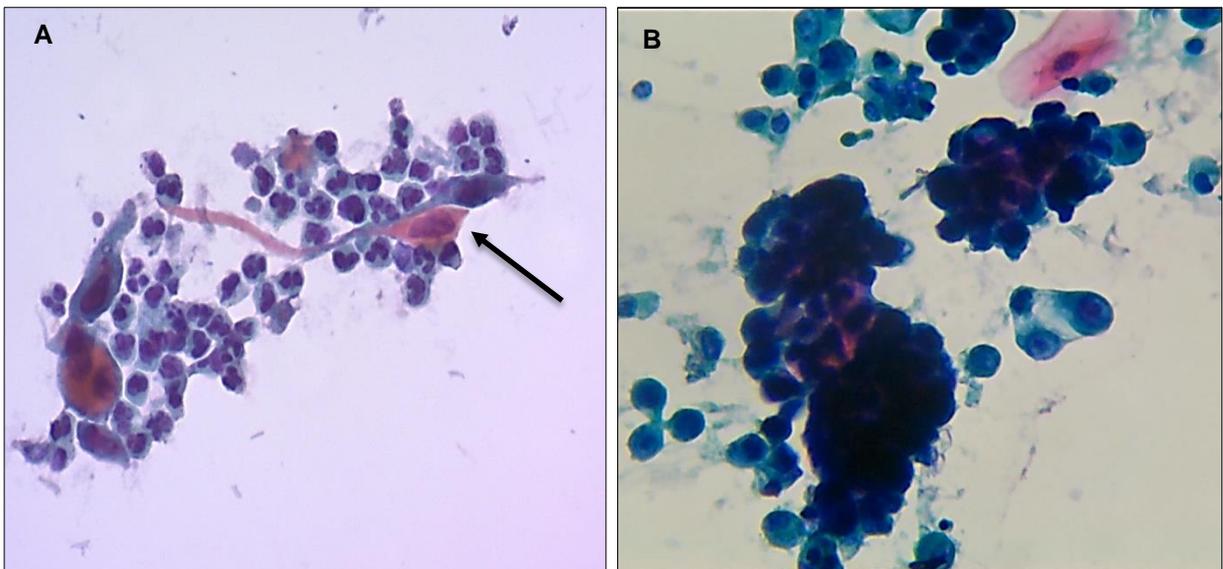


Figura 12. Microfotografia de lesões malignas. (A) Células escamosas malignas, proveniente de paciente com Carcinoma de Células Escamosas (CCE), apresentando morfologia fusiforme, núcleo atípico, com alterações de contorno e queratinização (seta). (B) Células colunares atípicas, consistente com Adenocarcinoma (ADN), apresentando agrupamentos estratificados, anisocucleose e núcleos hiper cromados. Colorações em Papanicolaou. Aumento 400x. Sistema de captura *HAYEAR USB Microscope camera*. Autoria própria, 2024.

Sobre as Doenças Intersticiais Pulmonares (DIP), totalizando 53 casos, observou-se a linfocitose em 15 ocorrências (28.3%). Esta foi particularmente prevalente nas suspeitas de Pneumonia de Hipersensibilidade (PH), representando 10 casos. A neutrofilia, por sua vez, esteve presente em 46 casos (86.7%), exibindo maior prevalência igualmente nas suspeitas de PH, totalizando 21 casos. Também foi frequente em 11 casos de Pneumonia Intersticial Não Específica (PINE), 5 casos de bronquiolite e 4 casos de Doença Pulmonar Fibrosante (DPF). Quanto à eosinofilia, esta foi identificada em 10 casos (18.8%), mostrando-se significativa nos casos de bronquiolite, DPF e PH. Os casos de Pneumonia de Hipersensibilidade associada a Autoimunidade (PHAA) e Pneumonia Intersticial Usual (PIU) também apresentaram uma média aumentada de neutrófilos (>3%), contudo, o percentual de linfócitos foi maior em PIU do que em PHAA. Tais dados são demonstrados na figura 13 e tabela 8.

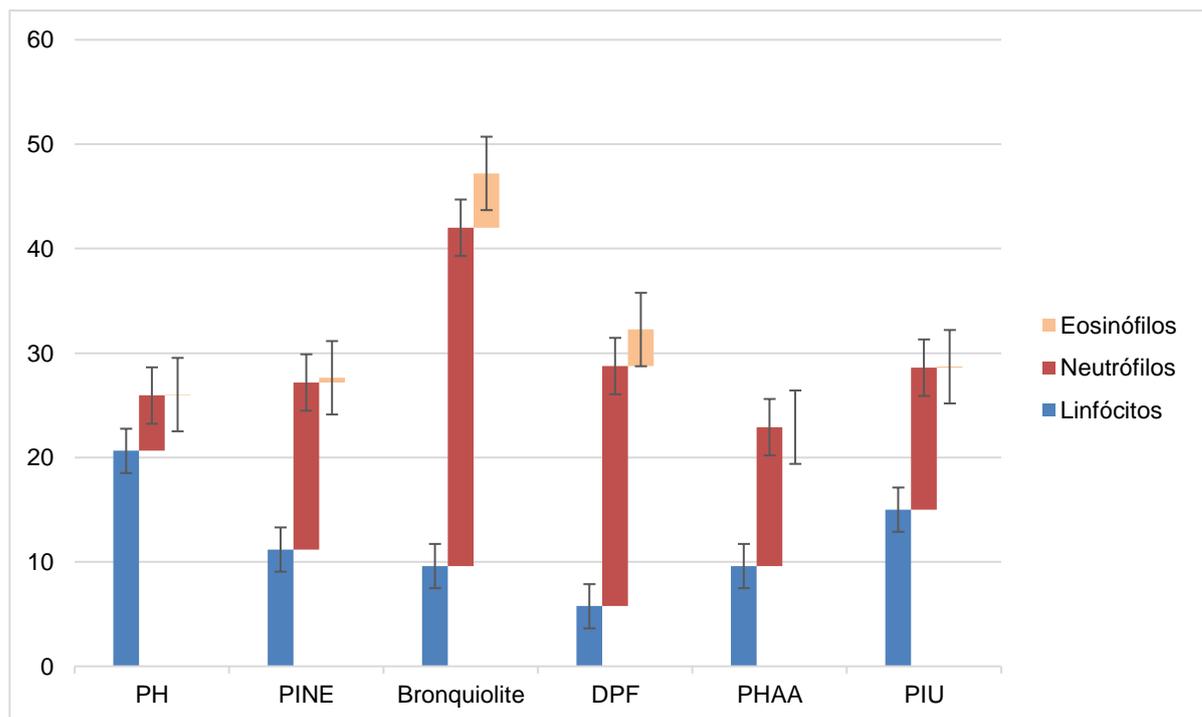


Figura 13. Resultados da citologia diferencial entre os tipos de DIPs, especificando os leucócitos, em pacientes da Região Metropolitana de Recife.

Em relação aos casos classificados como infecções (30 casos), foi constatado a presença de linfocitose em 12 ocorrências (40%), neutrofilia em 24 casos (80%) e eosinofilia em 3 casos (10%). Já entre os casos de neoplasia, com 19 suspeitas ao total, a linfocitose foi observada em 2 casos (10.5%), a neutrofilia em 18 casos (94.7%) e a eosinofilia em 4 casos (21.05%).

Tabela 8. Perfil celular das DIPs.

	Macrófagos (%)	Linfócitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Valor p
DIP (53)	72,35 (14,51)	12,41 (6,94)	14,03 (12,94)	1,18 (3,40)	0,003
PH (26)	71,45 (11,86)	20,63 (4,94)	5,30 (8,96)	0,09 (0,30)	0,0001
PINE (11)	72,36 (15,63)	11,18 (8,36)	16,0 (13,94)	0,45 (0,82)	0,0001
Bronquiolite (6)	58,16 (25,34)	8,66 (5,12)	27,16 (21,83)	4,33 (8,21)	0,1035
DPF (4)	71 (13,58)	7,75 (5,90)	20,5 (16,5)	0,75 (0,5)	--
PHAA (3)	77 (3,60)	9,66 (6,65)	13,33 (7,37)	0 (0)	--
PIU (3)	74,33 (15,14)	15 (4,58)	10,66 (16,69)	0 (0)	--

Legenda: Citologia relativa dos casos de DIP revelando a média e o desvio padrão (DP). O total de casos de DIP foi de 53 fluidos de LBA, entre eles, estão inclusos: 26 casos de PH, 11 casos de PINE, 6 casos de Bronquiolite, 4 casos de DPF, 3 casos de PHAA e 3 casos de PIU. O valor de p não pode ser calculado nos casos de DPF, PHAA e PIU por conta da baixa frequência.

5.3 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Ao decorrer deste estudo, foi produzido um artigo original (Apêndice A) no qual foi publicado na revista Concilium.

6 DISCUSSÕES

Pesquisas que envolvem a atuação carcinogênica de agentes infecciosos são desenvolvidas a décadas, sendo um dos principais a infecção do HPV. O tropismo do vírus com células escamosas não se limita a região genital, por isso é possível identificar o material genético em diversos tecidos, incluindo no pulmão (Nachira *et al.*, 2024; Robinson *et al.*, 2016).

Até o presente instante, não há relatos na literatura sobre estudos, na América do Sul, que tenham como propósito detectar o DNA-HPV em amostras oriundas de LBA. No entanto, uma pesquisa conduzida por Mammias *et al.* (2011), na Grécia, detectou DNA-HPV via PCR convencional (*primers* GP5/6) em amostras provenientes de LBA, oriundas de crianças imunocomprometidas (Mammias *et al.*, 2011). Dessa forma, o presente estudo configura-se como pioneiro por utilizar células de lavagem broncoalveolar na detecção de HPV em pacientes com múltiplas suspeitas, incluindo doenças intersticiais, infecções, neoplasias primárias e metástases.

Foi encontrado DNA-HPV em 4 (8.69%) amostras no presente ensaio, sendo estas detectadas pela Nested-PCR. A Nested-PCR é uma variação da PCR convencional, a qual utiliza o produto de uma PCR como *template* e utiliza *primers* com o mesmo alvo, ou seja, é a amplificação de um produto já amplificado. A baixa prevalência do vírus no tecido pulmonar pode ser trivial, como também reportado por Branica *et al.* (2010), Sagerup *et al.* (2014) e Argyri *et al.* (2017), que tiveram positividade em 3 (3.57%), 13 (3.90%) e 2 (3.0%) casos, respectivamente. Contudo, os presentes estudos citados utilizaram amostras parafinadas e de natureza maligna (Argyri *et al.*, 2017; Branica *et al.*, 2010; Sagerup *et al.*, 2014).

Alguns estudos relatam a positividade do HPV variando entre 0 a 78%, aproximadamente (Srinivasan, Taioli e Ragin, 2009). Dentre estes, normalmente são utilizadas amostras parafinadas ou frescas, de caráter maligno, o que pode mascarar os resultados. A positividade no presente estudo refere-se as amostras de natureza benigna e de caráter inflamatório, o que pode ser um fator para a infecção do HPV (Gorvel e Olive, 2023; Tsyganov *et al.*, 2023)

Dentre os casos positivos, 2 eram ex-fumantes e 2 sem prática tabagista. O consumo de tabaco é um dos principais agentes etiológicos de lesão pulmonar, principalmente maligna, contudo, somado ao tabagismo, o HPV parece contribuir com a carcinogênese pulmonar (Nachira *et al.*, 2024). No estudo de Carpagnano *et al.*

(2014), o qual utilizou amostras provenientes de carcinoma de células não pequenas, todos os casos (11) positivos para HPV eram fumantes ativos. Semelhante ao estudo de Argyri *et al.* (2017), o qual detectou a presença do HPV em 67 casos, dentre esses, 98.5% eram tabagistas (Argyri *et al.*, 2017; Carpagnano *et al.*, 2014). Fora do que é esperado no câncer cervical, o HPV no pulmão é mais atrelado a população masculina, conforme evidenciado no artigo de Tsyganov *et al.* (2023) (Tsyganov *et al.*, 2023).

