

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Carolina Maria Medeiros Do Amaral

**Avaliação da Presença do Papilomavírus Humano (HPV)
em Tumores de Pulmão**

**Recife
2015**

Carolina Maria Medeiros Do Amaral

**Avaliação da Presença do Papilomavírus Humano (HPV)
em Tumores de Pulmão**

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

Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientador : Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz

Recife

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Amaral, Carolina Medeiros do

Avaliação da presença do Papilomavírus humano (HPV) em tumores de pulmão / Carolina Medeiros do Amaral – Recife: O Autor, 2015.

122 folhas: il. fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

**Coorientadores: Jacinto da Costa Silva Neto e Maria Tereza
Cartaxo Muniz**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biociências. Genética, 2015.**

Inclui referências e anexos.

- 1. Papilomavírus humano 2. DNA 3. Pulmões- câncer I. Freitas,
Antonio Carlos (orientador) II. Silva Neto, Jacinto da Costa
(orientador) III. Muniz, Maria Tereza Cartaxo (coorientadora) IV.
Título**

616.911

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-300

CAROLINA MARIA MEDEIROS DO AMARAL

**Avaliação da Presença do Papilomavírus Humano (HPV) em
Tumores de Pulmão**

Aprovada em: 15/12/2015

Dr. Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz
Universidade de Pernambuco

Dra. Prof. Neide Santos
Universidade de Pernambuco

Dra. Nara Diniz Soares Pessoa
Universidade de Pernambuco

Dra. Paula Sandrin Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

Recife
2015

A minha avó Maria dedico com muito amor

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, autor e consumidor da minha fé, pelo dom da vida e por todas as bênçãos sobre mim derramadas, pelo cuidado, pela proteção e por me dar condições de trilhar por este caminho;

Agradeço aos meus pais, Ronaldo Amaral e Eliane Amaral, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, incentivando e me ajudando em tudo;

As minhas irmãs Rafaela Amaral, Juliana Amaral e Ana Beatriz Amaral pelo companheirismo, incentivo, compreensão e apoio;

Aos meus pimpolhos lindos que a titia ama demais, Eduardo Cró e Gabriela Moraes. Obrigada por aliviar os momentos difíceis e estressantes e torná-los menos pesados e por encher as nossas vidas de tanto amor e alegria;

Obrigada aos meus avós, Maria Medeiros e Eliel Medeiros, pelas orações, pelo amor, pelo exemplo de fé e perseverança;

Obrigada a toda a minha família, tios e primos que sempre me ajudaram com palavras de incentivo, motivação, conselhos e tantas coisas mais. Muito obrigada, vocês são DEMAIS!!!

Agradeço ao professor Antonio Carlos pela confiança e oportunidade de fazer parte do LEMTE, que me permitiu conhecer amigos maravilhosos e grandes colegas de trabalho;

Obrigada à amiga Pavla Gurgel, que de uma forma mais direta, me ajudou, me aconselhou e me incentivou durante toda essa jornada. Aprendi muito nesses anos com sua dedicação e empenho pela ciência;

Ao amigo André, sempre disposto a baixar artigos, a ajudar, a discutir, tirar e criar dúvidas;

Obrigada a Élyda Gonçalves e a Bianca São Marcos, que estiveram mais de perto me auxiliando nos experimentos;

Aos amados amigos do LEMTE, André Luis, Marcelo Nazário, Jackeline Gomes, Ana Jéssica, Bianca São Marcos, Kamylla Conceição, Bárbara Simas, Pavla Gurgel, Angélica Ramos, Talita Araújo, Antonio Humberto, Marconi Rego, Eliane Coimbra, Rita Lima, Elyda Gonçalves, Ruany Cristyni, Conceição, Nayara Pontes, Morse, Elias Jr. Obrigada pelos momentos de descontração e pelas ajudas quando precisei;

Obrigada a amiga Heidi Lacerda, pelos sequenciamentos e por me ajudar sempre;

Obrigada ao professor Jacinto Costa e a toda a sua equipe, Dafne Carolina, Filipe e Romulo;

Obrigada aos técnicos de laboratório Paulo e Silvana;

Obrigada ao Professor e colega de curso, Sergio Paiva, pela ajuda nas análises estatísticas;

Obrigada a professora Tereza Cartaxo pelo apoio durante todo este processo;

Obrigada a Dra. Isabela, Dr. Mário e aos residentes do Hospital Oswaldo Cruz que de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

Obrigada a todos os pacientes que se dispuseram participar deste estudo;

Obrigada a patologista Ricella pela leitura das lâminas;

Obrigada aos funcionários do laboratório central, Nadja e Gabi, pelos materiais autoclavados e a Carminha, pela dedicação em manter a limpeza dos laboratórios;

Agradeço ao programa de pós-graduação em genética;

Agradeço a FACEPE pelo apoio financeiro.

“A ciência serve para nos dar uma ideia de quão extensa é a nossa ignorância”. **(Félicité Robert de Lamennais)**

Resumo

Os Papilomavírus humano (HPV) infectam mucosas e epitélio contribuindo para o desenvolvimento de tumores benignos como também malignos. São amplamente conhecidos como causadores do câncer cervical, contudo, atualmente, vem apresentando evidências de associação com diversos outros tipos de cânceres, como o câncer de pulmão. Sendo assim, o presente estudo avaliou a presença do DNA do HPV em tumores de pulmão de pacientes do Estado de Pernambuco bem como a expressão de suas oncoproteínas E6 e E7. Para isto, a detecção foi feita em amostras de tecidos de tumores frescos e parafinados de 63 pacientes. HPV estava presente em 52% das amostras, sendo detectados os tipos 16 e 18 com frequências de 81 e 19%, respectivamente. Quanto a presença do vírus nos diferentes tipos histológicos dos tumores, foi detectado HPV em 40% dos carcinomas escamosos, 33% dos adenocarcinomas, 18% dos carcinomas de células pequenas e 9% em carcinoma de células grandes. Através da técnica de imunohistoquímica detectou-se a presença das oncoproteínas virais E6 (anticorpo anti-HPV 16 e anti-HPV 18) e E7 (anticorpo anti-HPV 16 e anti-HPV 18) com frequências de 85 e 75%, respectivamente. Tal resultado confirma os resultados obtidos molecularmente quanto à presença do HPV e é sugestivo de que o vírus esteja em atividade nas células tumorais e provavelmente esteja desempenhando um papel na carcinogênese de pulmão. No entanto, mais estudos são necessários para se ter um maior esclarecimento sobre interação de E6 e E7 com proteínas celulares na tumorigenese pulmonar.

Palavras-chave: Câncer de pulmão; HPV; oncoproteína E6; oncoproteína E7.

Abstract

Small DNA viruses - Human Papillomavirus (HPV) - infect oral mucosa and the epithelium, which leads to the development of both benign and malignant tumors. They are widely known as the principal causes of cervical cancer although currently there is evidence to show that they are associated with several other types of cancer, such as lung cancer. In the light of this, this study evaluated the presence of HPV in the tumors of lungs of patients from the State of Pernambuco, as well as the E6 and E7 oncoproteins expression. This involved carrying out the detection in tumor tissue samples that were fresh and paraffin-embedded and taken from 63 patients. HPV was found to be present in 52% of the samples, and types 16 and 18 were detected with frequencies of 81% and 19% respectively. With regard to the presence of the virus in different histological types of tumors, HPV was detected in 40% of the squamous carcinomas, 33% of the adenocarcinomas, 18% of the small cell carcinomas and 9% in large cell carcinomas. The presence of the E6 (antibody anti-HPV 16 and anti-HPV 18) and E7 (antibody anti-HPV 16 and anti-HPV 18) oncoproteins was detected by means of the immunohistochemical technique and this confirmed the results obtained from a molecular analysis with regard to the presence of the virus and it is suggestive that the virus is active in tumor cells and is probably playing a role in lung carcinogenesis. However, further studies are required to have a clearer understanding of the interaction of E6 and E7 with the cell proteins in pulmonary tumorigenesis.

Keywords: Lung cancer; HPV; E6 oncoprotein; E7 oncoprotein.

Lista de Ilustrações

Figura 1:	Os trinta e sete gêneros do Papilomavírus apresentados na árvore filogenética construída a partir do alinhamento das sequências dos genes E1, E2, L1 and L2	23
Figura 2:	Representação esquemática do genoma do Papilomavírus Humano com aproximadamente 8 kb de tamanho contendo genes não estruturais de expressão precoce (E), genes estruturais de expressão tardia (L) e regiões não traduzidas: URR entre os genes L1 e E6 e NCR entre os genes E5 e L2	27
Figura 3:	Ciclo de vida do vírus	34
Figura 4:	Quadro comparativo da incidência e mortalidade por câncer pulmão entre homens e mulheres em todo mundo	37
Figura 5:	Estimativas para novos casos de câncer de pulmão para os anos 2014 e 2015 para homens e mulheres no Brasil	38
Figura 6:	Papel da proteína E6 na progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S	44
Figura 7:	Representação esquemática da transcrição de p21 por p53	45
Figura 8:	Representação esquemática da ação da oncoproteína E6 na expressão da interleucina 10	47
Figura 9:	Angiogênese promovida por E6 e E7	51
Figura 10:	Modelo de interação entre o tabaco e o HPV	53
Figura 11:	Ao interagir com a proteína pRb, E7 promove a dissociação do complexo HDAC/pRb/E2F	55
Figura 12:	O gráfico mostra a frequência das pacientes nos diferentes grupos etários	68

Figura 13:	Grupo de pacientes dividido em não fumantes, fumantes/já fumaram	69
Figura 14:	Frequência da distribuição de homens e mulheres	70
Figura 15:	O gráfico mostra a frequência dos pacientes em relação ao consumo de álcool	71
Figura 16:	Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR com primers para β -globina	72
Figura 17:	Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR com primers MY 09/11	73
Figura 18:	Eletroforese do produto da PCR com primers GP 5/6 em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo	73
Figura 19:	Eletroesferogramas obtidos no sequenciamento dos fragmentos gerados pela PCR	74
Figura 20:	Prevalência do DNA do HPV em 63 amostras de tumores de pulmão	75
Figura 21:	Prevalencia dos HPV 16 e 18 em 33 tumores HPV positivos dos pacientes analisados	76
Figura 22:	Prevalência do HPV de acordo com o tipo histológico do tumor	81
Figura 23:	Imunomarcacão em tecido tumoral de pulmão para anticorpo E6 HPV 16/18	83
Figura 24:	Representação do epitélio glandular em um adenocarcinoma pulmonar para o anticorpo E7 (HPV 16 e 18)	84

Lista de Tabelas

Tabela 1	Autores que detectaram DNA de HPV em pacientes com câncer de pulmão	41
Tabela 2	Análise de associação entre as características clínicas-biológicas e sócio-demográficas dos pacientes de acordo e a presença do HPV.	77
Tabela 3	Análise de associação entre as características clínicas e sócio-demográficas e a presença do HPV 16 e 18.	79
Tabela 4	Análise da associação entre os HPV 16 e 18 e os tipos histológicos dos tumores.	82
Tabela 5	Análise da associação entre a presença de carcinoma escamoso e as características clínicas-biológicas e sócio-demográficas.	85
Tabela 6	Análise da associação entre a presença de adenocarcinoma e as características clínicas-biológicas e sócio-demográficas.	86
Tabela 7	Análise da associação entre a presença de carcinoma de células grandes e as características clínicas-biológicas e sócio-demográficas.	87
Tabela 8	Análise da associação entre a presença de carcinoma de células pequenas e as características clínicas-biológicas e sócio-demográficas.	88

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AhR	Receptor de hidrocarboneto Aril (Aryl hydrocarbon receptor)
Bcl-2	Proteína anti apoptótica Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)
CDK	Quinase dependente de ciclina
CDKN2A	Inibidor de quinase-dependente de ciclina 2 ^a (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A)
clAP2	Proteína inibidora de apoptose – 2 (Cellular inhibitors of apoptosis)
CIP1	Proteinase cisteína 1 (Cysteine proteinase-1)
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (cAMP responsive elemento binding protein)
DDX3	Dead box polypeptide 3
E6AP	Complexo E6 ligase ubiquitina celular
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal (Epidermal growth factor receptor)
EV	epidermoplasia verruciforme
HDAC	Histona deacetilase (Histone deacetylase)
HE	Hematoxilina e Eosina
HIF-1 α	Fator induzível de hipóxia 1 alfa (Hypoxia inducible factor 1 alpha)

HPV	Papilomavírus humano
HR	Papilomavírus de alto risco
hTERT	Telomerase transcriptase reversa humana (Human telomerase reverse transcriptase)
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
ISH	Hibridização <i>in situ</i>
KDa	Quilodaltons
LR	Papilomavírus de baixo risco
NCR	Região não codificante
NF-kB	Fator nuclear Kappa beta (nuclear factor fo Kappa B)
OR	Odds Ratio
ORF	Quadro aberto de leitura (Open Reading Frame)
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
PV	Papilomavírus
SB	Southern blot
SBH	Hibridização Southern blot
SP1	Proteína de especificidade 1 (specificity protein 1)
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (Tetrachlorodibenzo-p-dioxin)
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido

URR	Região Regulatória upstream (Upstream Regulatory Region)
UTR	Região não traduzida (untranslated region)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (Vascular endothelial growth factor)
WAF1	Gene Wildtype p53-Activated Fragment 1

SUMÁRIO

1. Introdução	20
2. Revisão da Literatura	22
2.1 Papilomavírus	22
2.2 Papilomavírus humano	24
2.2.1 Genoma Viral	26
2.2.2 Ciclo de vida	32
2.2.3 Integração do DNA do HPV ao genoma celular	35
2.2.4 HPV e cânceres não cervicais	36
2.3 Câncer de Pulmão	36
2.4 HPV e o Câncer de Pulmão	40
2.4.1 Proteínas E6, E7 e a Carcinogênese De Pulmão	43
2.4.1.1 E6 e a inativação de p53	43
2.4.1.2 E6 e IL-10	46
2.4.1.3 E6 e a proteína Bcl-2	47
2.4.1.4 E6 e mutações em EGFR	48
2.4.1.5 E6 e metaloproteinases	48
2.4.1.6 E6 e hTERT	49
2.4.1.7 E6, E7 e HIF-1 α	50
2.4.1.8 E6, E7 e o Tabaco	51
2.4.1.9 E7 e inativação de pRB	54
2.4.1.10 E7 e o receptor de hidrocarboneto de arila (AhR)	55
3. Objetivos	57

3.1 Objetivo Geral	57
3.2 Objetivos específicos	57
4. Material e Métodos	58
4.1 Local, período e tipo de estudo	58
4.3 Caracterização da amostra	58
4.4 Coleta do material biológico	59
4.5 Criação de banco de dados	59
4.6 Fixação dos tumores	60
4.7 Preparação de lâminas para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e para ensaio de imunohistoquímica	60
4.8 Extração e quantificação do DNA	60
4.9 Avaliação da qualidade do DNA extraído	61
4.10 Detecção do DNA viral	62
4.11 Tipificação do DNA viral	63
4.12 Coloração HE	63
4.13 Desparafinização das lâminas	64
4.14 Imunohistoquímica	64
4.15 Análises estatísticas	66
4.16 Aspectos éticos	66
5. Resultados	68
5.1 Caracterização da amostra estudada	68
5.1.1 Análise da amostra total	68
5.2 Detecção viral	71
5.2.1 Avaliação da qualidade do DNA extraído	71
5.2.2 Detecção do HPV com primers MY e GP através da reação de nested-PCR	72

5.3	Tipificação	74
5.4	Prevalência do HPV em tumores de pulmão	75
5.5	Prevalência do HPV X características clínicas e sócio demográficas	76
5.6	Prevalência do HPV 16 e 18 X características clínicas e sócio-demográficas	78
5.7	Análise histopatológica	80
5.8	Análise imunohistoquímica	82
5.8.1	Oncoproteína viral E6	82
5.8.2	Oncoproteína viral E7	83
5.9	Análise de associação de todas as características clínicas-biológicas e sócio-demográficas quanto à presença e ausência dos tipos histológicos dos tumores	84
6.	Discussão	89
7.	Conclusões	98
8.	Referências bibliográficas	99
9.	Anexos	114
10.	Curriculo Lattes	119

1. Introdução

Com mais de 120 tipos já conhecidos e caracterizados, os Papilomavírus humano (HPV) são categorizados em cutâneos, aqueles associados a verrugas, câncer de pele e cistos epidermóides, e mucocutâneo, aqueles associados à condiloma acuminato, hiperplasia epitelial focal, cânceres da cérvix, ano-genital e cabeça e pescoço.

Tais vírus pertencem à família *Papillomaviridae* a qual possui 37 gêneros organizados em 16 grupos designados por letras gregas, que compreendem mais de 240 tipos. Os HPV são membros de cinco grupos de gêneros (*Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gamma**papillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapilomavirus*).

Os HPV associados ao desenvolvimento de verrugas benignas são considerados de baixo risco, são eles: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 45, 54, 61, 70, 72, 81; enquanto aqueles associados ao desenvolvimento de lesões com capacidade de progressão para a malignidade são incluídos entre os de alto risco, a saber: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82. É importante salientar que tal classificação se dá de acordo com o conhecimento que se tem deste vírus em relação às lesões cervicais, visto ser o mais amplamente estudado.

Primariamente associados a lesões cervicais, os HPVs têm sido detectados em diversos outros tipos de cânceres, dentre eles: câncer na vulva, pênis, anal, perianal, pele, língua, laringe, entre outros.

Estudos também têm detectado HPV em tumores de pulmão como também em sangue, aspirado brônquico e ar exalado condensado de pacientes portadores

desta doença. Na literatura, os estudos divergem quanto à prevalência e associação deste vírus com o câncer de pulmão, embora alguns trabalhos apontem a infecção por HPV como o segundo fator etiológico deste tipo de câncer. Sendo assim, estudos neste sentido são de grande relevância para o entendimento da biologia deste vírus e desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamentos do câncer de pulmão, visto ser incluído entre os principais problemas de saúde pública com incidência de mais de 1,8 milhão de novos casos por ano.

Desta maneira, o presente estudo, sendo o primeiro desenvolvido no Brasil, teve como finalidade avaliar a presença do HPV e a expressão das oncoproteínas virais E6 e E7 em tumores de pulmão.

2. Revisão da Literatura

2.1 Papilomavírus

Constituindo um grupo de vírus heterogêneo e diverso, o Papilomavírus (PV) infecta tanto humanos quanto animais. Foi inicialmente descrito em mamíferos, mas atualmente, tem sido encontrado em aves, répteis e marsupiais (Herbst et al. 2009; Rector e Ranst, 2013). São vírus espécie-específico podendo, em alguns casos, apresentar infecção cruzada entre as espécies (Scheurer et al., 2005; Bravo et al., 2010; Silva et al., 2014). Infecções por PV podem induzir o desenvolvimento de tumores benignos, como verrugas e papilomas, no epitélio cutâneo ou mucoso de seu hospedeiro (De Villiers et al., 2004).

Os PV pertencem à família *Papillomaviridae* e possuem 37 gêneros organizados em 16 grupos designados por letras gregas, que compreendem mais de 240 tipos (Bernard et al., 2010; Van Doorslaer, 2013). Figura 1.

muita similaridade entre seus aminoácidos e nucleotídeos. Desde então, foram considerados como duas famílias separadas, *Papillomaviridae* e *Polyomaviridae* (De Villiers et al., 2004).

A classificação taxonômica se baseia na sequência nucleotídica conservada do gene L1 para identificar gêneros, tipos, subtipos e variantes de PV. Os PV que apresentam semelhanças maiores que 60% são considerados do mesmo gênero (Bernard et al., 2010) e diferenças maiores que 10% entre as ORF L1 são consideradas novos tipos. Diferenças entre 2 a 10%, são considerados subtipos e por fim, diferenças menores que 2% são classificadas como variantes (De Villiers et al., 2004). No entanto, Burk et al., 2013 sugerem uma nova classificação baseada na utilização de sequência do genoma inteiro. Sendo assim, diferenças entre 1 a 10% seriam considerados variantes e diferenças entre 0,5 a 1%, sublinhagens (Burk et al., 2013).

O genoma dos PV é constituído de uma fita dupla cujo comprimento varia de 6953 pb a 8607 pb (Van Doorslaer, 2013). Estes vírus utilizam a maquinaria enzimática do hospedeiro para replicar seu material genético (Rector et al., 2007).

2.2 – Papilomavírus humano

Infecções por PV provocam, de uma forma geral, o desenvolvimento de lesões benignas, entretanto, infecções por Papilomavírus humano (HPV) podem progredir para lesões malignas (Zheng e Baker, 2006).

Mais de 120 tipos de HPV já foram caracterizados e divididos em cutâneos, mucocutâneos e naqueles associados à desordem autossômica recessiva rara,

como a *epidermoplasia verruciforme* (EV). Os cutâneos estão associados às verrugas, cistos epidermóides e câncer de pele, enquanto os mucosos ou mucocutâneos estão associados à condiloma acuminato, hiperplasia epitelial focal, neoplasia e câncer cervical, cânceres anogenitais e câncer de cabeça e pescoço (Doobar, 2005; Bernard et al., 2010; Cubie, 2013).

Tais vírus são conhecidos como agentes etiológicos de cânceres cervicais, anogenital e orofaríngeo (Bernard et al., 2010). Embora o HPV esteja associado a vários tipos de cânceres, o conhecimento que se tem hoje deste vírus, advém de estudos em cânceres cervicais.

Os HPV são membros de cinco grupos de gêneros (*Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus*) (Bernard et al., 2010) e podem ser agrupados de acordo com a localização da infecção no corpo (Cubie, 2013). O gênero *Alphapapillomavirus* compreende os tipos que estão envolvidos tanto em doenças benignas quanto malignas, orais ou genitais (Burk et al., 2011; Shen-Gunther et al., 2011), como condiloma acuminata, papilomatose respiratória e cânceres cervicais, anais e de cabeça e pescoço (Burk et al., 2013). O gênero *Betapapillomavirus* está associado com epidermodisplasia verruciforme benigna e maligna. Tais lesões cutâneas apresentam alta taxa de progressão para carcinoma de células escamosas (Bavinck et al., 2010; Shen-Gunther et al., 2011). O gênero *Gammapapillomavirus* está relacionado a lesões benignas e é frequentemente detectado em lesões cutâneas, no entanto, já foi detectado em mucosa nasal (Li et al., 2009; Shen-Gunther et al., 2011; Forslund et al., 2013). Os HPV associados ao gênero *Mupapillomavirus* estão envolvidos com lesões cutâneas esporádicas e os do

gênero *Nupapillomavirus*, envolvidos tanto em lesões cutâneas benignas quanto malignas (de Villers et al., 2004).

Os HPV mucocutâneos são subdivididos em baixo risco (LR HPV), que compreendem aqueles tipos que estão associados com o desenvolvimento de verrugas benignas (6, 11, 40, 42, 43, 44, 45, 54, 61, 70, 72, 81); e em alto risco (HR HPV); aqueles tipos associados ao desenvolvimento de lesões que apresentam risco de progredir para um estado maligno (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) (Corneanu et al., 2011; Cubie, 2013).

2.2.1 – Genoma Viral

Os HPV são vírus de DNA dupla fita, circular, com aproximadamente 7.900 pares de bases associados com histonas H2a, H2b, H3 e H4. (Favre et al., 1977; zur Hausen, 2002; Zheng e Baker, 2006). São relativamente pequenos, medindo 55 nm de diâmetro. Apresentam uma simetria icosaédrica, com capsídeo composto por 72 pentâmeros.

O genoma do HPV pode ser dividido em três principais regiões: região precoce, que é formada por seis genes envolvidos na replicação viral e transformação celular (E1, E2, E4, E5, E6, e E7); região tardia, formada pelos genes L1 e L2, cujas proteínas têm funções estruturais; e a região longa de controle (LCR) ou região regulatória (URR) e a região não codificante (NCR) entre E5 e L2, que são regiões não traduzidas que contêm sítios de ligação de fatores de transcrição e região de controle da expressão dos genes virais. Tais regiões (URR e NCR) estão separadas por dois sítios de poliadenilação (pA): sítio

precoce (pAE) e sítio tardio (pAL) (Zheng e Baker, 2006; Smith et al., 2011; Bravo e Félez-Sánchez, 2015) (Figura 2).

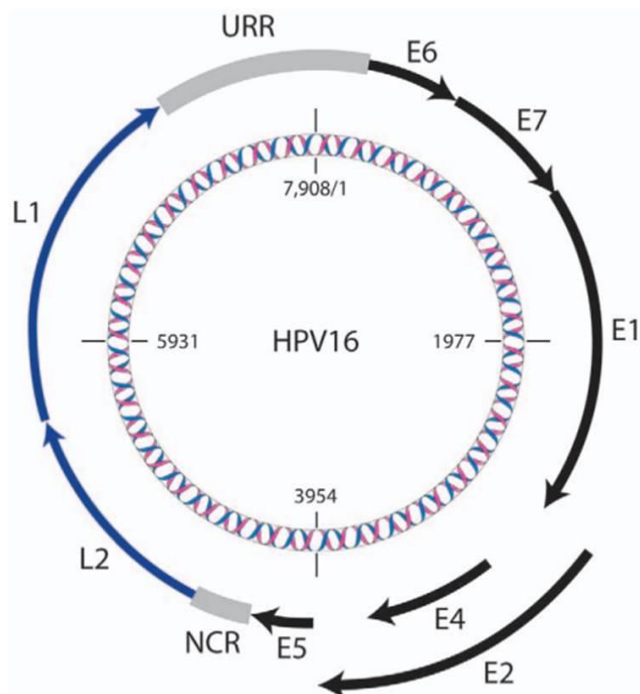


Figura 2: Representação esquemática do genoma do HPV com aproximadamente 8 kb de tamanho contendo genes não estruturais de expressão precoce (E), genes estruturais de expressão tardia (L) e regiões não traduzidas: URR entre os genes L1 e E6 e NCR entre os genes E5 e L2. Fonte: Smith et al., 2011.

A proteína L1 é o principal componente do capsídeo viral, enquanto a proteína L2 é um componente secundário estando envolvida na encapsidação do genoma viral, estabilização do capsídeo, fuga endossomal dos vírions bem como transporte celular do genoma do HPV. Tal proteína encontra-se localizada mais internamente no capsídeo (Zur Hausen, 1996 ; Horvath et al., 2010)

O gene E1 cuja proteína E1 apresenta um papel central na replicação viral por contribuir com o aumento no número de cópias na forma episssomal nos

queratinócitos basais; manter o nível de epissomas constantes nas células que entram na fase de diferenciação e por promover a amplificação do genoma viral durante a fase produtiva do vírus nas camadas epiteliais diferenciadas (Wilson et al., 2002; Bergvall et al., 2013). A proteína E1 exerce atividade helicase na replicação do vírus (Lehoux et al., 2015). Esta proteína apresenta três regiões principais de domínio: região C-terminal ATPase/helicase, domínio de origem de ligação (OBD) e a região regulatória N-terminal (Lehoux et al., 2015).