Além disso, a detecção do DNA-HPV foi presente em 2 pacientes com doenças cardiovasculares. Alguns estudos supõem que a presença do HPV aumenta o risco de desenvolver doenças cardíacas (Reis *et al.*, 2020), entretanto, os relatos limitam-se a presença do HPV em mulheres, especificamente no colo uterino, não englobando a presença do vírus em homens e no tecido pulmonar.

Outro ponto a ser levado em consideração são as vias de transmissão, dado a possibilidade de disseminação sanguínea e linfática, além de transmissão vertical ou até mesmo aérea. Consolidar transmissão do HPV por via aérea seria crucial para o estudo do potencial carcinogênico do vírus no trato respiratório inferior (Nachira *et al.*, 2024; Oyouni, 2023)

Como já dito, a broncoscopia é uma técnica não-invasiva, com valores preditivos significativos (Sareen e Pandey, 2016). Devido a isto, investir na detecção e expressão do HPV por lavagem ou escovado brônquico é uma necessidade que deve ser explorada. Apesar da baixa frequência, o atual estudo prova que é possível detectar HPV por lavagem broncoalveolar. Vale salientar que as células escamosas não são as principais componentes, o que também pode refletir em resultados com baixa presença do vírus.

Mesmo atingindo um percentual de 8.69%, tais resultados são consideráveis quando se correlaciona a detecção de DNA-HPV no pulmão, principalmente pode se tratar de um tipo amostral que é composto, eminentemente, por leucócitos e de caráter benigno. A positividade do HPV agiu sobre pacientes sem lesões neoplásicas, o que resulta em casos poucos discutidos na literatura. É importante relatar a pertinência deste estudo, dado que a detecção foi feita a partir de material celular, configurando em um achado precoce. A implicação do HPV no pulmão é muito debatida, pois acredita-se que suas oncoproteínas possam atuar no desenvolvimento de doenças benignas, mas também na carcinogênese pulmonar (Zhai, Ding e Shi, 2015)

Por determinação citológica, o LBA se mostrou adequado na pesquisa primária e no diagnóstico diferencial, principalmente para DIPs, infecções pulmonares e neoplasias. Neste estudo, a principal DIP foi a PH, a qual dispõe de diversos parâmetros radiológicos e citológicos, contudo, na microscopia, é mais associada a linfocitose – como foi relatada no estudo de Sobiecka *et al.* (2023), cujo resultado de linfocitose foi mais comum, estatisticamente, em PH do que em DPF (ou PFI) (Sobiecka *et al.*, 2023).

Em contrapartida, a linfocitose relacionada a neutrofilia foi associada aos casos de PFI e sem associação significativa para PH no estudo de Bergantini *et al.* (2021). O autor ressalta também a importância de fazer combinação citológicas, o que pode auxiliar no diagnóstico diferencial (Bergantini *et al.*, 2021). Este achado também foi observado no estudo de Heron *et al.* (2012) e Jara-Palomares *et al.* (2009) (Heron *et al.*, 2012; Jara-Palomares *et al.*, 2009).

É comum padrões citológicos de PH e DPF serem semelhantes. Por isso que é recomendado associar os achados citomorfológicos com a idade, carga tabagista, fatores de exposição e *status* de linfocitose (leve, moderada e severa) (Sobiecka *et al.*, 2023).

Os casos de bronquiolite apresentaram uma média de neutrofilia severa (>25%), e diminuição de linfócitos, sendo característico da doença (Sieminska e Kuziemski, 2014). Os casos de neutrofilia foram mais comuns do que linfocitose e eosinofilia. As taxas de neutrófilos-linfócitos no LBA (TNL-LBA) são fundamentais para determinar diagnóstico e prognóstico (Kono *et al.*, 2021). Adjunto ao pressuposto, a contagem diferencial de cada população leucocitária consegue distinguir entre tecido broncoalveolar sadio e alterado, como foi publicado por Frye *et al.* (2020) (Frye *et al.*, 2020).

Epidemiologicamente, é difícil classificar as DIP, pois apresentam divergências no diagnóstico diferencial, além de dispor parâmetros semelhantes entre suas subclassificações (Sesé *et al.*, 2020; Wijzenbeek, Suzuki e Maher, 2022). Sendo necessário criar uma padronização entre a citologia e a conclusão médica.

Já nos casos de suspeita de infecção, foi comum o aumento de neutrófilos, e em alguns casos, o aumento de linfócitos junto aos neutrófilos, sendo concordante com o guia de 2012 (Meyer *et al.*, 2012). Este estudo mostrou boa associação entre suspeita de infecção com os achados citológicos do LBA.

Entre as hipóteses para neoplasia primária, o ensaio provou que é possível identificar câncer de pulmão. Neste caso, a citopatologia intercede a citologia quantitativa/relativa. Os achados neoplásicos se destacam-se entre CCE a ADC, sendo os principais vistos pelo LBA. Estudos revelam especificidade próxima ou igual a 100%, enquanto a sensibilidade pode variar entre 29 a 88.1%, isto depende do tamanho da lesão e do local (Bezel et al., 2016; Kumar Choudhary et al., 2019; Sareen e Pandey, 2016; Tomar et al., 2016).

De maneira geral, os resultados citológicos contribuem com os consensos citológicos já estabelecidos, porém, estes estudos multicêntricos são de países do hemisfério Norte, o que não condiz com a população estudada nesta pesquisa. É necessário investir na padronização das técnicas broncoscópicas e das análises celulares, assim como em estudos multicêntricos regionais. Mesmo com dificuldade, o anseio de estabelecer este tipo de padronização em um país continental como o Brasil é uma súplica dos pesquisadores e profissionais voltada aos órgãos de fomento e as agências governamentais, para que, de forma direta ou indireta, contribua com a adesão e desenvolvimento da pesquisa e, conseqüentemente, com o diagnóstico e o acompanhamento de várias doenças pulmonares. Logo, esta pesquisa partilha de resultados que possam contribuir com a concepção de padrões citológicos em amostras de LBA.

Entre os 101 casos com suspeitas entre DIP, neoplasia e infecções, 54 obtiveram diagnóstico estabelecido pela citologia (p 0,005).

7 CONCLUSÕES

Esta pesquisa revelou que é possível identificar o DNA-HPV pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em amostras de lavado broncoalveolar (LBA). A baixa detecção do HPV no LBA pode ser justificada pela baixa carga viral, além das células escamosas não serem predominantes neste tipo de amostra. Contudo, as metodologias abordadas neste estudo conseguiram detectar o material genético viral e apresentou resultados promissores na investigação do HPV no interstício pulmonar, abrindo uma maior possibilidade de estudos na área.

Indo de encontro a maioria dos estudos, os casos de neoplasia não tiveram detecção do DNA viral, mas sim em pacientes com suspeitas de doenças intersticiais. A presença do material genético do HPV em amostras citológicas e em pacientes com lesões benignas são relevantes, dado que o fator tempo é crucial para a progressão e desenvolvimento de lesões malignas.

Mesmo com algumas limitações metodológicas do estudo, estes resultados ganham prestígio por serem derivados de uma técnica minimamente invasiva, que, além de ser apta a estudos moleculares, também pode ser utilizada em estudos microscópicos e dosagem de citocinas relacionadas ao HPV, além de contribuir com a criação de consensos citológicos a nível regional e nacional. Por fim, este estudo também serve para mostrar a aptidão diagnóstica do lavado e de sua versatilidade para as pesquisas biomédicas.

REFERÊNCIAS

- ADDERLEY, N. *et al.* Bronchoalveolar lavage fluid lymphocytosis in chronic hypersensitivity pneumonitis: A systematic review and meta-analysis. **European Respiratory Journal**, v. 56, n. 2, 1 ago. 2020.
- AEGERTER, H.; LAMBRECHT, B.; JAKUBZICK, C. Biology of lung macrophages in health and disease. **Immunity**, v. 55, p. 1564-1580. 2022.
- ARALDI, R. P. *et al.* The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1537–1556, 1 out. 2018.
- ARBYN, M. *et al.* 2020 list of human papillomavirus assays suitable for primary cervical cancer screening. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 8, p. 1083–1095, 1 ago. 2021.
- ARGYRI, E. *et al.* Investigating the role of human papillomavirus in lung cancer. **Papillomavirus Research**, v. 3, p. 7–10, 1 jun. 2017.
- BAPTISTA, E. A.; DEY, S.; PAL, S. Chronic respiratory disease mortality and its associated factors in selected Asian countries: evidence from panel error correction model. **BMC Public Health**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2021.
- BELTRÃO, M. *et al.* Site of infections associated with human papillomavirus. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 291, n. 3, p. 481–491, 1 mar. 2015.
- BERGANTINI, L. *et al.* Integrated approach to bronchoalveolar lavage cytology to distinguish interstitial lung diseases. **European Journal of Internal Medicine**, v. 89, p. 76–80, 1 jul. 2021.
- BEZEL, P. *et al.* Diagnostic Value of Bronchoalveolar Lavage for Diagnosis of Suspected Peripheral Lung Cancer. **Clinical Lung Cancer**, p. 151-156. 2016.
- BHATLA, N.; SINGHAL, S. Primary HPV screening for cervical cancer. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 65, p. 98–108, 1 maio 2020.
- BOONSARNGSUK, V.; KANOKSIL, W.; LAUNG DAMERONGCHAI, S. Comparison of diagnostic performances among bronchoscopic sampling techniques in the diagnosis of peripheral pulmonary lesions. **Journal of Thoracic Disease**, v. 7, n. 4, p. 697–703, 2015.
- BRANICA, B. *et al.* Detection of Human Papillomaviruses Type 16, 18 and 33 in Bronchial Aspirates of Lung Carcinoma Patients by Polymerase Chain Reaction: A Study of 84 Cases in Croatia. **Coll. Antropol.** v. 34, n. 1, p. 159-162. 2010
- BURD, E. M.; DEAN, C. L. Human Papillomavirus. **American Society for Microbiology Press**, v. 4, n. 4, p. 1–17, 2016.
- CARPAGNANO, G. E. *et al.* Exhaled HPV infection in lung cancer: Role of MA at 3p. **Archives of Medical Research**, v. 45, n. 5, p. 383–387, 2014.
- CAVALCANTE, J. R. *et al.* Association of breast cancer with human papillomavirus (Hpv) infection in northeast brazil: Molecular evidence. **Clinics**, v. 73, 2018.