O gene E2 é expresso nos estágios precoces e intermediários do ciclo de vida do vírus. Seu produto, a proteína E2, apresenta regiões conservadas nos seus domínios N-terminal com aproximadamente 200 aminoácidos ligados ao domínio C-terminal, com aproximadamente 100 aminoácidos. Estes domínios estão ligados através de uma sequência ligante conhecida como dobradiça (McBride, 2013). A proteína E2 tem a capacidade de se ligar a sítios no próprio genoma viral como no genoma celular e está envolvida na transcrição e replicação do genoma viral. No entanto, o desempenho de suas funções depende de sua interação com proteínas celulares e em modular suas atividades normais para favorecer o vírus (Doorbar et al., 2015). Sendo assim, E2 se liga a um motivo de 12 pb na região URR para ativar ou reprimir a transcrição de genes através do recrutamento de fatores de transcrição. Desse modo, E2 regula a transcrição de E6 e E7, desempenhando um papel crucial no direcionamento para entrada no ciclo celular permitindo a amplificação do genoma nas camadas intermediárias do epitélio (Doorbar et al., 2015). Entretanto, a perda da região E2, por mutação ou integração viral, inativa a repressão de E6 e E7, levando a um processo de malignização (Goodwin et al., 2000). Na replicação viral, E2 participa da fase inicial levando a helicase E1 à origem de replicação, a qual contém sítios de

ligação para E1, E2 e uma região rica em A/T. Assim, E2 colabora com E1 na replicação do genoma viral (McBride, 2013).

Acumulada nas células em diferenciação, a proteína E4 é a proteína viral mais abundante e desempenha um papel na liberação do vírus da superfície das células epiteliais. É produzida a partir do splice do seu mRNA com cinco aminoácidos de E1, resultando na proteína E1^{E4} de 10 KDa. Uma das características dessa proteína é sua habilidade em se ligar à rede de filamentos de citoqueratina aumentando a fragilidade celular, facilitando assim, a saída das partículas virais maduras destas células (Raj et al., 2004; Doobar et al., 2015).

O gene E5 codifica uma proteína pequena com 40 a 85 aminoácidos, rica em aminoácidos hidrofóbicos, transmembrana, que atua modulando a atividade de proteínas celulares (DiMaio e Petti, 2013). A proteína E5, juntamente com as proteínas E6 e E7, são consideradas oncoproteínas virais, pois estimulam proliferação celular, sobrevivência da célula e modulam a diferenciação dos queratinócitos (Vande Pol e Klingelutz, 2013). Contudo, E5 apresenta uma baixa atividade transformante e acredita-se não ser essencial para a carcinogênese, pois não é expressa em todos os tumores positivos para HPV (Müller et al., 2015). O mecanismo de ação da proteína E5 ainda não é bem conhecido. Sabe-se que está envolvida na inibição da expressão do complexo de histocompatibilidade (MHC-I e MHC-II) na membrana plasmática (Tsai e Chen, 2003). Além disso, a proteína E5 está envolvida na indução da fusão celular (Gao e Zheg, 2010), processo presente nos estágios iniciais do câncer cervical. E5 também atua na ubiquitinação da proteína pró-apoptótica, Bax, inibindo assim a apoptose (Oh et al., 2010). Além disso, têm sugerido que E5 atua para manter as

células em um estado de proliferação competente até a diferenciação, por ativar funções virais tardias (Regan et al., 2008).

A proteína E6, codificada pelo gene E6, associa-se a proteínas celulares formando complexos protéicos que modulam a sobrevivência da célula, transcrição celular, diferenciação da célula hospedeira, resposta de dano ao DNA e a progressão do ciclo celular. A proteína E6 está envolvida na degradação e inativação da função da proteína celular p53. A interação entre essas proteínas pode se dar através da associação com a proteína E6AP E3 ubiquitina ligase formando um complexo, o qual marca a proteína p53 para degradação proteossomal (Huibregtse et al., 1993; Zur Hausen, 2000; Bodily et al., 2011). Para que isso aconteça, é indispensável que E6AP esteja ligado à proteína E6, pois, sozinha, E6AP é incapaz de se ligar e induzir a degradação da p53 (Huibregtse et al., 1993). Embora o complexo E6/E6AP seja a via mais conhecida em que a proteína E6 inibe a atividade da p53, existem outros mecanismos em que E6 atua bloqueando a função dessa proteína. Segundo Thomas et al., (1995), a associação de E6 com p53 pode provocar uma mudança conformacional em p53, levando tanto a perda da capacidade de ligação ao DNA quanto causar a dissociação desta proteína ao DNA. Além disso, E6 pode também causar a retenção de p53 no citoplasma devido a sua ligação ao terminal carboxila de p53 (Mantovani et al., 2001). Outro mecanismo é através da associação de E6 com histonas acetiltransferases CBP/p300 ou através da associação prévia de E6AP e/ou p53 (Ito et al., 2001; Vande Pol e Klingelutz, 2013). A ligação de E6 a p300 impede a acetilação de p53 (Zimmermann et al., 2000), pois em condições normais a acetilação de p53 pela p300 aumenta a habilidade de p53 se ligar aos promotores dos genes cujas transcrições são ativadas por ela (Ito et al., 2001).

Além disso, E6 também pode ligar-se a proteínas PDZ levando a sua degradação. E6 de HPV de alto risco também pode ativar a atividade da enzima telomerase, contribuindo para a imortalização dos queratinócitos (Vande Pol e Klingelutz, 2013).

Não sendo produzida por todos os tipos de HPV, a proteína E7, produto do gene E7, está envolvida na transformação celular, desempenhando um papel importante no ciclo de vida viral. A proteína E7 interage com várias proteínas celulares, como a proteína supressora de tumor pRB e com o fator de transcrição E2F, com o complexo ciclina/cdk, com proteínas tipo *pocket*, p107 e p130, dentre outras. Tais proteínas regulam a passagem do ciclo celular da fase G1 para a fase S através da modulação da atividade transcricional dos fatores de transcrição E2F. Ao se ligar ao complexo pRb/E2F, provoca sua dissociação, resultando na liberação de E2F, o qual atuará como um ativador transcricional dos genes que estão envolvidos na progressão do ciclo celular, além de contribuir para a ubiquinização de pRb (Dyson et al., 1992; Wu et al., 1993; Boyer et al., 1996; Frolov e Dyson, 2004; Roman e Munger, 2013).

A região LCR é a região de controle do genoma viral que modula a transcrição de todos os genes virais. Apresenta aproximadamente 400-1000 pares de bases e contém uma origem de replicação e promotores P97 (HPV 16) e P105 (HPV 18). Apresenta quatro sítios de ligação da proteína E2 (E2BS) que são altamente conservados e ricos em elementos *cis*. Tais sítios localizam-se próximos às regiões de ligação do DNA de muitos fatores de transcrição celular. A região LCR além de determinar o tipo de epitélio que o vírus infecta, determina a expressão dos genes precoces e tardios para a diferenciação do epitélio escamoso, como também modula a biologia viral em resposta a fatores de

crescimento e hormônios (Turek e Smith, 1996; Burd, 2003; Bhattacharjee e Sengupta, 2006; Bernard, 2013).

2.2.2 O Ciclo de vida

O ciclo de vida do HPV está diretamente ligado ao processo de diferenciação do epitélio do hospedeiro e tem início com uma injúria no epitélio escamoso cutâneo ou mucoso expondo a base da membrana e a camada de células basais ao capsídeo do vírus. As proteínas do capsídeo, L1 e L2 entram em contato com receptores proteoglicanos de sulfato de heparina e lamina presentes nas membranas celulares. Tal interação induz uma mudança conformacional do capsídeo, resultando na clivagem da proteína furina em L2 pela enzima furina convertase. Tal clivagem permite a ligação com um segundo receptor, a α -integrina, a qual é importante para a internalização e transferência do genoma viral para o núcleo celular. O complexo L2-DNA garante a entrada do genoma viral, enquanto que a proteína L1 é retida no endossoma e posteriormente sofre degradação lisossomal (Evander et al., 1997; Girolglou et al., 2001; Culp et al., 2006; Johnson et al., 2009; Kines et al., 2009; Bergant et al., 2012).

Uma vez dentro da célula hospedeira, o DNA viral se replica como um plasmídeo (forma episomal) em baixo número de cópias nas células epiteliais basais proliferativas. Nessa camada ocorre a expressão dos genes precoces, E1, E2, E5, E6 e E7. Ao se dividirem, as células basais progenitoras se movem lateralmente na membrana basal ou se movem para cima, para a camada de

células espinhosas, onde um subconjunto destas células infectadas, aberrantemente, entra novamente no ciclo celular para amplificar seu DNA em baixo número de cópias. Nas células da camada intermediária, há um aumento das proteínas necessárias para a amplificação do genoma viral e o gene E4 passa a ser expresso. Tais células encontram-se na fase S ou G2 do ciclo celular. Nas camadas superiores, as células saem do ciclo celular e em um subconjunto de células expressando E4, ocorre produção de L1 e L2, permitindo o empacotamento dos genomas virais amplificados. Estas células são eliminadas com vírus (Doorbar et al., 2012; Pol e Klingelutz, 2013) (Figura 3).

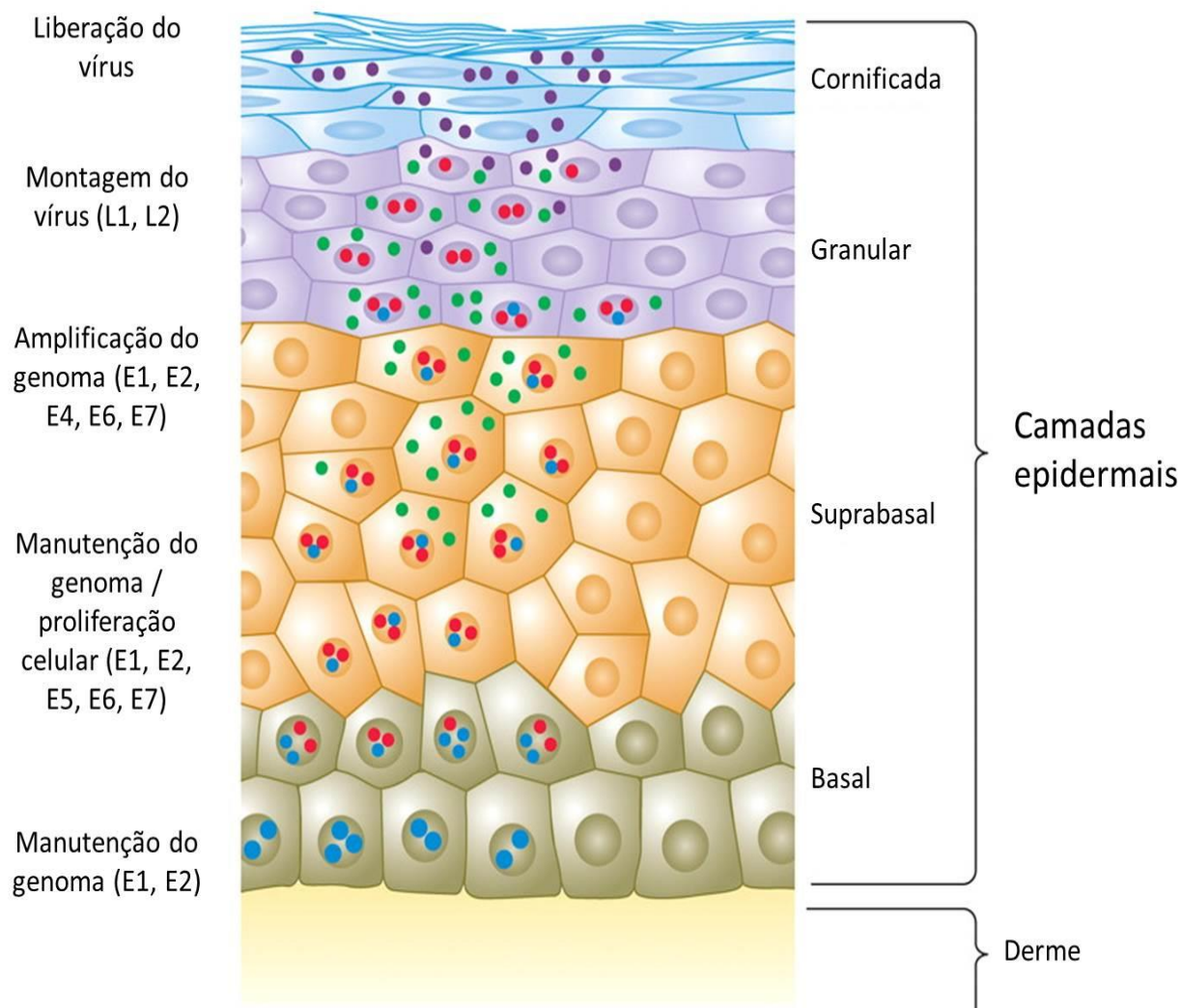


Figura 3. Ciclo de vida do vírus. As diferentes camadas do epitélio estão indicadas à direita. Os eventos que ocorrem após a entrada do vírus nas células basais estão indicados à esquerda. Expressão dos genes E1 e E2 (em azul); E5, E6 e E7 (em vermelho), E4 (em verde) e L1 e L2 (em preto). Adaptado de Lazarczyk et al., 2009).

2.2.3 Integração do DNA do HPV ao genoma celular

Em lesões de baixo grau, o genoma de HPV de alto risco apresenta-se na forma episomal, porém durante a progressão para lesão de alto grau, o genoma viral encontra-se integrado ao genoma do hospedeiro (Jeon et al., 1995). A integração é caracterizada pela deleção de genes de expressão tardia, os quais são essenciais para a produção de vírus infecciosos. A progressão para o câncer ocorre quando, após a integração do genoma viral, a região LCR, os genes E6, E7 e a terminação 5' do gene E1 se mantêm íntegros e o genoma integrado perde todo o gene E1, o qual regula o número de cópias episomais, e a capacidade de expressar proteínas que se ligam ao DNA que reprimem o promotor das oncoproteínas E6 e E7 (Doorbar et al., 2012). O genoma do HPV integrado geralmente encontra-se rompido ou com os genes E1 e E2 completamente deletados. A integração pode ocorrer em várias regiões do genoma humano, inativando genes supressores de tumor ou ativando proto-oncogenes (Xu et al., 2013). Os sítios de integração, ou *hotspots*, são preferenciais e encontram-se dispersos no genoma de forma não aleatória (Schmitz et al., 2012). Atualmente, mais de 300 sítios de integração já foram mapeados e relacionados com alterações cromossômicas e sítios frágeis. No entanto, não se sabe ao certo, se a integração do DNA é a causa ou a consequência das modificações estruturais e instabilidade genômicas, pois existem divergências entre os estudos (Winder et al., 2007; Vinokurova et al., 2008; Kraus et al., 2008; Schmitz et al., 2012).

2.2.4 HPV e cânceres não cervicais

Desde a sua descoberta, a infecção pelo HPV, inicialmente associada a neoplasias cervicais, vem apresentando evidências de associação com diversos tipos de cânceres. HPV de alto risco foi encontrado na vulva (em cerca de 50% dos carcinomas de células escamosas), no pênis (30 a 50% dos carcinomas peniano), cânceres anal e perianal (60 a 90%). A partir de ensaio de imunohistoquímica, no qual proteínas estruturais foram detectadas em carcinomas de células escamosas orais, foi levantada a hipótese de que o HPV pudesse ter um papel na etiologia dos cânceres de cabeça e pescoço. Este vírus foi, então, detectado em carcinoma de língua, laringe e outros carcinomas orofaríngeos. Lesões papilomatosas também têm sido encontradas em cânceres de pele com potencial de progressão para carcinoma de células escamosas. Além disso, tem sido detectado em câncer de esôfago, rim, mama, próstata e pulmão (Syrjänen et al., 1983; Rubin et al., 2001; Madsen et al., 2008; Zur Hausen, 2009; Cao et al., 2014).

2.3 Câncer de Pulmão

Considerado um dos principais problemas de saúde pública em todo mundo, o câncer de pulmão constitui um dos dez tipos de câncer com maior incidência de mortalidade relacionada a câncer no mundo. Aproximadamente 1.8 milhões de pessoas foram diagnosticadas com esta doença no ano de 2012 em todo o mundo. Destes, 1.240,600 eram homens e 583.100 mulheres com uma

estimativa de morte de 1.098,700 homens e 491.200 mulheres (Torre et al., 2015). A figura 4 mostra a incidência e mortalidade entre homens e mulheres no mundo.

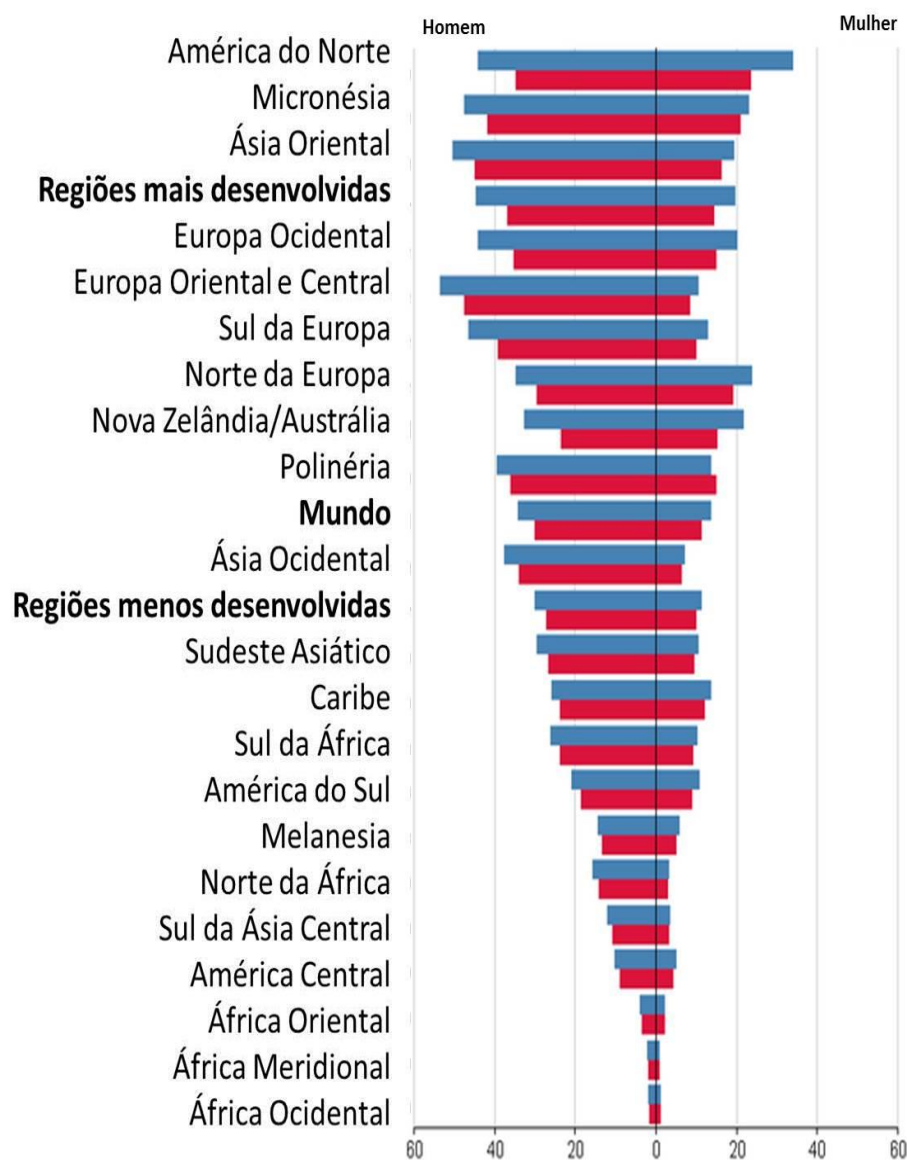


Figura 4. Quadro comparativo da incidência (em azul) e mortalidade (em vermelho) por câncer pulmão entre homens e mulheres em todo mundo (WHO, 2012).

No Brasil, as estimativas para novos casos são de 27.330 sendo 16.400 em homens e 10.930 em mulheres, com risco estimado de 16,79 novos casos para cada 100 mil homens e 10,75 para cada 100 mil mulheres. Em Pernambuco, as estimativas são de 660 novos casos para homens e 490 para mulheres (INCA, 2014) (Figura 5).

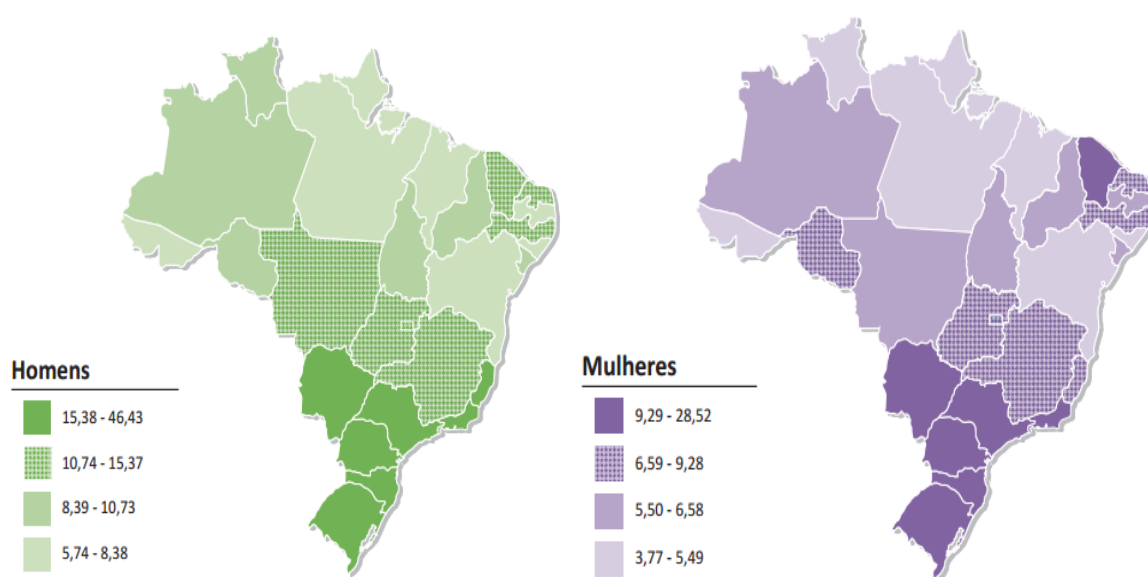


Figura 5. Estimativas para novos casos de câncer de pulmão para os anos 2014 e 2015 para homens (em verde) e mulheres (em roxo) no Brasil. Fonte: Inca, 2014.

Quanto à histologia, o câncer de pulmão está categorizado em dois grandes grupos: câncer de pulmão de pequenas células (SCLC) e câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC). Câncer de pulmão de pequenas células está presente em 20% dos casos de câncer de pulmão, enquanto que o câncer de pulmão de não pequenas células compreende de 70 a 80% dos casos

de câncer de pulmão. O NSCLC é subdividido em três subtipos: carcinoma de células escamosas (44% ocorre em homens e 25%, em mulheres), adenocarcinoma (aproximadamente 28% em homens e 42% em mulheres) e carcinoma de células grandes (cerca de 9%) (Who, 2012).

Uma característica do carcinoma de células pequenas é que em 78% dos casos observa-se uma massa no hilo ou adjacente a ele. Em carcinoma de células não pequenas, observa-se uma grande infiltração do mediastino definida como uma massa que infiltra e encerra o mediastino em sua estrutura onde linfonodos mediastinais não são visíveis (Rivera e Mehta, 2007).

Quanto aos sintomas, pacientes com câncer de pulmão apresentam tosse, fadiga, dispneia e hemoptises. Por serem sintomas comuns a outras doenças, tais manifestações dificultam o diagnóstico do câncer de pulmão nos estágios iniciais I e II (Hollen et al., 1995; Hensing al., 2014). Sendo assim, a maior parte dos pacientes recebe o diagnóstico quando a doença se apresenta nos estágios mais adiantados, em torno de 30% no estágio III e 40% no estágio IV (estágio de metástase). Tal fato reduz a taxa de sobrevivência para 16% (Howlader et al., 2011).

O principal agente etiológico do câncer de pulmão é o tabaco. O uso prolongado e o tipo de fumo podem aumentar o risco de desenvolver a doença (Samet, 1991; Chen et al., 2015). Contudo, entre 15 e 50% dos casos de câncer de pulmão são diagnosticados em pacientes não fumantes (Kawaguchi et al., 2010; Yang, 2011; Torok et al., 2011) e, conseqüentemente, o número de óbitos em decorrência vem crescendo e ocupa a sétima posição mundial de mortalidade (Couraud et al. 2012). Câncer de pulmão em não fumantes é considerado uma doença com características clínicas, moleculares e genéticas específicas e

distintas daquela causada pelo cigarro, pois, tais tumores têm uma maior proporção de alterações genômicas do que aqueles desenvolvidos em fumantes (Yano et al., 2008; Thu et al., 2012). Até o momento, a etiologia desses tumores não está elucidada. No entanto, alguns fatores têm sido sugeridos como possíveis causadores dessa doença, como: poluição do ar, exposição a metais, a radiação, ao gás radão, inalação de óleo de cozinha, fatores genéticos e infecciosos, como infecção por HPV (Cheng et al., 2001; Matakidou et al., 2005; Amabile et al., 2009; Yu et al., 2011; Silverman et al., 2012; Xue et al., 2013).

2.4 HPV e o Câncer de Pulmão

No ano de 1970 surgiu a primeira evidência de infecção por HPV relacionada ao câncer de pulmão. Rubel e Reynolds encontraram semelhanças citológicas e histológicas entre papilomas de células escamosas e condiloma acuminato, além de observarem coilócitos (característico de infecção por HPV) no escarro de pacientes com lesões brônquicas (Rubel e Reynolds, 1979). Entre 1979 e 1980, Syrjänen observou alterações histológicas no epitélio brônquico que eram semelhantes às alterações presentes no trato genital infectado por HPV. Tal observação o levou a sugerir que a infecção por HPV estava envolvida no desenvolvimento de lesões pulmonares (Syrjänen, 1979, 1980).

Deste então, diversos estudos têm detectado HPV em carcinomas de pulmão. A tabela 1 mostra de forma resumida, os tipos de HPV detectados em tumores pulmonares em todo o mundo.

Tabela 1. Autores que detectaram DNA de HPV em pacientes com câncer de pulmão.

Ano	Autor	País	Tipo de HPV	Preservação do tecido	Técnica de detecção
1989	Syrjanem et al.,	Finlândia	16	Tecido parafinado	PCR
1990	Kulski et al.,	Australia	6, 11, 16, 18	Tecido parafinado	ISH
1995	Kinoshita et al.,	Japão	18	Tecido fresco congelado	PCR/DBH
1995	Nuorva et al.,	Finlândia	6, 11, 16, 18, 31, 33	Tecido parafinado	PCR
1996	Hirayasu et al.,	Japão	6, 16, 18	Tecido parafinado	PCR
1998	Bohlmeier	EUA	18	Tecido parafinado	PCR/SBH
1998	Tsuhako et al.,	Japão	6, 11, 16, 18	Tecido parafinado	PCR
1999	Hiroshima et al.,	Japão	16	Tecido parafinado	PCR
2000	Miyagi et al.,	Japão	6, 11, 16, 18	Tecido parafinado	PCR
2001	Cheng et al.,	China	16, 18	Tecido fresco	PCR/ISH
2003	Chiou et al.,	Taiwan	16, 18	Tecido sanguíneo	PCR
2005	Jain et al.,	Índia	18	Tecido parafinado e tecido sanguíneo	PCR
2005	Coissard et al.,	França	16	Tecido fresco congelado	PCR
2006	Ciotti et al.,	Italia	16, 18, 31	Tecido parafinado/tecido fresco	PCR
2006	Castillo et al.,		16, 18, 33	Tecido parafinado	PCR
2007	Nadji et al.,	Iran	16, 18, 6, 11, 26, 31		PCR
2007	Aguayo et al.,	Chile	6, 16, 18, 31, 45	Tecido parafinado	PCR/SB
2007	Giuliani et al.,	Italia	16, 18, 31, 53	Tecido parafinado/tecido fresco	PCR
2008	Cheng et al.,	China	16	Tecido fresco	ISH
2009	Hsu et al.,	Taiwan	16, 18	Tecido parafinado	PCR
2010	Baba et al.,	Japão	16, 33, 18, 6	Tecido parafinado	PCR
2010	Branica et al.,	Croácia	16, 18, 33	Aspirado Brônquico	PCR
2010	Joh et al.,	EUA	11, 16	Tecido fresco	PCR/Seq
2011	Carpagnano et al.,	Italia	16, 30, 31, 39	Ar exalado condensado/Esco vado brônquico/Tecido fresco	PCR/IHQ/ Pirosequenciamento
2011	Koshiol et al.,	Italia	6, 18	Tecido parafinado	PCR
2011	Goto et al.,	Japão Coreia	6, 11, 16, 18	Tecido parafinado	PCR

Taiwan					
2012	Kato et al.,	Japão	16, 58	Tecido parafinado	PCR
2012	Syrjänen et al.,	Finlândia	16, 18	Tecido parafinado	PCR
2013	Mehra et al.,	Canadá	16, 18, 35, 52, 53	Tecido parafinado	PCR/RH
2013	Yanagawa et al.,	Canadá	16	Tecido parafinado	PCR/ISH
2014	Sarchianaki et al.,	Grécia	16, 18, 31, 33, 11, 6, 59	Tecido parafinado	qPCR
2014	Wang et al.,	Taiwan	16, 18	Tecido parafinado /Biopsia/Efusão pleural	PCR

DBH hibridização dot blot, *ISH* hibridização *in situ*, *SB* Southern blot, *seq* sequenciamento

Como supracitado, o vírus foi detectado na Ásia, América, Austrália e Europa. O DNA do HPV foi detectado, na maior parte dos casos, no tecido tumoral pulmonar, mas também foi detectado em tecido sanguíneo, em aspirado brônquico e ar exalado condensado de pacientes com câncer de pulmão (Chiou et al., 2003; Branica et al., 2010; Carpagnano et al., 2011). Dentre os tipos de HPV mais prevalentes no câncer de pulmão, estão HPV 16, 18, 31, 33, 6 e 11. Os tipos de baixo risco para lesões cervicais, 6 e 11 foram encontrados associados a carcinomas de células escamosas e também em todos os outros subtipos dos câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC). Também foram encontrados, os tipos 26 e 45 em carcinoma de pulmão de células não-pequenas e de pequenas células, e o tipo 35 no carcinoma de pulmão de células não-pequenas (Klein et al., 2009; Srinivasan et al., 2009).

Estudos na Ásia sugerem um papel para o HPV no desenvolvimento de câncer de pulmão independente do tabaco, devido à presença do vírus em adenocarcinomas de pulmão em mulheres não tabagistas (Li et al., 2009). No entanto, outro estudo mostrou que em carcinomas de pulmão (de pacientes da Ásia, Europa, América Central e do Sul) positivos para HPV, 71% ocorriam em pacientes que eram ou foram tabagistas. Na América do Norte, 87% dos

carcinomas de pulmão positivos para HPV ocorriam em tabagistas (Ragin et al., 2014).

Alguns estudos sugerem que a presença do vírus em carcinoma de pulmão é simplesmente oportunista (Coissard et al., 2005). No entanto, a infecção por HPV já foi indicada como o segundo fator de risco mais importante no desenvolvimento do câncer de pulmão (Klein et al., 2009). Além disso, alguns trabalhos mostraram possíveis mecanismos utilizados pelas oncoproteínas E6 e E7 do HPV para induzir o desenvolvimento do câncer de pulmão (Cheng et al., 2007; Liu et al., 2005; Buonomo et al., 2011; Wu et al., 2011; Sung and Lee, 2013; Tung et al., 2013).

2.4.1 Proteínas E6, E7 e a Carcinogênese De Pulmão

2.4.1.1 E6 e a inativação de p53

Em células de pulmão, a proteína E6 também é responsável pela inativação da proteína p53 e essa inativação também pode acontecer através do complexo E6AP. Por sua vez, p53 ativa a transcrição de p21, inibidor de quinase dependente de ciclina, também chamado de p21WAF1/CIP1. A proteína p21 é um supressor de tumor, pois interage com o complexo ciclina/cdk inibindo a fosforilação da proteína pRb. Esta interação impede a progressão do ciclo celular para a fase de síntese, fase S. Para a ativação de p21, ocorre uma ação sinérgica entre p53 e a proteína DDX3, cuja função está envolvida no desenvolvimento do câncer, pois atua na regulação do ciclo celular e na apoptose. A proteína DDX3

modula o início da tradução do mRNA de ciclina E1, que tem a função de ativar genes envolvidos na entrada da fase S e na replicação pela fosforilação de pRb e subsequente liberação do fator de transcrição E2F (Cheng et al., 2007; Lai et al., 2010; Wu et al., 2011; Fuller-Pace 2013) (Figura 6).

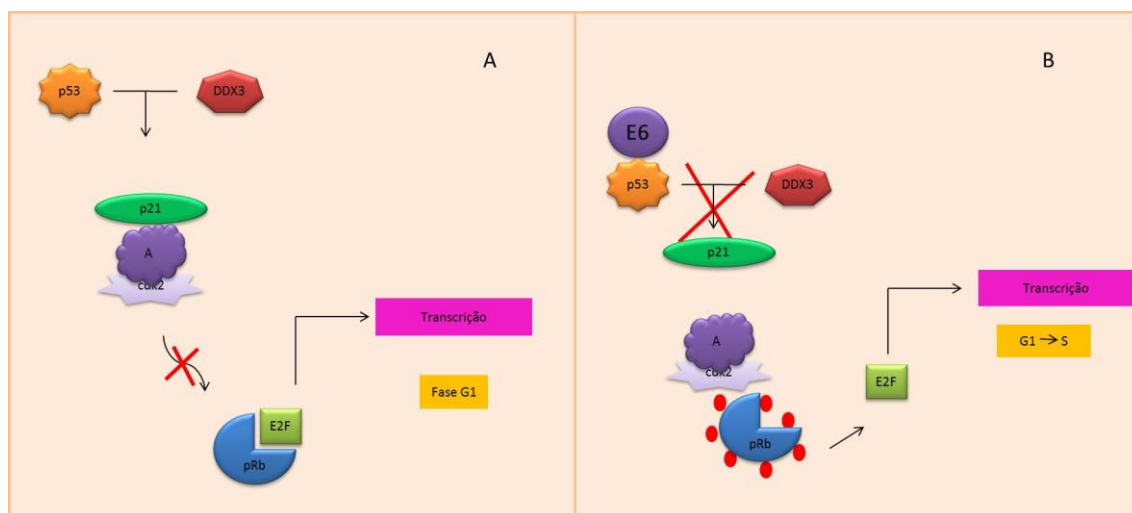


Figura 6. Papel da proteína E6 na progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. **A** – a proteína p53 interage com a proteína DDX3 e ativa a transcrição do gene p21, cuja proteína inibe o complexo ciclina/cdk. Assim, pRb não sofre fosforilação e permanece ligada ao fator de transcrição E2F e, conseqüentemente, o ciclo celular permanece na fase G1. **B** - Em presença de E6, a proteína p53 não se liga a proteína DDX3 e não ocorre a produção da proteína p21. Sem a proteína p21, o complexo ciclina/cdk fica livre e fosforila a proteína pRb. Tal fosforilação permite que pRb sofra uma mudança conformacional perdendo, assim, a afinidade pelo fator de transcrição E2F o qual fica livre para ativar a transcrição de genes ligados à fase de síntese do ciclo celular. Fonte: Autora

Em células de pulmão, DDX3 parece aumentar a ativação da transcrição de p21 por p53 pelo aumento da ligação do fator transcricional SP1 dentro do

promotor de p21 (Wu et al., 2011). Regiões específicas no promotor de p21 recrutam p53, o qual atua como um acentuador transcricional do promotor proximal para um mecanismo sinérgico, o qual envolve a ligação de SP1 na porção proximal e acentuador ligado a p53. O promotor de p21 apresenta quatro sítios de ligação à SP1. O efeito de DDX3 na indução do promotor p21 é 10 vezes maior quando co-expresso com SP1. A interação entre p53 e DDX3 facilita a interação com SP1 no promotor de p21. A expressão de p21 diminui com a interação de p53 com E6, o que provoca uma mudança na via p53-DDX3, levando assim, ao crescimento tumoral, pois esta interação provoca a diminuição da proteína supressora p21 (Chao et al., 2006; Koutsodontis et al., 2011; Wu et al., 2011) (Figura 7).

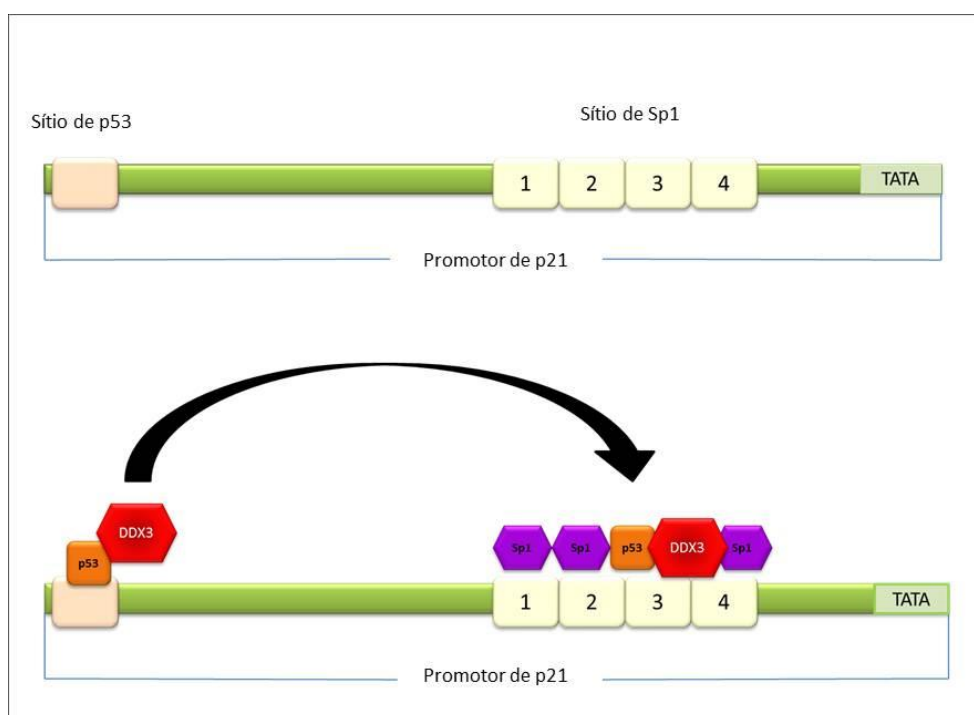


Figura 7. Representação esquemática da transcrição de p21 por p53. Regiões no promotor de p21 recrutam p53, o qual, por sua vez, recruta DDX3 e esta interação aumenta a afinidade de SP1 pelo promotor de p21, resultando no aumento da transcrição de p21. Fonte: Autora

2.4.1.2 E6 e IL-10

A proteína E6 regula positivamente a expressão da interleucina 10 (IL-10) pela fosforilação de CREB e C/EBP β através da via fosfoinositol quinase-3, (P13K)/AKT. Por sua vez, IL-10 regula positivamente a expressão de cIAP2, proteínas da família de IAPs, que atuam inibindo o processo apoptótico, promovendo assim, a agressividade tumoral. Pacientes com adenocarcinoma pulmonar e HPV positivos com níveis de expressões elevados de IL-10 e cIAP2, apresentam taxa de sobrevida menor do que aqueles com baixos níveis de expressão destas proteínas. Sendo assim, a expressão de IL-10 em carcinoma pulmonar relacionado à infecção por HPV, promove a progressão tumoral, sendo responsável por um prognóstico sombrio (Huang et al., 2000; Shih et al., 2005; Wilson e Brooks, 2011; Sung et al., 2013; Sung and Lee, 2013) (Figura 8).

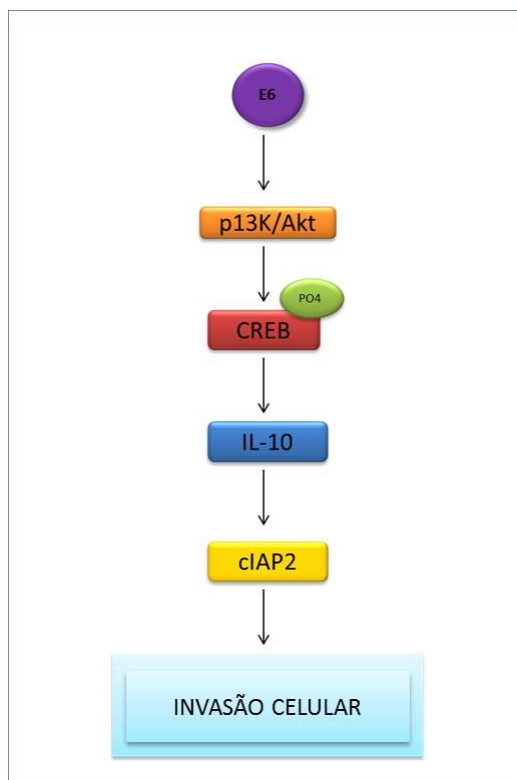


Figura 8. Representação esquemática da ação da oncoproteína E6 na expressão da interleucina 10. Inicialmente, E6 ativa a via p13K/Akt, a qual fosforila CREB. Após a fosforilação, CREB ativa IL-10, que por sua vez, regula positivamente a expressão de cIAP2. Dessa forma, o processo apoptótico é inibido favorecendo a invasão celular. Fonte: Autora

2.4.1.3 E6 e a proteína Bcl-2

Os níveis de expressão de Bcl-2, proteína mitocondrial a qual atua inibindo ou bloqueando a apoptose, pode ser regulada positivamente pela oncoproteína E6. Em células tumorais de pulmão, cujo DNA do HPV encontrava-se integrado ao genoma da célula, os níveis de expressão de Bcl-2 estavam significativamente altos. A expressão de Bcl-2 é reprimida por p53 e ativada por NF-κB através da via p13K/Akt. E6 ativa via p13K/Akt e assim, estimula a expressão da bcl-2, a

qual apresenta na sua região 3'UTR elementos de resposta negativa a p53, região esta que p53 se liga e reprime a expressão de bcl-2. Contudo, quando E6 inibe a atividade de p53, os níveis de bcl-2 são elevados e a sobrevivência das células é mantida (Krajewskiet al., 1993; Brambilla et al., 1996; Wu et al., 2007; Xu et al., 2009; Sung et al., 2013).

2.4.1.4 E6 e mutações em EGFR

Mutações em EGFR, gene do receptor do fator de crescimento epidermóide, podem ser provocadas pela oncoproteína E6, que contribui para a elevação da formação de 8-OH-dG através do aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio ROS, um agente causador de dano no DNA, que eleva a taxa de mutação, resultando em transformação oncogênica. A oncoproteína E6 causa estresse oxidativo na célula, acarretando dano ao DNA, levando assim, a inativação da via MMR. Esta via é responsável por remover mal pareamentos de bases causados por falha na replicação ou por *mismatches* com bases oxidadas (Behrend et al., 2003; Tung et al., 2013).

2.4.1.5 E6 e metaloproteínases

Em células tumorais de pulmão, as metaloproteínases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) são reguladas positivamente por E6 através da expressão da interleucina 8 (IL-8). As metaloproteínases são enzimas envolvidas na destruição proteolítica da matriz extracelular, induzindo assim, a invasão do tumor e a metástase. Ao

passo que a IL-8 é um fator angiogênico responsável pelo recrutamento das células do sistema imunológico durante estresse químico e ambiental, inflamação e em resposta a hormônios esteroides. Em células tumorais, há uma hiperexpressão de IL-8 em resposta a hipóxia e ocorre expressão de MMP-2 e MMP-9, levando a um processo angiogênico e progressão tumoral. Em presença de E6, IL-17 também é expressa e estimula a expressão da proteína antiapoptótica, Mcl-1, através da via P13K. A indução de IL-17 regula positivamente a produção de IL-6 e IL-8 (Freije et al 2003; Brat et al., 2005; Shiau et al., 2013).

2.4.1.6 E6 e hTERT

A oncoproteína E6 ativa a transcrição do gene da transcriptase reversa telomerase humana (hTERT). Trata-se de uma enzima que controla a expressão e ativação da telomerase e está presente em 90% das células cancerosas. A ativação transcricional de hTERT é acionada pela ligação de c-Myc e Sp1 em seu promotor. No entanto, a transcrição de c-Myc é inibida por p53 e o ciclo celular é interrompido na fase G1. E6 regula positivamente hTERT através da inativação de p53. A indução de hTERT por E6 é feita através da formação do complexo E6AP-E6, o qual é necessário para a acetilação de histona H3 no promotor hTERT e repressão de p300 (Liu et al., 2005; James et al., 2006; Cheng et al., 2008; Kyo et al., 2008).

2.4.1.7 E6, E7 e HIF-1 α

Em câncer de pulmão de células não pequenas, o nível de expressão do mRNA HIF-1 α , fator de transcrição que regula angiogênese, é mais alto do que em tecido de pulmão livre de tumor. Tal dado sugere uma associação com a progressão da doença. Através de HIF-1 α , as proteínas E6 e E7 induzem o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o qual leva ao desenvolvimento e progressão de NSCLC. A hiperexpressão de VEGF contribui para o aumento de microvasos no tumor de pulmão. Angiogênese mediada por HIF-1 α /VEGF pode ser promovida pelas oncoproteínas E6 e E7 na indução de NSCLC em não fumantes (Yuan et al., 2000; Yohena et al., 2009; Li et al, 2011; Zhang et al., 2014) (Figura 9).

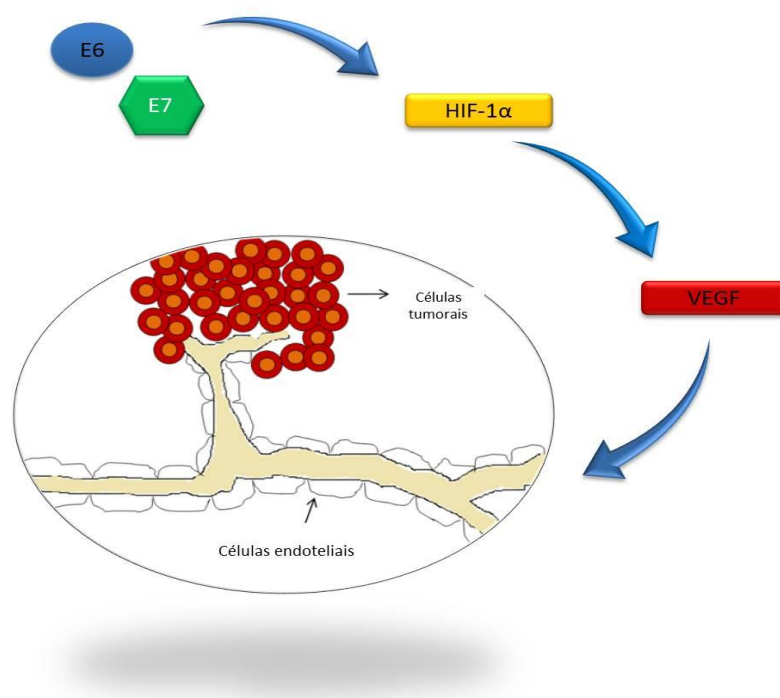


Figura 9. Angiogênese promovida por E6 e E7. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é induzido por E6 e E7 através da ativação do fator indutor de hipóxia HIF-1 α . O aumento da expressão de VEGF aumenta o número de microvasos, os quais contribuem para a vascularização do tumor. Fonte: Autora

2.4.1.8 E6, E7 e o Tabaco

O mecanismo molecular do cigarro de tabaco na carcinogênese ainda não está totalmente elucidado. Sabe-se que o benzopireno é um hidrocarboneto aromático, policíclico e um agente carcinogênico, pois ativa o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), bem como a proliferação celular. Além disso, o benzopireno é capaz de aumentar o número de vírions e o genoma de HPV. As oncoproteínas E6 e E7 parecem ser capazes de modular a proliferação e o

comportamento tumoral das células expostas à fumaça do tabaco no epitélio brônquico. Estudos observaram que em células de pulmão positivas para HPV, o promotor p97, presente na região LCR do vírus, pode ser ativado por componentes do tabaco. Esta ativação induz a expressão das oncoproteínas E6 e E7. Tais proteínas atuam em conjunto com o tabaco para ativar o promotor p97 como também para tornar as células pulmonares sensíveis ao dano oxidativo causado, pelo tabaco, ao DNA (Kometani et al., 2009; Alam et al., 2010; Muñoz et al., 2012; Peña et al., 2015) (Figura 10).

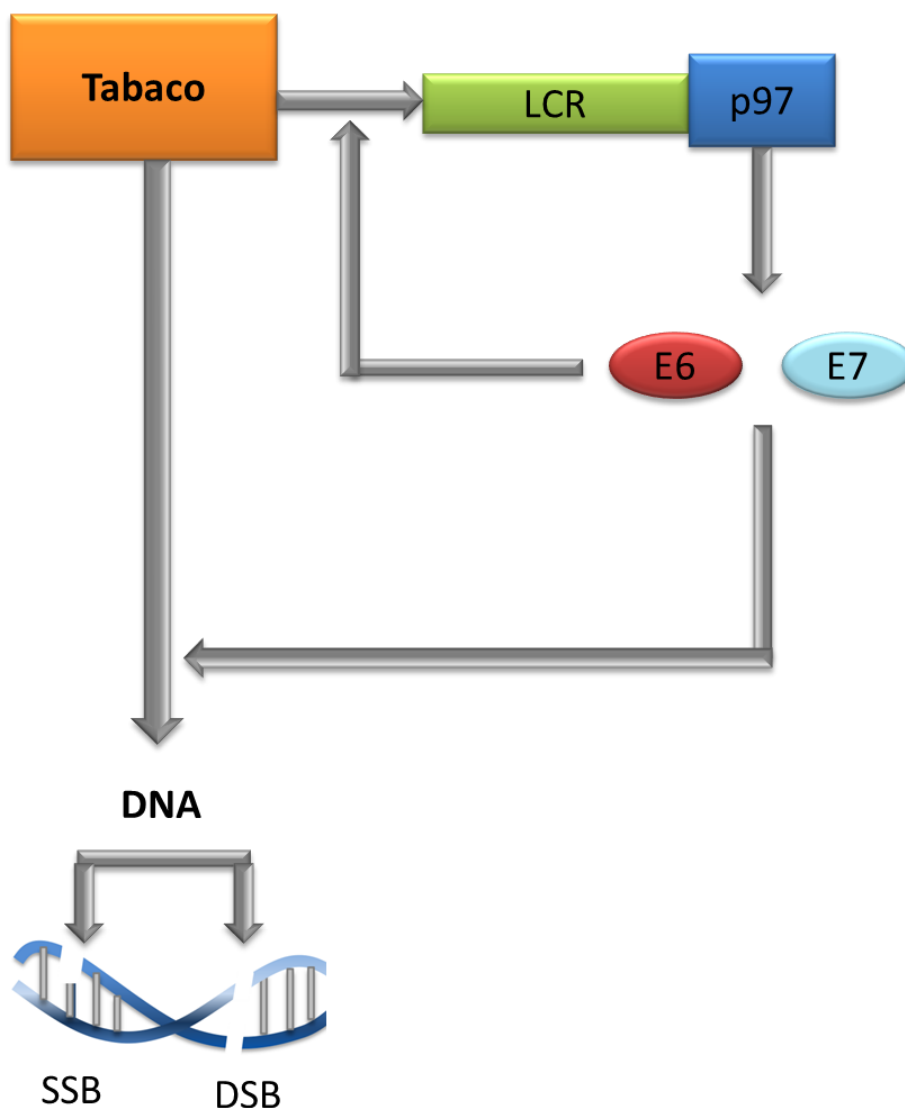


Figura 10. Modelo de interação entre o tabaco e o HPV. Inicialmente, o tabaco induz a atividade do promotor p97 de HPV com a região LCR intacta induzindo a expressão das oncoproteínas E6 e E7. E6 e E7, por sua vez, sensibilizam as células do pulmão ao dano oxidativo do DNA causado pelo tabaco e também colaboram com o tabaco para ativação do promotor p97. DSB – *double strand break* (Quebra de fita dupla). SSB – *Single Strand Break* (Quebra de fita simples). Adaptado de Peña et al., 2015.

2.4.1.9 E7 e inativação de pRB

A formação do complexo entre E7 e pRb, proteína supressora retinoblastoma, constitui uma importante parte da transformação celular. Sob condições normais, pRb tem afinidade pelo fator de transcrição E2F, formando assim, o complexo pRb/E2F. Com a formação desse complexo, ocorre o recrutamento de histonas desacetilases (HDAC) e com isso, a expressão dos genes envolvidos na proliferação celular é suprimida. A fosforilação de pRb por CDKs impede a associação desta com HDAC e E2F, o que deixa E2F livre para ativar a expressão de genes dependentes dele. O recrutamento de HDAC é feito por p107 e p130. A fosforilação de pRb é inibida por quatro proteínas INK, como p16, cujo gene (CDKN2A) é regulado por pRb. Dessa forma, a atividade das proteínas INK, pRb e CDK fazem parte da via de controle da progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. Em células infectadas por HPV, como células de pulmão, a proteína E7 se liga a pRb provocando a dissociação do complexo pRb/E2F/HDAC. Tal dissociação, deixa livre HDAC e E2F para ativarem a transcrição dos genes de proliferação celular e inativar os genes supressores de tumor, como o p16^{INK4}, hipermetilando seu promotor (modificação epigenética) através da remodelação da cromatina (Finzer et al., 2001; Sherr and McCormick 2002; Wu et al., 2005) (Figura 11).