- CHAGAS, B. S. *et al.* An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 32–37, out. 2013.
- CHANG, S. Y. *et al.* Detection of human papillomavirus in non-small cell carcinoma of the lung. **Human Pathology**, v. 46, n. 11, p. 1592–1597, 1 nov. 2015.
- CHEN, L. *et al.* Increased pro-angiogenic factors, infiltrating neutrophils and CD163 + macrophages in bronchoalveolar lavage fluid from lung cancer patients. **International Immunopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 74–80, 2014.
- CHEN, X. *et al.* Immunological network analysis in HPV associated head and neck squamous cancer and implications for disease prognosis. **Molecular Immunology**, v. 96, p. 28–36, 1 abr. 2018.
- CHOO, R. *et al.* Utility of bronchoalveolar lavage in the management of immunocompromised patients presenting with lung infiltrates. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 19, n. 51, p.1-12. 019.
- COTTIN, V.; VALENZUELA, C. Diagnostic approach of fibrosing interstitial lung diseases of unknown origin. **Presse Medicale**, v. 49, p. 1-12. 2020.
- DAVIDSON, K. R. *et al.* Bronchoalveolar lavage as a diagnostic procedure: A review of known cellular and molecular findings in various lung diseases. **Journal of Thoracic Disease**, v. 12, n. 9, p. 4991–5019, 1 set. 2020.
- DOMAGALA-KULAWIK, J. The relevance of bronchoalveolar lavage fluid analysis for lung cancer patients. **Expert Review of Respiratory Medicine**, 2019.
- EFARED, B. *et al.* The diagnostic value of the bronchoalveolar lavage in interstitial lung diseases. **Journal of Negative Results in BioMedicine**, v. 16, n. 1, 1 mar. 2017.
- EIDE, M. L.; DEBAQUE, H. Méthodes de détection des HPVs et techniques de génotypage dans le dépistage du cancer du col utérin. **Annales de Pathologie**, v. 32, n. 6, p. 401–409, dez. 2012.
- FERA, A. N. DELLA *et al.* **Persistent human papillomavirus infection** **Viruses** MDPI AG, v. 13, n. 321. 2021.
- FORBES, B. *et al.* Challenges for inhaled drug discovery and development_induced alveolar macrophage responses. **Advanced Drug Delivery Reviews**, p. 15–33, 2014.
- FRANCIOSI, J. R. *et al.* Is there a role played by HLA-E, if any, in HPV immune evasion? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 91, n. 3, 1 mar. 2020.
- FREITAS, A. C. DE *et al.* Human papillomavirus and lung carcinogenesis: an overview. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, n. 12, p. 2415–2427, 1 dez. 2016.
- FRYE, B. C. *et al.* The value of bronchoalveolar lavage for discrimination between healthy and diseased individuals. **Journal of Internal Medicine**, v. 287, n. 1, p. 54–65, 1 jan. 2020.

- GATTA, L. B. *et al.* Human Papillomavirus DNA and p16 Gene in Squamous Cell Lung Carcinoma. **Anticancer Research**, v. 32, p. 3085–3900, 2012.
- GELARDEN, I. *et al.* Comprehensive evaluation of bronchoalveolar lavage from patients with severe COVID-19 and correlation with clinical outcomes. **Human Pathology**, p. 92–103, 2021.
- GHARSALLI, H. *et al.* The Utility of bronchoalveolar lavage in the evaluation of interstitial lung disease: A clinicopathological perspective. **Seminars in Diagnostic Pathology**, 2018.
- GIANNELLA, L. *et al.* Age-related distribution of uncommon HPV genotypes in cervical intraepithelial neoplasia grade 3. **Gynecologic Oncology**, v. 161, n. 3, p. 741–747, 1 jun. 2021.
- GIOVANNINI-CHAMI, L. *et al.* Eosinophilic pneumonias in children: A review of the epidemiology, diagnosis, and treatment. **Pediatric Pulmonology**, v. 51, n. 2, p. 203–216, 1 fev. 2016.
- GIRARD, P. *et al.* Sensitivity of Cytology Specimens From Bronchial Aspirate or Washing During Bronchoscopy in the Diagnosis of Lung Malignancies: An Update. **Clinical Lung Cancer**, v. 18, n. 5, p. 512–518, 1 set. 2017.
- GOOS, T. *et al.* Defining and predicting progression in non-IPF interstitial lung disease. **Respiratory Medicine**, v. 189, 1 nov. 2021.
- GORVEL, L.; OLIVE, D. Tumor associated macrophage in HPV+ tumors: Between immunosuppression and inflammation. **Seminars in Immunology Academic Press**. 2023.
- GRAVITT, P. E.; WINER, R. L. Natural history of HPV infection across the lifespan: Role of viral latency. **Viruses MDPI AG**. v. 9, n. 10, p.1-10. 2017.
- HAN, Y. *et al.* Bronchoalveolar lavage fluid polymerase chain reaction for invasive pulmonary aspergillosis among high-risk patients: a diagnostic meta-analysis. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 23, n. 1, 1 dez. 2023.
- HAUSEN, H. ZUR. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.
- HERON, M. *et al.* Bronchoalveolar lavage cell pattern from healthy human lung. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 167, n. 3, p. 523–531, mar. 2012.
- HETZEL, J. *et al.* Bronchoscopic performance of bronchoalveolar lavage in Germany - A call for standardization. **Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases**, v. 38, n. 1, 2021.
- HOGEA, S. P. *et al.* Bronchoalveolar lavage: role in the evaluation of pulmonary interstitial disease. **Expert Review of Respiratory Medicine Taylor and Francis**. 2020.
- HUSSEN, B. M. *et al.* The role of HPV gene expression and selected cellular MiRNAs in lung cancer development. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, 1 jan. 2021.
- ISHIGURO, T. *et al.* Viral pneumonia requiring differentiation from acute and progressive diffuse interstitial lung diseases. **Internal Medicine**, v. 58, n. 24, p. 3509–3519, 2019.

- JARA-PALOMARES, L. *et al.* Bronchoalveolar Lavage Findings in Patients With Diffuse Interstitial Lung Disease: Prospective Study of a Cohort of 562 Patients. **Arch Bronconeumol**, v. 45, n. 3, p. 115–121, 2009.
- KARNOSKY, J. *et al.* HPV and lung cancer: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Reports**, v. 4, n. 4, 1 ago. 2021.
- KEBBE, J.; ABDO, T. Interstitial lung disease: The diagnostic role of bronchoscopy. **Journal of Thoracic Disease**, v. 9, p. S996–S1010, 1 set. 2017.
- KNÖR, M. *et al.* Human papillomavirus (HPV) prevalence in nasal and antrochoanal polyps and association with clinical data. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 28 out. 2015.
- KONO, M. *et al.* Prognostic significance of bronchoalveolar lavage cellular analysis in patients with acute exacerbation of interstitial lung disease. **Respiratory Medicine**, v. 186. 2021.
- KUMAR CHOUDHARY, P. *et al.* PAT H O L O G Y Diagnostic role of bronchoalveolar lavage: A cytohistopathological correlation. **Journal of Pathology of Nepal**, v. 9, p. 1441, 2019.
- KWIECIEŃ, I. *et al.* Flow Cytometric Analysis of Macrophages and Cytokines Profile in the Bronchoalveolar Lavage Fluid in Patients with Lung Cancer. **Cancers**, v. 15, n. 21, 1 nov. 2023.
- LEE, S. H. *et al.* Performance of a multiplex PCR pneumonia panel for the identification of respiratory pathogens and the main determinants of resistance from the lower respiratory tract specimens of adult patients in intensive care units. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 52, n. 6, p. 920–928, 1 dez. 2019.
- LEÓN-ORDÓÑEZ, K.; ABAD-SOJOS, S. Prevention of cervical cancer development through early detection of HPV using novelty molecular applications. **Bionatura**, v. 02, n. 19 fev. 2019.
- LI, M. *et al.* Association between human papillomavirus and EGFR mutations in advanced lung adenocarcinoma. **Oncology Letters**, v. 12, n. 3, p. 1953–1958, 1 set. 2016.
- LIEGEOIS, M. *et al.* The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity. **Cellular Immunology**, v. 330, p. 91–96, 1 ago. 2018.
- LIN, C. *et al.* Use of nested PCR for the detection of trichomonads in bronchoalveolar lavage fluid. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, 10 jun. 2019.
- MAMMAS, I. N. *et al.* Detection of human papillomavirus in bronchoalveolar lavage samples in immunocompetent children. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, n. 5, p. 384–386, 2011.
- MARTÍNEZ-GIRÓN, R.; PANTANOWITZ, L. Lower respiratory tract viral infections: Diagnostic role of exfoliative cytology. **Diagnostic Cytopathology**, v. 45, n. 7, p. 614–620, 1 jul. 2017.

- MARTINU, T. *et al.* International Society for Heart and Lung Transplantation consensus statement for the standardization of bronchoalveolar lavage in lung transplantation. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 39, n. 11, p. 1171–1190, 1 nov. 2020.
- MES, S. W. *et al.* Development and Validation of a Novel and Rapid Molecular Detection Method for High-Risk Human Papillomavirus in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tumor Tissue. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 22, n. 2, p. 262–271, 1 fev. 2020.
- METOVIC, J. *et al.* Role of Immunocytochemistry in the Cytological Diagnosis of Pulmonary Tumors. **Acta Cytologica**, v. 64, n. 1–2, p. 16–29, 1 jan. 2020.
- MEYER, K. C. *et al.* An official American Thoracic Society clinical practice guideline: The clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 185, n. 9, p. 1004–1014, 1 maio 2012.
- MEYER, K. C.; RAGHU, G. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: Is it clinically useful? **European Respiratory Journal**, v. 38, p.761-769. 2011.
- MUCIÑO-HERNÁNDEZ, M. I. *et al.* Molecular Identification of Human Papillomavirus DNA in Thyroid Neoplasms: Association or Serendipity? **Cureus**, v. 13, n. 4. 2021.
- MULLERPATTAN, J. B.; UDWADIA, Z. F.; UDWADIA, F. E. Tropical pulmonary eosinophilia- A review. **Indian J Med Res**, v. 138, p. 295–302, 2013.
- MURRO, D.; SLADE, J.; GATTUSO, P. Cytologic findings of hematologic malignancies in bronchoalveolar lavage fluid. **American Society of Cytopathology**, p. 267–275, 2015.
- NACHIRA, D. *et al.* The Role of Human Papilloma Virus (HPV) in Primary Lung Cancer Development: State of the Art and Future Perspectives. **Life**, v. 14, n. 1, p. 110, 10 jan. 2024.
- NASCIMENTO, K. C. G. DO *et al.* Detection of human papillomavirus dna in paired peripheral blood and cervix samples in patients with cervical lesions and healthy individuals. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 21, 1 nov. 2021.
- ODA, K. *et al.* Relationship between the ratios of CD4/CD8 T-lymphocytes in the bronchoalveolar lavage fluid and lymph nodes in patients with sarcoidosis. **Respiratory Investigation**, v. 52, n. 3, p. 179–183, 2014.
- O'DWYER, D. N. *et al.* Lung microbiota contribute to pulmonary inflammation and disease progression in pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 199, n. 9, p. 1127–1138, 1 maio 2019.
- OSINSKA, I.; WOLOSZ, D.; DOMAGALA-KULAWIK, J. Association between M1 and M2 macrophages in bronchoalveolar lavage fluid an tobacco smoking in patients with sarcoidosis. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej**, v. 124, n. 7-8, p. 359-364. 2014.
- OYOUNI, A. A. A. Human papillomavirus in cancer: Infection, disease transmission, and progress in vaccines. **Journal of Infection and Public Health**. v. 16, p. 626-631. 2023.

- PACHORI, G. *et al.* Utility of image guided fine needle aspiration cytology in intra-thoracic lesions with emphasis on lung cancer detection. **Journal of Cytology**, v. 37, n. 3, p. 136–140, 1 jul. 2020.
- PESCI, A. *et al.* Bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis: What does it tell us? **Respiratory Medicine**, v. 104, n. SUPPL. 1, jul. 2010.
- POURAKBARI, B. *et al.* Clinical, cytological and microbiological evaluation of bronchoalveolar lavage in children: A referral hospital-based study. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 179–183, 1 nov. 2016.
- PREZIOSO, C. *et al.* HPyV6 and HPyV7 in urine from immunocompromised patients. **Virology Journal**, v. 18, n. 1, 1 dez. 2021.
- PRIGGE, E. S. *et al.* Diagnostic accuracy of p16INK4a immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 140, n. 5, p. 1186–1198, 1 mar. 2017.
- RAJARAM, S.; GUPTA, B. Screening for cervical cancer: Choices & dilemmas. **Indian Journal of Medical Research**, v. 154, n. 2, p. 210–220, 1 ago. 2021.
- RECIO, R. *et al.* Lack of clinical significance for molecular detection of respiratory viruses in bronchoalveolar lavage samples. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 8, p. 4693–4703, 1 ago. 2021.
- REIS, D. R. A. *et al.* HPV infection as a risk factor for atherosclerosis: A connecting hypothesis. **Medical Hypotheses**, v. 144, 1 nov. 2020.
- REZAEI, M. *et al.* The association between HPV gene expression, inflammatory agents and cellular genes involved in EMT in lung cancer tissue. **BMC cancer**, v. 20, n. 1, p. 916, 24 set. 2020.
- RICE, A. J. Non-neoplastic respiratory fluid cytology including cell differential counts for interstitial lung disease. **Cytopathology**, v. 33, n. 1, p. 44–56, 1 jan. 2022.
- ROBINSON, L. A. *et al.* Molecular evidence of viral DNA in non-small cell lung cancer and non-neoplastic lung. **British Journal of Cancer**, v. 115, n. 4, p. 497–504, 9 ago. 2016.
- RODEN, R. B. S.; STERN, P. L. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in câncer. **Nature Reviews Cancer**. v. 35, n. 4, p.260-271. 2018.
- ROJAS, L. *et al.* Human papillomavirus infection and lung adenocarcinoma: special benefit is observed in patients treated with immune checkpoint inhibitors. **ESMO Open**, v. 7, n. 4, 1 ago. 2022.
- RYU, W. K. *et al.* Usefulness of bronchial washing fluid for detection of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 186, 1 dez. 2023.
- SAGERUP, C. M. T. *et al.* Human papilloma virus detection and typing in 334 lung cancer patients. **Acta Oncologica**, v. 53, n. 7, p. 952–957, 2014.

- SARCHIANAKI, E. *et al.* Detection and genotype analysis of human papillomavirus in non-small cell lung cancer patients. **Tumor Biology**, v. 35, n. 4, p. 3203–3209, 1 abr. 2014.
- SAREEN, R.; PANDEY, C. Lung malignancy: Diagnostic accuracies of bronchoalveolar lavage, bronchial brushing, and fine needle aspiration cytology. **Lung India**, v. 33, n. 6, p. 635–641, 1 nov. 2016a.
- SASAGAWA, T.; TAKAGI, H.; MAKINODA, S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 18, n. 6, p. 807–815, 2012.
- SCHERER, E. *et al.* **Quantitative PCR (qPCR) Detection of Mucorales DNA in Bronchoalveolar Lavage Fluid To Diagnose Pulmonary Mucormycosis**. v. 56, n. 8. 2018.
- SCHIFFMAN, M. *et al.* Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 1 dez. 2016.
- SESÉ, L. *et al.* Adult interstitial lung diseases and their epidemiology. **Presse Medicale**, v. 49, n. 2, 1 jun. 2020.
- SIEMINSKA, A.; KUZIEWSKI, K. Respiratory bronchiolitis-interstitial lung disease; Orphanet Journal of Rare, v. 9, n.106. 2014.
- SIMOENS, C. *et al.* HPV DNA genotyping, HPV E6*1 mRNA detection, and p16INK4a/Ki-67 staining in Belgian head and neck cancer patient specimens, collected within the HPV-AHEAD study. **Cancer Epidemiology**, v. 72, 1 jun. 2021.
- SOBIECKA, M. *et al.* Bronchoalveolar Lavage Cell Count and Lymphocytosis Are the Important Discriminators between Fibrotic Hypersensitivity Pneumonitis and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Diagnostics**, v. 13, n. 5, 1 mar. 2023.
- SRINIVASAN, M.; TAIOLI, E.; RAGIN, C. C. Human papillomavirus type 16 and 18 in primary lung cancers - A meta-analysis. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 10, p. 1722–1728, 2009.
- STAAL, A. VAN DER *et al.* Immune cell profiles and patient clustering in complex cases of interstitial lung disease. **Immunology Letters**, v. 253, p. 30–40, 1 jan. 2023.
- STANLEY, M. HPV vaccination in boys and men. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 7, p. 2109–2111, 7 jul. 2014.
- SUBHAGAN, H. *et al.* A simple high-volume culture technique—Good substitute for polymerase chain reaction for the detection of *Aspergillus* species in bronchoalveolar lavage samples. **Mycoses**, v. 65, n. 1, p. 24–29, 1 jan. 2022.
- SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

- SUNG, S. *et al.* Lung cancer cytology and small biopsy specimens: diagnosis, predictive biomarker testing, acquisition, triage, and management. **Journal of the American Society of Cytopathology**, v. 9, n. 5, p. 332–345, 1 set. 2020.
- SYRJANEN, K. **Condylomatous Changes in Neoplastic Bronchial Epithelium** *Respiration*, 1979.
- SZYMONOWICZ, K. A.; CHEN, J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. **Cancer Biology and Medicine**, v. 17, n. 4, p. 864–878, 1 nov. 2020.
- TAKESHITA, M. *et al.* Antigen-driven autoantibody production in lungs of interstitial lung disease with autoimmune disease. **Journal of Autoimmunity**, v. 121. 2021.
- TARASIDIS, A.; ARCE, S. Immune response biomarkers as indicators of sarcoidosis presence, prognosis, and possible treatment: An immunopathogenic perspective. **Autoimmunity Reviews**, 2020.
- TOMAR, V. *et al.* Comparative study of bronchoalveolar lavage, bronchial brushing, and FNAC in diagnosing malignant neoplasms of lungs. **Journal of Cytology**, v. 33, n. 4, p. 210–213, 1 out. 2016.
- TSYGANOV, M. M. *et al.* Human papillomavirus and lung cancer: an overview and a meta-analysis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 145, n. 8, p. 1919–1937, 1 ago. 2019.
- TSYGANOV, M. M. *et al.* Human Papillomavirus in Non-Small Cell Lung Carcinoma: Assessing Virus Presence in Tumor and Normal Tissues and Its Clinical Relevance. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2023.
- WAHLSTROM, J. *et al.* Autoimmune T cell responses to antigenic peptides presented by bronchoalveolar lavage cell HLA-DR molecules in sarcoidosis. **Clinical Immunology**, v. 133, p.353-363. 2009.
- WESTRICH, J. A.; WARREN, C. J.; PYEON, D. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. **Virus Research**, v. 231, p. 21–33, 2 mar. 2017.
- WIJSENBEEK, M.; SUZUKI, A.; MAHER, T. Interstitial lung diseases. **Lancet**, p. 769–786, 2022.
- ZHAI, K.; DING, J.; SHI, H. Z. HPV and lung cancer risk: A meta-analysis. **Journal of Clinical Virology**, v. 63, p. 84–90, 1 fev. 2015.

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL

Deteção do DNA-HPV no Tecido Pulmonar Através da Lavagem Broncoalveolar (LBA) em Pacientes da Região Metropolitana de Recife, Pernambuco-Brasil

Julliano Matheus de Lima Maux; Helbert Gean da Silva; Isa Cordeiro da Silva; Emmanuel Nóbrega Travassos de Arruda; Julia Jordão do Espírito Santo; Giwellington Silva Albuquerque; Jacinto da Costa Silva Neto

Resumo

Introdução: As doenças pulmonares representam uma considerável fonte de morbimortalidade, evidenciando a necessidade de métodos diagnósticos avançados e não invasivos, como o lavado broncoalveolar (LBA). Tal procedimento permite a obtenção direta de amostras do interstício pulmonar, facilitando análises citológicas, microbiológicas e moleculares. O Papilomavirus Humano (HPV), conhecido por seu papel oncogênico principalmente nas regiões genitais, tem sua investigação expandida para além dos tecidos ginecológicos, incluindo o pulmonar, onde sua presença e implicação patológica permanecem pouco elucidadas. **Objetivo:** Este estudo visa identificar a presença do DNA-HPV em pacientes com suspeita de doenças pulmonares, por intermédio do LBA. **Métodos:** Realizou-se um estudo transversal e analítico envolvendo 146 pacientes internados em hospitais da Região Metropolitana do Recife (RMR). O LBA foi dividido entre análises citológicas e moleculares. Para detecção do DNA-HPV, foram processadas 46 amostras utilizando-se a técnica de PCR convencional com primers consensos MY09/11, seguida de Nested-PCR, com primers GP5/6. **Resultados:** A presença de DNA-HPV foi confirmada em 4 (8.69%) amostras, sendo todas de caráter benigno e com suspeitas de doenças intersticiais. Esses achados indicam a viabilidade da detecção de HPV no interstício pulmonar por meio de LBA, utilizando Nested-PCR. **Conclusão:** Os resultados obtidos sugerem uma nova perspectiva na compreensão da presença do HPV em tecidos pulmonares. A detecção do HPV não limita-se as amostras teciduais e malignas, e isto oferece uma nova dimensão metodológica para a pesquisa do vírus. Esta pesquisa proporciona um avanço significativo no diagnóstico molecular de doenças pulmonares, incentivando a realização de futuros estudos para explorar o papel do HPV no pulmão e suas consequências para a saúde pública.

Keywords: Bronchoalveolar Lavage; Interstitial Lung Disease; Cytology; HPV; Diagnosis

INTRODUÇÃO

As doenças pulmonares, neoplásicas ou intersticiais, se destacam pela sua morbimortalidade em vários países, devido a sua rápida progressão e diagnósticos tardios (Goos *et al.*, 2021). Visando aprimorar o diagnóstico precoce, no início da década de 1980, o lavado broncoalveolar (LBA) se tornou uma ferramenta importante na pneumologia (Rice, 2022), inclusive na pesquisa de doenças intersticiais pulmonares (DIP) (Hogea *et al.*, 2020). O LBA possui grande versatilidade, podendo ser submetido a testes microbiológicos, moleculares, imunológicos e citológicos (Subhagan *et al.*, 2022).

Para consolidar o diagnóstico de DIP, estudos multicêntricos foram criados para estabelecer critérios citológicos e associá-los com dados clínicos-sociais e radiológicos, configurando um estudo multidisciplinar que utiliza a análise celular como teste primário de doenças intersticiais (Staal, van der *et al.*, 2023). Para isso, o *guideline* criado pela *American Thoracic Society* e *European Respiratory Society* (ATS/ERS) de 2012, definiu que a contagem celular do LBA, em pacientes adultos e não-fumantes, devem conter >85% de macrófagos alveolares; 10–15% de linfócitos; ≤3% de neutrófilos e ≤1% de eosinófilos. Em caso de modificação quantitativa, esta condição pode estar atrelada a alterações parenquimais (Meyer *et al.*, 2012).

Fatores etiológicos são determinantes para o diagnóstico de doenças pulmonares e, conseqüentemente, para o tratamento (Efared *et al.*, 2017). Entretanto, as causas idiopáticas são comuns nas DIPs, e isso dificulta estabelecer os fatores de risco tanto quanto o desfecho clínico-laboratorial, assim como estudos epidemiológicos (Sesé *et al.*, 2020). Para identificar componentes etiológicos, o LBA pode ser utilizado em testes moleculares, como na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o que resulta em uma ferramenta fundamental no diagnóstico diferencial (Recio *et al.*, 2021).