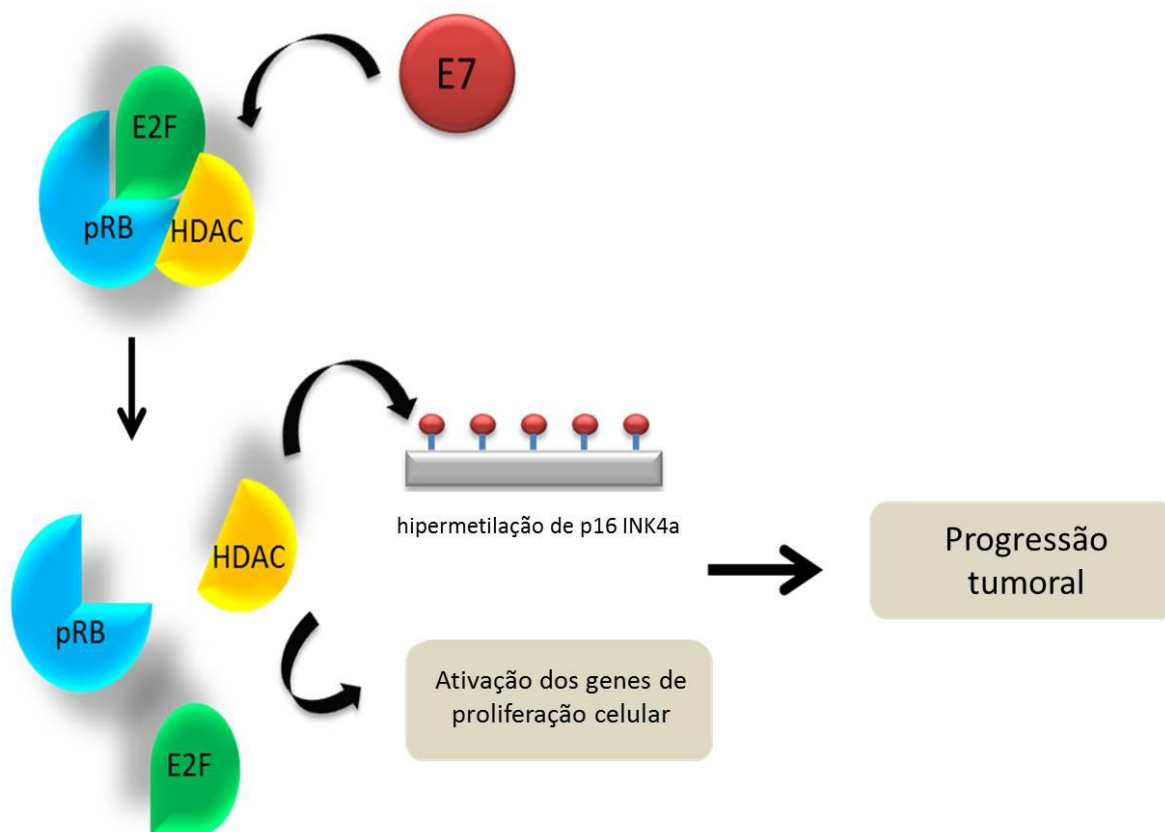


Figura 11. Ao interagir com a proteína pRb, E7 promove a dissociação do complexo HDAC/pRb/E2F. Como consequência, HDAC fica livre para hipermetilar p16^{INK4} e, juntamente com E2F, inativar genes supressores de tumores e ativar genes de proliferação celular, levando à progressão do tumor. Fonte: Autora

2.4.1.10 E7 e o receptor de hidrocarboneto de arila (AhR)

O receptor de hidrocarboneto de arila é um fator de transcrição que modifica a expressão gênica através da ligação do TCDD, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina. Após a ligação, AhR dirige-se até o núcleo, onde

sofre heterodimerização com translocador nuclear de AhR e transativa a expressão de genes envolvidos no crescimento e no ciclo celular. AhR se liga a E2F e pRb formando um complexo, E2F/pRb/AhR, que segura o ciclo celular, impedindo sua progressão para a fase S. A ligação de pRb a AhR é importante, pois permite que TCDD induza CYP1A1 e pare o ciclo celular na fase G1. A oncoproteína E7 desregula a via AhR em SCLC, onde o inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A) ocupa uma posição central nessa via. O nível de fosforilação de pRb em SCLC é aumentado através da ligação da proteína E7 e dos sinalizadores do receptor de hidrocarboneto de arila, os quais são inibidores de quinases dependentes de ciclina, como p21 e p16 (Ge e Elferink, 1998; Whitlock, 1999; Cornels et al., 2001; Buonomo et al., 2011).

Desse modo, diversos estudos têm apresentado evidências da presença do HPV em tumores de pulmão, bem como os possíveis mecanismos de ação do vírus no desenvolvimento destes tumores. Não obstante a relevância, não existem estudos que avaliem a presença do HPV em tumores de pulmão no Brasil. O presente trabalho é o primeiro realizado no Brasil e Nordeste neste sentido.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Detectar a presença de HPV em tumores de pulmão de pacientes submetidos à cirurgia oncológica.

3.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar a amostra estudada de acordo com os aspectos clínicos-biológicos;
2. Detectar a presença do DNA de HPV em material tumoral de pacientes com câncer de pulmão;
3. Identificar os tipos de HPV presentes em material tumoral de pacientes com câncer de pulmão;
4. Detectar a presença das oncoproteínas virais E6 e E7 em material tumoral de pacientes com câncer de pulmão;

4. Material e Métodos

4.1 Local, período e tipo de estudo

O presente estudo teve um caráter retrospectivo e prospectivo. Neste sentido, as amostras foram obtidas entre os anos de 2013 a 2015.

Todas as coletas foram obtidas de pacientes atendidos no setor de pneumologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, localizado no Campus da Universidade de Pernambuco, situada na cidade de Recife, estado de Pernambuco, Brasil.

4.3 Caracterização da amostra

Foram coletadas um total de 63 amostras de pacientes de ambos os sexos, com idades entre 11 e 81 anos, que apresentaram diagnóstico de câncer de pulmão. Foram tomados cuidados especiais para evitar a contaminação entre as amostras durante os processos ulteriores.

4.4 Coleta do material biológico

No presente estudo foram resgatados blocos de tecidos pulmonares parafinados de pacientes que foram submetidos à cirurgia oncológica a partir do no Centro Integrado de Anatomia (CIAP) do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC). Além disso, também foram realizadas coletas de tecido fresco obtidas de pacientes atendidos no setor de pneumologia do HUOC e submetidos à cirurgia oncológica. As amostras foram preservadas em solução preservadora de ácidos nucléicos (*RNA Later*) em freezer -80°C e em formalina tamponada 10% para posterior processamento.

4.5 Criação de banco de dados

Aos pacientes que foram submetidos à cirurgia foi aplicado um questionário, o qual permitiu obtenção de informações referentes ao perfil social, comportamental e familiar. Quanto às informações dos pacientes cujos blocos parafinados foram utilizados, foram resgatadas no Arquivo Médico do Hospital Oswaldo Cruz. Tais informações permitiram a estruturação de um banco de dados, onde foram inseridas todas as informações referentes aos pacientes. Tais informações são de acesso restrito do grupo de pesquisa e ficarão arquivadas durante 10 anos.

4.6 Fixação dos tumores

Após um tempo máximo de 24 horas em formalina tamponada 10%, os fragmentos de tumores foram lavados em água corrente por 2 horas e depois armazenados em álcool 70% para processamento posterior.

4.7 Preparação de lâminas para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e para ensaio de imunohistoquímica

Para análise histopatológica, os blocos de tecidos parafinados foram cortados na espessura de 8 μ m e colocados em lâminas comuns. Seguiu-se com o processo de coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), seguindo protocolo padrão.

Para o ensaio de imunohistoquímica, foram utilizados cortes de 5 μ m e colocados em lâminas silanizadas. Em seguida, as lâminas passaram por banho de parafina para conservá-las para processamento posterior.

4.8 Extração e quantificação do DNA

Para a desparafinização e extração do DNA dos cortes parafinados, foi utilizado o kit QIAmp DNA FFPE tissue (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente, a parafina foi removida através da utilização do xilol e

incubação em banho maria por 30 min a 65 °C. Em seguida, foram feitas lavagens com álcool 100% e 70%. Após a extração, o DNA foi ressuspensionado em 20 µl de tampão de eluição fornecido pelo kit de extração.

Para a extração do DNA dos tumores frescos, foi utilizado o kit DNeasy blood & tissue, seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA foi eluído em 150 µl de tampão de eluição fornecido pelo kit.

Todas as amostras de DNA extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro (nanodrop LITE - Thermo Scientific) utilizando alíquota de 1µl. Após a quantificação, foram preparadas alíquotas de uso na concentração de 50 ng/µl.

4.9 Avaliação da qualidade do DNA extraído

A qualidade do DNA extraído foi avaliada através da amplificação pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction – reação em cadeia da polimerase*) com oligonucleotídeos (iniciadores) específicos para o gene de β-globina humana, cuja sequência é 5'-ACACAACTGTGTCTACTA-3' e 5'-GGTGAACGTGGATGAAGTTG-3' Baldez, et al., (2009). Para a reação de PCR foram utilizados: 50 ng de DNA genômico, 20 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,1 mM de cada dNTP, tampão 1x (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl e 0,1% Triton X-100), 1 mM MgCl₂ e 1 unidade de Taq polymerase. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Biocycler MG96+ nas seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para a desnaturação inicial do material genômico, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 66,5°C por 40 segundos, 72°C por 45 segundos para

amplificação do segmento gênico de interesse e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos para a extensão final do fragmento. O produto da PCR foi submetido à eletroforese e visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.

4.10 Detecção do DNA viral

Para a detecção do DNA do HPV, foi utilizada a técnica de PCR convencional, baseada na amplificação do gene codificador da L1 usando *primers* consenso e degenerados (MY09/MY11) Forward: 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3' e Reverse: 5' – GCMCAGGGWCATAAYAATGG- 3' (Manos et al., 1989). Foram utilizados 50 ng de DNA genômico, 20 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,1 mM de cada dNTP, tampão 1x (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl e 0,1% Triton X-100), 1 mM MgCl₂ e 1 unidade de Taq polymerase. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Biocycler MG96+ nas seguintes condições: 35 ciclos com 95°C durante 30 segundos para a desnaturação, 55°C durante 40 segundos para o anelamento, 72°C 64 durante 45 segundos para a extensão e um ciclo com 72°C durante 5 minutos para a extensão final. Após a amplificação, o produto de PCR foi analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Em seguida, foi realizada uma nested PCR utilizando 2 µl do produto da PCR realizada com primer MY 09/11 e primers GP5/6 Forward: 5'- TTTGTTACTGTGGTAAG e Reverse: 5'- GAAAAATAAACTGTAAATCA (de Roda Husman et al., 1995). O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.

4.11 Tipificação do DNA viral

Para a tipificação, as amostras positivas para o DNA do HPV foram sequenciadas pelo método dideoxi-terminal fluorescente, utilizando o kit ABI PRISM *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction* (Applied Biosystems®) através da colaboração com a plataforma multiusuária de sequenciamento e análise de expressão gênica do Laboratório Central, Universidade Federal de Pernambuco. Foi utilizado o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®), de acordo com os padrões estabelecidos nesta unidade.

Para as análises do sequenciamento, foi utilizado o pacote Standen (STANDEN, 1996) com os programas Gap4 (versão 4.0) e Pregap4 (versão 1.5), os quais foram utilizados para a construção dos *contigs* das sequências obtidas de DNA dos HPV. Após a montagem dos *contigs*, foi utilizado o programa BLAST disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> para a comparação das sequências de DNA.

4.12 Coloração HE

Para análise histopatológica, os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Para isso, os cortes foram submetidos a duas incubações em xilol por 10 e cinco minutos, cada. Em seguida, foram incubados em etanol 100%, 90%, 70% por cinco minutos cada. Em seguida, foram

submetidos à lavagem com água destilada por cinco minutos. Posteriormente, os cortes foram corados com Hematoxilina por 30 minutos. Em seguida, foram lavados em água corrente por 10 minutos. Posteriormente, foram corados com Eosina por 2 minutos e lavados com etanol 90% por um minuto e meio, seguindo com duas lavagens com etanol 100% por um minuto, cada. Os cortes foram tratados com xilol por um minuto. As lâminas foram então montadas e analisadas em microscópio Zeiss Axio Scope.A1 com câmera AxioCam ERc5s.

4.13 Desparafinização das lâminas

A retirada da parafina das lâminas contendo cortes tumorais se deu através de incubação em xilol por 60 minutos em estufa a 60°C. Em seguida, foi realizada nova incubação em xilol por 30 minutos em temperatura ambiente. As lâminas passaram, então, por três lavagens em álcool etílico 100% e uma lavagem em álcool etílico 70% por cinco minutos, cada. Após essa etapa, iniciaram-se os procedimentos de imunohistoquímica.

4.14 Imunohistoquímica

Amostras de tumores de pulmão foram analisadas através de imunohistoquímica para avaliar a presença das oncoproteínas virais E6 e E7.

O ensaio de imunohistoquímica foi realizado com anticorpos monoclonais (Santa Cruz Biotechnology, Brasil) para E6 HPV 16/18 (sc460 com diluição 1:200)

e para a proteína E7 (ab30731 com diluição 1:500). Após serem desparafinizados e desidratados, os cortes foram lavados com água corrente por cinco minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas em PBS por cinco minutos. Após este período, as lâminas foram incubadas por 20 minutos em tampão citrato 10mM para a recuperação antigênica, quebra das ligações cruzadas e exposição dos epítomos para o reconhecimento do anticorpo primário. Em seguida, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente.

Após o resfriamento, as lâminas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas em água corrente por cinco minutos, seguindo-se com duas lavagens com PBS por cinco minutos, cada. Em câmara úmida à 37°C, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário por duas horas. Depois, foram incubadas em PBS por cinco minutos. Esta etapa foi realizada mais uma vez. Seguiu-se com incubação do anticorpo secundário (ADVANCE™ HRP LINK) por 45 minutos em temperatura ambiente.

As lâminas passaram por mais duas incubações em PBS de cinco minutos cada. Após a secagem das lâminas, as mesmas foram incubadas com anticorpo terciário (ADVANCE™ HRP ENZIME) por 45 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas duas vezes em PBS por cinco minutos. Foi adicionada, então, solução DAB em cima dos cortes histológicos com tempo de permanência de aproximadamente três minutos. Seguiu-se com uma lavagem de água corrente por um minuto, depois outra lavagem de água corrente por cinco minutos. Posteriormente, os cortes foram corados com hematoxilina por no máximo um minuto. Em seguida, foi realizada lavagem com água corrente por cinco minutos e incubação em álcool etílico 70% por três minutos e mais três

incubações em álcool 100% por três minutos, cada. Para finalizar, as lâminas foram submetidas a dois banhos de xilol por cinco minutos, cada. Para as montagens das lâminas, foi utilizado o meio entellan.

Para as análises de imunohistoquímica foi utilizado microscópio Zeiss Axio Scope.A1 com câmera AxioCam ERc5s.

4.15 Análises estatísticas

Para analisar a associação das características clínicas-demográficas e presença do HPV com o desenvolvimento do câncer de pulmão, foi realizada análise estatística. Para tanto, foi utilizado o software online Social Science Statistics com aplicação do teste qui-quadrado bem como o software MedCalc com aplicação do teste odds ratio (OR) com intervalo de confiança (IC) 95%. Nos testes aplicados, foi considerado o nível de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$).

4.16 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE com número CAAE 06396812.0.3001.5192 (Anexo 1).

Os pacientes participantes do estudo foram informados sobre a pesquisa, sobre os procedimentos, riscos e importância de sua participação na pesquisa. Aqueles que consentiram participar do estudo assinaram um Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2). Além disso, aos pacientes foi aplicado um questionário para anamnese que consistia de informações sobre histórico familiar de doenças malignas, tabagismo, etilismo (Anexo 3). Quanto às informações dos pacientes cujos blocos foram resgatados no CIAP, foram extraídas no arquivo médico da Universidade de Pernambuco.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra estudada

5.1.1 Análise da amostra total

Foram incluídos neste estudo, 63 pacientes naturais da região metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco.

Analizando toda a amostra de pacientes participantes do estudo, observou-se que a média da idade das pacientes foi de 55 anos. A faixa etária entre 56 a 81 anos foi mais frequente (51%, 32 pacientes), seguida da faixa etária entre 11 e 55 anos (38%, 24 pacientes). Não se obteve a idade de cerca de 11% dos pacientes como mostra a figura 12.

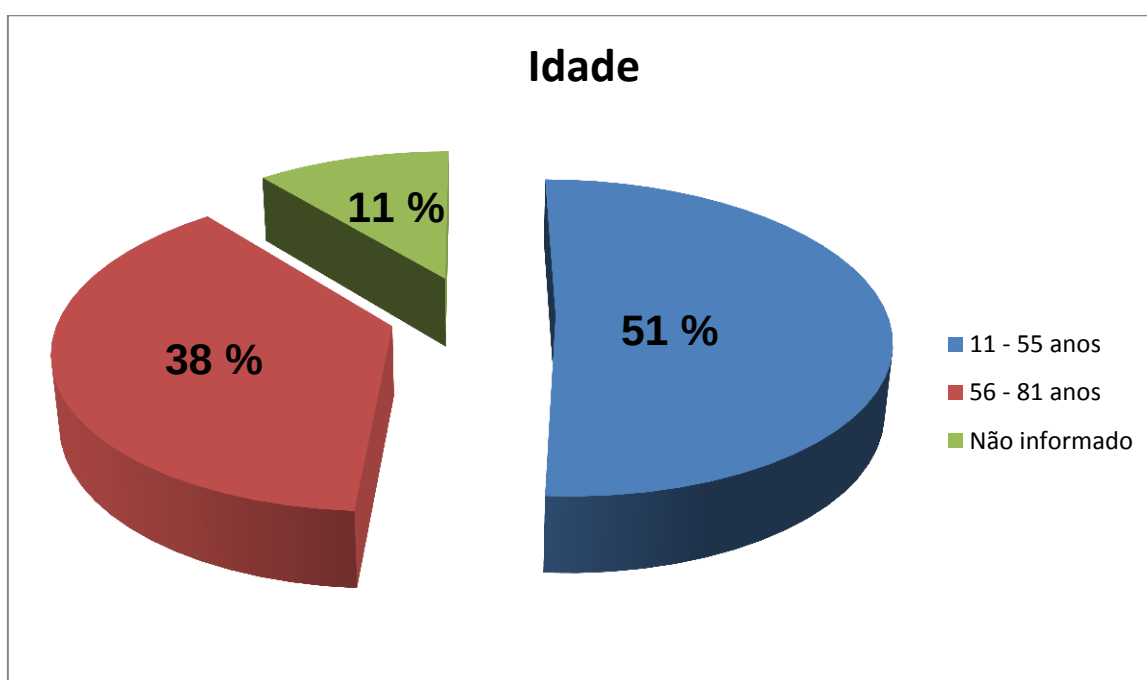


Figura 12 - O gráfico mostra a frequência das pacientes nos diferentes grupos etários. Em azul, pacientes com idades entre 11 e 55 anos de idade. Em vermelho, pacientes com idades entre 56 e 81 anos de idade. Em verde, pacientes cujas idades não foram informadas.

Do total, 35% (22) não são fumantes, 49% (31) são fumantes ou já fumaram e 16% (10) não informaram (Figura 13).

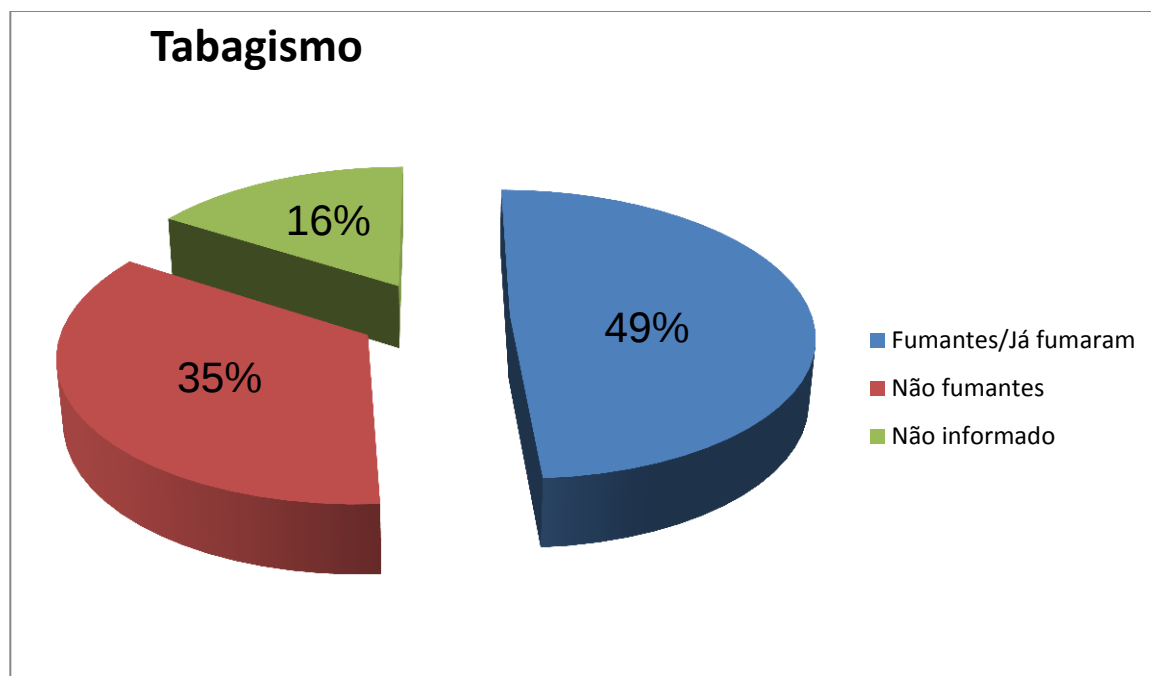


Figura 13 – Grupo de pacientes dividido em não fumantes, fumantes/já fumaram. Em vermelho, percentagem das pacientes não fumantes, 35%. Em azul, percentagem das pacientes fumantes/já fumaram, 49%. Em verde, percentagem de pacientes que não informaram quanto ao hábito de fumar.

Quanto ao gênero, 60% (38) eram pacientes do sexo masculino e 40% (25) eram pacientes do sexo feminino (Figura 14).

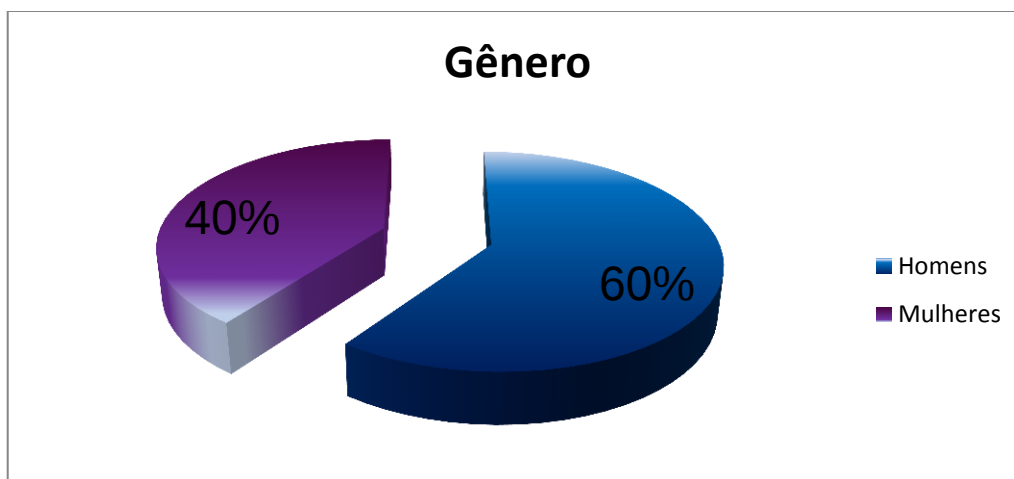


Figura 14 – Frequência da distribuição de homens e mulheres. Em azul, percentagem de homens, 60% (38). Em roxo, percentagem de mulheres, 40% (15).

Em relação ao consumo de álcool, 20% (13) pacientes se declararam etilistas ou que já consumiram, 30% (19) declararam não ser etilistas e 50% (31) não informaram (Figura 15).

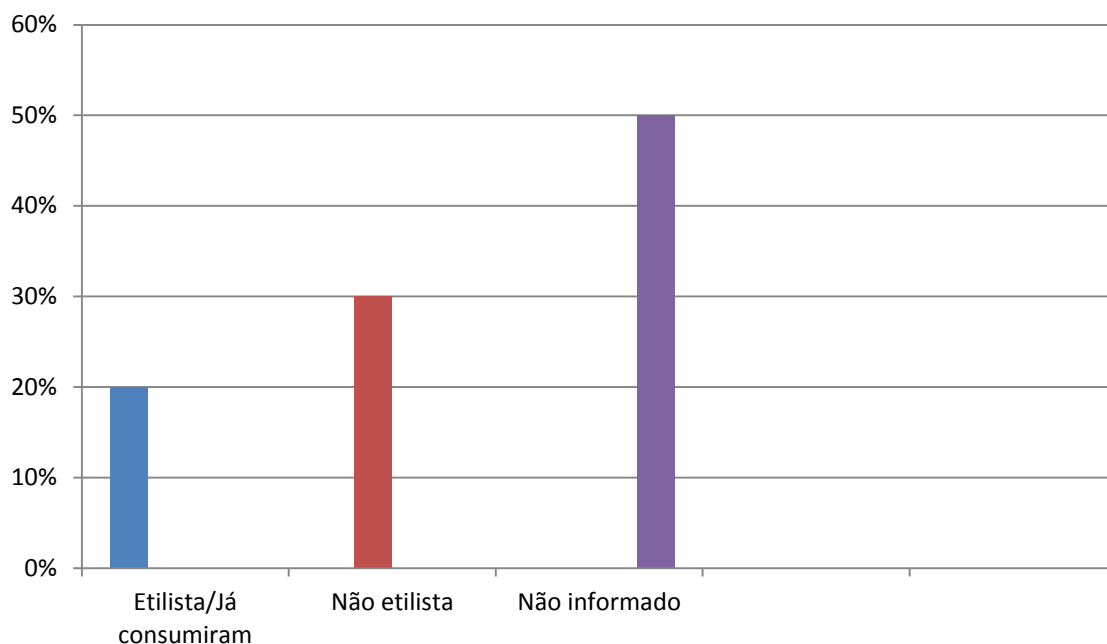


Figura 15 – O gráfico mostra a frequência dos pacientes em relação ao consumo de álcool. Em azul, frequência de pacientes etilistas e que já consumiram. Em vermelho, frequência de pacientes que não consomem álcool. Em roxo, frequência de pacientes cuja informação não foi cedida.

5.2 – Detecção viral

5.2.1 – Avaliação da qualidade do DNA extraído

As amostras de DNA extraídas foram avaliadas quanto a sua qualidade. Sendo assim, foi realizada reação de PCR para a amplificação do gene β -globina. A figura 16 mostra o resultado da eletroforese. As amostras negativas não foram incluídas nas etapas posteriores do presente estudo.