Além de fatores de risco bem conhecidos, como tabagismo, poluição e fatores genéticos, as infecções virais, como o Papilomavirus humano (HPV), parecem contribuir com a carcinogênese pulmonar (Zhai, Ding e Shi, 2015). O HPV é o principal agente etiológico do câncer de colo uterino, entretanto, seu material genético já foi encontrado em diversos tecidos não ginecológicos, tais como o mamário (Cavalcante *et al.*, 2018), cabeça e pescoço (Simoens *et al.*, 2021), tireoide (Muciño-Hernández *et al.*, 2021) e pulmão (Hussen *et al.*, 2021). A presença do HPV em tecido pulmonar ainda provoca debates na comunidade científica, contudo, estas discussões levam em consideração apenas estudos que tem como alvo, lesões cancerígenas, os quais utilizam como amostra diagnóstica apenas porções teciduais (Chang *et al.*, 2015; Sarchianaki *et al.*, 2014), o que cria a necessidade de ser esclarecido a associação desse vírus também nas células do interstício pulmonar e a lesões não malignas, uma vez que há um longo prazo do momento da infecção até o desenvolvimento da lesão tecidual (Fera, Della *et al.*, 2021; Schiffman *et al.*, 2016).

Desse modo, o objetivo deste estudo é determinar a presença de DNA-HPV, por intermédio do LBA, em pacientes da Região Metropolitana de Recife (RMR) com suspeita de DIP, infecções

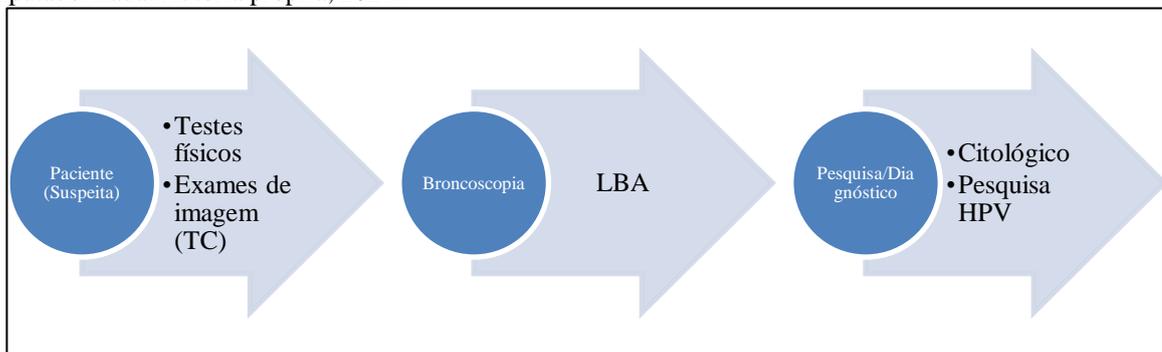
pulmonares e neoplasias. Esta detecção foi feita a partir da PCR convencional, seguida de Nested-PCR, sendo este um dos estudos pioneiros na detecção da presença do DNA-HPV em amostras de LBA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal, conduzido no Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares (LPCM), do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os procedimentos broncoscópicos foram realizados em pacientes do Hospital das Clínicas (HC-UFPE) e Hospital Universitário Oswaldo Cruz.

Broncoscopia

Figura 1. Passo a passo da coleta do fluido LBA até o processamento laboratorial. TC = Tomografia Computadorizada. Autoria própria, 2024.



O LBA foi obtido a partir da instilação de solução salina (NaCl) a 0,9%, com auxílio de broncoscópico de haste flexível, injetando cerca de 100 a 200 mililitros (mL), conforme indicação médica, sendo recuperado, pelo menos, $\geq 5\%$ do volume instilado, conforme recomendação do estudo HOGEA et al., 2020. Posteriormente, as amostras foram alíquotadas para análise citológica e molecular. A figura 1 mostra o passo-a-passo da obtenção do LBA até as análises citológicas e moleculares.

Após centrifugação do fluido do LBA, foram alíquotados 500 microlitros (μL) da amostra e submergido em 1000 μL de Phosphate-buffered saline (PBS) à temperatura ambiente, em seguida, as amostras foram transferidas a congelamento em -20°C e -80°C .

Extração de ácido nucléico

A extração do DNA foi feita a partir de uma adaptação de protocolo do kit EasyPure[®] Transgene (China), utilizando alíquota de 1000 μL do lavado, seguido de homogeneização no vórtex e centrifugação a 250g por 5 minutos. Em seguida, foi transferido 100 μL do sedimento formado a um microtubo estéril e adicionado 100 μL de solução de lise, homogeneização no vórtex. Para remover moléculas de RNA e proteínas, foi adicionado 20 μL de RNase, incubando a solução por 2 minutos,

posteriormente, foi adicionado 20 µL de Proteinase K, seguida de homogeneização no vórtex e incubação por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 µL de Binding Buffer (BB2), seguida de homogeneização e incubação por 10 minutos. Transfere-se a solução para a coluna de extração, depois centrifugou-se a 12.000g por 1 minuto. Remove-se o que foi passado pelo filtro e adicionou-se 500 µL de Clean Buffer (CB2), seguindo para centrifugação (12.000g por 1 minuto). Removeu-se o que foi passado pelo filtro e adiciona 500 µL de Wash Buffer (12.000g por 2 minutos). Esta etapa foi repetida duas vezes a fim de assegurar que todo material foi removido, exceto o DNA. Posteriormente, foi adicionado 20 µL do buffer de eluição (12.000g por 1 minuto). Por fim, o DNA extraído foi quantificado utilizando-se NanoDrop, sendo considerado apto entre 0.1 ng/µL a 10 ng/µL de DNA, conforme estabelecido pelo MasterMix (FIREPol®, Solis Byodine). A unidade de medida utilizada para centrifugação foi *Relative Centrifugal Force* (RCF), Força G.

Análise molecular

Foi utilizado o FIREPol® MasterMix da Solis Byodine para PCR convencional e Nested-PCR. Após quantificação do DNA extraído, foi feita a PCR com primers β-globina (*reverse*PC04: ACACA ACTGTGTTCACTAGC; *foward*GH20: CAACTTCATCCACGTTCAACC) para controle endógeno do DNA e, posteriormente, primers alvo para L1 do HPV: MY09/11 (MY09: CGTCCMAARGGAWACTGGATC; MY11: GCMCAGGGWCATAAYAATGG) 450pb. Nested-PCR feitas a partir do produto de PCR MY09/11, com primers GP5/6, aproximadamente 130pb (GP5: TTTGTTACTGTGGTAGATAC; GP6: GAAAAATAAACTGTAAATCA). Após a etapa de ciclagem, as amostras foram submetidas a eletroforese, em gel de agarose 2%, usando 5 µL de volume de cada amostra. Foi utilizado, como controle, amostras positivadas para MY09/11 e GP5/6, oriundas da linhagem celular SiHa e HeLa HPV18+, além de amostras cervicais (resultado citológico Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LSIL. Positivas para MY09/11 e GP5/6). A Nested-PCR foi considerada em resultados negativos como critério confirmatório.

As amostras submetidas a análise molecular foram divididas em 3 grupos: LBA com suspeita de neoplasia e/ou confirmados pela citologia (grupo 1); LBA contendo hiperplasia epitelial escamosa (grupo 2) e LBA de pacientes com DIP, confirmados por citologia (grupo 3).

Análise Citológica

Para a análise citológica, o fluido do LBA foi centrifugado (1200rpm ou 790RCF) por 10 minutos e posteriormente submetido a citocentrifugação (1200rpm x 5 minutos). As lâminas foram coradas em Papanicolau e coloração rápida (panóptico); a contagem diferencial foi feita para representar 100% da amostra, contabilizando, no mínimo, 200 células, como recomendado pelo estudo de Frye et al. (2020) (Frye *et al.*, 2020). A determinação de celularidade foi feita a partir da contagem pela câmara

de Neubauer. As características citomorfológicas também foram levadas em consideração no relatório final.

Análise estatística e preceitos éticos

Os resultados obtidos foram demonstrados e organizados em planilhas do software Excel (Microsoft), BioEstat 5,0 e SPSS software. Os testes estatísticos feitos consistem em: Cálculo de *Odds ratio* (OR), para mensurar o risco relativo entre a exposição ao HPV com a possibilidade desenvolver a doença; o Teste exato de Fisher, o qual calcula a hipótese de duas variáveis e o Teste de correlação de Spearman (rs), para avaliar a concordância entre suspeita clínica e resultado citológicos. Todos os valores de *p* (*p-value*) foram bilaterais com nível de significância de 0,05, exceto o teste de Spearman.

A realização da presente pesquisa obedece aos preceitos éticos da Resolução 466/12 ou 510/16 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Seguindo os requisitos da Resolução 196 de 1996 e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (CAAE: 62776022.6.0000.5208). Os dados clínicos-sociais e prontuários foram utilizados para associar com os resultados microscópicos e moleculares.

RESULTADOS

Foram coletadas 146 amostras, com alguns casos excluídos, 132 amostras foram incluídas no estudo. As amostras foram coletadas com base em suspeitas clínicas, distribuídas em 53 casos de DIP (40.15%), 30 de infecção (22.72%), 19 de neoplasia (14.39%) e casos para pacientes sem suspeita de DIP (22.72%), sugestivo de doenças secundárias pulmonar e/ou sem suspeita clínica concretizada.

Os pacientes foram atendidos em dois hospitais públicos universitários da Região Metropolitana do Recife (RMR), totalizando 115 (87.12%) do hospital das clínicas/UFPE e 17 (12.87%) do Hospital Universitário Oswaldo Cruz. Dos 132 pacientes, 73 (55.30%) foram mulheres e 59 (44.70%) homens. A tabela 1 resume os dados clínicos dos pacientes.

Tabela 1. Dados clínicos.

Fatores clínicos			
Idade	Tabagismo	Uso de imunossupressores	
57.82 (14.7)	Fumantes ou ex-fumantes: 58 (43.93%)	Sim: 48 (36.36%)	
	Não-fumantes: 66 (50%)	Não: 75 (56.81%)	
Padrões clínicos associados a suspeita médica			
DIP, 53	Infecção, 30	Neoplasia, 19	Outras doenças

pulmonares, 30				
Idade				
	61.78 (11.8)	52.97 (16.5)	66.24 (10.0)	51.33 (14.9)
Sexo				
Homem	29 (54.72%)	14 (46.66%)	12 (63.16%)	9 (30%)
Mulher	24 (45,28%)	16 (53.33%)	7 (36.84%)	21 (70%)
Tabagismo				
Fumantes ou ex-fumantes	27 (50.94%)	14 (46.66%)	12 (63.15%)	5 (16.67%)
Não-fumantes	22 (41.50%)	14 (46.66%)	6 (31.58%)	25 (83.33%)
Uso de imunossupressores				
Sim	18 (33.96%)	11 (36.66%)	4 (21.05%)	15 (50%)
Não	32 (60.37%)	16 (53.33%)	14 (73.68%)	14 (46.66%)

Legenda: Alguns dados sobre tabagismos uso de imunossupressores não foram compartilhados pelos pacientes.

Resultados Moleculares

Como controle endógeno, foi utilizado o gene da β -globina, sendo amplificado em todas as amostras. Nas amostras submetidas a PCR convencional (MY09/11), não houve presença de DNA-HPV, contudo, quando submetidas a Nested-PCR houve positividade em 4 (8.69%) amostras ($p = 0.66$), resultados repetidos em triplicata. Do total positivado, 3 eram homens e apenas uma mulher, divididos entre 2 ex-tabagistas e 2 não-tabagistas. Todos com suspeitas de DIP, incluindo Pneumonia de Hipersensibilidade (3) e Bronquiolite (1). Detecção sumarizada na tabela 2. A tabela 3 demonstra a associação entre a análise celular dos casos positivos.