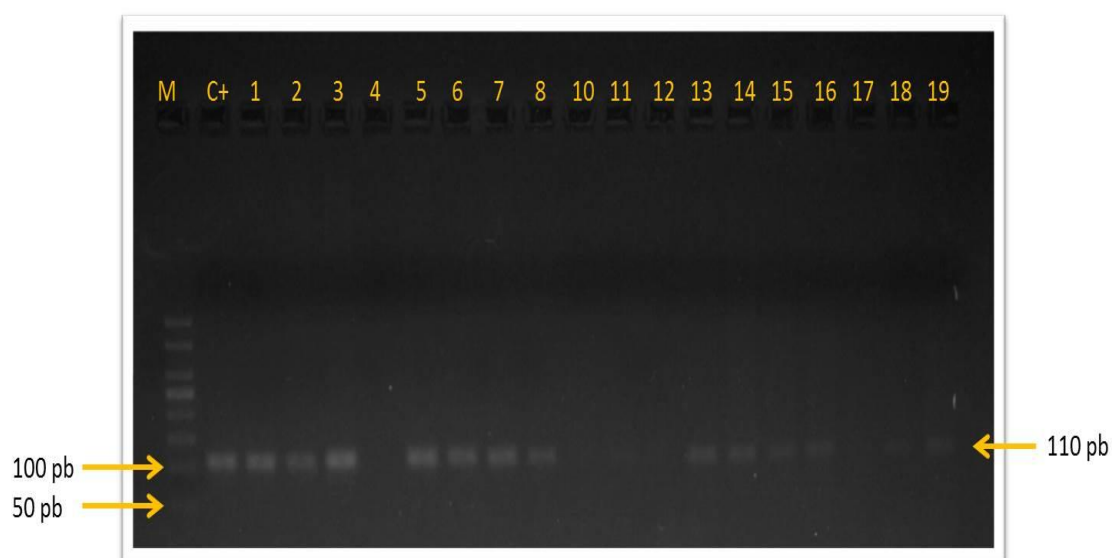


Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR com primers para β -globina.

M: Marcador 50 pb; C+: Controle positivo. 1-19: amostras de tecido tumoral.

5.2.2 – Detecção do HPV com primers MY e GP através da reação de nested-PCR

A detecção do DNA do HPV se deu através da técnica de PCR utilizando primers específicos (MY 09/11) para a região conservada do gene L1, gerando fragmentos de aproximadamente 450 pb (Figura 17).

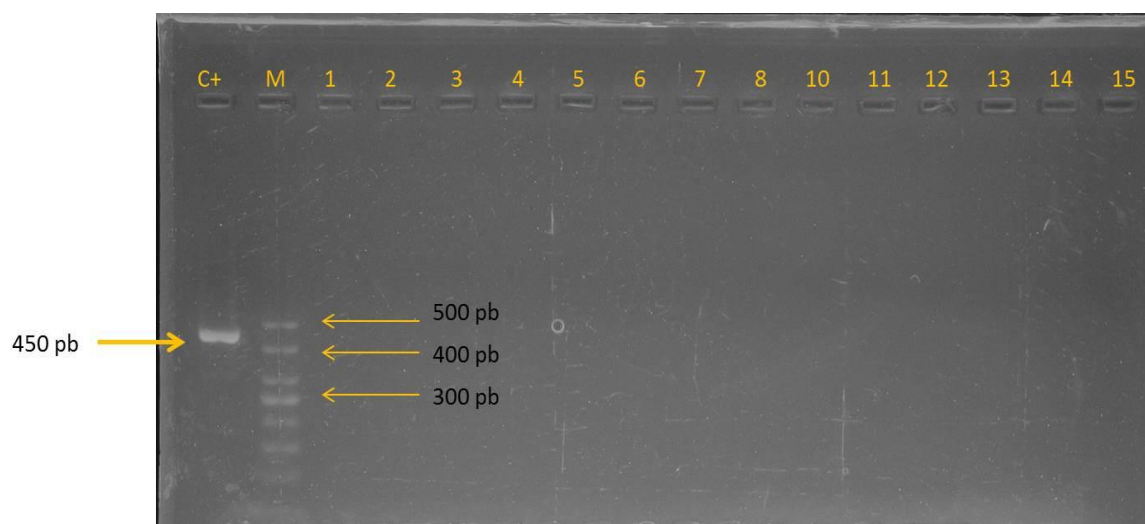


Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR com primers MY 09/11. M: Marcador 50 pb; C+: Controle positivo. 1-15: amostras de tecido tumoral.

As amostras negativas na reação de PCR utilizando os primers MY09/11 foram submetidas a uma nested PCR com primers GP 5/6, o qual também amplifica região conservada do gene L1 gerando fragmentos com 150 pb. O produto desta reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%. A figura 18 mostra o resultado desta reação.

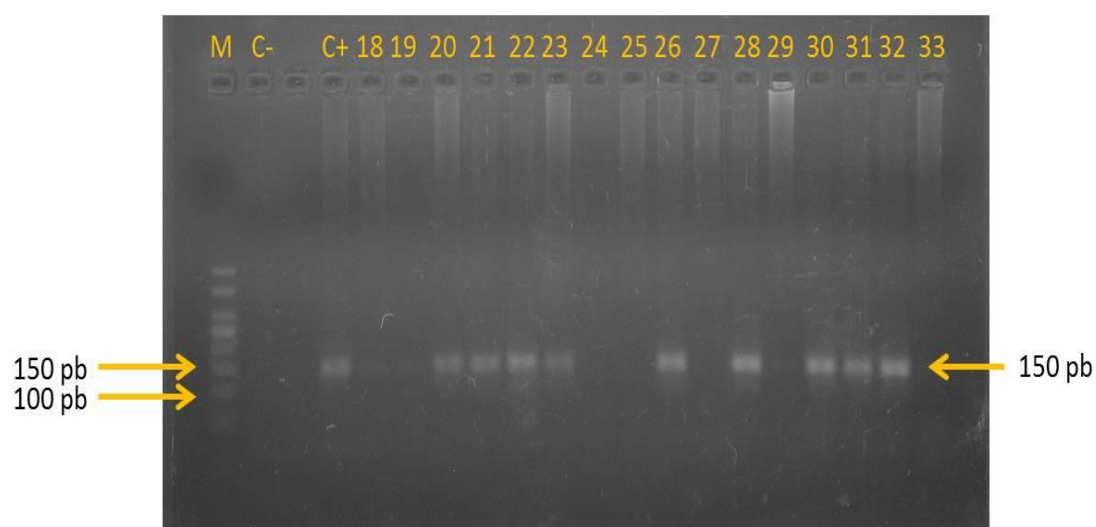


Figura 18 - Eletroforese do produto da PCR com primers GP 5/6 em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. M: marcador 50 pb; C-: Controle negativo; C+: controle positivo; 20-23,

26, 28, 30-32: amostras de tecido pulmonar positivas para HPV; 18-19, 24-25, 27, 29 e 33: amostras de tecido pulmonar negativas para HPV.

5.3 Tipificação

As amostras positivas na PCR convencional foram sequenciadas para confirmação e tipificação (Figura 19).

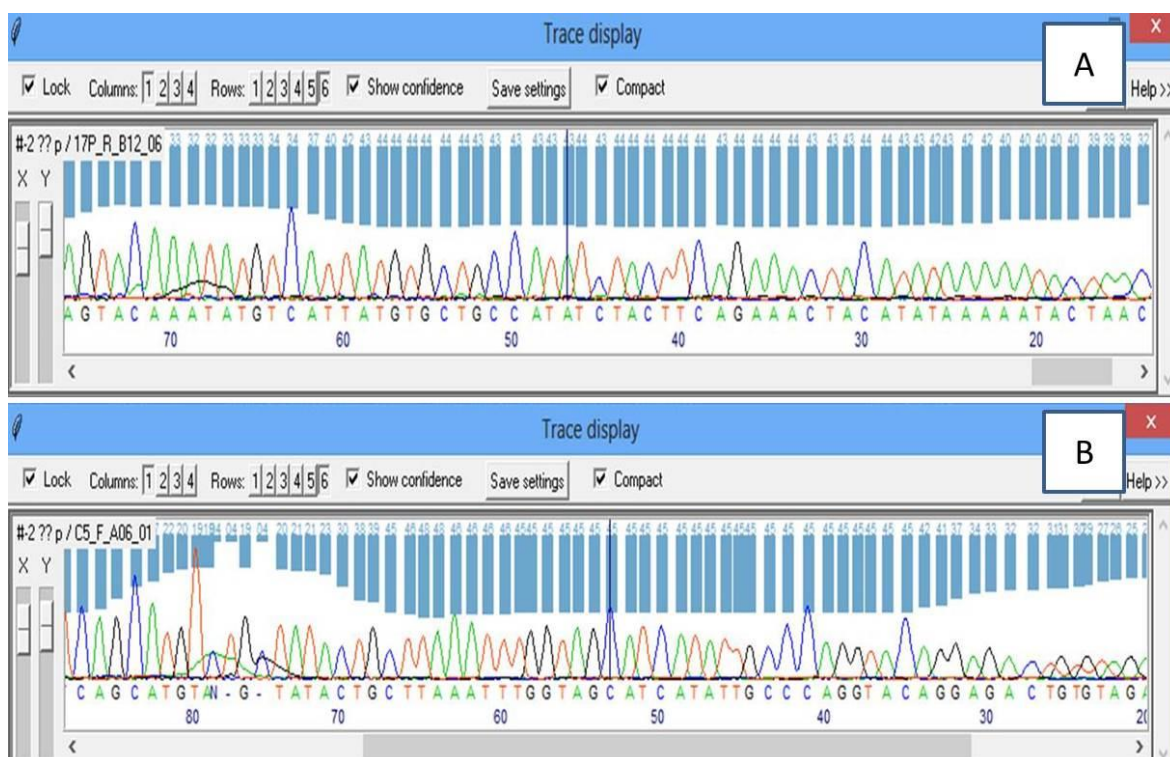


Figura 19 – Eletroesferogramas obtidos no sequenciamento dos fragmentos gerados pela PCR. A: eletroesferograma de uma sequência de HPV 16. B: eletroesferograma de uma sequência de HPV 18.

5.4 Prevalência do HPV em tumores de pulmão

A presença do DNA do HPV em tumores de pulmão foi avaliada em 63 pacientes. Destes, 52% (33/63) foram positivos para o DNA de HPV (Figura 20).

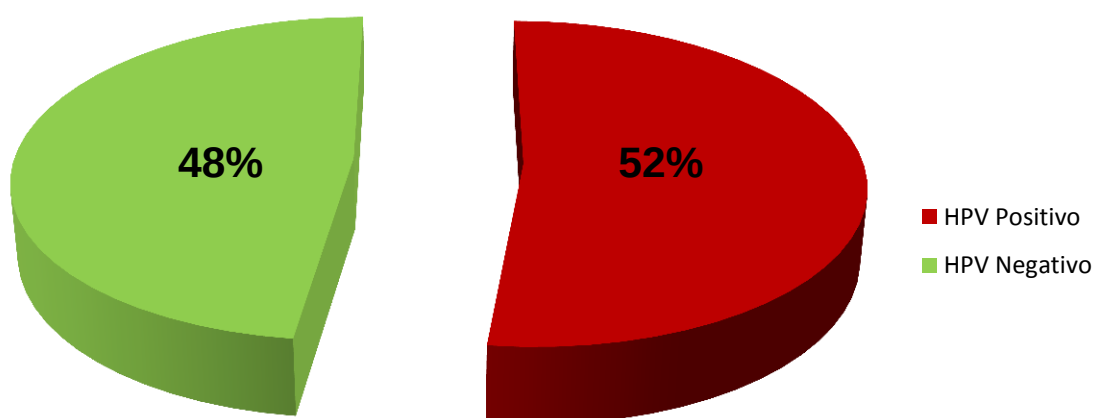


Figura 20 – Prevalência do DNA do HPV em 63 amostras de tumores de pulmão. O DNA do HPV foi prevalente em 52% dos tumores analisados (vermelho).

Foram detectados dois tipos de HPV de alto risco, nomeadamente o HPV 16 e 18. O HPV 16 foi o mais frequente 81% (27/33) enquanto a frequência do HPV 18 foi de 19% (6/33) (Figura 21).

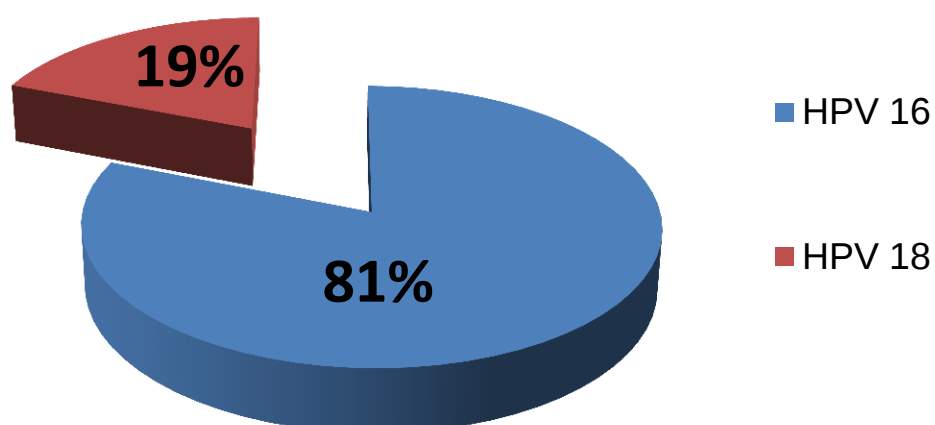


Figura 21 – Prevalência dos HPV 16 e 18 em 33 tumores HPV positivos dos pacientes analisados. Em azul, prevalência do HPV 16 (81%). Em róseo, prevalência do HPV 18 (19%).

5.5 Prevalência do HPV x características clínicas e sócio-demográficas

A tabela 2 apresenta as características clínicas-demográficas entre os grupos classificados de acordo com a presença e ausência do HPV. No grupo HPV positivo foram incluídas amostras de tumores de pacientes com HPV. No grupo HPV negativo foram incluídas amostras de tumores de pacientes sem HPV.

Tabela 2 – Análise de associação entre as características clínicas-biológicas e sócio-demográficas dos pacientes de acordo e a presença do HPV.

CARACTERÍSTICAS	HPV +	HPV -	p ¹	OR (95% IC)	p ²
Idade					
11 – 55	11 (38%)	13 (48%)	p=0.440	0.658	
56 - 81	18 (62%)	14 (52%)	$\chi^2=0.596$	(0.22-1.90)	0.441
Tabagismo					
Sim/já fumou	17 (60%)	14 (56%)	p=0.728	1.214	
Não	11 (40%)	11 (44%)	$\chi^2=0.120$	(0.40-3.62)	0.728
Gênero					
Homem	17 (52%)	21 (70%)	p=0.143	0.455	0.137
Mulher	16 (48%)	09 (30%)	$\chi^2=2.243$	(0.16-1.28)	
Etilista					
Sim/Já consumiu	05 (36%)	08 (44%)	p=0.617	0.694	
Não	09 (64%)	10 (56%)	$\chi^2=0.248$	(0.16-2.91)	0.618

p¹= Teste qui-quadrado; OR= Odds Ratio; IC= Intervalo de confiança; p²= OR.

Entre as características clínicas e sócio-demográficas dos pacientes e a presença do vírus, não se observou diferença significativa ($p \leq 0.05$) entre os grupos HPV positivos e HPV negativos quanto a idade, tabagismo, gênero e etilismo. No entanto, constatou-se uma maior prevalência de HPV em pacientes nas faixas etárias entre 56 a 81 anos (62%), que fumam ou já fumaram (60%), do sexo masculino (52%) e que não são etilistas (64%).

5.6 Prevalência do HPV16 e 18 x características clínicas e sócio-demográficas

A tabela 3 apresenta as características clínicas e sócio-demográficas entre os grupos categorizados em HPV 16 e HPV 18.

Tabela 3 – Análise de associação entre as características clínicas e sócio-demográficas e a presença do HPV 16 e 18.

CARACTERÍSTICAS	HPV 16	HPV 18	p	OR (95% IC)	p ²
Idade					
11 – 55	10 (43%)	01 (17%)	p=0.228	3.84	
56 - 81	13 (57%)	05 (83%)	$\chi^2= 1.543$	(0.38-38.35)	0.2510
Tabagismo					
Sim/já fumou	10 (48%)	06 (100%)			
Não	11 (52%)	0	-	-	-
Gênero					
Homem	14 (52%)	03(50%)	p=0.934	1.076	0.934
Mulher	13 (48%)	03 (50%)	$\chi^2=0.006$	(0.18-6.31)	
Etilismo					
Sim/Já consumiu	05 (38%)	01 (50%)	p=0.658	0.50	
Não	08 (62%)	01 (50%)	$\chi^2=0.207$	(0.02-10.25)	0.652

- Impossibilidade de analisar estatisticamente pelo fato de uma das células está zerada.

P<0.05 = estatisticamente significativa

Não se observou diferenças significativas entre a presença de HPV 16 e HPV 18 e os grupos quanto à idade, gênero e etilismo. Quanto ao tabagismo não foi possível analisar estatisticamente, pois uma das caselas estava zerada. Contudo, a frequência do HPV 16 foi maior em pacientes na faixa etária entre 56 a 81 anos, 57% (13); em não fumantes, 52% (11); em homens, 52% (14) e naqueles não etilistas. Quanto a frequência do HPV 18, a frequência foi maior em pacientes com idade entre 56 a 81 anos, 83% (5); tabagistas, 100% (6) e quanto ao gênero e etilismo, a frequência foi igual nos dois grupos, 50% (3) e 50% (1) repectivamente.

5.7 Análise histopatológica

Os resultados do exame histopatológico mostraram que um total de 42% dos pacientes apresentaram tumores do tipo adenocarcinomas, enquanto 33% tinham carcinoma de células escamosas, 16% carcinoma de células pequenas e 9% carcinoma de células grandes. Pode-se observar uma maior prevalência do HPV em carcinoma de células escamosas (40%), seguido do adenocarcinoma (33%), carcinoma de células pequenas (18%) e carcinoma de células grandes (9%) (Figura 22).

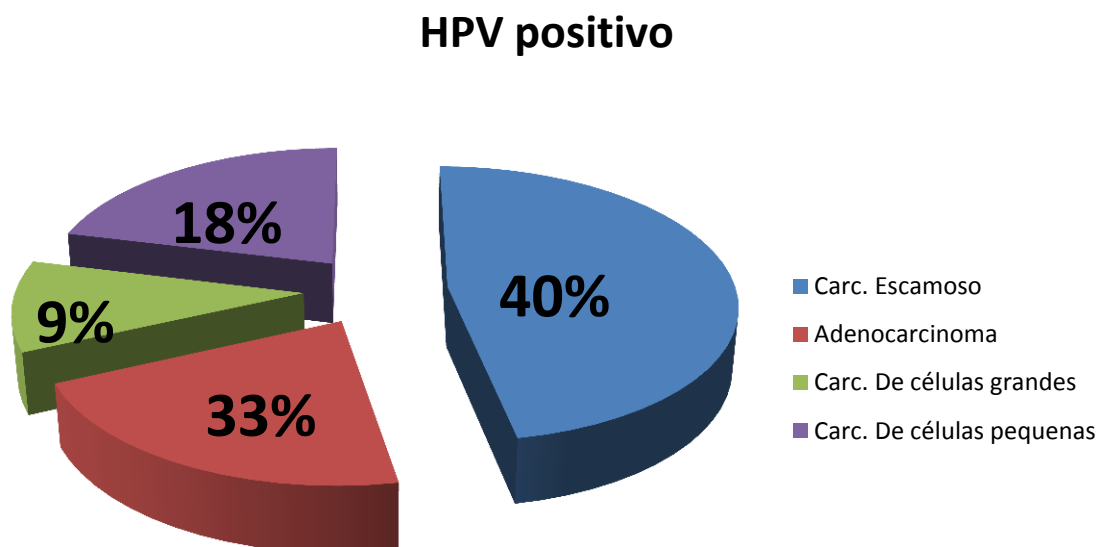


Figura 22 – Prevalência do HPV de acordo com o tipo histológico do tumor. Em azul, percentagem do HPV em carcinoma de células escamosas (40%). Em vermelho, percentagem do HPV em adenocarcinoma (33%). Em roxo, percentagem do HPV em carcinoma de células pequenas (18%). Em verde, percentagem do HPV em carcinoma de células grandes (9%).

Dentre os HPV 16, 41% (11) eram carcinomas de células escamosas, 37% (10) eram adenocarcinoma, 4% (1) eram carcinomas de células grandes e 18% eram carcinomas de células pequenas. Quanto ao HPV 18, 33% (2) eram carcinoma de células escamosas, 17% (1) eram adenocarcinoma, 33% (2) eram carcinoma de células grandes e 17% eram carcinomas de células pequenas. Não se observou diferenças estatisticamente significantes entre os HPV 16 e 18 e os tipos histológicos dos tumores (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise da associação entre os HPV 16 e 18 e os tipos histológicos dos tumores.

	HPV 16	HPV 18	p
Carcinoma escamoso	11	2	0.455
Adenocarcinoma	10	1	
Carcinoma de células grandes	01	2	
Carcinoma de células pequenas	05	1	
P<0.05 = estatisticamente significativa			

5.8 Análise imunohistoquímica

5.8.1 Oncoproteína viral E6

Foi realizada reação imunohistoquímica em amostras de tumores de pulmão conservados em blocos de parafina utilizando anticorpo contra a proteína E6. A imunomarcação foi observada em 85% (28/33) dos tumores HPV positivos. A marcação foi evidenciada nos núcleos como também no citoplasma das células tumorais (Figura 23).

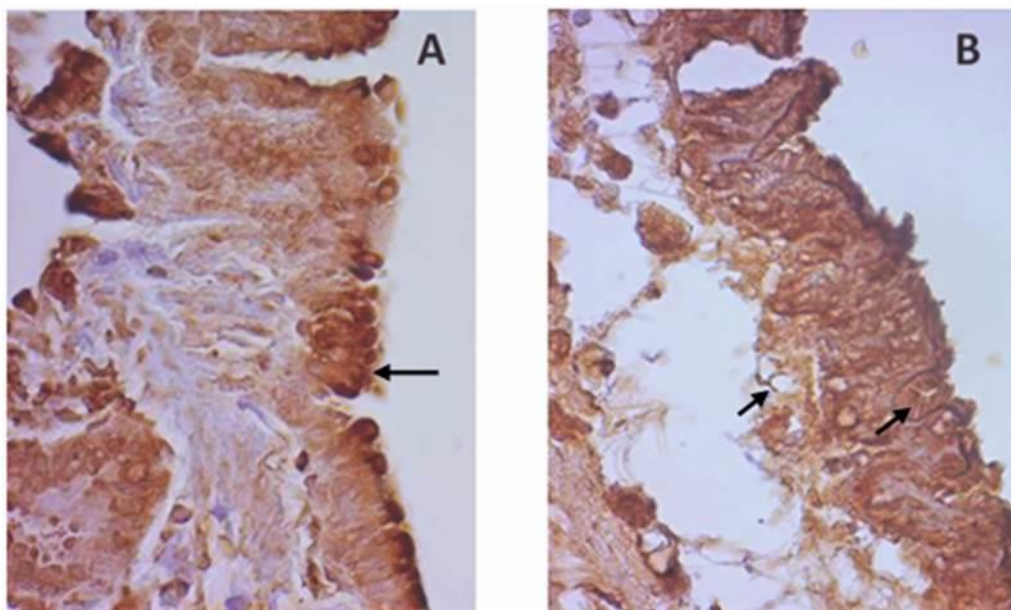


Figura 23 – Representação da imunomarcação em adenocarcinoma pulmonar para o anticorpo E6 (HPV 16 e 18)- 1:200. A-Células glandulares com marcação difusa no citoplasma e núcleo, com intensidade acentuada ao nível nuclear (seta) (aumento de 400X). B- Células glandulares ciliadas com marcação predominantemente citoplasmática, com expressão concomitante da oncoproteína viral pelo tecido conjuntivo adjacente (seta) (aumento de 100X).

5.8.2 Oncoproteína viral E7

Também foi realizada reação de imunohistoquímica com utilização de anticorpo contra a proteína E7. A imunomarcação foi observada em 75% (25/33) dos tumores HPV positivos. Evidenciou-se marcação nos núcleos e citoplasmas das células tumorais (Figura 24).

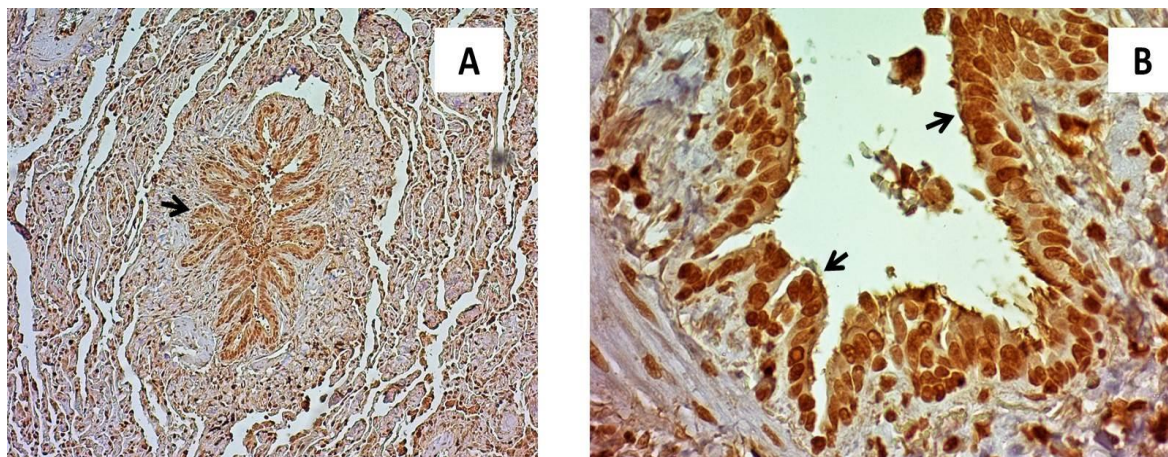


Figura 24- Representação do epitélio glandular em um adenocarcinoma pulmonar para o anticorpo E7 (HPV 16 e 18) - 1:500. A- Marcação predominantemente nuclear forte, com expressão moderada também no citoplasma em toda a extensão epitelial (seta). Aumento de 100X. B- Marcação citoplasmática fraca com expressão forte da oncoproteína a nível nuclear (seta). Aumento de 400X.

5.9 Análise de associação de todas as características clínicas-biológicas e sócio-demográficas quanto à presença e ausência dos tipos histológicos dos tumores

Dentre os tipos histológicos dos tumores (carcinomas de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes e carcinoma de células pequenas) não se observou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos idade, gênero, tabagismo, etilismo, presença de E6 e presença de E7 (Tabelas 5, 6, 7 e 8).

Tabela 5 – Análise da associação entre a presença de carcinoma escamoso e as características clínicas-biológicas e sócio-demográficas.

CARACTERÍSTICAS	Carcinoma escamoso +	Carcinoma escamoso -	p
Idade			
11 – 55	02	09	p=0.148
56 - 81	08	10	
Gênero			
Homem	07	10	p=0.828
Mulher	06	10	
Tabagismo			
Sim/já fumou	05	12	p=0.700
Não	04	07	
Etilista			
Sim/Já consumiu	02	03	p=0.803
Não	03	06	
.			
E6 +	11	17	p=0.361
E6 –	02	01	
.			
E7+	11	14	p=0.462
E7-	02	05	

P<0.05 = estatisticamente significativa

P<0.05 = estatisticamente significante

Tabela 6 – Análise da associação entre a presença de adenocarcinoma e as características clínicas-biológicas e sócio-demográficas.