Tabela 2. Detecção de HPV.

Detecção	PCRc	Nested-PCR	Valor de p	Fisher	OR
Grupo 1 (12)	ND	0	NR	NR	NR
Grupo 2 (16)	ND	2 (12.5%)	0.1250	0.27	1.1429
Grupo 3 (18)	ND	2 (11.1%)	0.1111	0.21	0.8750
Total	0	4 (8.69%)	0.6728	0.65	2.0952

Legenda: Grupo 1 (Suspeita e/ou confirmado para neoplasia); Grupo 2 (Hiperplasia escamosa); Grupo 3 (DIP confirmada por citologia). O grupo 2 inclui todos os tipos de suspeitas, exceto neoplasia, seu diferencial é a presença de hiperplasia escamosa. Fisher = Teste exato de Fisher; PCRc = PCR convencional; ND = Não detectado; NR = Não realizado. OR = Odds ratio.

Tabela 3. Relação da citologia com os casos positivos para DNA-HPV.

LBA	Macrófagos (%)	Linfócitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Células epiteliais
Amostra 1	82	10	08	-	> 5%
Amostra 2	51	09	38	-	Até 5%
Amostra 3	70	07	21	02	> 5%
Amostra 4	38	29	33	-	Até 5%

Legenda: Amostras 1, 2 e 4 suspeitas para Pneumonia de Hipersensibilidade (PH), amostra 3 suspeita de bronquiolite. Houve uma associação entre neutrofilia (>3%) com a positividade do HPV.

Resultados Citológicos

Os achados citológicos confirmaram 50.9% (27/53) dos casos suspeitos de DIP, 66.6% (20/30) de infecção e 42.1% (8/19) dos casos suspeitos de neoplasia, utilizando o referencial estabelecido pela AST/ERS 2012 (Meyer *et al.*, 2012). Para as suspeitas de neoplasia, foram considerados confirmatórios após conclusão de atipia celular e/ou presença de células malignas e suspeitas (Figura 2). Os resultados do teste de correlação de Spearman foram de 0.399 para DIP; Neoplasia = 0.232 para neoplasia e 0.599 para infecção; $rs_{\text{Infecção}} = 0,599$ (Figura 3).

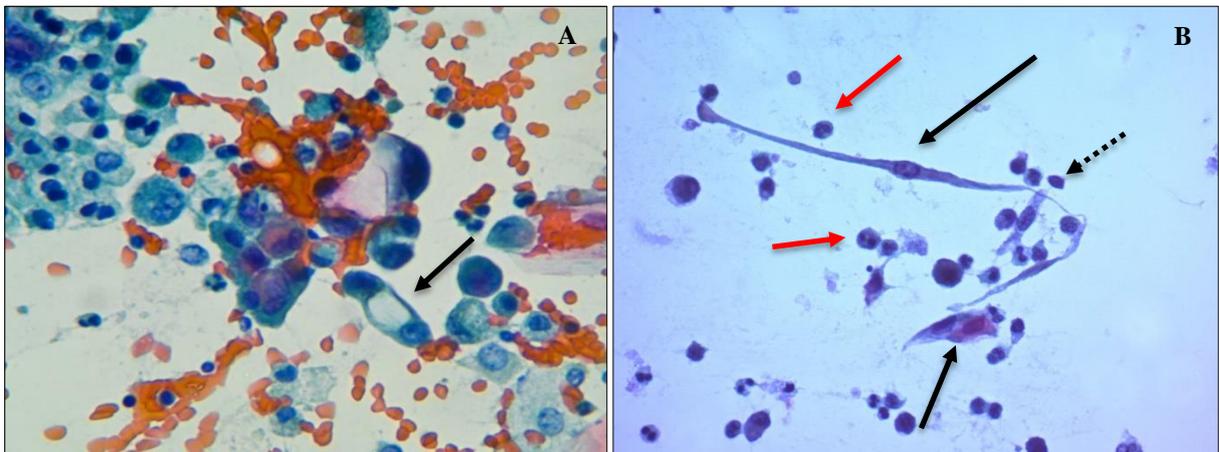


Figura 2. Microfotografia de lesões malignas. (A) Atipia em células colunares, apresentando vacuolizações citoplasmáticas (seta), anisonucleose e hiper Cromasia, positivo para adenocarcinoma. (B). Células escamosas malignas, positivo para carcinoma escamoso. Células fusiformes, apresentando intenso pleomorfismo (setas), com linfócitos (seta pontilhada) e neutrófilos (seta vermelha). Aumento 400x. Coloração Papanicolaou. Autoria própria, 2024.

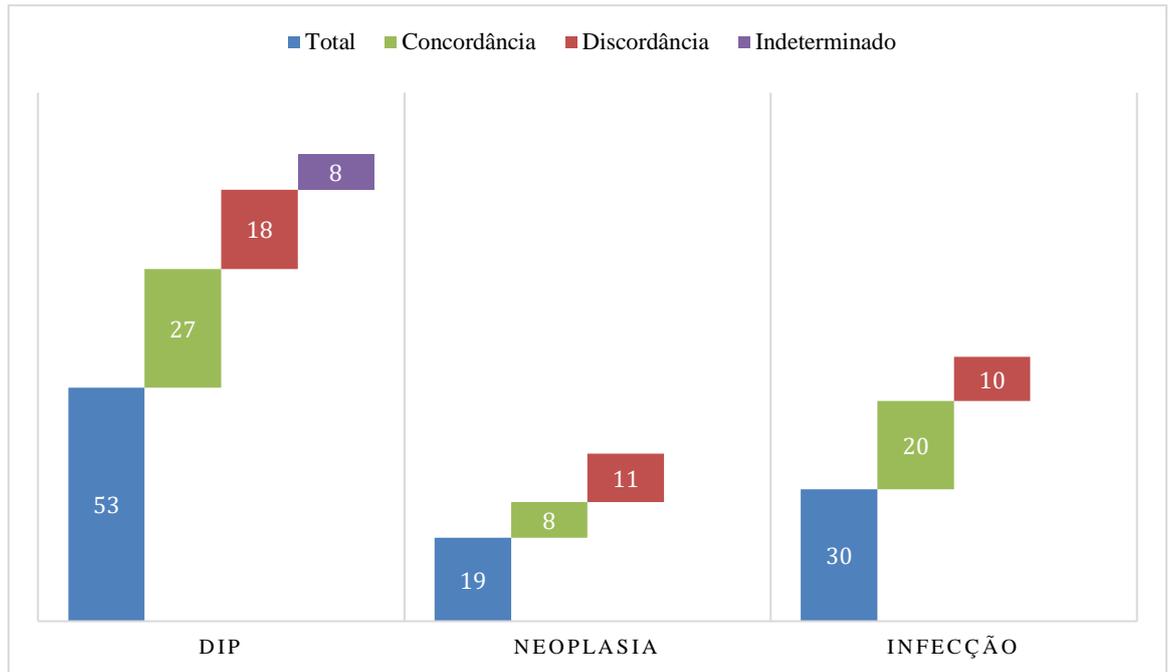


Figura 3. Associação dos casos suspeitos e achados citológicos: as taxas de concordâncias foram mais promissoras em suspeitas de DIP e infecção quando comparado às suspeitas de neoplasia primária. O teste de correlação de Spearman (rs) demonstrou correlação fraca nos casos de neoplasia (p-valor 0,377) e correlação moderada e forte em DIP e infecção, respectivamente (p-valor <0,05). Casos indeterminados possuem valores citológicos próximos ao referencial estabelecido (MEYER et al., 2012). Autoria própria.

Entre as principais DIP suspeitas e/ou diagnosticadas foram: Pneumonia de Hipersensibilidade (PH), Pneumonia Intersticial Não Específica (PINE), Bronquiolite e Doença Pulmonar Fibrosante (DPF). Através das análises citológicas, previamente com os laudos radiológicos, foi possível identificar e diferenciar padrões singulares de cada subclassificação das DIP, como mostrado na tabela 4.

Tabela 4. População celular média do LBA versus suspeitas médicas.

%	PH (26)	PINE (11)	Bronquiolite (6)	DPF (4)	PHAA (3)	PIU (3)
Macrófagos	71,45 (11,86)	72,36 (15,63)	58,16 (25,34)	71 (13,58)	77 (3,60)	74,33 (15,14)
Linfócitos	20,63 (4,94)	11,18 (8,36)	8,66 (5,12)	7,75 (5,90)	9,66 (6,65)	15 (4,58)
Neutrófilos	5,30 (8,96)	16,0 (13,94)	27,16 (21,83)	20,5 (16,50)	13,33 (7,37)	10,66 (16,96)
Eosinófilos	0,09 (0,30)	0,45 (0,82)	4,33 (8,21)	0,75 (0,50)	0(0)	0 (0)
Valor p	0,0001	0,0001	0,1035	--	--	--

Legenda: Média e desvio padrão referente a citologia relativa das subclassificações de DIP. Valor de p em DPF, PHAA e PIU não realizados por conta da baixa frequência. DPF = Doença Pulmonar Fibrosante; PHAA = Pneumonia de Hipersensibilidade associada a Autoimunidade; PIU = Pneumonia Intersticial Usual.

A análise dos casos revelou um padrão predominante na distribuição de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. Observou-se que a neutrofilia apresentou a maior incidência, sendo identificada em 112 casos, correspondendo a 84.8% do total. Em seguida, o predomínio de linfócitos foi observado em 40 casos (30.3%), enquanto a eosinofilia foi registrada em 20 casos (15.1%).

Além disso, a coexistência de mais de um tipo de predomínio celular foi notada em uma parcela de casos. A combinação de linfocitose e neutrofilia ocorreu em 29 casos (21.9%), indicando uma ocorrência relativamente frequente dessa associação. Por outro lado, a linfocitose associada à eosinofilia foi consideravelmente mais rara, aparecendo em apenas 2 casos (1.5%). A neutrofilia e eosinofilia, coexistindo, foram identificadas em 20 casos (15.1%), refletindo uma proporção similar à da eosinofilia isolada.

Notavelmente, a associação de linfocitose, neutrofilia e eosinofilia foi excepcionalmente rara, sendo encontrada em apenas 2 casos (1.5%). Essa observação sublinha a infrequência de uma resposta inflamatória que envolva simultaneamente os três tipos de células.

No contexto dos casos de Doença Intersticial Pulmonar (DIP), analisados em um total de 53 casos, observou-se a linfocitose em 15 ocorrências (28.3%). Esta foi particularmente prevalente nas suspeitas de Pneumonia de Hipersensibilidade (PH), representando 10 casos. A neutrofilia, por sua vez, esteve presente em 46 casos (86.7%), exibindo maior prevalência igualmente nas suspeitas de PH, totalizando 21 casos. Também foi frequente em 11 casos de Pneumonia Intersticial Não Específica (PINE), 5 casos de bronquiolite e 4 casos de Doença Pulmonar Fibrosante (DPF). Quanto à eosinofilia, esta foi identificada em 10 casos (18.8%), mostrando-se significativa nos casos de bronquiolite, DPF e PH.

Em relação aos casos classificados como infecções, em um total de 30 casos, foi constatado a presença de linfocitose em 12 ocorrências (40%), neutrofilia em 24 casos (80%) e eosinofilia em 3 casos (10%). No que concerne aos casos de neoplasia, com 19 suspeitas ao total, a linfocitose foi observada em 2 casos (10.5%), a neutrofilia em 18 casos (94.7%) e a eosinofilia em 4 casos (21.05%). A figura 4 representa as alterações leucocitárias associadas aos casos suspeitos.