CARACTERÍSTICAS	Adenocarcinoma +	Adenocarcinoma -	p
Idade			
11 – 55	03	08	p=0.523
56 - 81	07	11	
Gênero			
Homem	06	11	p=0.805
Mulher	05	11	
Tabagismo			
Sim/já fumou	05	12	p=0.386
Não	05	06	
Etilista			
Sim/Já consumiu	02	03	p=0.872
Não	04	05	
E6 +	08	20	p=0.387
E6 -	02	02	
E7+	08	17	p=0.862
E7-	02	05	

P<0.05 = estatisticamente significante

Tabela 7 – Análise da associação entre a presença de carcinoma de células grandes e as características clínicas-biológicas e sócio-demográficas.

Características	Carcinoma de células grandes +	Carcinoma de células grandes -	p
Idade			
11 – 55	02	09	p=0.278
56 - 81	01	17	
Gênero			
Homem	01	16	p=0.508
Mulher	02	14	
Tabagismo			
Sim/já fumou	03	14	-
Não	0	11	
Etilista			
Sim/Já consumiu	0	05	-
Não	02	07	
Estadiamento			
E6 +	06	25	-
E6 -	0	04	
Estadiamento			
E7+	02	23	p=0.614
E7-	01	06	

- Impossibilidade de analisar estatisticamente pelo fato de uma das células está zerada.

P<0.05 = estatisticamente significativa

Tabela 8 – Análise da associação entre a presença de carcinoma de células pequenas e as características clínicas-biológicas e sócio-demográficas.

CARACTERÍSTICAS	Carcinoma de células pequenas +	Carcinoma de células pequenas -	p
Idade			
11 – 55	04	07	p=0.103
56 - 81	02	16	
Gênero			
Homem	03	14	p=0.934
Mulher	03	13	
Tabagismo			
Sim/já fumou	04	13	p=0.736
Não	02	09	
Etilista			
Sim/Já consumiu	01	04	-
Não	0	09	
 E6 +	 06	 22	-
E6 -	0	04	
 E7+	 04	 21	p=0.451
E7-	02	05	

- Impossibilidade de analisar estatisticamente pelo fato de uma das células está zerada.

P<0.05 = estatisticamente significativa

6. Discussão

Infecções por PV são um importante fator na patogênese de lesões humanas tanto benignas quanto malignas. Recentemente, tais infecções têm sido associadas a diversos tipos de cânceres não genitais, dentre eles, câncer de pulmão (Klein et al., 2009). No que se refere aos tipos de HPV mais prevalentemente associados a essas infecções, destaca-se o HPV 16, o qual está presente em mais de 90% dos casos em todo o mundo (Parking et al., 2002; zur Hausen 2009; Jemal et al., 2013).

O HPV 16 também é o tipo mais encontrado em carcinoma do trato respiratório. A maior incidência de HPV em câncer de pulmão e o maior número de trabalhos ocorrem entre os pacientes asiáticos, seguidos da Europa e América. Na Ásia, as maiores incidências vão de 79 a 71,4% enquanto que as menores ocorrem na faixa de 0,4 a 10% (Liu et al 1994; Hirayasu et al., 1996; Yang et al., 1998; Hiroshima et al., 1999; Lim et al., 2009; Goto et al., 2011). Os tipos 6, 11, 16, 18 são os mais comumente encontrados; todavia, os tipos 26, 31 e 33 já foram detectados (Tsuhaiko et al 1998; Nadji et al., 2007). Na Europa, a maior incidência ocorre na Grécia, 69% e a menor, na Croácia, 3,6% (Papadopolou et al., 1998; Branica et al., 2010). Assim como na Ásia, os tipos mais comuns são 6, 11, 16 e 18. No entanto, também foram detectados os tipos 31, 33, 35 na Áustria e 53 na Itália (Popper et al., 1994; Giuliani et al., 2007). No continente americano, o número de trabalhos neste sentido é bastante reduzido e pode-se dividir em América do Norte e América Latina. Quanto a América do Norte, a maior incidência foi encontrada no Canadá, 40% enquanto que a menor ocorreu nos Estados Unidos, 0.6% (Aaron et al., 2004; Koshiol et al., 2011). Quanto aos tipos

virais, foram detectados HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35 sendo o tipo 16 e 18 o mais incidente (Yousem et al., 1992; Bohlmeier et al., 1998; Flieder et al., 1998;). Na América Latina, até o momento, apenas dois trabalhos foram realizados. O primeiro, realizado com a população do Peru, México e Colômbia apresentando incidência geral de 28%, sendo 64,3% na Colômbia, 7.7 % no México e 0% no Peru. Foram detectados, nos estudos citados anteriormente, os tipos 16, 18 e 33. O segundo trabalho, conduzido no Chile, detectou HPV em 29% dos tumores, não observando o tipo 33, mas os tipos 6, 31 e 45 além dos 16 e 18 (Castilho et al., 2006; Aguayo et al., 2007). Assim como na América Latina, na Oceania existem poucos trabalhos que se propuseram a avaliar a incidência do HPV em tumores de pulmão. Os trabalhos foram realizados com população da Nova Guiné, onde foi observada uma incidência de 8% do HPV 16 e com a população da Austrália, cuja incidência foi de 0% e 40%, detectando os tipos 6, 11, 16 e 18 (Kulski et al., 1990; Plunkett et al., 2003; Aguayo et al., 2010).

O presente estudo detectou DNA de HPV em amostras de tumores de pulmão de pacientes da região metropolitana de Pernambuco. Este é o primeiro trabalho que relata a presença do HPV em células pulmonares no Brasil. Neste estudo, o HPV foi detectado em 52% (33) de 63 amostras de tumores de pulmão. Foram detectados os tipos 16 e 18, com frequências de 81% e 19%, respectivamente. O resultado do presente estudo corrobora com os obtidos por Castillo et al., 2006, em cujo trabalho foi observado uma prevalência maior do HPV 16, seguido do HPV 18. No entanto, Castillo et al., 2006 detectaram também o tipo 33, tipo esse que não foi encontrado no presente estudo. Assim também, HPV 16 foi mais prevalente em tumores de pulmão de pacientes oriundos do Chile seguido do HPV 18 (Aguayo et al., 2007). Os resultados deste trabalho, com

relação ao tipo de HPV mais prevalente, está de acordo com os achados em câncer genital. No Brasil, o HPV 16 é o tipo mais prevalente tanto em homens quanto em mulheres (Giuliano et al., 2008; dos Santos et al., 2013; Bruno et al., 2014; Rodrigues et al., 2014). Especificamente na região nordeste, o HPV 16 tem sido o mais amplamente detectado em pacientes com câncer cervical, seguido dos tipos 18 (Fernandes et al., 2010; Lima et al., 2011). No estado de Pernambuco, Baldez da Silva et al., 2009 observaram que o tipo 16 é o mais prevalente na população, seguido dos tipos 31, 33, 18 seguido do tipo 56. Gurgel et al., 2013 prevalência maior do tipo 16, seguido do tipo 31, no entanto, o tipo 58 foi o terceiro mais prevalente e o 18 foi o sétimo tipo mais prevalente. Contudo, trabalho realizado por Lima et al., 2011, observou que o HPV 18 é o segundo tipo mais prevalente, seguido do 31, 33 e 56.

A ampla variabilidade encontrada nos estudos quanto à prevalência do HPV pode estar relacionada à região geográfica do estudo, ao tipo da amostra, aos números amostrais e a utilização de diferentes técnicas de detecção. Por exemplo, em amostras de tecido fresco congelado o DNA sofre menos degradação do que tecidos parafinados, pois nestes o DNA pode ser fragmentado e sofrer modificações (Dubeau et al., 1986), tais processos dificultam o trabalho com esses tipos de amostras. Para a detecção, muitas técnicas com diferentes especificidades e sensibilidades são usadas. A grande parte dos estudos utiliza PCR, que apresenta maior sensibilidade; no entanto, apresenta dificuldades na obtenção de amplicons em grandes quantidades quando se utiliza tecidos parafinados. Por outro lado, a utilização da técnica de hibridização *in situ* é bastante utilizada, porém apresenta sensibilidade de detecção restrita (Speel et al., 1999).

No presente estudo, HPV foi detectado em 40% (13) casos de carcinoma de células escamosas, 33% (11) casos foram detectados em adenocarcinoma, 9% (3) casos em carcinoma de células grandes e 18% (6) casos em carcinoma de células pequenas. A frequência de casos HPV positivos foi maior em carcinoma de células escamosas (40%) do que nos outros tipos histológicos, 33% em adenocarcinoma, 18% em carcinoma de células pequenas e 9% em carcinoma de células grandes. A presença do HPV em carcinomas de células grandes não é comumente relatada nos estudos, uma vez que tem sido encontrada em poucos estudos (Yousem et al., 1992; Miasko et al., 2001; Zafer et al., 2004; Jain et al., 2005; Nadji et al., 2007; Park et al., 2007). Os resultados do presente trabalho corroboram com aqueles obtidos por Yu et al., 2009 onde a frequência do HPV foi maior em carcinoma de células escamosas (51%) seguidos do adenocarcinoma (16%), embora trabalho anterior tenha revelado uma diminuição na prevalência do HPV em carcinoma de células escamosas de 79% para 24% em cinco anos (Miyagi et al., 2000). Resultados semelhantes, ao presente trabalho, foram obtidos por Aguayo et al., 2007 e Sirjänen, 2002, onde as frequências de carcinomas de células escamosas HPV positivas foram maiores do que as frequências de adenocarcinomas. Contudo, carcinoma de células pequenas foi o segundo tipo histológico mais frequente naqueles trabalhos. Adicionalmente, os achados de Fei et al., 2006, revelaram positividade maior do HPV 16 quanto do HPV 18 em carcinoma de células escamosas do que em adenocarcinomas.

Zhai et al., 2015 observaram prevalência de HPV 16/18 maior em carcinoma de células escamosas (45,18%) do que em adenocarcinoma (22,78%). Yu et al., 2009 encontraram que HPV 16/18 apresentou prevalência de 43,1% em carcinoma de células escamosas. No presente estudo, a prevalência do HPV 16

foi maior em carcinoma de células escamosas (41%), seguida do adenocarcinoma (37%), do carcinoma de células pequenas (18%) e em carcinoma de células grandes com 4%. Quanto à prevalência do HPV 18, foi de 33% em carcinoma escamoso como também em carcinoma de células grandes e 17% tanto em adenocarcinoma quanto carcinoma de células pequenas. Contudo, não se observou uma associação significativa entre os tipos de HPV e os tipos histológicos dos tumores, possivelmente pelo número de amostras analisadas. Resultados divergentes foram encontrados por Cheng et al., 2001 ao detectarem prevalência maior de HPV 16 em adenocarcinoma (43%) do que em carcinoma de células escamosas (24,1%) bem como HPV 18, 49,4% em adenocarcinoma e 29,3% em carcinoma de células escamosas. Os achados de Chiou et al., 2003, assemelham-se aos resultados obtidos por este estudo quanto à maior prevalência de HPV 16 em relação ao HPV18. Contudo, diverge no que diz respeito ao tipo histológico. Chiou et al., 2003 observaram maior prevalência de HPV 16 em adenocarcinoma do que em carcinoma escamoso. Observaram também que pacientes infectados por este tipo apresentaram um risco 6.5 maior de desenvolver câncer. Assim também, os resultados de Hsu et al., 2009, mostraram que HPV 16 foi mais prevalente em adenocarcinoma apresentando risco de 2.32 do que em carcinoma escamoso, bem como HPV 18 apresentando risco de 2.32.

Com a finalidade de avaliar não só a presença do vírus, mas se o mesmo encontra-se em atividade, as amostras de tumores de pulmão parafinadas foram analisadas quanto à presença das oncoproteínas virais E6 e E7 por meio da técnica de imunohistoquímica. Assim, foi possível observar marcação para as proteínas virais E6 e E7 tanto no citoplasma quanto no núcleo das células. Este

resultado sugere que o HPV apresenta atividade nestas células e, possivelmente, ação transformante. O potencial oncogênico do HPV de alto risco depende da expressão dos oncogenes virais E6 e E7. A expressão de E6 e E7 de HPV 16/18 sugere que o HPV possa desempenhar um papel na carcinogênese de pulmão. Expressão de genes virais é considerada o padrão ouro para o estabelecimento de um tumor (Molden et al., 2006).

O presente trabalho detectou DNA de HPV de alto risco em células de pulmão, bem como a presença da proteína oncogênica E6. Outros estudos têm detectado este vírus em cânceres de mama (Wang et al., 2014), colorectal (Lee et al., 2001), pele (Iannacone et al., 2013), dentre outros. Contudo, este vírus, encontra-se muito bem estabelecido e adaptado às células cervicais de seu hospedeiro. Por conseguinte, o que leva este vírus infectar outras regiões, como o pulmão, que distam do seu sítio comum de infecção e que meios são utilizados pelo vírus como rota para atingir tais regiões, são alguns questionamentos que surgem e que precisam ser esclarecidos.

Embora os PV sejam espécie-específico, estudos realizados em cavalos, observaram que a presença do Papilomavírus bovino (BPV) estava associada ao desenvolvimento de sarcóide equíneo (Chambers et al., 2003; Brandt et al., 2008; Silva et al., 2014). Uma das prováveis razões para a infecção de BPV em um hospedeiro não natural seria a presença de variantes nas sequências de nucleotídeos na ORF E5, que codifica para a principal proteína transformante do BPV, em amostras de sarcóide (Chambers et al., 2003). Variações genéticas ocorrem durante o processo de adaptação do PV, as quais se fixam e dão origem a uma variante, processo esse chamado de especiação (Burk et al., 2013). Em HPV, estudos mostraram que a variação no potencial oncogênico, persistência e

progressão da infecção estão relacionadas com as variantes de L1, E6, E7, LCR (Chargas et al., 2011; Gurgel et al., 2013), pois tais alterações genéticas interferem desde a forma como as oncoproteínas interagem com as proteínas celulares, reconhecimento do sistema imunológico como também com a alteração na expressão dos oncogenes virais (Gurgel et al., 2013). Assim como variantes em E5 de BPV foram encontradas em sarcóides equinos, variantes das oncoproteínas de HPV podem estar presentes em cânceres em outros órgãos, além da cérvix, como o pulmão, e estar associadas a infecções nesses sítios. Talvez, a presença de variações gênicas possa conferir ao vírus capacidade de infectar sítios anteriormente incomuns, como reflexo de sua estratégia adaptativa. Estudos de variantes são necessários para uma melhor compreensão da relação do HPV e seu hospedeiro.

Outra explicação provável consiste no fato de que o trato respiratório é composto de cavidade nasal, paranasal, orofaríngea, hipofaríngea, laringe, traquéia e brônquios. Sua mucosa apresenta dois tipos de epitélio: até a faríngea, o epitélio é composto por células colunares enquanto que na laringe e traqueia, há presença de células escamosas. Esta transição histológica (metaplasia) resulta na presença da junção escamo-colunar (SCJ), a qual é similar à junção escamo-colunar da cérvix e, por ser o sítio preferencial de entrada do HPV, pode favorecer o estabelecimento de infecções por este vírus no trato respiratório. A SCJ pode ocorrer de forma natural ou por iatrogenia, sendo a fumaça do cigarro a principal causa iatrogênica. Dentre as alterações causadas pelo cigarro está a redução ou destruição das células colunares ciliadas o que diminui a função de barreira destas células favorecendo a entrada e colonização de patógenos (Kashima et al., 1993; Syrjänen 2002; Schamberger et al., 2015).

Quanto à rota de transmissão do HPV detectado na carcinogênese de pulmão, algumas hipóteses podem ser levantadas. A primeira hipótese é de que o vírus entra através da cavidade oral e se propaga entre as células até atingir o pulmão. Estudos em câncer da cavidade orofaringe tem observado que o comportamento sexual foi um fator de risco significativo para a infecção do HPV e os pacientes que relataram contato oral-anal apresentaram um risco de maior de desenvolver a doença (OR=4,6) (Smith et al., 2004). Atividade sexual oral pode ser uma possível via de acesso de HPV para as células de pulmão.

Por outro lado, uma via possível é a hematogênica. Por muito tempo acreditou-se que o Papilomavírus não poderia ser propagado para outras partes do corpo através do sangue por não apresentar uma fase virêmica durante a infecção. Contudo, diferentes tipos de HPV (6, 11, 16 e 18) já foram detectados em células mononucleares de sangue periférico (Pao et al., 1991; Bodaghi et al., 2005), no plasma (Dong et al., 2002), no soro (Liu et al., 2001), além de ser encontrado no sangue arterial do cordão umbilical (Rombaldi et al., 2008). Além disso, DNA de HPV, de baixo e alto risco, também foi encontrado em células de sangue periférico (células B, células dendríticas, NK e neutrófilos) de homens saudáveis (Chen et al., 2009). Analisando o sangue de doadores para transfusão, Bodagui et al., 2005 detectaram HPV 16 em 15,8% do sangue periférico de doadores saudáveis. Esses dados abrem uma nova perspectiva no tocante à origem da infecção, pois trabalhos anteriores atribuem a presença do HPV no sangue ao câncer cervical (Pao et al., 1997; Ho et al., 2005; Tsai et al., 2005). No entanto, como visto, a presença do vírus no sangue circulante independe da presença de câncer cervical.

O sangue pode ser um reservatório do DNA viral contribuindo para a disseminação do vírus. DNA de HPV tem sido detectado no sangue de pessoas com câncer de pulmão. Chiou et al., 2008, observaram que pacientes com carcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC), apresentaram uma alta prevalência de HPV na corrente sanguínea. Além disso, eles observaram que células do sangue periférico transportavam DNA de HPV em seus núcleos. Estas observações nos leva a acreditar que a via hematogênica pode ser a causa da propagação do vírus no organismo. Assim, estas células podem ser uma fonte de HPV na infecção de outros órgãos, além de contribuir para a propagação viral por uma via não sexual.

7. Conclusões

1. DNA de HPV foi detectado em amostras de tumores de pulmão com frequência de 52%;
2. Foram detectados dois tipos de HPV de alto risco: 16 e 18;
3. A frequência do HPV 16 foi de 81% e HPV 18 foi de 19%;
4. O HPV foi mais frequente em carcinomas de células escamosas (42%);
5. O HPV 16 foi mais prevalente em carcinoma de células escamosas (41%) enquanto o HPV 18 foi mais prevalente em carcinoma de células escamosas e em carcinoma de células grandes (33%);
6. Foi detectada a presença da oncoproteína viral E6 em 85% dos tumores bem como a presença da oncoproteína viral E7 em 75% dos tumores, o que é sugestivo de atividade viral nestes tumores.

8. Referências Bibliográficas

- Aaron S, Wong E, Tyrrell D, Duggan M, Vallieres E, Jewell L, Romanowski B and Doe PJ (2004) Interferon treatment of multiple pulmonary malignancies associated with papilloma virus. *Canadian respiratory journal: Can Respir J* 11(6): 443-446.
- Aguayo F, Anwar M, Koriyama C, Castillo A, Sun Q, Morewaya J, Eizuru Y and Akiba S (2010) Human papillomavirus-16 presence and physical status in lung carcinomas from Asia. *Infect Agent Cancer* 5:20.
- Aguayo F, Castillo A, Koriyama C, Higashi M, Itoh T, Capetillo M, Shuyama K, Corvalan A, Eizuru Y and Akiba S (2007) Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile. *Br J Cancer* 97:85-91.
- Alam S, Bowser BS, Conway MJ, Israr M, Ryndock EJ, Xi LF, Meyers C (2010) Downregulation of Cdc2/CDK1 kinase activity induces the synthesis of noninfectious human papillomavirus type 31b virions in organotypic tissues exposed to benzo[a]pyrene. *J Virol* 84: 4630–4645.
- Amabile JC, Leuraud K, Vacquier B, Alain A and Dominique L (2009) Multifactorial study of the risk of lung cancer among French uranium miners: radon, smoking and silicosis. *Health Phys* 97(6):613-21.
- Baba M, Castillo A, Koriyama C, Yanagi M, Matsumoto H, Natsugoe S, Shuyama KY, Khan N, Higashi M, Itoh T, et al. (2010) Human papillomavirus is frequently detected in gefitinib-responsive lung adenocarcinomas. *Oncol Rep* 23(4): 1085-1092.
- Baldez Da Silva MF, Chagas BS, Guimaraes V, Katz LMC, Felix PM, Miranda PM, Lima AA, Arraes LC, Martins DBG, Lima Filho JL et al. (2009) HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. *Genet Mol Res* 8(4):1437-1443.
- Bavinck JNB, Neale RE, Abeni D, Euvrard S, Green AC, Harwood CA, Koning MNC, Naldi L, Nindl I, Pawlita M, et al. (2010) Multicenter study of the association between betapapillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer research* 70(23): 9777-9786.
- Behrend L, Henderson G, Zwacka RM (2003) Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 31(6):1441-1444.
- Bergant MM, Ozbun MA, Campos SK, Myers MP and Banks L (2012) Human Papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. *Traffic* 13(3):455–67.
- Bergvall M, Melendy T, Archambault J (2013) The E1 proteins. *Virology Special Issue: The Papillomavirus Episteme* 445 (1–2):35–56.
- Bernard HU (2013) Regulatory elements in the viral genome. *Virology* 445(1): 197-204.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H and De Villers EM (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401(1):70–79.
- Bhattacharjee B and Sengupta S (2006) CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology* 354(2): 280-285.

- Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C, Steinberg SM and Zheng ZM (2005) Could human papillomaviruses be spread through blood? *J Clin Microbiol* 43(11):5428-5434.
- Bodily J and Laimins LA (2011) Persistence of human papillomavirus infection: key to malignant progression. *Trends Microbiol* 19(1): 33-39.
- Bohlmeier T, Le TN, Shroyer L, Markham N and Shtoyer KR (1998) Detection of Human Papillomavirus in Squamous Cell Carcinomas of the lung by Polymerase Chain Reaction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:265-269.
- Boyer SN, Wazer DE and Band V (1996) E7 protein of human papillomavirus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56:4620-4624.
- Brambilla E, Adrien Negoescu, Sylvie Gazzeri, Sylvie Lantuejoul, Denis Moro, Christian Brambilla, and Jean-Luc Coll (1996) Apoptosis-Related Factors p53, Bcl2, and Bax in Neuroendocrine Lung Tumors. *Am J Pathol* 149(6):1941-1952.
- Brandt S, Haralambus R, Schoster A, Kirnbauer R, and Stanek, C (2008) Peripheral blood mononuclear cells represent a reservoir of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected equines. *J Gen Virol* 89(6):1390-1395.
- Branica BV, Smojer-Jezek S, Juros Z, Grgic S, Srpak N, Mitrecic D and Gajovic S (2010) 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* 34(1):159-62.
- Bravo IG and Félez-Sánchez M (2015) Papillomaviruses: viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol Med Public Health* 2015(1):32-51.
- Bravo IG, de Sanjosé S and Gottschling, M. (2010). The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends Microbiol*, 18(10), 432-438.
- Brouchet L, Valmary S, Dahan M, Didier A, Galateau-Salle F, Brousset P and Degano B (2005) Detection of oncogenic virus genomes and gene products in lung carcinoma. *Br J Cancer* 92(4):743-746.
- Bruno A, Serravalle K, Travassos AG and Lima BGDC (2014) Genotype distribution of human papillomavirus in women from the state of Bahia, Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 36(9):416-422.
- Buonomo T, Laura Carraresi, Mara Rossini, Rosanna Martinelli (2011) Involvement of aryl hydrocarbon receptor signaling in the development of small cell lung cancer induced by HPV E6/E7 oncoproteins. *J transl med* 9(2):1-11.
- Burd EM (2003) Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev* 16(1): 1-17.
- Burk RD, Harari A, Chen Z (2013) Human papillomavirus genome variants. *Virology* 445(1): 232–243.
- Cao F, Han H, Zhang F, Wang B, Ma W, Wang Y, Sun G, Shi M, Ren Y and Cheng Y (2014) HPV infection in esophageal squamous cell carcinoma and its relationship to the prognosis of patients in northern China. *The Scientific World Journal* 2014.
- Carpagnano GE, Koutelou A, natalicchio MI, Martinelli D, Ruggieri C, Di Taranto A, Antonetti R, Carpagnano F and Foschino-Barbaro MP (2011) HPV in exhaled breath condensate of lung cancer patients. *Br J Cancer* 105:1183-1190.
- Castillo A, Aguayo F, Koriyama C, Shuyama K, Akiba S, Herrera-Goepfert R, Carrascal E, Klinge G, Sánchez J and Eizuru Y (2006) Human papillomavirus

- in lung carcinomas among three Latin American countries. *Oncol rep* 15(4):883-888.
- Castillo A, Aguayo F, Koriyama C, Shuyama K, Akiba S, Herrera-Goepfert, Carrascal E, Klinge G, Sánchez J and Eizuru Y (2006) Human papillomavirus in lung carcinomas among tree Latin American countries. *Oncol Rep* 15:883-888.
- Chambers G, Ellsmore VA, O'Brien PM, Reid SWJ, Love S, Campo MS and Nasir L (2003) Sequence variants of bovine papillomavirus E5 detected in equine sarcoids. *Virus Res* 96(1):141-145.
- Chao CH, Chun-Ming Chen, Pei-Lin Cheng, Jing-Wen Shih, Ann-Ping Tsou, and Yan-Hwa Wu Lee (2006) DDX3, a DEAD Box RNA Helicase with Tumor Growth-Suppressive Property and Transcriptional Regulation Activity of the p21waf1/cip1 Promoter, Is a Candidate Tumor Suppressor. *Cancer Res* 66(13):6579-6588.
- Chen ACH, Keleher A, Kedda MA, Spurdle AB, McMillan NA and Antonsson A (2009) Human papillomavirus DNA detected in peripheral blood samples from healthy Australian male blood donors. *J Med Virol* 81(10):1792-1796.
- Chen ZM, Peto R, Iona A, Guo Y, Chen YP, Bian Z, Yang L, Zhang WY, Lu F, Chen JS et al. (2015) Emerging tobacco-related cancer risks in China: A nationwide, prospective study of 0.5 million adults. *Cancer* 121(S17): 3097-3106.
- Cheng YW, Ming-Fang Wu, John Wang, Kun-Tu Yeh, Yih-Gang Goan, Hui-Ling Chiou, Chih-Yi Chen, Huei Lee (2007) Human Papillomavirus 16/18 E6 Oncoprotein Is Expressed in Lung Cancer and Related with p53 Inactivation. *Cancer Res* 67:10686-10693.
- Cheng YW, Chiou HL, Sheu GT, Hsieh LL, Chen JT, Chen CY, Su JM and Lee H (2001) The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res* 61(7):2799-2803.
- Cheng YW, Huei Lee, Ming-Yuh Shiau, Tzu-Chin Wu, Tsung-Teng Huang, and Yih-Hsin Chang (2008). Human Papillomavirus Type 16/18 Up-Regulates the Expression of Interleukin-6 and Antiapoptotic Mcl-1 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 14(15):4705-4712
- Cheng YW, Tzu-Chin Wu, Chih-Yi Chen, Ming-Chih Chou, Jiunn-Liang Ko, Huei Lee (2008) Human Telomerase Reverse Transcriptase Activated by E6 Oncoprotein Is Required for Human Papillomavirus-16/18-Infected Lung Tumorigenesis. *Clin Cancer Res* 14(22):7175-7179.
- Chiou HL, Wu MF, Liaw YC, Cheng YW, Wong RH, Chen CY and Lee H (2003) The presence of Human Papillomavirus Type 16/18 DNA in Blood Circulation May Act as a Risk Marker of Lung Cancer in Taiwan. *Cancer* 97(6):1558-1563.
- Ciotti M, Giuliani L, Ambrogi V, Ronci C, Benedetto A, Mineo TC, Syrjänen K and Favali C (2006). Detection and expression of human papillomavirus oncogenes in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 16:183-189.
- Coissard CJ, Besson G, Polet MC, Monteau M, Birembaut PL and Clavel CE (2005) Prevalence of human papillomaviruses in lung carcinomas: a study of 218 cases. *Mod Pathol* 18:1606-1609.
- Corneanu LM, Stanculescu D and Corneanu C (2011) HPV and cervical squamous intraepithelial lesions: clinicopathological study. *Rom J Morphol Embryol* 52(1):89-94.
- Couraud S, Zalcman G, Milleron B, Morin F and Souquet PJ (2012) Lung cancer in never smokers—a review. *Eur J Cancer* 48(9):1299-1311.