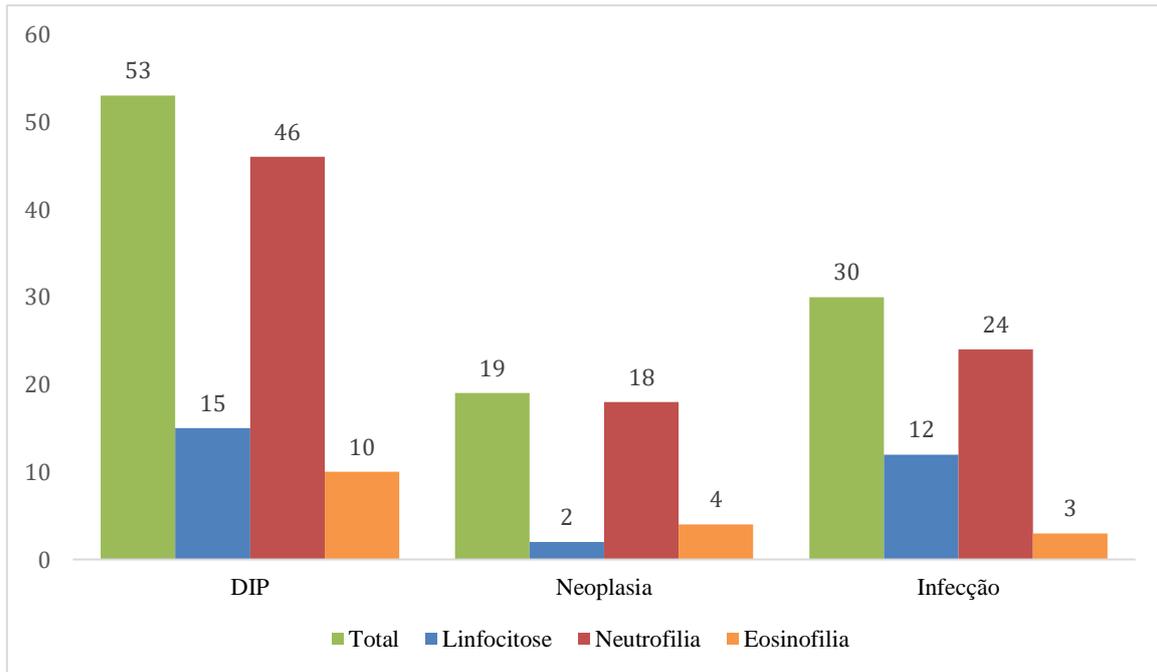


Figura 4. Alterações leucocitárias presente nos casos estudados. A coexistência entre neutrofilia e linfocitose ou eosinofilia foram comuns na maioria das hipóteses médicas.

DISCUSSÃO

O interesse científico na investigação da presença e da atividade carcinogênica do HPV em tecidos não ginecológicos tem se intensificado ao longo das últimas décadas. Neste contexto, o pulmão destaca-se como um dos principais focos de estudo, conforme documentado por Robinson et al. (2016) (Robinson *et al.*, 2016). Especificamente no âmbito neoplásico, mais precisamente nos carcinomas de células não pequenas, a ação oncogênica atribuída ao HPV ainda é controversa. Esta incerteza pode ser justificada pela variabilidade genotípica do vírus, pela carga viral presente e pela limitada sensibilidade das técnicas de detecção empregadas até o momento. Adicionalmente, questiona-se a seleção das amostras para estudo, que frequentemente se limitam as amostras parafinadas e a tecidos frescos (Chang *et al.*, 2015; Sarchianaki *et al.*, 2014). Nesta pesquisa, optou-se pela detecção do DNA-HPV em amostras de Lavado Broncoalveolar (LBA) através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional e da Nested-PCR.

Até o presente momento, não foram identificados na literatura científica estudos conduzidos na América do Sul que tenham como objetivo a detecção do HPV em células obtidas por lavagem broncoalveolar. Em contrapartida, um estudo realizado na Grécia por Mammias et al. (2011) conseguiu identificar a presença do DNA-HPV em 6 de 71 (8.45%) amostras de LBA oriundas de crianças imunocomprometidas, utilizando os primers GP5/6 em PCR convencional (Mammias *et al.*, 2011). No entanto, o presente estudo distingue-se por ser pioneiro na utilização de células de LBA de pacientes com amplas condições clínicas suspeitas, incluindo doenças intersticiais, infecções, neoplasias primárias e metástases, bem como doenças secundárias.

No presente trabalho, 8.69% (4/46) das amostras foram positivas para DNA-HPV utilizando Nested-PCR. Tal resultado foi consistente com o trabalho de Branica et al. (2010), que detectou DNA-HPV em 3 (3.57%) amostras de aspirado brônquico de lesões malignas, utilizando primer específico para E6 (BRANICA et al., 2010). Já no estudo de Argyri et al. (2017) e Sagerup et al. (2014), a prevalência de HPV foi de 2 (3.0%) e 13 (3.90%) em amostras parafinadas, respectivamente. Tais achados demonstram uma frequência baixa do HPV no tecido pulmonar em estudos europeus (Argyri et al., 2017; Sagerup et al., 2014). Além disso, as células escamosas não são as principais participantes do LBA, o que pode justificar a baixa frequência do HPV nesse tipo de amostra.

Geralmente a presença do HPV em câncer pulmonar varia entre 0 a 78.3%, consoante meta-análise (Srinivasan, Taioli e Ragin, 2009), sendo eles, normalmente, encontrados em amostras tumorais. Em contrapartida, a positividade dos nossos resultados limitou-se às amostras sem lesões malignas, também sendo encontrados em estudos que utilizaram amostras pulmonares de controle negativo, não cancerígena, como nos estudos de Gatta et al. (2012) e Robinson et al. (2016), que detectaram 4.34% e 10% de DNA-HPV, respectivamente (Gatta et al., 2012; Robinson et al., 2016). Mesmo sem malignidade, as amostras possuem características inflamatórias – a qual pode ser um fator contribuinte para a infecção do HPV no pulmão. A positividade do HPV foi mais prevalente na população masculina, análoga aos resultados de Tsyganov et al. (2023) (GORVEL; OLIVE, 2023; TSYGANOV et al., 2023).

Entre as amostras positivas para DNA-HPV, todas tinham neutrofilia (>3%). Tomando como referência a atuação do HPV em carcinoma de cabeça e pescoço, macrófagos e linfócitos parecem ter uma associação maior, enquanto os neutrófilos são um pouco mais associados a tumores HPV-negativo (Chen et al., 2018). Todavia, se faz necessário pesquisar a correlação de neutrófilos pulmonares com a detecção de DNA viral.

A causa mais comum de infecção pelo HPV ocorre por transmissão sexual, contudo, também pode ocorrer por transmissão vertical, visto que o DNA-HPV já foi encontrado em células reprodutivas, placenta, líquido amniótico e sangue periférico. Além disso, também não se pode descartar a possibilidade de transmissão por via aérea (Nachira et al., 2024; Nascimento, Do et al., 2021; Oyouni, 2023). Naturalmente, o percentual de infecções de HPV muda conforme a localização geográfica, em virtude disso, é necessário investimentos em pesquisas que visem determinar os tipos de transmissões, além de associá-los com o tipo de material estudado, dado que a presença do DNA viral no trato respiratório inferior (TRI) tem se tornando um ponto de pesquisa fundamental para o entendimento da infecção pulmonar pelo HPV (Tsyganov et al., 2019).

Técnicas broncoscópicas, como a lavagem e o raspado, têm demonstrado resultados promissores na pesquisa de doenças do TRI, possuindo alta especificidade (Sareen e Pandey, 2016a). Por se tratar de um procedimento não-invasivo, a aplicação da lavagem broncoalveolar é promissora tanto para análise citológica, quanto para pesquisa molecular, como também demonstrado no estudo de Han et al. (2023) e Subhagan et al. (2021), os quais utilizaram PCR para detecção de microrganismos fúngicos oportunistas (Han et al., 2023; Subhagan et al., 2022).

Apesar de alcançar 8.69% de detecção, esses números se mostram relevantes quando se associa a presença do HPV no pulmão, ainda mais por se tratar de amostras celulares, composta predominantemente por leucócitos e de natureza benigna. Os casos positivos para DNA-HPV atuam sobre pacientes com suspeitas de doenças intersticiais e infecções pulmonares, resultando em casos pouco discutidos na literatura. Além disso, a detecção de HPV a nível celular é significativo, pois a detecção precoce é um fator determinante para a progressão e desenvolvimento de lesões teciduais (Fera, Della *et al.*, 2021; Schiffman *et al.*, 2016).

No aspecto citológico, a análise do fluido do LBA mostrou conseguir diagnosticar DIP, infecções e lesões neoplásicas. As suspeitas de infecções apresentaram neutrofilia e/ou linfocitose, diferente dos casos que confirmaram malignidade, a qual a neutrofilia foi unânime. Nas suspeitas de neoplasia, a citologia do LBA limita-se quanto ao tamanho da lesão e o local acometido, conforme descrito por Boonsarngsuk; Kanoksil; Laungdamerongchai. (2014) (Boonsarngsuk, Kanoksil e Laungdamerongchai, 2014).

Quanto aos casos de DIP, a neutrofilia foi mais comum, mas os casos com linfocitose tiveram maior impacto no diagnóstico. No presente estudo, neutrofilia e, principalmente, linfocitose, foram presentes nos casos de PH, semelhante ao estudo de Sobiecka *et al.* (2023), contudo, a linfocitose apresentou um ponto de corte para diferenciação entre PH e DPF (Sobiecka *et al.*, 2023). Já na avaliação de PINE, Bergantini *et al.* (2021) demonstrou resultados citológicos congruentes ao deste estudo (Bergantini *et al.*, 2021).

Apesar dos resultados promissores, ainda são necessários estudos que confirmem a detecção e atuação do HPV no tecido bronquial, bem como validar a lavagem broncoalveolar como metodologia eficiente para esse tipo de abordagem.

CONCLUSÃO

Este estudo revelou que é viável a aplicação da técnica de detecção de DNA do Papilomavírus Humano (HPV) em amostras de Lavado Broncoalveolar (LBA) através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Uma das observações relevantes é que a escassa presença de células escamosas no LBA pode influenciar na reduzida detecção do HPV. No entanto, essa metodologia apresenta-se como um avanço promissor na investigação do HPV no contexto pulmonar, especialmente considerando que a composição celular do lavado tem origem intersticial. Isso abre um leque de possibilidades para o estudo de citocinas e quimiocinas que podem estar relacionadas à presença do vírus.

Um aspecto significativo deste estudo é a identificação do HPV em lesões benignas, um resultado que demanda atenção, sobretudo no que tange ao tempo de desenvolvimento e à progressão dessas lesões. É crucial destacar a importância da padronização das técnicas broncoscópicas, uma vez que a falta desta pode comprometer tanto a análise citológica quanto molecular. Contudo, essa limitação

não diminui o potencial benéfico deste método para o diagnóstico, nem compromete a validade dos resultados obtidos neste estudo.

Este achado sugere que, apesar das limitações técnicas e metodológicas, a detecção de DNA-HPV via PCR em amostras de LBA emerge como uma abordagem inovadora para a pesquisa do HPV em tecidos pulmonares. O potencial para explorar a associação entre o vírus e diferentes condições patológicas, especialmente em lesões benignas, pode oferecer novos *insights* para o entendimento da patogênese do HPV, além de contribuir para o aprimoramento das estratégias de diagnóstico e tratamento. Portanto, a implementação e aprimoramento dessa metodologia podem representar um avanço significativo na pesquisa biomédica, destacando a necessidade de futuras investigações para explorar plenamente seu potencial clínico e científico.

REFERÊNCIAS

- ARGYRI, E. et al. Investigating the role of human papillomavirus in lung cancer. **Papillomavirus Research**, v. 3, p. 7–10, 1 jun. 2017.
- BERGANTINI, L. et al. Integrated approach to bronchoalveolar lavage cytology to distinguish interstitial lung diseases. **European Journal of Internal Medicine**, v. 89, p. 76–80, 1 jul. 2021.
- BOONSARNGSUK, V.; KANOKSIL, W.; LAUNG DAMERONGCHAI, S. Diagnosis of Peripheral Pulmonary Lesions With Radial Probe Endobronchial Ultrasound-Guided Bronchoscopy. **Archivos de Bronconeumología (English Edition)**, v. 50, n. 9, p. 379–383, set. 2014.
- CAVALCANTE, J. R. et al. Association of breast cancer with human papillomavirus (Hpv) infection in northeast brazil: Molecular evidence. **Clinics**, v. 73, 2018.
- CHANG, S. Y. et al. Detection of human papillomavirus in non-small cell carcinoma of the lung. **Human Pathology**, v. 46, n. 11, p. 1592–1597, 1 nov. 2015.
- CHEN, X. et al. Immunological network analysis in HPV associated head and neck squamous cancer and implications for disease prognosis. **Molecular Immunology**, v. 96, p. 28–36, 1 abr. 2018.
- DELLA FERA, A. N. et al. **Persistent human papillomavirus infection**. **Viruses**. [S.l.]: MDPI AG. , 1 fev. 2021
- DO NASCIMENTO, K. C. G. et al. Detection of human papillomavirus dna in paired peripheral blood and cervix samples in patients with cervical lesions and healthy individuals. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 21, 1 nov. 2021.
- EFARED, B. et al. The diagnostic value of the bronchoalveolar lavage in interstitial lung diseases. **Journal of Negative Results in BioMedicine**, v. 16, n. 1, 1 mar. 2017.
- FRYE, B. C. et al. The value of bronchoalveolar lavage for discrimination between healthy and diseased individuals. **Journal of Internal Medicine**, v. 287, n. 1, p. 54–65, 1 jan. 2020.
- GATTA, L. B. et al. Human Papillomavirus DNA and p16 Gene in Squamous Cell Lung Carcinoma. **Anticancer Research**, v. 32, p. 3085–3900, 2012.
- GOOS, T. et al. Defining and predicting progression in non-IPF interstitial lung disease. **Respiratory Medicine**, v. 189, 1 nov. 2021.

- GORVEL, L.; OLIVE, D. **Tumor associated macrophage in HPV+ tumors: Between immunosuppression and inflammation. *Seminars in Immunology***. [S.l.]: Academic Press. , 1 jan. 2023
- HAN, Y. et al. Bronchoalveolar lavage fluid polymerase chain reaction for invasive pulmonary aspergillosis among high-risk patients: a diagnostic meta-analysis. ***BMC Pulmonary Medicine***, v. 23, n. 1, 1 dez. 2023.
- HOGEA, S. P. et al. **Bronchoalveolar lavage: role in the evaluation of pulmonary interstitial disease. *Expert Review of Respiratory Medicine***. [S.l.]: Taylor and Francis Ltd. , 1 nov. 2020
- HUSSEN, B. M. et al. The role of HPV gene expression and selected cellular MiRNAs in lung cancer development. ***Microbial Pathogenesis***, v. 150, 1 jan. 2021.
- ICA VRABEC BRANICA, B. et al. **Detection of Human Papillomaviruses Type 16, 18 and 33 in Bronchial Aspirates of Lung Carcinoma Patients by Polymerase Chain Reaction: A Study of 84 Cases in Croatia. *Coll. Antropol.*** [S.l: s.n.], 2010.
- MAMMAS, I. N. et al. Detection of human papillomavirus in bronchoalveolar lavage samples in immunocompetent children. ***Pediatric Infectious Disease Journal***, v. 30, n. 5, p. 384–386, 2011.
- MEYER, K. C. et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: The clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. ***American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine***, v. 185, n. 9, p. 1004–1014, 1 maio 2012.
- MUCIÑO-HERNÁNDEZ, M. I. et al. Molecular Identification of Human Papillomavirus DNA in Thyroid Neoplasms: Association or Serendipity? ***Cureus***, 20 abr. 2021.
- NACHIRA, D. et al. The Role of Human Papilloma Virus (HPV) in Primary Lung Cancer Development: State of the Art and Future Perspectives. ***Life***, v. 14, n. 1, p. 110, 10 jan. 2024.
- OYOUNI, A. A. A. **Human papillomavirus in cancer: Infection, disease transmission, and progress in vaccines. *Journal of Infection and Public Health***. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 1 abr. 2023
- RECIO, R. et al. Lack of clinical significance for molecular detection of respiratory viruses in bronchoalveolar lavage samples. ***Journal of Medical Virology***, v. 93, n. 8, p. 4693–4703, 1 ago. 2021.
- RICE, A. J. Non-neoplastic respiratory fluid cytology including cell differential counts for interstitial lung disease. ***Cytopathology***, v. 33, n. 1, p. 44–56, 1 jan. 2022.
- ROBINSON, L. A. et al. Molecular evidence of viral DNA in non-small cell lung cancer and non-neoplastic lung. ***British Journal of Cancer***, v. 115, n. 4, p. 497–504, 9 ago. 2016.
- SAGERUP, C. M. T. et al. Human papilloma virus detection and typing in 334 lung cancer patients. ***Acta Oncologica***, v. 53, n. 7, p. 952–957, 2014.
- SARCHIANAKI, E. et al. Detection and genotype analysis of human papillomavirus in non-small cell lung cancer patients. ***Tumor Biology***, v. 35, n. 4, p. 3203–3209, 1 abr. 2014.
- SAREEN, R.; PANDEY, C. Lung malignancy: Diagnostic accuracies of bronchoalveolar lavage, bronchial brushing, and fine needle aspiration cytology. ***Lung India***, v. 33, n. 6, p. 635–641, 1 nov. 2016.
- SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. ***Nature Reviews Disease Primers***, v. 2, 1 dez. 2016.
- SESÉ, L. et al. Adult interstitial lung diseases and their epidemiology. ***Presse Medicale***, v. 49, n. 2, 1 jun. 2020.
- SIMOENS, C. et al. HPV DNA genotyping, HPV E6*I mRNA detection, and p16INK4a/Ki-67 staining in Belgian head and neck cancer patient specimens, collected within the HPV-AHEAD study. ***Cancer Epidemiology***, v. 72, 1 jun. 2021.

- SOBIECKA, M. et al. Bronchoalveolar Lavage Cell Count and Lymphocytosis Are the Important Discriminators between Fibrotic Hypersensitivity Pneumonitis and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Diagnostics**, v. 13, n. 5, 1 mar. 2023.
- SRINIVASAN, M.; TAIOLI, E.; RAGIN, C. C. Human papillomavirus type 16 and 18 in primary lung cancers - A meta-analysis. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 10, p. 1722–1728, 2009.
- SUBHAGAN, H. et al. A simple high-volume culture technique—Good substitute for polymerase chain reaction for the detection of *Aspergillus* species in bronchoalveolar lavage samples. **Mycoses**, v. 65, n. 1, p. 24–29, 1 jan. 2022.
- TSYGANOV, M. M. et al. Human papillomavirus and lung cancer: an overview and a meta-analysis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 145, n. 8, p. 1919–1937, 1 ago. 2019.
- TSYGANOV, Matvey M. et al. Human Papillomavirus in Non-Small Cell Lung Carcinoma: Assessing Virus Presence in Tumor and Normal Tissues and Its Clinical Relevance. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2023.
- VAN DER STAAL, A. et al. Immune cell profiles and patient clustering in complex cases of interstitial lung disease. **Immunology Letters**, v. 253, p. 30–40, 1 jan. 2023.
- ZHAI, K.; DING, J.; SHI, H. Z. HPV and lung cancer risk: A meta-analysis. **Journal of Clinical Virology**, v. 63, p. 84–90, 1 fev. 2015.

ANEXO A – FICHA DE COLETA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares – LPCM
Coordenação: Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto



FICHA DE COLETA PARA LAB

LBA (ID interno) : _____ No. REGISTRO: _____

DATA: ____ / ____ / ____ TURNO: _____

PACIENTE: _____

IDADE: _____ SEXO: _____

EXPOSIÇÃO A AGENTES CAUSADORES DE LESÃO PULMONAR: _____

IMUNOSUPRESSÃO/ESTERÓIDES: () SIM () NÃO

OUTRAS MEDICAÇÕES: _____

COMORBIDADES: () SIM () NÃO. SE SIM, QUAIS? _____

FUMANTE: () SIM () NÃO

CARGA TABÁGICA: _____ MAÇOS-ANO

EX-FUMANTE: () PAROU DE FUMAR HÁ: _____ ANOS

SUSPEITA CLÍNICA: _____

ACHADOS RADIOLÓGICOS: _____

LBA PRÉVIO: () SIM () NÃO

ACHADOS BRONCOSCÓPICOS: () NORMAIS () BRONQUITE AGUDA

() BRONQUITE CRÔNICA () SECREÇÃO PURULENTA () TUMOR

() TRAQUEOBRONQUITE MODERADA DIFUSA.

OBSERVAÇÕES: _____

VOLUME INSTILADO: _____ ml.

VOLUME RECUPERADO: _____ ml.

OBSERVAÇÕES/INTERCORRÊNCIAS (exemplo: separado material para cultura, achados relevantes):

CONSERVANTE: () NENHUM () ÁLCOOL 50% (QUANTIDADE 1:1)

() OUTRO TIPO DE CONSERVANTE: _____

CLÍNICO – RESPONSÁVEL: _____

ANEXO B – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO ADAPTADO

A extração do DNA foi feita a partir de uma adaptação de protocolo do kit EasyPure® Transgene (China):

1º Passo: Utilizar uma alíquota de 1000 microlitros (μL) do lavado, seguido de homogeneização no vórtex e centrifugação a 250g por 5 minutos;

2º Passo: Em seguida, transferir 100 μL do sedimento formado a um microtubo (*ependorf*) estéril e adicionar 100 μL de solução de lise, homogeneização no vórtex;

3º Passo: Para remover moléculas de RNA, é adicionado 20 μL de RNase, incubando a solução por 2 minutos.

4º Passo: Posteriormente, é adicionado 20 μL de Proteinase K, seguida de homogeneização no vórtex e incubação por 2 minutos.

5º Passo: Adicionar 500 μL de Binding Buffer (BB2), seguida de homogeneização e incubação por 10 minutos.

6º Passo: Transferir a solução para a coluna de extração, seguida de centrifugação a 12.000g por 1 minuto.

7º Passo: Remova o que foi passado pelo filtro e adicione 500 μL de Clean Buffer (CB2), seguido de centrifugação a 12.000g por 1 minuto

8º Passo: Remova o que foi passado pelo filtro e adiciona 500 μL de Wash Buffer (WB) para seguir com centrifugação 12.000g por 2 minutos. Esta etapa é repetida duas vezes a fim de assegurar que todo material foi removido, exceto o DNA.

9º Passo: Adicionar 20 μL do buffer de eluição e centrifugar em 12.000g por 1 minuto.

Por fim, o DNA extraído pode ser quantificado pelo NanoDrop. Toda unidade de medida para centrifugação foi usada em RCF (*Relative Centrifugal Force*), Força G.