- Cubie HA (2013) Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology Special Issue: The Papillomavirus Episteme* 445(1-2): 21–34.
- Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G and Christensen ND (2006) Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol* 80(18):8940–50.
- Da Silva MB, Chagas BS, Guimaraes V, Katz LMC, Felix PM, Miranda PM, Lima AA, Arraes LC, Martins DBG, Lima Filho JL et al. (2009) HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. *Genet Mol Res* 8(4):1437-1443.
- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, and Snijders PJ (1995) The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 76(4):1057-1062.
- De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.
- Dimaio D and Petti LM (2013) The E5 proteins. *Virology Special Issue: The Papillomavirus Episteme* 445(1-2): 99–114.
- Dong SM, Pai SI, Rha SH, Hildesheim A, Kurman RJ, Schwartz PE, Mortel R, McGowan L, Greenberg MD, Barnes WA et al. (2002) Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11(1): 3-6.
- Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32:7-15.
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5:F55–70.
- Doorbar J (2013) The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* 445(1):80-98.
- Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C and Murakami I (2015) Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol* 25(S1): 2-23.
- Dos Santos JC, Cezar MRDS, Lisboa MR and Moura MMDF (2013) Occurrence of human papillomavirus in uterine cervix of women in the western Brazilian Amazon. *Acta Amazon* 43(2): 185-190.
- Dubeau L, Chandler LA, Gralow JR, Nichols PW and Jones PA (1986) Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res* 46(6):2964-2969.
- Dyson N, Guida P, Munger K and Harlow E (1992) Homologous sequences in adenovirus E1 A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *Virol J.* 66(12):6893-6902.
- Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K and McMillan NA (1997) Identification of the alpha 6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 71(3):2449–56.
- Favre M, Breitburd F, Croissant O and Orth G (1977) Chromatin-Like Structures Obtained After Alkaline Disruption of Bovine and Human Papillomaviruses. *Virol J* 21(3):1205-1209.
- Fei Y, Yang J, Hsieh WC, Wu JY, Wu TC, Goan YG, Lee H and Cheng YW (2006) Different human papillomavirus 16/18 infection in Chinese non-small cell lung cancer patients living in Wuhan, China. *Jpn J Clin Oncol* 36(5):274-279.

- Fernandes JV, Meissner RV, Carvalho MG, Fernandes TA, Azevedo PR, Sobrinho JS, Prado JCM and Villa LL (2010) Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil. *BMC research notes* 3(1):96.
- Finzer P, Kuntzen C, Soto U, zur Hausen H and Rösl F (2001) Inhibitors of histone deacetylase arrest cell cycle and induce apoptosis in cervical carcinoma cells circumventing human papillomavirus oncogene expression. *Oncogene* 20(35):4768-4776.
- Flieder DB, Koss MN, Nicholson A, Sesterhenn IA, Petras RE and Travis WD (1998) Solitary pulmonary papillomas in adults: a clinicopathologic and in situ hybridization study of 14 cases combined with 27 cases in the literature. *Am J Surg Pathol* 22(11):1328-1342.
- Forslund O, Johansson H, Madsen K G and Kofoed K (2013) The nasal mucosa contains a large spectrum of human papillomavirus types from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *J Infect Dis* 208(8):1335-1341.
- Freije JMP, Milagros Balbín, Alberto M. Pendás, Luis M. Sánchez, Xose S. Puente and Carlos López-Otín (2003) Matrix Metalloproteinases and Tumor Progression. *Adv Med Biol* 532:91-107.
- Frolov MV and Dyson NJ (2004) Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci* 117(11):2173-2181.
- Fuller-Pace FV (2013) DEAD box RNA helicase functions in cancer. *RNA biology* 10(1):121-132.
- Gao P and Zheng J (2010) High-risk HPV E5-induced cell fusion: a critical initiating event in the early stage of HPV-associated cervical cancer. *Virology* 7(1):238-240.
- Ge NL, Elferink CJ (1998) A Direct Interaction between the Aryl Hydrocarbon Receptor and Retinoblastoma Protein. *J Biol Chem* 273(35):22708-22713.
- Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE and Sapp M (2001) Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75(3):1565–70.
- Giuliani L, Jaxmar T, Casadio C, Gariglio M, Manna A, D'Antonio D, Syrjanen K, Favalli C and Ciotti M (2007) Detection of oncogenic viruses (SV40, BKV, JCV, HCMV, HPV) and p53 codon 72 polymorphism in lung carcinoma. *Lung Cancer* 57(3):273-281.
- Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee JH, Papenfuss MR, Abrahamse M, Jolles E, Nielson CM, Baggio ML et al. (2008) The human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(8):2036-2043.
- Goodwin EC, Yang E, Lee CJ, Lee HW, DiMaio D and Hwang ES (2000) Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97:10978–10983.
- Goto A, Li CP, Ota S, Niki T, Ohtsuki Y, Kitajima S, Yonezawa S, Koriyama C, Akiba S, Uchima H, Lin YM, Yeh KT, Koh JS, Kim CW, Kwon KY, Nga ME, Fukayama M (2011) Human papillomavirus infection in lung and esophageal cancers: Analysis of 485 Asian cases. *J Med Virol* 83(8):1383-1390.
- Hensing T, Chawla A, Batra R and Salgia R (2014) A personalized treatment for lung cancer: molecular pathways, targeted therapies, and genomic

- characterization. In *Systems Analysis of Human Multigene Disorders*. Springer New York, pp 85-117.
- Herbest LH, Lenz J, Van Doorslaer K, Chen Z, Stacy BA, Wellehan JFX, Manire CA and Burk RD (2009) Genomic characterization of two novel reptilian papillomaviruses, *Chelonia mydas* papillomavirus 1 and *Caretta caretta* papillomavirus 1. *Virology* 383(1):131-135.
- Hirayasu T, Iwamasa T, Kamada Y, Koyanagi Y, Usuda H and Genka K (1996) Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the lung. *J Clin Pathol* 49(10) 810-817.
- Hiroshima K, Toyozaki T, Iyoda A, Ohwada H, Kado S, Shirasawa H and Fujisawa T (1999) Ultrastructural study of intranuclear inclusion bodies of pulmonary adenocarcinoma. *Ultrastructural pathology* 23(6):383-389.
- Ho CM, Yang SS, Chien TY, Huang SH, Jeng CJ and Chang SF (2005) Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 99(3):615-621.
- Hollen PJ, Gralla RJ, Kris MG, Cox C, Belani CP, Grunberg SM, Crawford J, Neidhart JA (1995) Measurement of Quality of life in Patients with Lung Cancer in Multicenter Trials of New Therapies. *Cancer* 73(8):2087-2098.
- Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO and Bogers JP (2010) Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology* 7(11):11.
- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W and Edwards BK (2011) SEER cancer statistics review, 1975–2008. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2011.
- Hsu NY, Cheng YW, Chan IP, Ho HC, Chen CY, Hsu CP, Lin MH, Chou MC (2009) Association between expression of human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein and survival in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 21(1):81-87.
- Huang HK, Claudio A. P. Joazeiro, Emanuela Bonfoco, Shinji Kamada, Joel D. Levenson, and Tony Hunter (2000). The Inhibitor of Apoptosis, cIAP2, Functions as a Ubiquitin-Protein Ligase and Promotes in Vitro Monoubiquitination of Caspases 3 and 7. *J Biol Chem* 275(35):26661-26664.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1993) Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Bio* 13(2):775-784.
- Iannaccone MR, Gheit T, Waterboer T, Giuliano AR, Messina JL, Fenske NA, Cherpelis BS, Sondak VK, Roetzheim RG, Ferrer-Gil S et al. (2013) Case-control study of cutaneous human papillomavirus infection in basal cell carcinoma of the skin. *J Invest Dermatol* 133(6):1512-1520.
- Inca (2014) Incidência de câncer no Brasil <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>. Acesso em : 15 de outubro de 2015.
- Ito A, Lai CH, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E and Yao TP (2001) P300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J* 20(6):1331-1340.
- Jain N, Singh V, Hedau S, Kumar S, Daga MK, Dewan R, Murthy NS, Husain SA and Das BC (2005) Infection of Human Papillomavirus Type 18 and p53 Codon 72 Polymorphism in Lung Cancer Patients From India. *Chest* 128(6): 3999-4007

- James MA, Lee JH and Klingelutz AJ (2006) HPV16-E6 associated hTERT promoter acetylation is E6AP dependent, increased in later passage cells and enhanced by loss of p300. *Int J Cancer* 119(8):1878-1885.
- Jeon S, Allen-Hoffman BL and Lambert PF (1995) Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* (69):2989-2997.
- Joh J, Jenson AB, Moore GD, Rezazadeh A, Slone SP, Ghim SJ and Kloecker GH (2010) Human papillomavirus (HPV) and Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in non small cell lung cancer. *Exp Mol Pathol* 89(3):222-226.
- Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT and Day PM (2009) Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol* 83(5):2067-74.
- Kashima H, Mounts P, Leventhal B and Hruban RH (1993) Sites of predilection in recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102:580-583.
- Kato T, Koriyama C, Kahan N, Samukawa T, Yanagi M, Hamada T, Yokomakura N, Otsuka T, Inoue H, Sato M, Natsugoe S and Akiba S (2012) EGFR mutations and human papillomavirus in lung cancer. *Lung Cancer* 78: 144-147.
- Kawaguchi T, Takada M, Kubo A, Matsumura A, Fukai S, Tamura A, Saito R, Maruyama Y, Kawahara M, Ignatus O et al. (2010) Performance status and smoking status are independent favorable prognostic factors for survival in non-small cell lung cancer: a comprehensive analysis of 26,957 patients with NSCLC. *J Thorac Oncol* 5(5):620-630.
- Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT and Day PM (2009) The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(48): 20458-63.
- Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Shindoh M, Fujino M, Akie K, Kato M, Fujinaga K and Kawakami Y (1995) Human papillomavirus type 18 DNA and E6-E7 mRNA are detected in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Br J Cancer* 71(2):344.
- Klein F, Kotb WFA, and Petersen I (2009) Incidence of human papilloma virus in lung cancer. *Lung Cancer*, 65(1), 13-18.
- Kometani T, Yoshino I, Miura N, Okazaki H, Ohba T, et al. (2009) Benzo[a]pyrene promotes proliferation of human lung cancer cells by accelerating the epidermal growth factor receptor signaling pathway. *Cancer Lett* 278: 27-33.
- Kometani T, Yoshino I, Miura N, Okazaki H, Ohba T, Takenaka T, Shoji F, Yano T and Maehara Y (2009) Benzo [a] pyrene promotes proliferation of human lung cancer cells by accelerating the epidermal growth factor receptor signaling pathway. *Cancer lett* 278(1):27-33.
- Koshiol J, Rotunno M, Gillison ML, Van Doorn L J, Chaturvedi AK, Tarantini L, Song H, Quint WGV, Struijk L, Goldstein AM et al. (2011) Assessment of human papillomavirus in lung tumor tissue. *J Natl Cancer Inst* 103(6):501-507.
- Koutsodontis G, Ioannis Tentes, Paraskevi Papakosta, Aristidis Moustakas and Dimitris Kardassis (2001) Sp1 Plays a Critical Role in the Transcriptional Activation of the Human Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21WAF1/Cip1 Gene by the p53 Tumor Suppressor Protein. *J Biol Chem* 276(31): 29116-29125.
- Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W and Reed JC (1993) Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence

- in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer research* 53(19):4701-4714.
- Kraus I, Driesch C, Vinokurova S, Hovig E, Schneider A, von Knebel Doeberitz M and Dürst M (2008) The majority of viral-cellular fusion transcripts in cervical carcinomas cotranscribe cellular sequences of known or predicted genes. *Cancer Res* 68(7):2514-2522.
- Kulski JK, Demeter T, Mutavdzic S, Sterrett GF, Mitchell KM, Pixley EC (1990). Survey of histologic specimens of human cancer for human papillomavirus types 6/11/16/18 by filter in situ hybridization. *Am J Clin Pathol* 94(5):566-570.
- Kyo S, Takakura M, Fujiwara T et al (2008) Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Science* 99:1528-1538.
- Lai MC, Wen-Cheng Chang, Sheau-Yann Shieh, and Woan-Yuh Tarn (2010) DDX3 Regulates Cell Growth through Translational Control of Cyclin E1. *Molecular and cellular biology* 30(22): 5444-5453.
- Lazarczyk M, Cassonnet P, Pons C, Jacob Y and Favre M (2009) The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiol Mol Biol Rev* 73(2):348-370.
- Lee YM, Leu SY, Chiang H, Fung CP and Liu WT (2001) Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer. *J Microbiol Immunol Infect = Wei mian yu gan ran za zhi* 34(2):87-91.
- Lehoux M, Fradet-Turcotte A and Archambault J (2015) Methods to Assess the Nucleocytoplasmic Shuttling of the HPV E1 Helicase and Its Effects on Cellular Proliferation and Induction of a DNA Damage Response. In *Cervical Cancer* Springer New York. pp 67-80.
- Li G, Li He, Erying Zhang, Jingli Shi, Qunzhou Zhang, Anh D. Le, Keyuan Zhou and Xudong Tang (2011) Overexpression of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins promotes angiogenesis via enhancing HIF-1a and VEGF expression in non-small cell lung cancer cells. *Cancer lett* 311:160-170.
- Li L, Barry P, Yeh E, Glaser C, Schnurr D and Delwart E (2009) Identification of a novel human gammapapillomavirus species. *J Gen Virol* 90(10):2413-2417.
- Li Q, Hu K, Pan X, Cao Z, Yang J and Hu S (1995) Detection of human papillomavirus types 16, 18 DNA related sequences in bronchogenic carcinoma by polymerase chain reaction. *Chin Med J (Engl)* 108(8):610-614.
- Li YJ, Tsai YC, Chen YC and Christiani DC (2009) Human papilloma virus and female lung adenocarcinoma. In *Seminars in oncology* WB Saunders 36:542-552.
- Lim WT, Chuah KL, Leong SS, Tan EH and Toh CK (2009) Assessment of human papillomavirus and Epstein-Barr virus in lung adenocarcinoma. *Oncol Rep* 21(4):971-975.
- Lima Júnior SFD, Fernandes MCM, Heráclio SDA, Souza PRED and Maia MDMD (2011) Prevalence of human papillomavirus genotypes: Comparison between three detection methods in patients of pernambuco, Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 33(10):315-320.
- Liu HR, Xing LQ and Si JY (1994) [A study of human papillary virus infection by in situ hybridization and histopathology in squamous cell carcinoma of the lung]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 23(5):299-301.

- Liu VW, Tsang P, Yip A, Ng TY, Wong LC and Ngan HY (2001) Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 82(2):269-272.
- Liu X, Yuan H, Fu B, Disbrow GL, Apolinario T, Tomaić V, Kelley ML, Baker CC, Huibregtse J and Schlegel R (2005) The E6AP ubiquitin ligase is required for transactivation of the hTERT promoter by the human papillomavirus E6 oncoprotein. *J Biol Chem* 280(11):10807-10816.
- Madsen BS, Jensen HL, van den Brule AJ, Wohlfahrt J and Frisch M (2008) Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina—Population-based case–control study in Denmark. *Int J Cancer* 122(12):2827-2834.
- Manos M M, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR and Wolinsky SM (1989) Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer cells* 7(17):209-14.
- Mantovani F and Banks L (2001) The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20(54):7874-7887.
- Matakidou A, Eisen T, Houlston RS (2005) Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer* 93:825-33.
- Mcbride AA (2013) The Papillomavirus E2 proteins. *Virology Special Issue: The Papillomavirus Episteme* 445(1–2):57–79.
- Mehra R, Egleston B, Yang D, Scott W, Borghaei H and Ragin C (2013) A pilot study of the association and prevalence of the human papillomavirus (HPV) in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cancer Res* 73(8 Supplement):4785-4785.
- Miasko A, Niklińska W, Nikliński J, Chyczewska E, Naumnik W and Chyczewski L (2000) Detection of human papillomavirus in non-small cell lung carcinoma by polymerase chain reaction. *Folia histochemica et cytobiologica/Polish Academy of Sciences, Folia Histochem Cytobiol* 39(2):127-128.
- Miyagi J, Tsuchiko K, Kinjo T, Iwamasa T and Hirayasu T (2000) Recent striking changes in histological differentiation and rate of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the lung in Okinawa, a subtropical island in southern Japan. *J Clin Pathol* 53(9): 676-684.
- Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H and Hagmar B (2006) Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age. *Gynecol Oncol* 100(1):95-100.
- Müller M, Prescott EL, Wasson CW and Macdonald A (2015) Human papillomavirus E5 oncoprotein: function and potential target for antiviral therapeutics. *Future Virol* 10(1):27-39.
- Muñoz JP, González C, Parra B, Corvalán AH, Tornesello ML, Eizuru Y and Aguayo F (2012) Functional interaction between human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins and cigarette smoke components in lung epithelial cells. *PloS one* 7(5):e38178.
- Muñoz JP, González C, Parra B, Corvalán AH, Tornesello ML, Eizuru Y and Aguayo F (2012) Functional interaction between human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins and cigarette smoke components in lung epithelial cells. *PloS one* 7(5):e38178.
- Nadji SA, Azad TM, Mahmoodi M, Yahyapour Y, Naghshvar F, Torabizadeh J, Ziaee AA, Nategh R (2007) *Cancer Letters* 248:41-46.
- Nuorva K, Soini Y, Kamel D, Pöllänen R, Bloigu R, Vähäkangas K and Pääkkö P (1995) p53 protein accumulation and the presence of human papillomavirus

- dna in bronchiolo-alveolar carcinoma correlate with poor prognosis. *Int J Cancer* 64(6):424-429.
- O'Connor M, Bernard H-U (1995) Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. *Virology*. V. 207, n.1, p. 77-88.
- Ogura H, Watanabe S, Fukushima K, Masuda Y, Fujiwara T and Yabe Y (1993) Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinomas of the respiratory and upper digestive tracts. *Jpn J Clin Oncol* 23(4):221-225.
- Oh JM, Kim SH, Cho EA, Song YS, Kim WH and Juhnn YS (2010) Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis* 31(3):402-410.
- Pao CC, Hor JJ, Yang FP, Lin CY and Tseng CJ (1997) Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis. *J Clin Oncol* 15(3):1008-1012.
- Pao CC, Lin SS, Lin CY, Maa JS, Lai CH and Hsieh TT (1991) Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Pathol* 95(4):540-546.
- Papadopoulou K, Labropoulou V, Davaris P, Mavromara P and Tsimara-Papastamatiou H (1998) Detection of human papillomaviruses in squamous cell carcinomas of the lung. *Virchows Arch* 433(1):49-54.
- Park MS, Chang YS, Shin JH, Kim DJ, Chung KY, Shin DH, Moon JW, Kang SM, Hahn CH, Kim YS, Chang J et al. (2007) The prevalence of human papillomavirus infection in Korean non-small cell lung cancer patients. *Yonsei Med J* 48(1):69-77.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74-108.
- Peña N, Carrillo D, Muñoz JP, Chnaiderman J, Urzúa U, León O, Tornesello ML, Corvalán AH, Soto-Rifo R and Aguayo F (2015) Tobacco Smoke Activates Human Papillomavirus 16 p97 Promoter and Cooperates with High-Risk E6/E7 for Oxidative DNA Damage in Lung Cells. *PloS one* 10(4):e0123029.
- Plunkett M, Brestovac B, Thompson J, Sterrett G, Filion P, Smith D and Frost F (2003) The value of HPV DNA typing in the distinction between adenocarcinoma of endocervical and endometrial origin. *Pathol* 35(5):397-401.
- Pol SBV and Klingelutz AJ (2013) Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virol* 445(1):115-137.
- Popper HH, El-Shabrawi Y, Wöckel W, Höfler G, Kenner L, Jüttner-Smolle F M and Pongratz MG (1994) Prognostic importance of human papilloma virus typing in squamous cell papilloma of the bronchus: comparison of in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Hum Pathol* 25(11):1191-1197.
- Ragin C, Obikoya-Malomo M, Kim S, Chen Z, Flores-Obando R, Gibbs D, Koriyama C, Aguayo F, Koshiol J, Caporaso NE et al. (2014) HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis. *Carcinogenesis* bgu038.
- Raj K, Berguerand S, Southern S, Doorbar J and Beard P (2004) E1 $\wedge$ E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *J of Virol* 78(13):7199-7207.
- Rector A, Lemey P, Tachezy R, Mostmans S, Ghim SJ, Van Doorslaer K, Roelke M, Bush M, Montali RJ, Joslin J, Burk RD et al. (2007) Ancient papillomavirus-host co-speciation in Felidae. *Genome Biol* 8:R57.

- Rector A and Van Ranst M (2013) Animal papillomaviruses. *Virol* 445(1):213-223.
- Regan JA and Laimins LA (2008) Bap31 is a novel target of the human papillomavirus E5 protein. *Journal of virology* 82(20):10042-10051.
- Rivera MP and Mehta AC (2007) Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *CHEST Journal* 132(3_suppl):131S-148S.
- Rodrigues DA, Pereira ÉR, Oliveira LSDS, Speck NMDG and Gimeno SGA (2014) Prevalência de atipias citológicas e infecção pelo papilomavírus humano de alto risco em mulheres indígenas Panará, povo indígena do Brasil Central. *Cad. Saúde Pública* 30(12):2587-2593.
- Roman A and Munger K (2013) The papillomavirus E7 proteins. *Virol* 445(1):138-168.
- Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E and Losquiavo KP (2008) Transplacental transmission of human papillomavirus. *Virol J* 5:106.
- Rubel L and Reynolds RE (1979) Cytologic description of squamous cell papilloma of the respiratory tract. *Acta Cytol* 23(3):227-231.
- Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WG and Pirog EC (2001) Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol* 159(4):1211-1218.
- Samet JM. Health benefits of smoking cessation (1991) *Clinics in Chest Medicine* 12:669-79.
- Sapp M, Volpers C, Müller M and Streeck RE (1995) Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Virol* 76(9):2407-2412.
- Sarchianaki E, Derdas SP, Ntaoukakis M, Vakonaki E, Lagoudaki ED, Lasithiotaki I, Sarchianaki A, Koutsopoulos A, Symvoulakis EK, Spandidos DA, Antoniou KM and Sourvinos G (2014) Detection and genotype analysis of human papillomavirus in non-small cell lung cancer patients. *Tumor Biology* 35(4):3203-3209.
- Schamberger AC, Staab-Weijnitz CA, Mise-Racek N and Eickelberg O (2015) Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. *Scientific reports*, 5.
- Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K (2005) Human papilomavírus infection:biology, epidemiology and prevention. *Int J Gynecol Cancer* 15:727-746.
- Schmitz M, Driesch C, Jansen L, Runnebaum IB and Durst M (2012) Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. *PloS one* 7(6):e39632.
- Shen-Gunther Jane and Yu X (2011) HPV Molecular assays: Defining analytical and clinical performance characteristics for cervical cytology specimens. *Gynecol Oncol* 123(2): 263-271.
- Sherr CJ and McCormick F (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell* 2(2):103-112.
- Shiau MY, Li-Ching Fan., Shun-Chun Yang³, Chang-Hui Tsao, Huei Lee, Ya-Wen Cheng, Li-Chuan Lai and Yih-Hsin Chang (2013) Human Papillomavirus Up-Regulates MMP-2 and MMP-9 Expression and Activity by Inducing Interleukin-8 in Lung Adenocarcinomas. *Plos one* 8(1):e54423.
- Shih CM, Yao-Ling Lee, Hui-Ling Chiou, Wei-Fang Hsua, Wei-Erh Chen, Ming-Chih Chou and Long-Yau Lin (2005) The involvement of genetic polymorphism of IL-10 promoter in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 50:291-297.

- Silva MAR, Silva KMG, Jesus ALS, Barros LO, Corteggio A, Altamura G, Borzacchiello G and Freitas AC (2014) The presence and gene expression of Bovine papillomavirus in the peripheral blood and semen of healthy horses. *Transbound Emerg Dis* 61(4):329-333.
- Silverman DT, Samanic CM, Lubin JH, Blair AE, Stewart PA, Vermeulen R, Coble JB, Rothman N, Schleiff PL, Travis WD et al. (2012) The Diesel Exhaust in Miners Study: A Nested Case–Control Study of Lung Cancer and Diesel Exhaust. *J Natl Cancer Inst* 104:1-14.
- Sirjänen K (2012) Detection of human Papillomavirus in lung cancer: Systematic Review and Meta-analysis. *Anticancer Research* 32:3235:3250.
- Smith B, Chen Z, Reimers L, Van Doorslaer K, Schiffman M, DeSalle R, Herrero R, Yu K, Wacholder S, Wang T and Burk RD (2011) Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *Plos one* 6(6):e21375.
- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH and Turek LP (2004) Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 108: 766 – 772.
- Speel EJ, Hopman AH and Komminoth P (1999) Amplification methods to increase the sensitivity of in situ hybridization: play card (s). *J Histochem Cytochem* 47(3):281-288.
- Srinivasan M, Taioli E and Ragin CC (2009) Human papillomavirus type 16 and 18 in primary lung cancers—a meta-analysis. *Carcinogenesis* 30:1722-1728.
- Sung WW, Lee W (2013) The role of interleukin-10 in the progression of human papillomavirus-associated lung carcinoma. *Oncol Immunology* 2(9): e25854.
- Sung WW, Yao-Chen Wang, Po-Lin Lin, Ya-Wen Cheng, Chih-Yi Chen, Tzu-Chin Wu, and Huei Lee (2013) IL-10 Promotes Tumor Aggressiveness via Upregulation of CIP2A Transcription in Lung Adenocarcinoma. *Human Cancer Biology*. 19(15): 4092-4103.
- Syrjänen K, Syrjänen S, Kellokoski J, Kärjä J and Mäntyjärvi R (1989) Human papillomavirus (HPV) type 6 and 16 DNA sequences in bronchial squamous cell carcinomas demonstrated by in situ DNA hybridization. *Lung* 167(1):33-42.
- Syrjänen KJ (1979) condylomatous changes in neoplastic bronchial epithelium. *Respiration* 38:299-304.
- Syrjänen KJ (1980) Epithelial lesions suggestive of a condylomatous origin found closely associated with invasive bronchial squamous cell carcinomas. *Respiration* 40(3):150-160.
- Syrjänen KJ (2002) HPV infections and lung cancer. *J Clin Pathol* 55(12):885-891.
- Syrjänen KJ, Pyrhönen S, Syrjänen SM and Lamberg MA (1983) Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg* 21(2):147-153.
- Thomas M (1995) HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene* 10(2):261-268.
- Thu KL, Vucic EA, Chari R, Zhang W, Lockwood WW, English JC, Fu R, Wang P, Feng Z, MacAulay CE et al. (2012) Lung adenocarcinoma of never smokers and smokers harbor differential regions of genetic alteration and exhibit different levels of genomic instability. *PloS one* 7(3):e33003.
- Torok S, Hegedus B, Laszlo V, Hoda MA, Ghanim B, Berger W, Klepetko W, Dome B and Ostoros G (2011) Lung cancer in never smokers. *Future Oncol* 7(10):1195-1211.

- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 65(2):87-108.
- Tsai HJ, Peng YW, Lin LY, Chou MC, Lee H and Chiou HL (2005) An association between human papillomavirus 16/18 deoxyribonucleic acid in peripheral blood with p16 protein expression in neoplastic cervical lesions. *Cancer Detect Prev* 29(6):537-543.
- Tsai TC and Chen SL (2003) The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol* 148(8):1445-1453.
- Tsuhako K, Nakazato I, Hirayasu T, Sunakawa H and Iwamasa T (1998) Human papillomavirus DNA in adenosquamous carcinoma of the lung. *J Clin Pathol* 51(10):741-749.
- Tung MC, Heng-Hsiung Wu, Ya-Wen Cheng, Lee Wang, Chih-Yi Chen, Sauh-Der Yeh, Tzu-Chin Wu, and Huei Lee (2013) Association of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations With Human Papillomavirus 16=18 E6 Oncoprotein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer* 119(18):3367-3376.
- Turek LP, Smith EM (1996) The genetic program of genital human papillomaviruses in infection and cancer. *Obstet Gynecol Clin* 23(4):735-758.
- Van Doorslaer K (2013) Evolution of the Papillomaviridae. *Virology Special Issue: The Papillomavirus Episteme* 445(1–2):11–20.
- Vande PSB and Klingelhutz AJ (2013) Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology, Special Issue: The Papillomavirus Episteme* 445(1–2):115–137.
- Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, Kisseljov F, Dürst M, Schneider A, Doeberitz MVK (2008) Type-Dependent integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions. *Cancer Res* 68(2):307-313.
- Wang T, Zeng X, Li W, Zhu H, Wang G, Liu X, Lv Y, Wu J, Zhuang X, Zhang J et al. (2014) Detection and analysis of human papillomavirus (HPV) DNA in breast cancer patients by an effective method of HPV capture. *PloS one* 9(3).
- Wang Y, Wang A, Jiang R, Pan H, Huang B, Lu Y and Wu C (2008) Human papillomavirus type 16 and 18 infection is associated with lung cancer patients from the central part of China. *Oncol Rep* 20(2):333-339.
- Whitlock Jr JP (1999) Induction of cytochrome P4501A1. *Ann Rev Phar macol Toxicol* 39: 103–125.
- WHO (2012) Lung Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=lung. Acesso em 15 de Outubro de 2015.
- Wilson EB and Brooks DG (2011) The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 350:39-65.
- Wilson VG, West M, Woytek K and Rangasamy D (2002) Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus genes* 24(3):275-290.
- Winder DM, Pett MR, Foster N, Shivji MKK, Herdman MT, Stanley MA, Venkitaraman AR and Coleman N (2007) An increase in DNA double-strand breaks, induced by Ku70 depletion, is associated with human papillomavirus 16 episome loss and de novo viral integration events. *Journal Pathol* 213(1):27-34.
- Wu DW, Wen-Shan Liu, John Wang, Chih-Yi Chen, Ya-Wen Cheng, and Huei Lee (2011) Reduced p21WAF1/CIP1 via Alteration of p53-DDX3 Pathway Is Associated with Poor Relapse-Free Survival in Early-Stage Human Papillomavirus–Associated Lung Cancer. *Clinical Cancer Res* 17:1895-1905.

- Wu EW, Clemens KE, Heck DV and Münger K (1993) The human papillomavirus E7 oncoprotein and the cellular transcription factor E2F bind to separate sites on the retinoblastoma tumor suppressor protein. *J Virol* 67(4):2402-2407.
- Xu B, Chotewutmontri S, Wolf S, Klos U, Schmitz M, Dürst M, and Schwarz E (2013) Multiplex identification of human papillomavirus 16 DNA integration sites in cervical carcinomas. *PLoS One* 8(6):e66693.
- Xu Y, Cheng B, Pan H, Wu A, Zhang L (2009) The Relationship between the Status of Human Papillomavirus 16/18 Infection and the Expression of Bcl-2 and Bax in Squamous Cell Carcinomas of the Lung. *Chinese journal of the lung* 12(8):849-852.
- Xue X, Zhihua Y, Yao Lu, Haibo Zhang, Ying Yan, Yuxia Zhao, Xuelian Li, Zeshi Cui, Miao Yu, Lu Yao, Baosen Zhou (2013) The Joint Effect of hOGG1, APE1, and ADPRT Polymorphisms and Cooking Oil Fumes on the Risk of Lung Adenocarcinoma in Chinese Non-Smoking Females. *Plos one* 8(8):e71157.
- Yanagawa N, Wang A, Kohler D, da Cunha Santos G, Sykes J, Xu J, Pintilie M and Tsao MS (2013) Human papilloma virus genome is rare in North American non-small cell lung carcinoma patients. *Lung Cancer* 79(3):215-220.
- Yang P (2011) Lung cancer in never smokers. *Semin Respir Crit Care Med* 32(1):10.
- Yang Y, Dong D, Peng L, Ling J, Xiao Y and Zhuang H (1998) [A study on the relationship between HPV infection and the oncogenesis of primary squamous carcinoma of the lung]. *Zhongguo fei ai za zhi= Chinese J lung cancer* 1(1):35-36.
- Yano T, Miura N, Takenaka T, Haro A, Okazaki H, Ohba T, Kouso H, Kometani T, Shoji F and Maehara Y (2008) Never-smoking nonsmall cell lung cancer as a separate entity: clinicopathologic feature and survival. *Cancer* 113:1012-8.
- Yohena T, Yoshino, Ichiro; Takenaka, Tomoyoshi; Kameyama, Toshifumi; Ohba, Taro; Kuniyoshi, Yukio M; Maehara, Yoshihiko (2009) Upregulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 α mRNA and its Clinical Significance in Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 4(3):284-290.
- Yousem SA, Paul ON and Sonmez-Alpan E (1992) Occurrence of human papillomavirus DNA in primary lung neoplasms. *Cancer* 69(3):693-697.
- Yu Y, Yang A, Hu S and Yan H (2009) Correlation of HPV-16/18 infection of human papillomavirus with lung squamous cell carcinomas in Western China. *Oncol Rep* 21(6):1627-1632.
- Yu YH, Liao CC, Hsu WH, Chen HJ, Liao WC, Muo CH, Sung FC and Chen CY (2011) Increased lung cancer risk among patients with pulmonary tuberculosis: a population cohort study. *J Thorac Oncol* 6(1):32-37.
- Yuan A, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KT and Yang PC (2000) Correlation of total VEGF mRNA and protein expression with histologic type, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 89(6):475-48.
- Zafer E, Ergun MA, Alver G, Sahin FI, Yavuzer S and Ekmekci, A (2004) Detection and typing of human papillomavirus in non-small cell lung cancer. *Respiration* 71(1):88-90.
- Zhai K, Ding J and Shi HZ (2015) HPV and lung cancer risk: A meta-analysis. *J Clin Virol* 63:84-90.
- Zhang E, Feng X, Liu F, Zhang P, Liang J and Tang X (2014) Roles of PI3K/Akt and c-Jun signaling pathways in human papillomavirus type 16 oncoprotein-

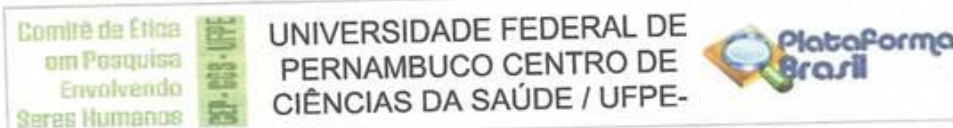
- induced HIF-1 α , VEGF, and IL-8 expression and in vitro angiogenesis in non-small cell lung cancer cells. *Plos one* 9(7):e103440.
- Zheng ZM and Baker CC (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 11:2286.
- Zimmermann H, Koh CH, Degenkolbe R, O'Connnor MJ, Müller A, Steger G, Chen JJ, Lui Y, Androphy E and Bernard HU (2000) Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *Journal of General Virology* 81:2617-2623.
- Zur Hausen H (2000) Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92(9):690-698.
- Zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews. Cancer* 2(5):342–350.
- Zur Hausen H (2009) Papillomaviruses in the causation of human cancers-a brief historical account. *Virology* 384:260-265.

9. Anexos

9.1 Anexo 1

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-									
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP										
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA										
Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO PAPILOMAVÍRUS E POLIMORFISMOS EM PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO										
Pesquisador: CAROLINA MARIA MEDEIROS DO AMARAL										
Área Temática:										
Versão: 3										
CAAE: 06396812.0.0000.5208										
Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS										
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio										
DADOS DO PARECER										
Número do Parecer: 968.840										
Data da Relatoria: 29/01/2015										
Apresentação do Projeto:										
Trata-se e emenda ao projeto de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPE em parceria com o Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) cujo objetivo é incluir o Hospital AC Camargo Cancer Center (São Paulo) visando aumentar o número de amostras de DNA e RNA de tumores frescos e a inclusão dos pesquisadores Antonio Hugo Jose Froes Marques Campos, Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osório e Jefferson Luiz Gross, todos do A C Camargo.										
O presente estudo de corte transversal retrospectivo, tem por objetivo avaliar a presença do papilomavírus humano em tecido pulmonar de pacientes com câncer de pulmão através da detecção e tipificação viral, análise da integração do DNA e expressão dos oncogenes virais, além da análise de polimorfismos gênicos.										
O material biológico será obtido do Biobanco do Hospital AC Camargo, que possui procedimentos operacionais padrão para coleta, armazenamento, solicitação, processamento e distribuição de material biológico humano (amostras de tecido congelado e/ou sangue) aprovado dentro de seu protocolo de desenvolvimento (Registro CONEP B-001).										
<table><tr><td>Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS</td><td></td></tr><tr><td>Bairro: Cidade Universitária</td><td>CEP: 50.740-600</td></tr><tr><td>UF: PE</td><td>Município: RECIFE</td></tr><tr><td>Telefone: (81)2126-8588</td><td>E-mail: cepccs@ufpe.br</td></tr></table>			Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS		Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-600	UF: PE	Município: RECIFE	Telefone: (81)2126-8588	E-mail: cepccs@ufpe.br
Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS										
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-600									
UF: PE	Município: RECIFE									
Telefone: (81)2126-8588	E-mail: cepccs@ufpe.br									

Página 01 de 03



Continuação do Parecer: 968.840

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

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

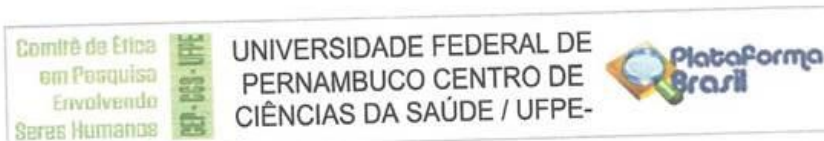
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conteúdo avaliado anteriormente pelo CEP tendo sido considerado adequado.

Recomendações:

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

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



Continuação do Parecer: 968.840

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda aprovada.

RECIFE, 02 de Março de 2015

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
 (Coordenador)

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

9.2 Anexo 2



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convido o (a) Sr.(a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa (*"Identificação da presença do Papilomavírus humano e polimorfismos em pacientes com câncer de pulmão"*), que está sob a responsabilidade da pesquisadora (Carolina Maria Medeiros do Amaral, Rua Maria Jaboatão, 70 – Apt 704 – Várzea, Recife – CEP 50740-360) fone 86581242/ carolinamed3@gmail.com.br. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Paulo Gomes da Silva – 82483450; Antonio Carlos de Freitas – 96067671; Maria Tereza Cartaxo Muniz – 99056802; Jacinto da Costa Silva Neto 97269509.

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

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

Serão coletadas informações (através de questionário) sobre seus hábitos de vida, fatores que podem facilitar a infecção pelo vírus e que podem causar o aparecimento do câncer de pulmão. Além disso, serão coletados 5.0ml de seu sangue e caso você necessite fazer cirurgia (por ordem do seu médico) para retirada de tumor, você será incluído (a) no grupo de casos e será coletada uma amostra do tumor para análise. Caso você não necessite de cirurgia por não ter nenhum tipo de tumor no pulmão, será coletado apenas 5.0 ml de seu sangue e você será incluído no grupo controle.

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

Como benefício direto em participar deste estudo, será possível auxiliar o seu médico no diagnóstico preventivo do câncer de pulmão, quando identificado a presença e o tipo de vírus nas amostras estudadas. Como benefício indireto, será possível

identificar outros fatores que causam o câncer de pulmão além do uso de cigarros; desenvolvimento de medidas que diminuam o risco e que tratem este tipo de câncer.

Sua participação nesta pesquisa terá validade de 5 anos. Você tem a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento sem nenhum custo ou dano. Todos os dados referentes a presente pesquisa serão armazenados no laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, com acesso restrito aos pesquisadores, durante o período de vigência do projeto (cinco anos). Os dados e amostras obtidos serão utilizados exclusivamente para a realização deste projeto e estarão sob a responsabilidade da pesquisadora principal, Carolina Maria Medeiros do Amaral.

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

Carolina M. Medeiros do Amaral

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

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

Local e data _____

Nome e Assinatura do participante ou responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

9.2 Anexo 3



L E M E T E

Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental



Ficha Nº _____

Nº Prontuário HUOC _____

Data ____/____/____

Pesquisa (Pacientes)

I) Informações Pessoais:

Nome: _____ Idade: _____

Município: _____ Estado: _____

Zona ☐ Rural ☐ Urbana

Parceiro sexual: ☐ Sim ☐ Não
☐ Fixo ☐ Varia

Raça / Cor: ☐ Branca ☐ Negra ☐ Parda ☐ Amarela

II) Fatores Interferentes:

Idade da 1ª relação sexual: _____ Número de gestações: _____

Idade da 1ª gestação: _____ Número de parceiros: _____

Uso atual de medicações ☐ Sim ☐ Não

Qual? _____

Tempo? _____

DST? ☐ Sim ☐ Não

Quais? ☐ HIV/AIDS ☐ Hepatite B ☐ Sífilis ☐ HPV

☐ Outros: _____

Número de partos: _____

Vaginal ☐ Cesáreas ☐

Esta exposto a algum tipo de radiação?

Sim ☐ Não ☐

Qual? _____

Profissão? _____

Há quanto tempo? _____

Sofre exposição a algum tipo de metal pesado ou arsênio?

Há quanto tempo? _____

Uso de anticoncepcional hormonal? ☐ Sim ☐ Não

Qual? _____

Método contraceptivo atual: _____

Fuma? ☐ Sim ☐ Não ☐ Ex-fumante

Há quanto tempo? _____ Quantos cigarros/dia? _____

Bebidas alcoólicas ☐ Nunca ☐ Sim

☐ Não agora, mas já consumiu

Convive com algum fumante? _____

Quanto tempo por dia? _____

Convive com algum fumante? _____

Quanto tempo por dia? _____

Tem ou já teve asma? _____

Há quanto tempo? _____

Inala óleo de cozinha ou óleo combustível com frequência?

III) Tipo histológico do tumor: _____

VI) Histórico de Câncer Familiar

☐ Sim ☐ Não

Em caso de positivo – Tipo: _____

Grau de parentesco: _____

10. Curriculum vitae (Lattes)

Carolina Maria Medeiros do Amaral

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Carolina Maria Medeiros do Amaral
Nascimento 28/03/1979 - João Pessoa/PB - Brasil
CPF 007.587.824-03

Formação acadêmica/titulação

2012 - 2015 Doutorado em Genética.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: Avaliação da presença do Papilomavírus humano em tumores de pulmão, Ano de obtenção: 2015
 Orientador: Antonio Carlos de Freitas
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

2010 - 2012 Mestrado em Genética.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: POLIMORFISMOS T309G MDM2 E C590T WAF-1 E A SUSCEPTIBILIDADE ÀS LESÕES E CÂNCER CERVICAIS, Ano de obtenção: 2012
 Orientador: Antonio Carlos de Freitas
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

1998 - 2005 Graduação em Ciências Biológicas.
 Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Joao Pessoa, Brasil

Formação complementar

2013 - 2013 Curso de curta duração em Introdução à Imunoistoquímica. (Carga horária: 8h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2013 - 2013 Curso de curta duração em GE Day / Microarray.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em PCR em Tempo Real. (Carga horária: 32h).
 Life Technologies , LIFE TEC, Sao Paulo, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Biotecnologia de Plantas e Sua Importância Para Me. (Carga horária: 4h).
 Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, UERN, Mossoro, Brasil

2006 - 2006 Extensão universitária em I Curso Prático de Pcr Hands On. (Carga horária: 40h).
 Universidade Estadual do Ceará, UECE, Fortaleza, Brasil

2006 - 2006 Extensão universitária em Introdução a Biotecnologia. (Carga horária: 40h).

Universidade Federal de Viçosa, UFV, Vicoso, Brasil

- 2005 - 2005** Extensão universitária em Bioinformática Área de Potencial Para Formação de. (Carga horária: 20h).
Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Joao Pessoa, Brasil
- 2004 - 2004** Extensão universitária em Biologia dos Extremófilos. (Carga horária: 10h).
Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Joao Pessoa, Brasil

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **AMARAL, CAROLINA MM**; CETKOVSKÁ, KATERINA; GURGEL, ANA PAD; CARDOSO, MARCUS V; CHAGAS, BÁRBARA S; JUNIOR, SÉRGIO DE; DE LIMA, RITA DE; NETO, JACINTO CS; SILVA, LUIZ AF; MUNIZ, MARIA TC; BALBINO, VALDIR Q; FREITAS, ANTONIO C MDM2 polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human papillomavirus and using of oral contraceptives. Infectious Agents and Cancer. , v.9, p.24 2014.
2. FREITAS, AC; Gurgel, A. P. A. D.; CHAGAS, B.S.; Coimbra, E. C.; AMARAL, C.M.M.; Susceptibility to cervical cancer: An overview. Gynecologic Oncology (Print). , v.126, p.1209 - 1214, 2012.
3. GURGEL, ANA PAVLA ALMEIDA DINIZ; CHAGAS, BÁRBARA SIMAS; **DO AMARAL, CAROLINA MEDEIROS**; NASCIMENTO, KAMYLLA CONCEIÇÃO GOMES; LEAL, LÍGIA ROSA SALES; SILVA NETO, JACINTO DA COSTA; CARTAXO MUNIZ, MARIA TEREZA; DE FREITAS, ANTONIO CARLOS
Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV16, HPV31, and HPV58 Found in North-East Brazil. BIOMED RES INT. , v.2015, p.1 - 12, 2015.
4. CHAGAS, BÁRBARA SIMAS; GURGEL, ANA PAVLA ALMEIDA DINIZ; DA CRUZ, HEIDI LACERDA ALVES; **AMARAL, CAROLINA MARIA MEDEIROS**; CARDOSO, MARCUS VINICIUS; NETO, JACINTO DA COSTA SILVA; SILVA, LUIZ ANTÔNIO FERREIRA DA; ALBUQUERQUE, EUGÊNIA MARIA BEZERRA DE; MUNIZ, MARIA TEREZA CARTAXO; FREITAS, ANTONIO CARLOS DE
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 (Print). , v.19, p.32 - 37, 2013.
5. CHAGAS, BÁRBARA SIMAS; BATISTA, MARCUS VINICIUS DE ARAGÃO; CROVELLA, SERGIO; GURGEL, ANA PAVLA ALMEIDA DINIZ; SILVA NETO, JACINTO DA COSTA; SERRA, IVI GONÇALVES SOARES SANTOS; **AMARAL, CAROLINA MARIA MEDEIROS**; BALBINO, VALDIR QUEIROZ; MUNIZ, MARIA TEREZA CARTAXO; FREITAS, ANTONIO CARLOS
Novel E6 and E7 oncogenes variants of human papillomavirus type 31 in Brazilian women with abnormal cervical cytology. Infection, Genetics and Evolution (Print). , v.16, p.13 - 18, 2013.
6. GURGEL, ANA PAVLA ALMEIDA DINIZ; CHAGAS, BÁRBARA SIMAS; **AMARAL, CAROLINA MARIA MEDEIROS DO**; ALBUQUERQUE, EUGÊNIA MARIA BEZERRA; SERRA, IVI GONÇALVES SOARES SANTOS; SILVA NETO, JACINTO DA COSTA; MUNIZ, MARIA TEREZA CARTAXO; FREITAS, ANTONIO CARLOS DE
Prevalence and Genetic Variability in Capsid L1 Gene of Rare Human Papillomaviruses (HPV) Found in Cervical Lesions of Women from North-East Brazil. BioMed Research International. , v.2013, p.1 - 7, 2013.
7. Baldez da Silva, MFPTB; GUIMARÃES, V.; SILVA, M. A. R.; AMARAL, C.M.M.; BEÇAK, W.;

STOCOO, R.C.; FREITAS, AC; CROVELLA, S.;

Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 33 and sites of cervical lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. *Genetics and Molecular Research*. , v.11, p.462 - 466, 2012.

8. ARAUJO-NETO, ARI P.; FERREIRA-FERNANDES, HYGOR; **AMARAL, CAROLINA M.M.**; SANTOS, LINA G.; FREITAS, ANTÔNIO C.; SILVA-NETO, JACINTO C.; REY, JUAN A.; BURBANO, ROMMEL R.; SILVA, BENEDITO B. DA; YOSHIOKA, FRANCE K.N.; PINTO, GIOVANNY R.

Lack of detection of human papillomavirus DNA in prostate carcinomas in patients from northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology (online version)*. , v.39, p.24 - 29, 2016.

Livros publicados

1. DE FREITAS, ANTONIO CARLOS; GURGEL, ANA PAVLA ALMEIDA DINIZ; CHAGAS, BÁRBARA SIMAS; **do Amaral, Carolina Maria Medeiros**; Coimbra, Eliane Campos; de Lima, Élyda Gonçalves; da Costa Silva Neto, Jacinto; da Conceição Gomes Leitão, Maria; de Cássia Pereira de Lima, Rita

Infection and Cancer: Bi-Directorial Interactions, 2015

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. AMARAL, C.M.M.; Gurgel, A. P. A. D.; ALBUQUERQUE, E. M. B.; FREITAS, AC
No association of the MDM2 SNP309 polymorphism with risk of CERVICAL LESIONS IN WOMEN INFECTED WITH PAPILLOMAVIRUS In: Encontro Nacional de Virologia, 2011, Atibaia.

Virus Reviews & Research. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Virologia, 2011. v.16.

2. MONTEIRO, V.L.C.; CARVALHO, C.C.R.; SILVA, M.A.R.; CHAGAS, B.S.; AMARAL, C.M.M.; FREITAS, AC

ABSENCE OF BOVINE ENZOOTIC HAEMATURIA IN CATTLE INFECTED WITH BOVINE PAPILLOMAVIRUS TYPE 2 BUT DO NOT EAT BRACKEN FERN In: XX ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 2009, Brasília.

Virus reviews & Research. RIO DE JANEIRO: IMPRINTA EXPRESS LTDA, 2009. v.14. p.257 - 258

3. SILVA, J.G.; AMARAL, C.M.M.; Jesus, A. L.S.; FREITAS, AC
CONSTRUÇÃO DE VETOR PARA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DO CAPSÍDEO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 PARA FINS VACINAIS In: I Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica, 2009, Recife, PE. 2009.

4. AMARAL, C.M.M.; SILVA, J.G.; LIRA, R.C.; LIRA, R.C.; Jesus, A. L.S.; FREITAS, AC
Construção de vetor para produção da proteína E5 de BPV2 em sistema heterólogo de expressão. In: I Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica, 2009, Recife, PE. 2009.

5. AMARAL, C.M.M.; SILVA, J.G.; LIRA, R.C.; LIRA, R.C.; Jesus, A. L.S.; FREITAS, AC
CONSTRUCTION OF AN EXPRESSSION VECTOR FOR THE PRODUCTION OF BPV2 PROTEIN IN *Escherichia coli*. In: XX ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 2009, Brasília.

Virus reviews & Research. RIO DE JANEIRO: IMPRINTA EXPRESS LTDA, 2009. v.14. p.197 - 197

6. AMARAL, C.M.M.; OLIVEIRA, Roseane da Silva; RIBEIRO, Isadora Louise Alves da Costa; ZÁRATE, Rómulo Marino Llamoca

Variabilidade genética entre seis cultivares de algodão colorido (*Gossypium SPP.*) através de RAPD. In: XXIX Reunião Nordestina de Botânica, 2006, Mossoró - RN. 2006.

7. COUTINHO, Vinícius R H Maracajá; COSTA, Deivid Almeida da; RIBEIRO, Isadora L A C;

AMARAL, C.M.M.; ARAÚJO, Demétrius A M; ZÁRATE, Rómulo M Llamoca
 Degenerate Primer Design Strategy Targeting the NHX1 Antiporter Gene from Twenty Plant Species In: X-meeting::2005 [1st International Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology], 2005, Minas Gerais. 2005.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. Gurgel, A. P. A. D.; CHAGAS, B. S.; Nascimento, KCG; **AMARAL, C.M.M.**; MUNIZ, M. T. C.; FREITAS, A. C.
 VARIABILIDADE GENÉTICA DO GENE L1 DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO TIPO 16 ENCONTRADO EM LESÕES CERVICAIS DE MULHERES DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL In: Jornada de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2014, Recife.
Jornada de Pós-graduação em Inovação Terapêutica. , 2014.

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Mestrado

1. **AMARAL, C.M.M.**
 Participação em banca de Dafne Carolina Alves Quixabeira. **Estudo dos Polimorfismos Genético da Metaloproteinase de Matriz 2 envolvidos na carcinogênese cervical**, 2016
 (Patologia) Universidade Federal de Pernambuco

Curso de aperfeiçoamento/especialização

1. **AMARAL, C.M.M.**
 Participação em banca de Maria Eduarda Rocha de França. **O comportamento preventivo das mulheres do bairro de Casa Caiada – Olinda/PE contra o câncer de colo de útero**. 2015
 (Curso de Especialização em Citologia Clínica) Universidade Federal de Pernambuco
2. **AMARAL, C.M.M.**
 Participação em banca de Thiara Cristina Cavalcanti Souza de Brito. **Uso da vacina contra HPV na prevenção do câncer de colo uterino: revisão de literatura**, 2015
 (Curso de Especialização em Citologia Clínica) Universidade Federal de Pernambuco

Graduação

1. **AMARAL, C.M.M.**
 Participação em banca de Monaliza Magalhães de Melo Freire. **Avaliação citológica do fluido mamilar por sucção no rastreamento precoce de lesões mamárias**, 2015
 (Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco